



1803

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUIMICA FARMACEUTICA

FORMULACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE PARA
FRUTAS CÍTRICAS, ESTUDIO DE SU IMPACTO MEDIANTE
APROXIMACIÓN METABOLÓMICA Y EVALUACIÓN DE LA
CALIDAD POSCOSECHA

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Rafael M. Alvarez Quintero

Tutor:
Dr. Edison Javier Osorio Durango

Comité Tutorial:
Dr. Gabriel Jaime Arango Acosta
Dra. Catarina Passaro Carvalho

Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias: Bioorgánica
Medellín-Colombia

2012

*Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas,
Estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.*

A mis amados padres

Eladio y Judith, a mis hermanos

y

a mi propia familia

Katalina M. y Juan Alejandro A.

AGRADECIMIENTOS

Al ministerio de agricultura y desarrollo rural de la Republica de Colombia (MADR) que hizo posible este trabajo gracias a la financiación concedida durante el periodo 2008-2011.

Muy especialmente a los doctores Gabriel Jaime Arango Acosta y Edison Javier Osorio Durango por haberme abierto las puertas del laboratorio y su interés en dirigir esta investigación, además, agradezco su calidez y su valiosa amistad.

Agradezco de todo corazón a mis compañeras de trabajo: Johana Ospina y Catalina Agudelo, por su invaluable ayuda, su dedicación incondicional y sobre todo, por todas las tardes de trabajo y las sonrisas que compartimos.

Gracias CATARINA Passaro y JULIAN Londoño, este título lo comparto con ustedes y con todos aquellos que de alguna manera colaboraron y me apoyaron en la culminación de este proyecto.....Gracias!

RESUMEN

Existen tecnologías para extender la vida útil en fresco de productos hortofrutícolas en poscosecha, para preservar del ataque de organismos patógenos y conservar la calidad general. Se destaca el uso de recubrimientos comestibles, los cuales forman una barrera en la superficie del fruto que permite modular el intercambio de gases y vapor de agua. La característica funcional más importante de una película comestible es la resistencia contra la migración de la humedad, por ello se deben conservar los niveles críticos de actividad de agua para asegurar la calidad e integridad metabólica, controlar la maduración y senescencia. Sin embargo, se debe asegurar una cierta permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono para evitar un estatus anaeróbico. Actualmente los recubrimientos comestibles se elaboran a partir de variedades de polisacáridos, proteínas, ceras naturales y resinas, entre otros, con denominación GRAS. Los retos técnicos involucrados en la elaboración de recubrimientos comestibles con propiedades funcionales incluyen la selección del tipo y concentración de los materiales usados en la formulación, las técnicas de preparación, durabilidad, adherencia, entre otras. Por lo tanto se requiere de estudios básicos para diseñar las propiedades funcionales de películas comestibles para aplicaciones en vegetales específicos.

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo un recubrimiento comestible compuesto por dos productos naturales obtenidos de residuos agroindustriales como ingredientes principales: Pectina cítrica como agente estructural y Aceite esencial de cítricos como agente antifúngico, ambos, integrados en una formulación hidrocoloidal compuesta, se determinaron sus propiedades funcionales mediante la aplicación in vivo del recubrimiento en una línea de tratamiento industrial, se evaluaron variables relacionadas con la calidad externa e interna de los frutos, se evaluó la actividad antifúngica y se estableció una plataforma analítica metabolómica para la identificación de marcadores de cambio mediante metodología metabolite profiling utilizando un sistema GC/qEIMS. Durante la etapa de desarrollo de la formulación se optimizó la retención de sustancias volátiles en la matriz de la película de recubrimiento, las sustancias retenidas mostraron una potente actividad fungistática frente *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, entre ellas se destacaron principalmente los componentes aromáticos: Carvacrol, Timol y p-Cimeno, los cuales aportaron una

sinergia considerable a la bioactividad del componente mayor (Limoneno 74-93%). La plataforma analítica permitió establecer diferentes librerías automatizadas para más de 400 metabolitos, entre ellos, se destacaron alrededor de 180 moléculas target que aportaron información de los cambios en la química de la maduración, senescencia y del impacto de materiales de recubrimiento: metabolitos terpénicos (volátiles monoterpénicos y sesquiterpénicos), carbohidratos, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos (cinámicos, fenólicos) y otros.

Finalmente se obtuvo un prototipo de formulación, el cual se comparó con ceras comerciales en cuanto a su capacidad para preservar la vida útil y conservar la calidad de naranja valencia en condiciones simuladas de comercialización, frigoconservación y cuarentena de exportación. El prototipo sobresalió en algunos parámetros de calidad y mostro un mejor desempeño en condiciones de comercialización directa por 2 semanas (25°C), e incluso fue útil para la frigoconservación durante 4 semanas (7°C). Respecto al control de patógenos la formulación presento protección en condiciones de comercialización directa, ninguna formulación presento efectividad en condiciones de frigoconservación.

SUMMARY

Technologies exist to extend the life of fresh fruit and vegetables in post harvest, to preserve the attack of pathogenic organisms and maintain overall quality. It emphasizes the use of edible coatings, which form a barrier on the surface of the fruit to modulate the exchange of gases and water vapor. The most important functional characteristic of an edible film is the resistance to moisture migration, therefore we must keep the critical levels of water activity to ensure the quality and integrity metabolic control ripening and senescence. However, it should ensure a certain permeability to oxygen and carbon dioxide to prevent anaerobic status. Currently edible coatings are made from varieties of polysaccharides, proteins, natural waxes and resins, among others, with GRAS designation. The technical challenges involved in the development of edible coatings with functional properties include selecting the type and concentration of the materials used in the formulation, preparation techniques, durability, and adhesion, among others. Therefore basic studies are needed to design the functional properties of edible films for applications in specific plant.

The aim of this study was to develop an edible coating composed of two natural products derived from agro-industrial wastes as ingredients: Citrus Pectin as a structural agent and citrus essential oil as an antifungal agent, both integrated into a composite hydrocolloidal formulation. Their functional properties were identified in vivo by applying the coating on industrial processing line, we evaluated variables related to external and internal quality of fruit, antifungal activity was evaluated and established a metabolomics analytical platform for the identification of markers of change through metabolite profiling method using a GC/qEIMS. During the development stage of the formulation was optimized the retention of volatile substances in the coating film matrix, retained substances showed potent fungistatic activity against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*, including mainly highlighted the aromatic components: Carvacrol, Thymol and p-Cymene, which provided a considerable synergy to the bioactivity of the major component (74-93% limonene). The analytical platform allowed us to establish different automated libraries for more than 400 metabolites, including about 180 highlighted target molecules that provided information on changes in the chemistry of maturation, senescence and the impact of coating materials: terpene

metabolites (volatile monoterpenes and sesquiterpenes), carbohydrates, lipids, amino acids, organic acids (cinnamic, phenolic) and others.

Finally, we obtained a prototype design, which was compared with commercial waxes in their ability to preserve life and maintain the quality of Valencia oranges in simulated conditions of merchantability, cold storage and export quarantine. The prototype excelled in some quality parameters and showed a better performance in terms of direct marketing for 2 weeks (25 ° C), and was even useful for cold storage for 4 weeks (7°C). The proposed formulation proved to be useful in terms of direct marketing. No formulation has effectiveness in cold storage conditions.

<i>Indice de contenidos</i>	<i>Pagina</i>
1. INTRODUCCION GENERAL	1
1.1 Producción citrícola.....	2
1.2 Producción de zumos y generación de residuos agroindustriales.....	2
1.3 Tecnologías de exprimido: Zumex y FMC.....	3
1.4 Aprovechamiento de residuos agroindustriales.....	5
1.5 Problemática de los cítricos en poscosecha.....	7
1.5.1 Respiración.....	8
1.5.2 Transpiración.....	9
1.5.3 Alteraciones fisiológicas.....	10
1.5.4 Alteraciones patológicas.....	11
1.6 Tecnologías poscosecha en la industria citrícola.....	12
1.6.1 Conservación por refrigeración (Frigoconservación).....	13
1.6.2 Tratamientos químicos.....	15
1.6.3 Pretratamientos térmicos.....	15
1.6.4 Almacenamiento en atmosferas modificadas (AM) y controladas (AC).....	16
1.6.5 Irradiación.....	17
1.6.6 Aplicación de recubrimientos: recubrimientos tipo Cera (RTC) y recubrimientos Comestibles (RC).....	18
1.6.6.1 Recubrimientos tipo cera.....	19
1.6.6.2 Recubrimientos comestibles.....	20
1.7 Consideraciones y aproximación analítica para el estudio del metabolismo vegetal.....	23
1.7.1 Cociente respiratorio.....	25
1.7.2 Compuestos volátiles.....	26
1.7.3 Ácidos grasos.....	28
1.7.4 Metabolitos polares no volátiles: sólidos solubles totales (SST).....	29
1.8 Técnicas instrumentales de soporte experimental.....	32
1.8.1 Cromatografía de gases/Espectrometría de Masas (GC/MS).....	32
1.8.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución/Arreglo de Diodos (HPLC/DAD).....	34
1.8.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	35
1.9 Referencias Bibliográficas.....	37
2. OBJETIVOS	45
3. PRODUCCIÓN DE ZUMOS Y GENERACIÓN DE RESIDUOS EN LA AGROINDUSTRIA CITRÍCOLA: OBTENCIÓN DE MATERIALES GRAS PARA RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	47
3.1 Introducción.....	47
3.1.1 Pectina.....	48
3.1.2 Aceites esenciales.....	50
3.1.2.1 Origen biosintético de Monoterpenos.....	51
3.1.2.2 Origen biosintético de Sesquiterpenos.....	57

3.2 Materiales y métodos.....	61
3.2.1 Materiales de partida.....	61
3.2.1.1 Extracción de Pectina de residuos agroindustriales.....	61
3.2.1.2 Hidrodestilación de AE de residuos agroindustriales.....	64
3.2.2 Picnometría de AE.....	65
3.2.3 Análisis de zumos y aceites esenciales mediante cromatografía de gases.....	66
3.2.3.1 Instrumentación.....	66
3.2.3.2 Implementación de un método para el análisis de volátiles mediante HS/SPME para zumos.....	67
3.2.3.3 Análisis de aceites esenciales mediante inyección líquida.....	69
3.2.3.4 Identificación mediante espectrometría de masas y Análisis Multivariado (PCA) de componentes volátiles.....	69
3.3 Resultados y discusión.....	70
3.3.1 Extracción de pectina.....	70
3.3.2 Hidrodestilación de aceites esenciales.....	71
3.3.3 Composición química de aceites esenciales hidrodestilados.....	73
3.3.4 Composición química de la fracción volátil de zumos de n. Valencia y m. Clementina mediante HS/SPME/GC/MS.....	77
3.4 Referencias Bibliográficas.....	82
4. ANALISIS METABOLOMICO EN DOS INDICES DE MADURACION Y CINCO PROCEDENCIAS DE CULTIVO.....	84
4.1 Introducción.....	84
4.1.1 Relación metabolismo-Ambiente.....	84
4.1.2 Estrés vegetal.....	85
4.1.3 Metabolómica (Aproximación mediante metabolite profiling).....	86
4.1.3.1 Metabolomics/Metabolómica.....	87
4.1.3.2 Metabolite profiling/perfilamiento metabólico.....	88
4.1.3.3 Metabolic fingerprinting/Identificación dactilar del metabolismo.....	88
4.1.3.4 Metabolite target analysis/Análisis de metabolitos Target.....	88
4.1.3.5 Metabonomics/Metabonómica.....	88
4.1.4 Aplicación de la metabolómica en el estudio del metabolismo de cítricos.....	89
4.2 Materiales y métodos.....	90
4.2.1 Caracterización de las muestras.....	90
4.2.2 Contenido de Hesperidina mediante HPLC/DAD.....	92
4.2.2.1 Instrumentación.....	92
4.2.2.2 Preparación de muestras.....	92
4.2.3 Metabolite profiling mediante GC/MSD.....	93
4.2.3.1 Extracción.....	93
4.2.3.2 Derivatización.....	93
4.2.3.3 Separación.....	94
4.2.3.4 Ionización.....	95
4.2.3.5 Detección de iones clave Ionización.....	95

4.2.3.6 Evaluación de los datos (Data Analysis).....	95
4.3 Resultados y discusión.....	96
4.3.1 Caracterización de las muestras.....	96
4.3.2 Contenido de Hesperidina mediante HPLC/DAD.....	98
4.3.3 Metabolite profiling mediante GC/MSD.....	99
4.3.3.1 Perfiles de metabolitos volátiles mediante HS/SPME.....	99
4.3.3.2 Perfiles de ácidos grasos. FAMES.....	99
4.3.3.3 Perfiles de metabolitos polares-TMS.....	99
4.3 Referencias Bibliográficas.....	121
5. FORMULACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE HIDROCOLOIDAL ANTIFÚNGICO	
5.1 Introducción.....	123
5.1.1 Materiales de los recubrimientos comestibles.....	124
5.1.1.1 Polisacáridos.....	124
5.1.1.2 Pectina.....	125
5.1.1.3 Goma tragacanto.....	127
5.1.1.4 Lípidos.....	127
5.1.1.4.1 Aceites.....	129
5.1.1.4.2 Ceras.....	129
5.1.2 Agentes antimicrobianos y antifúngicos en RC.....	130
5.1.3 Emulsificación.....	132
5.2 Materiales y métodos.....	133
5.2.1 Selección de materiales para un recubrimiento comestibles.....	133
5.2.1.1 Características de los materiales empleados.....	133
5.2.2 Aceites esenciales, hidrodestilación, caracterización química.....	134
5.2.2.1 Caracterización química de AE hidrodestilados.....	134
5.2.3 Actividad antifúngica in vitro de AE y componentes volátiles	135
5.2.3.1 Cepas de organismos patógenos.....	135
5.2.3.2 Ensayo de actividad antifúngica <i>in vitro</i>	136
5.2.4 Actividad antifúngica in vivo de recubrimiento	136
5.2.5 Diseño experimental de ensayos de formulación.....	138
5.2.6 Preparación de formulaciones.....	138
5.2.7 Evaluación de la compatibilidad de componentes.....	138
5.2.8 Evaluación de la retención de volátiles.....	139
5.3 Resultados y discusión.....	140
5.3.1 Aceites esenciales, hidrodestilación, caracterización química y actividad antifúngica.....	140
5.3.1.1 Caracterización química.....	145
5.3.1.2 Actividad antifúngica.....	147
5.3.2 Actividad fungistática de componentes volátiles.....	150
5.3.3 Análisis del perfil de ácidos grasos de aceites comerciales empleados en formulación.....	152
5.3.4 Evaluación de la compatibilidad de componentes.....	152
5.3.5 Evaluación de la retención de volátiles en película formada.....	152

5.3.6 Mejoramiento de la capacidad de retención de volátiles.....	153
5.3.7 Selección de pectinas.....	158
5.3.8 Características de la formulación final.....	159
5.3.9 Actividad antifúngica in vivo de recubrimientos.....	161
5.4 Referencias Bibliográficas.....	163
6. DESEMPEÑO DE RECUBRIMIENTOS EN UNA LINEA INDUSTRIAL DE CITRICOS, EVALUACIÓN DE LA CALIDAD POSCOSECHA E IMPACTO METABÓLICO.....	167
6.1 Introducción.....	167
6.2 Materiales y métodos.....	167
6.2.1 Características y diseño experimento de recubrimiento.....	168
6.2.2 Actividad fungistática in vivo de recubrimientos.....	169
6.2.3 Efecto de recubrimientos sobre la calidad y vida útil.....	170
6.2.3.1 Evaluación de la calidad externa de los frutos.....	170
6.2.3.2 Evaluación de la calidad interna de los frutos.....	171
6.2.3.3 Determinación de marcadores metabólicos.....	171
6.2.3.4 Desórdenes fisiológicos.....	172
6.3 Resultados y discusión.....	172
6.3.1 Evaluación de la calidad externa de los frutos.....	172
6.3.1.1 (%) Pérdida de peso.....	174
6.3.1.1 Índice de Color.....	175
6.3.1.1 Firmeza (% deformación).....	177
6.3.2 Evaluación de la calidad interna de los frutos.....	177
6.3.2.1 Índice de madurez (IM).....	178
6.3.2.2 Rendimiento en zumo (%).....	181
6.3.2.3 Contenido de vitamina C.....	181
6.3.3 Determinación de marcadores metabólicos de estrés relacionados con el uso de recubrimientos.....	182
6.3.3.1 Marcadores volátiles.....	182
6.3.3.2 Marcadores lipídicos.....	185
6.3.3.2.1 Comercialización directa CD.....	185
6.3.3.2.2 Frigoconservación y CD.....	186
6.3.3.2.3 Cuarentena y CD.....	187
6.3.3.3 Marcadores polares TMS.....	188
6.3.4 Desórdenes fisiológicos.....	189
6.4 Referencias Bibliográficas.....	192
7. COCLUSIONES GENERALES.....	194
8. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	197
ANEXOS.....	198

Índice de figuras

Figura 1. A. Esquema del sistema extractor Zumex; B. Apariencia de los cilindros rotatorios del sistema de extracción; C. aspecto de los residuos producidos.....	4
Figura 2. A. Esquema de un sistema extractor FMC en funcionamiento; B. Aspecto físico de los residuos producidos.....	5
Figura 3. Estructura de la pectina, un polímero de las paredes celulares de los vegetales, formadas por la polimerización del ácido galacturónico.....	49
Figura 4. Condensación de unidades de DMAPP con IPP, precursores básicos de compuestos terpénicos.....	51
Figura 5. Biogénesis de monoterpenos, origen de precursores básicos tipo geranil, Linalil y Neril.....	52
Figura 6. Biogénesis de monoterpenos, aparición del catión mentil o alfa-terpinil.....	53
Figura 7. Biogénesis de monoterpenos, reacción del catión mentil para formar limoneno y terpineol.....	54
Figura 8. Biogénesis de monoterpenos, formación de los cationes bicíclicos pinilo y bornilo.....	54
Figura 9. Biogénesis de monoterpenos, origen enantiomérico de limoneno y pineno.....	56
Figura 10. Biogénesis de monoterpenos, algunas reacciones adicionales para obtener productos oxigenados.....	58
Figura 11. Biogénesis de sesquiterpenos, formación del difosfato terciario NPP.....	59
Figura 12. Biogénesis de sesquiterpenos, formación de compuestos oxigenados.....	59
Figura 13. Biogénesis de compuestos sesquiterpénicos.....	60
Figura 14. Equipos utilizados para la obtención de aceites esenciales.....	65
Figura 15. Respuesta cromatográfica para extracción de volátiles de zumos de m. Clementina con una fibra DVB/CAR/PDMS.....	68
Figura 16. Estimación de los efectos principales que afectan el rendimiento en la extracción de sustancias insolubles en alcohol.....	70
Figura 17. Componentes principales de AE de n. Valencia y m. Clementina provenientes de residuos de dos tecnologías de extracción de zumos.....	77
Figura 18. Componentes principales de volátiles de zumos de n. Valencia y m. Clementina obtenidos por dos tecnologías de extracción.....	81
Figura 19. Distribución de valores de pH, SST, °Brix, A. Total e IM en dos etapas de maduración de m. Clementina.....	97
Figura 20. Contenido de hesperidina en zumo de mandarina Clementina en diferentes índices de maduración y procedencias de cultivo.....	98
Figura 21. Perfiles cuantitativos de ácidos grasos marcadores de maduración y origen geográfico en mandarina clementina.....	101
Figura 22. Perfiles cuantitativos de metabolitos marcadores de maduración y origen geográfico en mandarina clementina.....	102
Figura 23. Fragmentos característicos para la identificación de residuos de mono, di y trisacáridos.....	104
Figura 24. Dispersión de muestras de zumo de mandarina clementina en dos etapas de madures, según componentes principales volátiles.....	119
Figura 25. Dispersión de muestras de zumo de mandarina clementina en dos etapas de madures, según componentes principales volátiles.....	119

Figura 26. Dispersión de muestras de zumo de mandarina clementina en dos etapas de maduras, según componentes polares de sólidos solubles totales.....	120
Figura 27. Dispersión de muestras de de mandarina según procedencia de cultivo en dos etapas de maduras, según fracción de componentes de SST.....	120
Figura 28. Dispersión de muestras de AE según componentes volátiles principales.....	141
Figura 29. Dispersión de muestras de AE según componentes principales (concentración) en cepas de patógenos del genero penicillium.....	147
Figura 30. Imágenes estéreo microscópicas y nanotopografía de la superficie de la formulación FRCF.....	160
Figura 31. Porcentaje de frutos podridos por penicillium digitatum y P. Italicum en simulación de comercialización directa con la formula FRCF.....	162
Figura 32. Porcentaje de frutos podridos por penicillium digitatum y P. Italicum en simulación de exportación y posterior comercialización con la formulación FRCF.....	162
Figura 33. Porcentaje de frutos podridos por penicillium digitatum y P. Italicum en simulación de frigoconservación y posterior comercialización directa con la formulación FRCF.....	162
Figura 34. Pérdida de peso (%) de frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.....	172
Figura 35. Escala de color para cítricos, basada en los parámetros Hunter Lab e $IC = 1000 * a / L * b$	174
Figura 36. Evolución del índice de color en frutos de frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.....	175
Figura 37. Porcentaje de deformación en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.....	176
Figura 38. Rendimiento de zumo en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.....	178
Figura 39. Índice de madurez de frutos de naranja Valencia recubiertos en simulación de condiciones de almacenamiento.....	180
Figura 40. Contenido de ácido ascórbico en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.....	181
Figura 41. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales volátiles.....	183
Figura 42. Aspecto de la topografía superficial del recubrimiento comestible FRCF y recubrimiento tipo cera PZT mediante AFM.....	184
Figura 43. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales lipídicos, en simulación de comercialización directa.....	186
Figura 44. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales lipídicos. En simulación de frigoconservación y posterior comercialización directa.....	187
Figura 45. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales lipídicos. En simulación de cuarentena y posterior comercialización directa.....	188
Figura 46. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales de SST. En simulación de comercialización directa.....	189
Figura 47. Porcentaje de incidencia de daños por frío en frutos de naranja Valencia recubierta durante simulación de condiciones de almacenamiento comercial.....	190

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Mercado mundial de jugo de naranja: Producción, suministro y distribución en países representativos (1.000 toneladas métricas a 65 grados Brix).....</i>	<i>3</i>
<i>Tabla 2. Temperatura y tiempo de vida útil de cítricos en almacenamiento refrigerado.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 3. Componentes volátiles del aroma y sabor del zumo cítrico fresco.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 4. Composición porcentual de la fracción de sólidos solubles en un zumo de N. valencia en etapa madura.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 5. Ensayos de extracción de pectinas a diferentes condiciones experimentales.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 6. Diseño experimental factorial 2⁴ para optimización de condiciones de extracción de sustancias insolubles en etanol en condiciones de laboratorio.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 7. Rendimiento en la extracción de sustancias insolubles en alcohol, según diseño experimental factorial 2⁴.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 8. Densidad y rendimiento de aceites esenciales hidrodestilados en base húmeda (69,45 %H).....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 9. Principales componentes identificados en AE de n. Valencia y m. Clementina provenientes de residuos de dos tecnologías de extracción de zumos.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabla 10. Compuestos volátiles extraídos mediante HS/SPME de N. Valencia y m. Clementina), usando extractores industriales de zumos. Porcentajes relativos de área (%) ± SD (n= 6).....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 11. Características de lotes de producción de mandarina clementina sometidos a muestreo.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 12. Parámetros poscosecha: pH, SST, Acidez total e IM en dos etapas de maduración de m. Clementina.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 13. Metabólitos volátiles extraídos mediante HS/SPME de diferentes lotes de mandarina Clementina.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabla 14. Perfil de ácidos grasos en zumo de mandarina clementina en dos etapas de maduración.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabla 15. Perfil de metabólitos polares TMS de los sólidos solubles totales.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 16. Polisacáridos utilizados en formulación de recubrimientos.....</i>	<i>126</i>
<i>Tabla 17. Sustancias grasas utilizadas en formulación de recubrimientos.....</i>	<i>128</i>
<i>Tabla 18. Componentes básicos de una formulación de recubrimiento comestible.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabla 19. Aceites esenciales de mandarina Clementina empleados en ensayos de formulación.....</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 20. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de aceites esenciales en patógenos del genero penicillium.....</i>	<i>145</i>
<i>Tabla 21. porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de componentes volátiles en patógenos del genero penicillium.....</i>	<i>148</i>
<i>Tabla 22. Aceites vegetales empleados en el diseño de la formulación, AO y AP comercial.....</i>	<i>151</i>
<i>Tabla 23. Componentes volátiles retenidos en ensayo de incorporación de aceites vegetales (AO y AP).....</i>	<i>156</i>

1. INTRODUCCION

1.1 Producción citrícola

La producción de cítricos lidera el primer lugar en el mundo en relación a otras frutas. Durante el periodo 2006-2007 se registró una producción global de aproximadamente 120 millones de toneladas métricas (Tm) [1] y para la campaña 2010/2011 no obstante a los problemas climáticos fue prevista en aproximadamente 53,8 millones de Tm [2]. Los cítricos se cultivan comercialmente en más de 50 países. La contribución de la industria citrícola a la economía mundial se estima en más de 10 billones de dólares anualmente [3].

Los dos principales países productores de cítricos (principalmente naranjas) a nivel mundial son Brasil y Estados Unidos, participando respectivamente con el 44% y 21% de la producción global, lo que muestra que aunque la citricultura se extiende geográficamente, la producción y el comercio revelan cierto grado de concentración en pocos países. Siguen en orden de importancia México, España, China, India e Italia, representando en conjunto el 35% del total mundial. El principal productor mundial de mandarinas es China que alcanza más de 7.5 millones de Tm aunque la mayor parte de lo que produce lo dedica al consumo interno y participa con menos del 1% en el comercio mundial. España, el segundo productor mundial de mandarina con 1.7 millones de Tm es además, el principal proveedor del mercado internacional, especialmente hacia los mercados de Europa y Estados Unidos, en la variedad Clementina con el sello de Indicación Geográfica Protegida, IGP Cítricos de Valencia. Japón, el tercer productor mundial con 1.1 millones de Tm, concentra la producción en los meses de octubre a enero, especialmente de la variedad tipo Satsuma, originaria de este país. El primer productor latinoamericano de mandarina es Brasil (770.000 Tm) que, al igual que China, consume internamente la mayor parte de su producción. La tendencia en la producción indica que las naranjas constituyen cerca del 60% del total de cítricos producidos, seguida por las mandarinas con un 20%, limones y limas con un 11-12%, y pomelos con un 5-6%. De esta producción, cerca a 68 millones de Tm se destinan al consumo en fresco y unos 27 millones de Tm como productos procesados [4].

Colombia se encuentra al margen de la producción de cítricos en el mundo, aunque su participación muestra una dinámica interesante en el contexto nacional e internacional, de hecho en el periodo 1992-2004 mostró un crecimiento promedio anual de 6.7% en el volumen de producción y de 6.6% en la superficie del cultivo, siendo superior al crecimiento que registró el total del sector frutícola, con incrementos en la producción de 3.8% y de 5.3% en hectáreas de cultivo. De acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura sobre cítricos asociados y cítricos en monocultivo (mandarina, naranja y limones), en el 2004 se alcanzó una producción total de 989.539 Tm en una superficie de cultivo de 57.856 hectáreas [5]. La producción nacional de mandarina ha tenido un gran periodo de expansión entre 1992-2004 al pasar de 270 a 64.883 Tm con una tasa de crecimiento promedio anual de 54.6% [5]. En cuanto al rendimiento, se sabe también que a nivel regional, en el año 2004, los rendimientos más altos en el cultivo de naranja los obtuvo el departamento de Antioquia con 29.6 toneladas por hectárea y en relación a la productividad del cultivo de mandarina, se encontró también que en el 2004 los mayores rendimientos fueron obtenidos en el departamento de Antioquia con 30.8 Tm/Ha. Para ubicar estos datos en el contexto mundial, debe considerarse que, también en el año 2004, Estados Unidos y Brasil mostraron un rendimiento promedio de 31.1 y 19.8 Tm/Ha, respectivamente.

El incremento de la población mundial proyectada en 10 billones de personas para mediados de siglo y la tendencia observada en los últimos años de un aumento del consumo de fruta cítrica fresca y de zumos procesados, indican la importancia de aumentar la producción y conservar la calidad natural de la fruta para consumo en fresco durante el periodo poscosecha, tanto para su comercialización en mercado interno como para su exportación [6].

1.2 Producción de zumos y generación de residuos agroindustriales

Según pronósticos de la secretaría de agricultura de los Estados Unidos, la producción y el comercio mundial de cítricos para 2011 fue de 51,4 millones de Tm y 3,8 Tm [7], para naranjas y mandarinas respectivamente. En lo referente al principal producto como es el jugo de naranja, prevé que durante esa vigencia se obtengan más de cuatro

millones de toneladas métricas de jugo, lo que da una idea clara de la magnitud de producción de residuos para este sector, la tabla 1 muestra la producción y el comportamiento del comercio global del jugo de naranja durante los últimos años, los valores son engrosados básicamente por los principales países productores, como han sido mencionados anteriormente.

Tabla 1. Mercado mundial de jugo de naranja: Producción, suministro y distribución en países representativos (1.000 toneladas métricas a 65 grados Brix).

Temporada	Producción	Importaciones	Producción total	Exportaciones	Consumo domestico	Existencias finales
2008/09	2,322	1,496	4,499	1,523	2,305	671
2009/10	1,947	1,371	3,989	1,394	2,124	472
2010/11	2,195	1,346	4,012	1,473	2,099	441

Tomado de: reporte USDA. 2011. Citrus: World Markets and Trade.

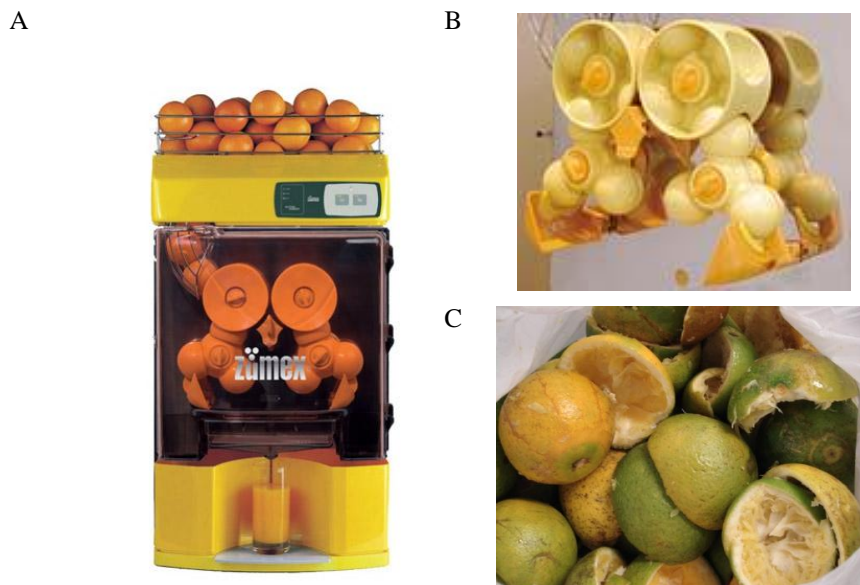
En referencia a las tecnologías que se utilizan para la extracción industrial de zumos, se destaca lo siguiente, los extractores industriales de cítricos comenzaron a desarrollarse en los años 40 y 50, y desde entonces no han dejado de incorporar nuevas mejoras y avances tecnológicos que han permitido aumentar los rendimientos y e imprimir cambios en la calidad del zumo obtenido. En la actualidad las dos tecnologías más usadas en nuestro medio son FMC[®], desarrollada por la empresa norteamericana Food Machinery Company, y Zumex[®], desarrollada por la empresa española Maquinas y Elementos S.A., utilizadas en nuestro país para obtener zumos de naranja y mandarina a gran volumen, dando como resultado residuos de marcada diferencia en la apariencia, estas tecnologías producen una afectación particular a los tejidos de frutos que ingresan ellas, no se dispone de adecuada información al respecto del efecto mecánico sobre la composición química final de los residuos y los zumos producidos, por ello es de nuestro interés caracterizarlos.

1.3 Tecnologías de exprimido: Zumex y FMC

El funcionamiento de una maquina Zumex ocurre de la siguiente manera: Este tipo de máquinas extractoras se utilizan principalmente para la obtención de zumo fresco a mediana y gran escala. Su principio de funcionamiento es bastante simple y se basa en

partir el fruto por la mitad y hacer pasar las mitades entre dos cilindros giratorios que presionan el fruto y extraen el zumo, la figura 1 muestra el aspecto físico de este tipo de maquinas.

Figura 1. A. Esquema del sistema extractor Zumex; B. Apariencia de los cilindros rotatorios del sistema de extracción; C. aspecto de los residuos producidos.

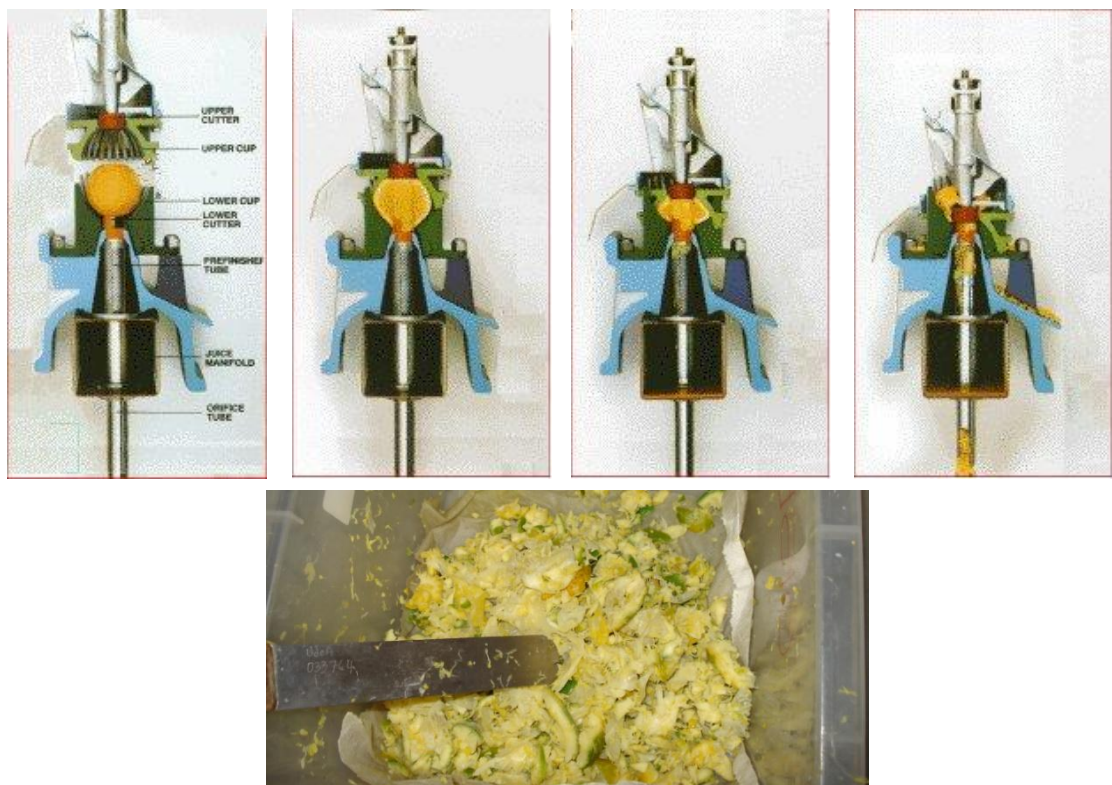


El sistema de extracción se basa en unos tambores machos y hembras que con sincronización extraen el zumo de la pulpa de la fruta, que previamente ha sido cortada en dos mitades por medio de una cuchilla ubicada en el compartimento superior de la máquina. Su gran peculiaridad reside en que en ningún momento las bolas de exprimido están en contacto con la corteza de la fruta, sino sólo con la pulpa. Este sistema permite un rendimiento de hasta el 95% según el fabricante, al final del proceso los residuos presentan un aspecto similar al de los exprimidores que usan a nivel domestico [8].

Por otra parte, FMC es el tipo de extractor más utilizado a nivel industrial en la elaboración de concentrados. Su principio se basa en la separación instantánea de los elementos constituyentes del fruto (piel, membrana, semillas y otros productos no deseables) que, de permanecer demasiado tiempo en contacto con el zumo, pueden tener una influencia adversa para la calidad final del producto, según el fabricante, la extracción rápida evitará que pasen al zumo sustancias procedentes de las semillas,

membranas y corteza que pueden producir amargor y sabores desagradables. Como resultado se obtiene un zumo con características únicas. El proceso se realiza muy rápidamente, ya que estos extractores pueden llegar a realizar casi 100 ciclos por minuto. La figura 2 muestra el esquema de este sistema de extracción y el aspecto físico de los residuos que producen [8], [9].

Figura 2. A. Esquema de un sistema extractor FMC en funcionamiento; B. Aspecto físico de los residuos producidos.



1.4 Aprovechamiento de residuos agroindustriales

La protección del medio ambiente se ha convertido en un tema prioritario para los sectores gubernamental e industrial, por ello se ha hecho importante lograr un uso racional de los subproductos agroindustriales; este plan puede contribuir a minimizar los gastos que supone la gestión de residuos y también incentivar nuevas fuentes de materias primas para la obtención de productos de alto valor agregado. En nuestro medio los residuos agroindustriales no se han aprovechado eficientemente, en parte, porque en muchos casos su valor es aún desconocido; de tal manera que el auge de los

estudios ha centrado su atención en la necesidad de identificar y recuperar sustancias de interés farmacéutico, cosmético o alimentario presentes en residuos de productos tales como manzana, cítricos, bagazos de yuca y caña de azúcar entre otros [10]. Es así como se han diseñado procesos para utilizar estos materiales en la generación de productos valorizados como etanol, enzimas, ácidos orgánicos, grasas, aminoácidos, pectina y metabolitos secundarios biológicamente activos, entre otros [11].

El aprovechamiento industrial de los cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas de toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; pero a medida que la producción crece se aumenta también la generación de desechos sólidos y líquidos. Los residuos de la producción de jugos de cítricos están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, flavonoides, aceites esenciales (AE), proteínas y minerales, que se encuentran en diferentes cantidades dependiendo del tejido u órgano de la fruta (albedo, flavedo, pulpa, semilla y jugo), el estado de madurez y el sistema tecnológico empleado para el procesamiento [12], [13].

En los últimos años, la agroindustria de cítricos en Colombia ha mostrado un crecimiento significativo, originado por la expansión del mercado de los derivados de frutas como jugos, concentrados, néctares y pulpas entre otros. Los residuos generados durante el procesado de cítricos están constituidos por flavelos, alvedos, segmentos de membrana y semillas, que tienen potencialidad como material de partida para la elaboración de productos comerciales importantes; entre ellos se destacan los aceites esenciales, aceites fijos, fibras, y pectinas. En particular, el epicarpio de los cítricos es una fuente importante de AE, los cuales están constituidos por compuestos volátiles (generalmente aislables por hidrodestilación) que son responsables del aroma y sabor característicos de los vegetales. Los AE de los cítricos (mandarina, limón, naranja y lima) tienen una demanda alta, principalmente en la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos [14], y son utilizados en la preparación de aromatizantes, saborizantes, desinfectantes ambientales, como antimicrobianos [15] y como precursores de procesos de síntesis química [16].

La pectina es también un producto de amplia demanda mundial por la industria de alimentos, comúnmente se obtiene de residuos de manzana y de cítricos, Las pectinas son uno de los principales constituyentes de la pared celular de los vegetales y forman parte importante de los componentes característicos de los frutos cítricos. Estas macromoléculas son polisacáridos altamente hidrofílicos que pueden absorber agua cien y hasta quinientas veces su propio peso. Es en la actualidad, el insumo más importante utilizado para estabilizar, espesar, corregir la consistencia de geles y mantener la viscosidad en diferentes tipos de productos.

Dado el interés de esta investigación, se perfilan las pectinas y los AE como productos derivados de residuos con alto valor por sus propiedades físico-químicas y biológicas, de acuerdo a la necesidad de obtener un material de tipo hidrocoloidal con capacidad para incorporar y retener AE mediante la formación de películas delgadas con capacidad antifúngica.

1.5 Problemática de los cítricos en poscosecha

En la gestión poscosecha es fundamental tener en cuenta, que éstas continúan activas fisiológicamente aún después de cosechadas. De esta forma cada fruta continúa respirando, madurando e iniciando procesos de senescencia, lo cual implica en adelante una serie de cambios estructurales y bioquímicos que son específicos de cada especie. Asimismo, el producto cosechado está constantemente expuesto a la pérdida de agua debido a la transpiración y a otros fenómenos fisiológicos. Los frutos cítricos, en particular, presentan una serie de problemas tras su recolección derivados de la falta de aporte hídrico y de nutrientes desde la planta, quedando así a expensas de su propio metabolismo. Dando lugar a una pérdida gradual de calidad de la fruta en sus características organolépticas de textura, sabor y aroma a medida que avanza su estado de senescencia, determinando finalmente la muerte fisiológica. Este tipo de metabolismo limitado a sus propias reservas coloca además al fruto en una situación de debilidad frente a la deshidratación y las agresiones físicas externas tales como: fricción, golpes o heridas y también frente a las infecciones, especialmente de tipo fúngico. Por tanto, son normalmente las alteraciones fisiológicas y patológicas las que

hacen inviable su comercialización mucho antes de que cese su actividad metabólica [17]. El conocimiento de la fisiología del fruto durante la etapa poscosecha es importante para comprender el proceso de deterioro de la calidad.

1.5.1. Respiración

La respiración es un indicador de la actividad metabólica y juega un papel significativo en la fisiología poscosecha y en el deterioro de la calidad de los alimentos. Es un proceso que implica la degradación oxidativa de los productos más complejos, normalmente presentes en las células, como el almidón, los azúcares y los ácidos orgánicos, a moléculas más simples como el dióxido de carbono y el agua, con la consiguiente liberación de energía [18], [19].

La respiración, por tanto, involucra reacciones complejas que en condiciones normales requiere de la presencia de O₂ para la degradación de los compuestos (respiración aeróbica). Sin embargo, cuando los niveles de oxígeno son muy bajos, la respiración se desplaza hacia rutas anaerobias [20], generándose compuestos volátiles, como el acetaldehído y etanol, que pueden dar origen a mal sabor y aroma [21], [22], [23].

Durante la respiración, la pérdida de moléculas almacenadas que representan reservas de energía en el fruto significa el aceleramiento de la senescencia conforme las reservas que proporcionan energía para mantener el estatus vivo del producto se agotan [24]. Por ello, la velocidad de deterioro de las frutas generalmente es proporcional a su velocidad de respiración. Adicionalmente, basados en sus patrones de respiración y producción de etileno (C₂H₄) durante la maduración organoléptica, los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos [25]. Los frutos climatéricos muestran un pico respiratorio durante la maduración organoléptica con un incremento en la producción de CO₂ y de C₂H₄, mientras que los frutos no climatéricos no muestran cambios en sus velocidades de producción de CO₂ y de C₂H₄ y estas son generalmente bajas.

Los cítricos poseen una intensidad respiratoria baja. Pero al igual que en todos los frutos, la manipulación y la temperatura estimulan la intensidad respiratoria de los

mismos [26]. Así por ejemplo, la intensidad respiratoria de los cítricos está entre 5-10 mg CO₂/Kg h a 5 °C, aumentando a valores entre 10-20 mg CO₂/Kg h a 10 °C y 40-80 mg CO₂/Kg h a 20 °C. Además, su comportamiento basado en su patrón de respiración y producción de C₂H₄ los clasifica como frutos no climatéricos, con una producción de C₂H₄ baja (<0,10 µL/Kg h en naranjas a 20 °C) [27].

1.5.2 Transpiración

La transpiración es la principal causa de la pérdida de agua de las frutas y vegetales ocasionando pérdidas de peso, deterioro en la apariencia (marchitamiento y formación arrugas), disminución de firmeza (ablandamiento, pérdida de turgencia), cambios en la calidad nutricional, además de una mayor susceptibilidad a determinadas alteraciones tanto fisiológicas y patológicas [28]. La transpiración es un proceso por el cual los tejidos vegetales pierden agua en forma de vapor desde las células del interior hacia la atmósfera que los rodea. Las diferentes estructuras epidérmicas regulan el flujo de vapor de agua hacia el exterior de los frutos. El vapor de agua sale hacia el exterior desde los espacios intercelulares existentes entre las células del parénquima poroso, pasa a través de estomas y lenticelas, atraviesa la epidermis y la cutícula. Las aperturas epidérmicas representan la principal vía de pérdida de agua, mientras que la transpiración a través de la cutícula representa alrededor del 5-10 % de la pérdida total [29]. Otros autores propusieron que la difusión de vapor de agua en cítricos se realiza tanto a través de las aperturas epidérmicas como a través de una fase acuosa líquida en la cutícula, contrariamente a los gases CO₂, O₂ y C₂H₄ cuya difusión se realiza esencialmente a través de estomas [30].

La intensidad de la pérdida de agua depende de factores intrínsecos del fruto y de factores ambientales. Entre las variables intrínsecas al fruto, las más relevantes son la relación superficie/volumen, la estructura de la epidermis y el grosor y composición de la cera epicuticular. Las pérdidas de agua son directamente proporcionales a la relación superficie/volumen, por lo que los frutos de mayor volumen y más esféricos son los que presentan menor pérdida de agua.

Los factores ambientales que más influyen en la deshidratación son la temperatura, la humedad relativa (HR) y la velocidad de circulación del aire que rodea al fruto. En el almacenamiento a bajas temperaturas y altas HR se reduce el gradiente de presión del vapor de agua entre el fruto y la atmósfera de almacenamiento, con lo que disminuye la velocidad de pérdida de agua por transpiración [31]. Además, en el almacenamiento y transporte, es importante una adecuada ventilación y velocidad del aire, puesto que incide sobre la capa de aire húmedo que rodea al fruto [32], [33]. Por tanto, las frutas y vegetales suelen ser almacenados en un ambiente húmedo (90-98% HR), especialmente a bajas temperaturas y con una velocidad del aire adecuada para minimizar la pérdida de agua [34]. En los cítricos, la transpiración es la principal causa de deterioro durante la poscosecha [35]. Distintos estudios indican que se pueden disminuir pérdidas de peso superiores a un 5% durante la comercialización, un 7% en la conservación frigorífica y un 16% en el almacenamiento en refrigeración durante periodos de tres meses [36].

1.5.3 Alteraciones fisiológicas

Las alteraciones fisiológicas pueden tener su origen en deficiencias nutricionales o condiciones climáticas adversas ocurridas durante el período pre-cosecha y/o en una incorrecta manipulación en poscosecha, como es el caso del almacenamiento a temperaturas y HR no adecuadas, conservación en atmósferas no adecuadas, etc [37]. Este tipo de alteraciones produce cambios indeseables en la piel de los cítricos y por lo tanto una pérdida del valor comercial [38]. Dentro de los desórdenes más comunes en las frutas cítricas se encuentran la necrosis peripeduncular o SERB (Steam end rind breakdown) y los daños por frío. El SERB es producido por una desecación de los tejidos situados alrededor del pedúnculo. En su fase inicial queda un anillo de 2 a 5 mm sin dañar, y al ir avanzando, el área afectada se hunde y cambia de color hacia tonos marrones. La alteración puede estar provocada por un desequilibrio nutricional, que involucra al nitrógeno y fósforo, y se desarrolla en el almacenamiento cuando hay condiciones propicias para la deshidratación [39].

Los cítricos, al igual que otros frutos tropicales y subtropicales, son sensibles a los daños por frío (chilling injury) cuando se almacenan a bajas temperaturas, aunque

superiores al punto de congelación. Los daños por utilización de bajas temperaturas en el almacenamiento de cítricos se manifiestan externamente con picados, ennegrecimiento de glándulas oleíferas, bronceado y peteca. Asimismo la conservación en frío puede producir daños internos como descomposición acuosa y membranosis [39]. El picado (pitting) aparece como depresiones más o menos redondeadas en la piel con ligera decoloración, las cuáles se oscurecen a medida que avanza el almacenamiento hacia tonalidades marrones. Los cítricos más susceptibles a esta alteración son pomelos y limones, mientras que las naranjas son las que presentan menor susceptibilidad. Entre las mandarinas, los cultivares ‘Nova’ y ‘Fortune’ son los más susceptibles. La peteca también forma depresiones en la corteza, pero tienen formas más circulares que las del picado y es más frecuente en limones [39], [40].

1.5.4 Alteraciones patológicas

Una de las más frecuentes causas de pérdidas económicas durante la poscosecha, son las alteraciones patológicas que limitan la vida útil de las frutas y otros vegetales frescos. El porcentaje de frutos cítricos afectados por podredumbres durante una campaña normal oscila entre el 3 y el 15 % del total manipulado, pudiendo alcanzar valores mayores (8-20%) en zonas con climatología anormal o falencias sanitarias [41].

En los cítricos, las alteraciones son provocadas muy frecuentemente por hongos, principalmente, por los patógenos de heridas, como son *Penicillium digitatum*, causante de la podredumbre verde, y *Penicillium italicum*, causante de la podredumbre azul. Otros hongos que alteran los cítricos son *Alternaria citri*, *A. alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Phytophthora citrophthora* [42].

El ataque por patógenos generalmente sigue al daño físico o al deterioro fisiológico. En raras ocasiones, los patógenos pueden infectar tejidos aparentemente sanos y ser la causa primaria del deterioro. Concretamente, para que la podredumbre se produzca en los frutos, deben darse las siguientes condiciones: a) nivel de inóculo suficiente en el ambiente; b) contacto entre el inóculo y la superficie de los frutos; c) entrada de la

espora en el fruto a través de una herida (incluso no perceptible a simple vista); d) condiciones favorables para que la espora se desarrolle dentro de la herida; e) susceptibilidad del fruto a la alteración. Por lo tanto, la incidencia de las podredumbres depende de las características intrínsecas del fruto, de las condiciones ambientales, del manejo durante la recolección y posterior manipulación poscosecha [19]. La refrigeración se utiliza como método que ayuda a reducir la incidencia de las alteraciones patológicas en la fruta, ya que las bajas temperaturas reducen la germinación de las esporas y el crecimiento de patógenos y, además, al retrasar la senescencia del fruto, este mantiene un mayor contenido de los compuestos antifúngicos (e.g. fitoalexinas y otros volátiles) que mejoran la resistencia fisiológica al ataque fúngico del fruto [43]. En el caso de los cítricos la principal estrategia de control de hongos es la aplicación de fungicidas de síntesis, como ortofenilfenato sódico, tiabendazol, imazalil o guazantina [44]. Sin embargo, el uso continuado de los fungicidas de síntesis presenta varias limitaciones importantes, como la aparición de cepas resistentes, las restricciones regulatorias sobre la aceptación de residuos en países importadores de cítricos y el posible efecto perjudicial de estos compuestos sobre la salud y el medio ambiente [45], [46].

En la actualidad se están estudiando nuevas estrategias para el control de enfermedades poscosecha, que incluyen tratamientos físicos, químicos y biológicos. Así por ejemplo, se ha estudiado la aplicación de aire caliente y baños en agua caliente [47], [48], la aplicación de luz ultravioleta (254 nm) [49], el uso de agentes químicos naturales de baja toxicidad, como las sales inorgánicas, parabenos y el desarrollo de agentes de control biológico [50].

1.6 Tecnologías poscosecha en la industria citrícola

Se define la calidad como ‘una combinación de características, atributos o propiedades que dan al producto el valor de alimento para el consumo humano’ [24]. Este conjunto de factores está relacionado tanto con la aceptación organoléptica y nutricional, como con su aspecto externo.

La evolución poscosecha de los cítricos tras la aplicación de distintos tratamientos puede alterar significativamente la calidad de los mismos [51]. En general, la calidad final de los frutos se puede mantener mediante el empleo de distintas tecnologías poscosecha, pero en todo caso siempre vendrá condicionada por la calidad inicial del fruto, siendo el grado de madurez en el momento de la recolección, uno de los factores que influye de manera decisiva en la calidad y conservación de la fruta [52]. Los tratamientos poscosecha más utilizados en la industria de cítricos son la frigoconservación, la aplicación de ceras comerciales, la desverdización y aplicación de tratamientos cuarentenarios por frío cuando estos son exigidos por los países importadores. Otras tecnologías más novedosas incluyen el uso de atmósferas insecticidas con alto contenido en CO₂, la aplicación de radiaciones ionizantes, el desarrollo de recubrimientos naturales.

1.6.1 Conservación por refrigeración (Frigoconservación)

Teniendo en cuenta que la temperatura es el factor más importante en la vida poscosecha de los productos hortofrutícolas, el almacenamiento en frío es la tecnología poscosecha más extendida en los frutos cítricos. El objetivo es prolongar el periodo de comercialización del fruto y mantener su calidad durante el transporte a mercados distantes de las zonas productoras. Adicionalmente, la refrigeración también se aplica como tratamiento cuarentenario para el control de insectos, principalmente la mosca de la fruta del mediterráneo (*Ceratitis capitata*).

Sin embargo, los cítricos son frutos subtropicales y por tanto sensibles al frío, por lo que es necesario optimizar la temperatura de almacenamiento para evitar la aparición de daños por frío. Cada variedad y cultivar tiene unas condiciones diferentes para el almacenamiento dependiendo de su tolerancia a las bajas temperaturas, a la alta humedad, a la baja concentración de oxígeno, a la alta concentración de dióxido de carbono, etileno y a los daños mecánicos [53]. La tabla 2 muestra las temperaturas de almacenamiento recomendadas en el almacenamiento de algunos cítricos. Las naranjas son menos sensibles al frío que el resto de los cítricos. Entre las mandarinas, Fortune y Nova son las que presentan mayor susceptibilidad, los pomelos y limones presentan la

máxima sensibilidad al frío [54], [40]. En general, se recomiendan temperaturas entre 2 y 10 °C, una humedad relativa cercana al 90% y concentraciones de etileno menores de 1 ppm y de dióxido de carbono inferiores al 0,25% durante el almacenamiento [55], [40]. Se recomiendan temperaturas óptimas de 3-8 °C para conservar naranjas durante 3 meses, dependiendo del cultivar, estado de madurez a la cosecha y área de producción [56].

Tabla 2. Temperatura y tiempo de vida útil de cítricos en almacenamiento refrigerado.

Especie/cultivar	Temperatura (°C)	Vida útil en Almacenamiento (meses)
Pomelo	12-13	2-3
Limas	9-10	1.5-2.5
Limones		
Fino	11-12	3-4
Verna	13-14	4-5
Naranjas		
Navelina	2-3	2.5-3.5
Washington Navel	2-3	2.0-2.5
Navelate	3-4	2-3
Lanelate	2-3	2.5-3.5
Blanca común	2-3	2.5-3.5
Salustiana	2-3	3-4
Valencia Late	2-3	3-4
Mandarinas		
Satsuma	2-3	1.0-1.5
Clementina	4-5	1.5-2.5
Híbridos		
Mandarina Fortune	9-10	1.0-1.5
Mandarina Nova	9-10	0.5-1.0
Tangelo Minneola	9-10	0.5-1.5
Tangor Ellendale	5-6	2.0-2.5
Tangor Ortanique	5-6	2.5-3.0

Tomado de: Martínez-Jávega et al., 1999

A nivel nutricional, se ha visto que el contenido de ácido ascórbico de las frutas y verduras disminuye con la aplicación de altas temperaturas y el almacenamiento prolongado [57]. Sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas también puede acelerar la pérdida de vitamina C en frutas sensibles al frío, incluso antes de que los daños por frío sean evidentes [58].

1.6.2 Tratamientos químicos

En poscosecha se utilizan reguladores del crecimiento para prolongar la vida útil de cítricos (e.g. ácido giberélico) [59], entre ellos se encuentran, las poliaminas que tienen actividad antioxidante [60], [61] y los metiljasmonatos que se utilizan para prevenir los daños por frío [62]. Con el objetivo de controlar podredumbres durante poscosecha se utilizan fungicidas de síntesis, individuales o en mezclas. Con el mismo objetivo, a nivel experimental se están aplicando agentes químicos naturales de baja toxicidad, como las sales inorgánicas, parabenos, etc, y agentes de control biológico [49], [50].

1.6.3 Pretratamientos térmicos

En combinación con la refrigeración se han aplicado con éxito pretratamientos térmicos con el fin de proteger a las frutas de daños por frío y/o reducir alteraciones patológicas, como el acondicionado [63], el curado, calentamientos intermitentes y los baños en agua caliente [64]. El curado es un tratamiento previo a la refrigeración y consiste en someter al fruto a altas temperaturas (35 °C, 72 horas) durante un periodo de tiempo para inducir la producción de proteínas de resistencia a las bajas temperaturas (Heat shock proteins, HSP) [65], [66]. Los calentamientos intermitentes se basan en el carácter reversible de algunos daños por frío en la fase de latencia de la alteración. Consiste en someter al fruto a calentamientos intermitentes en el curso de la conservación frigorífica convencional. La eficacia de los calentamientos intermitentes se atribuye a una serie de respuestas fisiológicas del fruto durante los mismos que incluyen: la restauración de las membranas celulares dañadas por el frío, la eliminación de metabolitos tóxicos acumulados a bajas temperaturas, y la síntesis de metabolitos indispensables para el correcto funcionamiento celular [67]. Se ha demostrado que los calentamientos intermitentes restablecen la respiración normal de cítricos, en melocotones y tomates dañados por frío, y la emisión de etileno y el equilibrio de la actividad pectinesterasa y poligalacturonasa en melocotones que también presentaban daños por frío [68]. En cultivares de cítricos sensibles al frío se ha observado una reducción de los daños mediante distintos tratamientos con calor [69], [70]. Otros

autores reportaron la reducción de los daños por frío de naranjas ‘Valencia’ almacenadas 15 semanas a 1 °C mediante baños con agua caliente [71].

1.6.4 Almacenamiento en atmósferas modificadas (AM) y controladas (AC)

Las AM y AC son técnicas en las que se altera la composición del aire que rodea al fruto con el fin de retrasar su deterioro [19]. La diferencia entre ambos métodos, está en el grado de control de las concentraciones gaseosas. En general, la atmósfera se modifica con un incremento en la concentración de CO₂ y una disminución de O₂. Sin embargo, también se han realizados estudios con altas concentraciones de O₂ (súper atmósferas) y con altas concentraciones de CO₂ (choques gaseosos). En el caso de que se fijen y controlen los valores de composición de los gases durante el almacenamiento se habla de AC, mientras que cuando la atmósfera de almacenamiento evoluciona con el tiempo se habla de AM. En este último caso la atmósfera se ve afectada por la actividad metabólica del fruto y, en el caso de frutos envasados o recubiertos, por la permeabilidad de los envases o coberturas que envuelven al fruto.

Algunas ventajas de las AC y AM son la reducción de la tasa respiratoria, la disminución de los efectos del etileno en la senescencia, la retención de firmeza y la reducción del desarrollo de hongos [72]. Sin embargo, las frutas presentan diferentes tolerancias al O₂ y CO₂ según la especie y cultivar, de acuerdo con su tasa respiratoria y permeabilidad de la piel [73]. En cítricos, bajas concentraciones de O₂ y/o altas concentraciones de CO₂ pueden dar lugar a la acumulación de etanol y acetaldehído y el desarrollo de malos sabores [74]. La tolerancia mínima, sin embargo, pueden verse modificados en función de la combinación de gases (e.g. los niveles de tolerancia al CO₂ disminuyen si se reduce el O₂ y a la inversa), del tiempo de exposición y la temperatura de almacenamiento [75]. Aunque la conservación en AC o AM en los cítricos no proporciona en general beneficios importantes por la baja tolerancia que presentan al CO₂ (inferior al 3% en naranjas y mandarinas y al 5% en pomelos y limones) [76], la aplicación de atmósferas insecticidas (AI) han resultado efectivas como tratamiento cuarentenario contra la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) y otras plagas [77], [78], [79], [80]. Las AI son un caso particular de las AC en las que se

aplican altos niveles de CO₂ (superiores al 50%) y muy bajos de O₂ (inferiores al 1%) [81]. La efectividad de las mismas depende de la temperatura, la humedad relativa, la duración de la exposición y de la fase de vida del insecto.

1.6.5 Irradiación

La irradiación de alimentos es un método físico de conservación que consiste en exponer el producto a la acción de las radiaciones ionizantes (radiación capaz de transformar moléculas y átomos en iones, quitando electrones) durante un tiempo determinado, proporcional a la cantidad de energía que deseamos que el alimento absorba. Actualmente se utilizan cuatro fuentes de energía ionizante: rayos gamma provenientes de Cobalto o Cesio radioactivo, rayos X y electrones acelerados.

La aplicación de irradiaciones en poscosecha tiene por objeto la desinfección de plagas mediante la destrucción de larvas y huevos [82], la inactivación de organismos patógenos [83] (Gladon et al., 1997) y la reducción del metabolismo del fruto, disminuyendo la actividad respiratoria, la síntesis de etileno y la pérdida de agua Lu et al., 1991) [84].

Algunos trabajos muestran la aptitud de esta técnica para mejorar y alargar la conservación de ciertas frutas y hortalizas [85]. Otros muestran un efecto negativo de las radiaciones ionizantes en algunos cultivares de fresas y arándanos que se manifiesta con una reducción de firmeza [86], [83]. Los efectos de la radiación en las frutas dependen de la especie y cultivar. Por otra parte, los tratamientos de irradiación han demostrado que el aumento o disminución del contenido antioxidante de los vegetales frescos depende de la dosis administrada, tiempo de exposición, y la especie vegetal. El aumento de la capacidad antioxidante en productos vegetales después de la irradiación se atribuye principalmente al aumento de la actividad enzimática (e.g. fenilalanina amonio liasa y peroxidasa) [87], [88], [89]. En cítricos, la irradiación se ha estudiado con el fin de eliminar insectos como *Ceratitis capitata* (mosca del mediterráneo). La tolerancia de los cítricos a la irradiación depende del cultivar. Se encontró que determinadas dosis (450 Gy) de irradiación para tratamientos de cuarentena de larvas de

la mosca de la fruta pueden dañar a algunos cítricos, la aplicación de irradiación gamma en mandarinas Clementines y en naranjas 'Navel' (600-850 Gy) ha dado buenos resultados [90].

La irradiación aumenta significativamente el contenido de flavonoides de mandarina Clementina [91], [92]. Otro reporte menciona que dosis bajas (300 Gy) de irradiación en pomelos aumentó los niveles de naringina y narirutina [93]. Se encontró que la concentración total de flavonoides se incrementó cuando los pomelos de principios de temporada fueron expuesta a bajas dosis de irradiación (70 y 200 Gy) seguido de 4 semanas de almacenamiento a 10 °C mas 1 semana a 20 °C, mientras que los niveles de naringina (el flavonoide más abundantes en pomelo) y de narirutina disminuyeron a medida que se incrementó la dosis de irradiación por encima de 200 Gy [94].

1.6.6 Aplicación de recubrimientos: recubrimientos tipo Cera (RTC) y recubrimientos Comestibles (RC)

La aplicación de recubrimientos o encerado es una práctica habitual en la industria cítrica para reponer las ceras eliminadas durante las etapas de lavado y manipulación de los frutos. Su aplicación permite alargar la vida útil durante el almacenamiento al reducir la pérdida de humedad y ralentizar la maduración de los frutos, ya que actúan como barrera al intercambio gaseoso. Además, otro objetivo de la aplicación de los mismos es aportar brillo al fruto, confiriéndole un aspecto más apetecible en el punto de venta.

En el caso de los cítricos, la aplicación de recubrimientos también reduce la susceptibilidad de los mismos a daños por frío o 'pitting' y la incidencia de SERB. La efectividad del encerado de frutos cítricos reduciendo la incidencia de SERB se ha visto directamente relacionada con un menor grado de deshidratación del fruto [63]. De igual manera, la menor susceptibilidad al picado se cree relacionado con la capacidad de reducción de pérdida de agua de los tejidos, ya que inhibe el colapso de las células de la epidermis [95]. Teniendo en cuenta que la aplicación de recubrimientos afecta al intercambio gaseoso entre el fruto y la atmósfera que lo rodea, si la barrera al

intercambio gaseoso es muy alta se puede inducir una respiración anaeróbica, con el consecuente incremento de volátiles, como etanol y acetaldehído, responsables de la aparición de malos sabores. Así por ejemplo, se demostró que la cantidad de cera no debe de exceder de 0,2-0,3 mg/cm² para evitar la respiración anaeróbica [96].

1.6.6.1 Recubrimientos tipo cera

Las primeras referencias del uso del encerado, en naranjas y limones, se remontan a los siglos XII –XIII en China [97]. Las primeras patentes de formulaciones de ceras mencionan la inclusión de parafina como material céreo y, junto a ella, diversas mezclas de otros componentes como: carnauba, candelilla y otras ceras, goma laca, aceites vegetales o minerales u otras grasas y emulsificantes y surfactantes [98].

Dado que los primeros recubrimientos de cítricos estaban compuestos por ceras (ésteres de ácidos carboxílicos y alcoholes grasos de cadena lineal), este término genérico se ha venido utilizando durante años para designar a los recubrimientos que se aplican a la fruta, a pesar de que en muchas de las formulaciones existentes en el mercado en la actualidad contienen poca proporción o nada de ceras [99]. Actualmente el tipo de recubrimientos comerciales empleados en la industria citrícola son ‘ceras al agua’ que consisten en disoluciones/dispersiones de una o más resinas y/o ceras emulsionadas [99]. Estas ceras han ido desplazando a las ‘ceras solventes’ que utilizan solventes orgánicos, por el peligro y la contaminación medioambiental que conllevan. Las formulaciones de ‘ceras al agua’ requieren generalmente medios alcalinos para emulsionar la cera y la disolución de la resina (generalmente goma laca), por lo que está extendido el uso de álcalis como el hidróxido potásico, el amoníaco o morfolina en su formulación. Las ceras mayoritariamente empleadas son ceras sintéticas del tipo polietileno oxidado, empleándose en mucha menor medida las ceras vegetales del tipo carnauba y prácticamente testimonial es el uso de ceras de origen animal, como la cera de abeja. Para formar la microemulsión también se añade emulsificantes como el ácido esteárico, palmítico, oleico o acetilglicéridos (ésteres de ácidos grasos con glicerol) [100], [101]. Asimismo, las ceras comerciales en muchos casos incorporan fungicidas sintéticos, como imazalil, tiabendazol u ortofenil fenato sódico, para controlar la

podredumbre verde y azul, que son las principales enfermedades poscosecha de los cítricos.

Los componentes permitidos varían de unos países a otros, debido a diferencias en la legislación y a las exigencias de cada mercado [102], así por ejemplo la legislación en Estados Unidos autoriza el uso de morfolina (CFR 172.235) y la colofonia modificada con anhídrido maléico y esterificada con pentaeritritol (CFR 172.210), mientras que la legislación Europea (Directiva europea 95/2/CE y posterior modificación 98/72/CE) no permite su uso y la morfolina es reemplazada por amoníaco [102]. En función de la finalidad de su uso, se pueden definir dos tipos de encerado: los de conservación y los de comercialización, que se diferencian por el contenido en sólidos en la aplicación. El encerado de conservación se utiliza antes del almacenamiento en las cámaras frigoríficas y su objetivo es mantener el peso, la firmeza y las propiedades organolépticas, no siendo necesario, en general, que mejore la apariencia del fruto. El encerado de comercialización se aplica a la fruta antes de su envío al mercado de consumo, con la finalidad de mejorar el aspecto externo y mantener el peso. Por tanto, el contenido de sólidos en el caso del encerado de conservación no supera al 10-12%, mientras que en el caso de comercialización el contenido de sólidos no supera el 18% [103].

1.6.6.2 Recubrimientos comestibles

El creciente interés de los consumidores hacia productos sanos y naturales ha orientado las investigaciones en el campo de los recubrimientos hacia el desarrollo de nuevos recubrimientos formulados a partir de compuestos naturales, seguros desde el punto de vista alimentario, apareciendo lo que se denominan recubrimientos comestibles. La expansión de los recubrimientos comestibles en cítricos va precedida de un aumento de su aplicación en otros frutos que se consumen con piel. Sin embargo, el futuro desarrollo de recubrimientos comestibles que eviten el uso de ceras sintéticas como el polietileno, o el uso de amoníaco, resulta un aspecto muy importante frente a las nuevas tendencias del mercado. Los principales componentes utilizados en la preparación de estos recubrimientos naturales son proteínas, polisacáridos y lípidos. Además de estos

componentes básicos, se añaden otros aditivos alimentarios, como plastificante, emulsificante, surfactante, conservante, antioxidante, otros, que ayudan a mejorar la integridad mecánica, la calidad, aroma y valor nutricional de los alimentos.

Los Polisacáridos, son los hidrocoloides más utilizados como recubrimientos de frutas y hortalizas y forman parte de la mayoría de las formulaciones que actualmente existen en el mercado [104], [105]. Los polisacáridos presentan buenas propiedades barrera a los gases y pueden adherirse a las superficies de frutas y hortalizas troceados, pero su carácter hidrófilo hace que presenten una baja barrera a la humedad. Los polisacáridos utilizados habitualmente en los recubrimientos comestibles son derivados de celulosa, alginatos, carragenatos, pectinas, almidón, pullulan, quitosanos y gomas [106]. Entre los polisacáridos de uso más extendido en la formulación de recubrimientos comestibles se encuentran los derivados de la celulosa (poli- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa). Debido a la disposición de los grupos hidroximetil en la cadena polimérica, la celulosa presenta una estructura cristalina compacta que impide su solubilidad en sistemas acuosos. Sin embargo, su solubilidad puede ser aumentada mediante la inclusión de grupos funcionales en la cadena a través de reacciones de esterificación, interfiriendo la formación de la estructura cristalina. Cuando se trata la celulosa con álcali, seguido de ácido cloroacético, cloruro de metilo u óxido de propileno se obtiene carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), respectivamente [104]. El aumento de la solubilidad de estos compuestos ha impulsado el desarrollo de recubrimientos comestibles a base de los mismos [107].

El quitosán (polímero de β -1,4-glucosamina), es un componente de la pared celular de los crustáceos, capaz de formar películas semipermeables y que se encuentra entre los polisacáridos utilizados como recubrimientos comestibles. Su aplicación como recubrimiento ha proporcionado buenos resultados en cuanto a reducción de pérdida de peso y mejora de la calidad en diferentes frutas y hortalizas. En concreto, su aplicación en cítricos ha mostrado resultados positivos sobre parámetros como pérdida de peso, firmeza y control de podredumbres [108], [109]. Asimismo, existen estudios que han puesto de manifiesto el efecto antifúngico del quitosán y derivados en otros frutos, como fresa, mango, melocotón [110], [111]. La efectividad de los recubrimientos de

quitosan se ha visto que depende, entre otros factores, del peso molecular y del grado de desacetilación [111].

Las Proteínas, al igual que los polisacáridos, presentan buenas propiedades barrera a los gases, a baja HR, y su carácter polimérico hace que presenten buenas propiedades mecánicas, sin embargo, su carácter hidrófilo hace que presenten una baja barrera a la humedad. Las proteínas utilizadas en la formulación de recubrimientos comestibles pueden ser de origen animal (caseínas y proteínas del suero lácteo) o de origen vegetal (zeína de maíz, gluten de trigo, y proteínas de soja, principalmente) y dependiendo de este origen muestran una amplia variedad de características moleculares. Así, las proteínas varían en su peso molecular, conformación, carga (dependiendo del pH), flexibilidad y estabilidad térmica y las diferencias en estas características moleculares determinarán su habilidad para formar recubrimientos así como las características de los recubrimientos formados.

Los lípidos, por su naturaleza hidrofóbica, ejercen una buena barrera a la humedad; sin embargo, su carácter no polimérico hace que presenten peores propiedades mecánicas que los hidrocoloides formando recubrimientos más quebradizos [112]. Los lípidos utilizados en las formulaciones de recubrimientos incluyen ceras naturales (cera de abeja, cera de candelilla y cera de carnauba), acilgliceroles y ácidos grasos. En ocasiones, en las formulaciones para frutos que se consumen sin piel, como los cítricos, se añade goma laca, que es una resina natural que tiene como principal objetivo aportar brillo.

Teniendo en cuenta las propiedades de los distintos grupos, la tendencia en el desarrollo de recubrimientos comestibles para frutas y verduras es combinar hidrocoloides y lípidos y así aprovechar las ventajas que ambos ofrecen, formando lo que se conoce como ‘recubrimientos comestibles compuestos’. De esta manera, los lípidos aportan resistencia al vapor de agua y los hidrocoloides, la permeabilidad selectiva al O₂ y CO₂, y una buena cohesión estructural o integridad. En el caso de películas comestibles compuestas de hidrocoloide-lípido, el lípido puede encontrarse laminando el hidrocoloide en forma de doble capa o ‘bicapa’, o disperso en la matriz de hidrocoloide en forma de ‘emulsión’. La formación de películas compuestas ‘bicapa’ y ‘emulsionadas’ presentan importantes ventajas y limitaciones que dependen de la

naturaleza de los compuestos que forman las películas y de la morfología de la misma. En general, las películas ‘bicapa’ son más efectivas reduciendo la transferencia al vapor de agua que las películas ‘emulsionadas’. Sin embargo, la obtención de estas películas mediante laminación requiere de dos etapas de laminado y secado, así como el uso de solventes orgánicos y/o altas temperaturas, que hace su obtención más costosa y menos segura que en el caso de las películas ‘emulsionadas’. Las películas comestibles ‘emulsionadas’ requieren un solo paso en su formación, lo que las hace más adecuadas desde el punto de vista de su desarrollo a nivel industrial. Sin embargo, las propiedades barrera y mecánicas de las películas compuestas de hidrocoloide-lípido se ven afectadas por numerosas variables de composición (tipo de lípido e hidrocoloide, contenido de lípido, otras), técnica de preparación (condiciones de secado, homogeneización, otros) y estructura [113]. Cuando el recubrimiento se encuentra aplicado a frutas y hortalizas, aparte de la composición del recubrimiento, existen otros factores a tener en cuenta que afectan la efectividad de los recubrimientos, como son el tipo de fruta y cultivar, el grosor del recubrimiento (que se ve modificado por cambios en el contenido en sólidos y viscosidad de las formulaciones), la adhesión del recubrimiento a la superficie del fruto (que depende de la naturaleza de la superficie y de las características del recubrimiento) y de las condiciones de almacenamiento (temperatura y HR). El efecto de los recubrimientos comestibles en la calidad nutricional de cítricos ha sido poco estudiado. Un reporte indica la pérdida de ácido ascórbico después del almacenamiento se detuvo cuando las mandarinas se recubrieron con CMC [114]. Este resultado se explicó por la barrera a los gases que ejercen los recubrimientos, creando una AM, lo que disminuyó el potencial de auto-oxidación del ácido ascórbico.

1.7 Consideraciones y aproximación analítica para el estudio del metabolismo vegetal

La evaluación de la calidad poscosecha de los cítricos se ha enfocado fisicoquímicamente hacia parámetros como la pérdida de peso, firmeza, color, índice de madurez, pH y acidez. La evaluación sensorial de las frutas ha cobrado importancia con el objetivo de establecer los estándares de calidad y de alteración de las características

organolépticas del fruto durante la manipulación poscosecha. En la actualidad, la calidad nutricional ha pasado a tener gran interés, siendo un componente de la calidad global muy valorado por el consumidor. Numerosos ensayos clínicos y estudios epidemiológicos han evidenciado que el consumo de frutas y verduras es beneficioso para la salud y contribuye a la prevención de los procesos degenerativos, previniendo accidentes cerebrovasculares y cardiovasculares y bajando la tasa de incidencia y mortalidad de cáncer.

En particular, los cítricos constituyen una importante fuente nutricional de vitaminas, caracterizándose por su alto contenido en vitamina C. La vitamina C es un gran contributor de la capacidad antioxidante de los cítricos. Además, los cítricos son una fuente de compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes, como por ejemplo los flavonoides [115]. La variedad y abundancia de compuestos antioxidantes en los cítricos posibilita la aparición de sinergias entre estos compuestos contribuyendo a la capacidad antioxidante total de estas frutas. Por tanto, la aplicación de las distintas tecnologías poscosecha debe mantener la calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de los frutos hasta que estos llegan al consumidor. Como se mencionó antes, bajo las condiciones de conservación de algunas tecnologías poscosecha, es inevitable que la fruta sufra alteraciones en su metabolismo dadas las propiedades y la intensidad de los estímulos aplicados, durante el uso de materiales de recubrimiento en cítricos se han identificado una serie de afectaciones que caracterizan el nivel de impacto de estos materiales en el estatus metabólico y en la calidad final de los productos, el abordaje de este impacto aplica el uso combinado de diferentes tecnologías y el análisis de algunos grupos específicos de sustancias trazadores de cambios en el metabolismo vegetal. Estas sustancias están integradas en el metabolismo primario y secundario de los frutos, marcan cambios importantes dados los procesos de desarrollo, crecimiento, maduración y en la senescencia de los frutos una vez han sido cosechados, a continuación se mencionan grupos de sustancias que constituyen parámetros para el estudio de la actividad metabólica.

1.7.1 Cociente respiratorio

Para determinar la naturaleza del sustrato metabólico utilizado en la respiración se utiliza normalmente el cociente respiratorio (CR) que se define como la relación entre el volumen de dióxido de carbono (CO_2) desprendido y el volumen de oxígeno absorbido (O_2) por el fruto en un mismo tiempo.

Valores de CR próximos a la unidad, indican que los sustratos utilizados mayoritariamente en el proceso respiratorio son los hidratos de carbono (si es glucosa el sustrato que se está oxidando, el CR es 1,00), en tanto que la oxidación de ácidos orgánicos provenientes de las vacuolas, que pueden ser movilizados para su empleo por las mitocondrias como sustratos oxidables en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, da lugar a valores de CR superiores a la unidad. En la mayoría de los tejidos vegetales, en condiciones normales, el CR se encuentra en el entorno de 0,97-1,17, señalando una respiración oxidativa de carbohidratos como proceso dominante [116].

En los cítricos, en atmósfera suficientemente oxigenada y a temperaturas inferiores a 25°C se obtienen valores de CR cercanos a la unidad. La oxidación de los hidratos de carbono exige en muchos casos una degradación enzimática previa de los carbohidratos de reserva, presentes en la mayoría de los frutos, a glucosa [117]. Por tanto, las modificaciones en el cociente respiratorio a lo largo del desarrollo y el almacenamiento pueden indicar el cambio del tipo de sustrato que está siendo metabolizado.

Bajo algunas condiciones de almacenamiento, el oxígeno atmosférico puede quedar considerablemente reducido y resultar insuficiente para un metabolismo plenamente aeróbico. En estas condiciones, los tejidos pueden iniciar una respiración anaeróbica en la que la glucosa se convierte en pirúvato por la vía EMP, el pirúvato se transforma en ácido acético, ácido láctico o acetaldehído y seguidamente en etanol en el proceso denominado fermentación. La concentración de oxígeno a la que se inicia la fermentación varía con los tejidos y se conoce como punto de extinción o umbral fermentativo. La concentración de oxígeno del punto de extinción depende de numerosos factores, tales como la especie, el cultivar, el grado de madurez y la temperatura [118].

La reacción global de la respiración vegetal es la siguiente [119]:



La reacción global de la fermentación etílica es la siguiente [119]:



Cuando las células funcionan con esta vía metabólica y comienzan a producir etanol, la tasa respiratoria aumenta con el consiguiente aumento en la producción de CO₂. Esto es debido al bajo rendimiento energético que se produce bajo condiciones anaeróbicas (2 equivalentes de ATP por mol de glucosa frente a 36 equivalentes de ATP por mol de glucosa que se liberan en las rutas aeróbicas). Por lo tanto se debe oxidar mucha más glucosa para mantener el nivel energético que la célula necesita [120].

Si bien la respiración anaeróbica produce mucha menos energía por mol de glucosa que la respiración aerobia, al menos permite poner a disposición de los tejidos cierta cantidad de energía en condiciones adversas. También produce metabolitos que son dañinos para el tejido vegetal como el etanol, el lactato, el acetato que si no se extraen rápidamente, la fermentación termina por envenenar a las células en poco tiempo [116]. En un mismo organismo pluricelular pueden darse tanto rutas aerobias como anaerobias, según las condiciones ambientales de sus células.

1.7.2 Compuestos volátiles

Todas las frutas, hortalizas y plantas sintetizan diversos y variados compuestos de bajo peso molecular (C₁, C₂, y C₁₀/C₁₅ principalmente, inferiores a 250 Da), volátiles a la temperatura ambiente. No son cuantitativamente mayoritarios, generalmente los volátiles se encuentran presentes en cantidades extremadamente pequeñas (normalmente menos de 100 microgramos por gramo de peso fresco), se utilizan como marcadores del metabolismo y se les atribuyen las características aromáticas de las frutas y hortalizas [121].

La mayoría de las frutas y hortalizas contienen más de 100 especies volátiles, casi todas ellas en cantidades mínimas. Los componentes volátiles de los productos vegetales poscosecha representan un espectro muy amplio de compuestos químicos. Estos incluyen ésteres, lactonas, alcoholes, ácidos aldehídos, cetonas, hidrocarburos, algunos fenoles y éteres [120] (Kays, 1991). Muchos de ellos, como el etanol, son comunes a todas las frutas y hortalizas [121] (Wills *et al.*, 1984). Los compuestos volátiles del aroma de los productos poscosecha se forman de tres maneras diferentes:

1. Muchos de ellos se forman naturalmente a través de enzimas que se encuentran en el tejido vegetal intacto por las siguientes vías biosintéticas: isoprenoide que origina los terpenos (limoneno por ejemplo); la vía del ácido shikímico que produce el alcohol benzilo, el benzaldehído y otros compuestos fenólicos; la beta-oxidación que representa una vía importante de producción de volátiles por oxidación de los ácidos grasos: ácidos oleico, linoleico y linolénico; la vía fermentativa que produce acetaldehído y etanol [120].
2. Un segundo grupo de volátiles se produce enzimáticamente tras un daño en el tejido vegetal. El daño celular permite que las enzimas y sus sustratos que previamente estaban aislados, interactúen [120].
3. El tercer grupo de volátiles se forma a través de una reacción química, que ocurre durante el proceso de calentamiento o cuando se cocina un alimento [120].

Los volátiles producidos en productos recolectados pueden verse alterados por varios factores, que incluyen el cultivar, la madurez, la estación, las prácticas de producción, de recolección, almacenamiento, maduración artificial y eventualmente los métodos de preparación de los productos. Debido a la importancia de los volátiles en la calidad del aroma y del sabor de los productos cosechados, los cuidados en el periodo de poscosecha deben ser máximos para minimizar cambios indeseables en la producción de volátiles. En el caso de los cítricos, si se recolectan en un estado inmaduro, esto puede tener un efecto negativo en su aroma y sabor [120]. El aroma de los frutos cítricos, es una compleja mezcla de compuestos volátiles. Los más característicos corresponden a ésteres y aldehídos, seguidos por alcoholes, cetonas e hidrocarburos [122]. En estudios realizados en zumo de naranja fresco [123], aplicando headspace/cromatografía de

gases (HS/GC), se identificaron alrededor de 20 componentes cuantitativamente importantes del aroma y sabor. De ellos, 8 son alcoholes, 4 aldehídos, 3 ésteres, y 5 hidrocarburos como puede observarse en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes volátiles del aroma y sabor del zumo cítrico fresco.

Componente	Rango (ppm)
ALDEHIDOS	
Acetaldehído	6,5 - 15
Hexanal	0,04 – 0,38
Octanal	0 - 0,04
ESTERES	
Etil Acetato	0,01 – 0,58
Metil Butirato	0,01 – 0,58
Etil Butirato	0,26 – 1,02
ALCOHOLES	
Metanol	10 -71
Etanol	75 -780
2-Metil-1-Propanol	0 – 0,07
Hexanol	0,04 – 0,22
cis-3-Hexenol	0,06 – 0,65
Trans-2-Hexenol	0,06 – 0,65
HIDROCARBUROS	
α - Pineno	trazas – 0,22
Sabineno	0 – 0,15
γ -Terpineno	0,04 – 0,46
Valenceno	0,8 – 15,30
Limoneno	22 – 67

Tomado de: Nísperos-Carriedo y Shaw, 1990.

1.7.3 Ácidos grasos (AG)

Se conoce bien la relación entre la presencia de ácidos grasos en frutos y productos derivados de cítricos con bastante anterioridad, el contenido de lípidos en frutas cítricas tiene influencia en la estabilidad del zumo y modifica marcadamente el sabor después de procesos de pasterización y almacenado. Los AG más comúnmente encontrados en cítricos son el ácido palmítico, palmitoleico, oleico y linoleico, los cuales representan el 92-97% de los AG con cadena lineal y ramificados. La relación entre estos cinco ácidos depende de la especie vegetal [124], también se presentan bajas cantidades de AG con con menos de 16 carbonos (C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₅) y de más de 18 carbonos (C₂₂, C₂₄, C₂₉) [124], se ha reportado que el ácido esteárico es menos del 1% en la fracción. Este tipo de diferencias significativas en el contenido de lípidos entre los diferentes cítricos a permitido la diferenciación de algunas especies con fines de identificación, de esta

forma el perfil de AG puede ayudar en la identificación de cultivares. Dado esto, el perfil de AG se propuso como marcador quimiotaxonómico para definir el parentesco de híbridos. En muchos zumos de cítricos el linoleico es el ácido mayoritario (21-39%) del total de la fracción de AG, seguido por oleico (6-37%), palmítico (17-25%), linoleico (6-18%) y palmitoleico (1-7%) [125].

La formación de ácidos grasos durante la formación, crecimiento, maduración y senescencia del fruto han revelado algunas variaciones: $C_{16:0}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$ decrecen, mientras $C_{16:1}$ y $C_{18:1}$ se incrementan, probablemente mediante reducción enzimática de $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$ durante el periodo de crecimiento. Durante la madurez óptima los cambios son leves ($C_{18:2}$ se iguala con $C_{18:3}$); durante la senescencia el contenido de $C_{18:3}$ varía, disminuyendo en algunos cultivares y aumentando en otros. Algunos autores han demostrado que las naranjas son capaces de sintetizar ácido linoleico a lo largo de crecimiento, causando reducción de $C_{18:1}$ y $C_{18:2}$, caso contrario a lo que ocurre en frutos climatéricos, al parecer durante la senescencia el ácido linoleico se convierte en etileno por una reacción catalizada por lipoxigenasa [126], se demostró que en manzanas el etileno se puede formar a partir de ácido linoleico por este mecanismo, esta conversión se ha propuesto para los cítricos, incluso otro autor, Hitchcock, registró un aumento de la producción de etileno en naranjas durante el almacenamiento y correlacionaron esto con una disminución del porcentaje de lípidos polares a lo largo del mismo período. Durante el almacenamiento de jugos ocurre un incremento en la producción de AG liberados de lípidos mediante lipólisis oxidativa, causando la formación de aldehídos cetonas y AG de cadena corta, a los que se les responsabiliza por la aparición malos aromas y sabores [127].

1.7.4 Metabólitos polares no volátiles; sólidos solubles totales (SST)

Los azúcares y ácidos orgánicos son los componentes principales de los sólidos solubles de los zumos de las frutas cítricas, como se observa en la tabla 4. Durante la maduración de los cítricos el contenido en azúcares se incrementa hasta llegar a un máximo y después suele mantenerse. Por el contrario el contenido en ácidos decrece, como consecuencia de su dilución y metabolismo.

En relación a la calidad interna en frutos cítricos, existen tres factores organolépticos importantes que dependen de estas sustancias: sabor, el aroma y la comestibilidad: El sabor, (también denominado equilibrio acidez-dulzor) en las naranjas y mandarinas por ejemplo, se debe en su mayor parte a los azúcares (mono, di y trisacáridos) y ácidos orgánicos (cítrico, fosfórico, málico, fumarico, ascórbico, succínico y otros). El aroma es debido a distintos compuestos que producen la sensación olfativa que se tiene cuando se consume la fruta y que matiza el sabor de cada una de las variedades y dentro de cada variedad el origen, Sala [128], mide el sabor y el aroma mediante paneles de catadores que clasifican la fruta con puntuaciones que van del 1 al 10. Establece relaciones entre algunos factores objetivos (índice de madurez (IM) y contenido en sólidos solubles, pulpa y zumo), la aceptación se evalúa por un panel de catadores expertos que califican la aceptación global de la muestra con arreglo a una escala Hedónica. Un fruto es fácilmente comestible cuando después de masticar sus gajos o segmentos, resulta fácil y agradable ingerir la parte sólida de los mismos juntamente con el zumo. Los azúcares constituyen alrededor del 76% de los SST lo que explica su elevada correlación medidos con un refractómetro y el contenido en azúcares. [129]. Los sólidos solubles son fáciles y rápidos de medir con un refractómetro, una metodología que tradicionalmente sustituye al análisis individual de los azúcares, que poseen una mayor complejidad química. Se sugiere clasificar la fruta en: de bajo contenido en sólidos si tienen menos del 10%, contenido medio entre 10 y el 12%, y contenido elevado si el contenido es superior al 12%.

Tabla 4. Composición porcentual de la fracción de sólidos solubles en un zumo de N. valencia en etapa madura

Grupos de constituyentes totales	Numero de constituyentes	% Sólidos solubles
Carbohidratos	10	76,00
Ácidos orgánicos	13	9,60
Aminoácidos libres	19	5,40
Iones inorgánicos	67	3,20
Vitaminas	14	2,50
Constituyentes lipídicos	26	1,20
Bases nitrogenadas	6	0,40
Flavonoides	24	0,81
Constituyentes volátiles	192	0,38
Carotenos	21	0,01
Enzimas (algunas identificadas plenamente)	49	-
Total	441	99,50

Tomado de: Sinclair W B, Bartholomew E T. 1947.

Su utilización se basa en el hecho de que, a medida que la fruta madura, el contenido en ácidos disminuye mientras que la cantidad de sólidos solubles prácticamente no varía [130]. A partir de 15° de acidez, en dicho estudio, el grado de aceptación es superior al 80%. Según Sala [128], el coeficiente de correlación entre acidez y aceptación para las Navelinas es elevado (-0,8003), si bien es mayor el que existe entre comestibilidad y aceptación (0,9706).

Cuando se analiza el IM a lo largo del periodo de maduración se observa una relación lineal. La pendiente de la recta ajustada indica el aumento de índice de madurez por día y es una medida de la rapidez con la que suceden cambios bioquímicos importantes asociados a la madurez del fruto. El Índice de madurez es el indicador químico que con mayor frecuencia se ha utilizado para determinar la madurez mínima exigible para iniciar la recolección. Se considera sin embargo que el Índice de madurez, por sí mismo, no puede ser criterio definitivo del valor comercial de una naranja, por dos razones fundamentales [131]:

- a) La gran variación en la preferencia de los consumidores.
- b) La gran diferencia en el contenido de ácido cítrico de las distintas variedades.

La determinación del valor de IM se puede calcular a través de la ecuación III:

$$\text{Índice de madurez} = E (\text{° Brix})/A (\text{\% acidez}) \quad (\text{III})$$

E = extracto seco ó Lectura del refractómetro; A: acidez expresada en gramos de ácido cítrico anhidro contenidos en un litro de jugo. Se calcula multiplicando los C.C. de NaOH 0.1 N empleados en neutralizar 5 C.C. de jugo por un factor de: 1,28.

1.8 Técnicas instrumentales de soporte experimental

1.8.1 Cromatografía de gases/Espectrometría de Masas (GC/MS)

El primer trabajo en el que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, es en la actualidad la plataforma tecnológica más ampliamente utilizada para la separación de los componentes volátiles, semivolátiles y polares en muestras de complejas. La combinación de alta resolución, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido una técnica de rutina usada en muchos laboratorios para análisis químico y bioquímico.

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en un puerto que permanece caliente y allí se mezcla con el gas portador (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna capilar. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como consecuencia de la diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en fracciones que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores específicos.

La extracción de espacio en cabeza (HS: Head-Space) permite la inyección de análogos volátiles que provienen de muestras sólidas o líquidas en forma directa al puerto de inyección, durante este proceso, la mayor parte de los compuestos volátiles se transfieren al aire (espacio de cabeza) de un vial sellado que contiene la muestra, se calienta el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio. Posteriormente, con una jeringa o una fibra de microextracción (HS-SPME, solid phase microextraction) se toma una cantidad de muestra del aire del vial y se aplica en el cromatógrafo.

La Espectrometría de Masas EM, es utilizada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. Sus principales cualidades son: Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada

molécula. Cuantificación, permite medir la concentración de las sustancias. Gran sensibilidad, capacidad de detección a concentraciones del orden de nanogramo (ng) 10^{-9} g. Universal y específica, proporciona información estructural sobre la molécula analizada. Suministra información isotópica. Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de compuestos.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía (70 eV), capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de cada molécula, muchas veces de sus propios isómeros y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria de un computador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen.

La cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas GC/MS, en principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la

corriente iónica total generada en la fuente ionización, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o TIC (Total Ion Current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a picos gaussianos de áreas relacionadas a la concentración de cada compuesto detectado mediante sus propios factores de respuesta.

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIM (Single Ion Monitoring). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total TIC y aumentándose la selectividad del método.

1.8.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución/Arreglo de Diodos (HPLC/DAD)

La Cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas, entre las sustancias analizadas, la columna cromatográfica y una fase móvil.

En HPLC isocrática o por gradiente, las sustancias pasan por una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar se introduce en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria, presentándose diferentes tiempos de retención (Tr) de los componentes de la muestra. El Tr se considera una propiedad identificativa de cada compuesto en condiciones cromatográficas específicas. Al finalizar la interacción de los componentes con la columna llegan al detector, Un detector para cromatografía es un dispositivo utilizado para visualizar los componentes de la mezcla que se eluyen de la columna. Los detectores de arreglo de diodos (Diode

Array Detector, DAD) son la tecnología de elección para biodescubrimiento. Estos detectores de alta sensibilidad permiten adquirir la respuesta de los compuestos eluidos a longitudes de onda en el espectro ultravioleta y visible, y proporcionar una respuesta sensible cuantitativa y cualitativa con respecto a los cromóforos de los análogos. HPLC-DAD es una potente tecnología de análisis adecuados para dereplicación.

1.8.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica (atomic force microscopy, AFM) es una técnica que pertenece al conjunto de microscopias de barrido con sondas, el instrumento consiste básicamente en una plataforma y una sonda que efectúa un barrido o escaneado de la muestra. El barrido puede hacerse moviendo ya sea la sonda o la plataforma, mediante actuadores de gran precisión. La sonda puede elevarse o bajarse, con lo que se tiene un sistema con tres ejes coordenados, por una parte un plano x-y de barrido y por otra parte una altura z, con lo cual se puede estudiar el relieve o la topografía de las microestructuras. No sólo se mide la geometría de la muestra sino que según el tipo de sonda usada se puede medir también propiedades químicas, térmicas, eléctricas o mecánicas o texturales, con lo cual se abre una ventana muy amplia de información, que permite estudiar las propiedades de los materiales a escala nano.

El instrumento muestrea la superficie mediante una punta muy pequeña de unos pocos micrones de largo y un diámetro más pequeño aún, de unos diez nanómetros. La punta está adherida a una barra flexible o cantiléver. Esta barra es como una "viga en voladizo" miniaturizada y se dobla cuando la punta hace contacto con la muestra. La mayoría de los AFM comerciales detectan la posición del cantiléver con métodos ópticos, uno de los sistemas más comunes es usar un rayo láser que se refleja en la punta del cantiléver y luego actúa sobre un fotodetector. El detector contiene particiones que permiten detectar cambios pequeños en la posición del haz incidente, el camino óptico entre el cantiléver y el detector produce una amplificación mecánica de la señal del láser y como consecuencia el sistema llega a detectar movimientos verticales de la punta con una precisión inferior a un angstrom. Las fuerzas que actúan sobre el cantiléver son varias, una de ellas son las fuerzas de Van der Waals que ocurren entre

átomos. Estas fuerzas pueden ser de atracción o de repulsión, dependiendo de la distancia entre los átomos. La señal del detector puede procesarse mediante un software permitiendo realizar mediciones topográficas a escala nanométrica, incluso siendo posible determinar índices de rugosidad del material.

1.9 Referencias Bibliográficas

1. FAO, 2007. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales. 2007. División FAO.
2. United States Department of Agriculture USDA, 2011. NASS February forecast.
3. Milind S, L., Commercial fresh citrus cultivars and producing countries, in Citrus Fruit. 2008, Academic Press: San Diego. p. 13-V.
4. FAO, 2009. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales. 2009. División FAO.
5. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005. Observatorio Agrociudades Colombia. Documento de trabajo no. 107. La cadena de cítricos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. Bogotá DC. 1991-2005.
6. Ladaniya, M. 2007. Citrus fruit: Biology, technology and evaluation. Published by academic press.
7. United States Department of Agriculture USDA, 2011. FAS January. Citrus: World Markets and Trade.
8. Khazaei, J.; Massah, J.; Mansouri, G. H., Effect of some parameters of air-jet on pneumatic extraction of citrus juice and juice sacs. Journal of Food Engineering 2008, 88, (3), 388.
9. Milind S, L., Preparation for fresh fruit market, in Citrus Fruit. 2008, Academic Press: San Diego. p. 229-XI.
10. Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T. and MOHAN R. (2000), Biotechnological potential of agro-industrial residues. II. Cassava bagasse. Biores. Technol. 74, 81-87.
11. Vandenberghe, L. P. S.; Soccol, C. R.; Pandey, A. and Lebeault, J. M. (2000c), Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. Biores. Technol., 74, 175-178.
12. Braddock, R. J., 1995, Byproducts of citrus fruits. Food Technol., 49: 74-77.
13. Del RY, J. A, Fuster, M. D, Sabater, F, Porras, I, Garcy, Lido, A, Ortun, A., 1997, Food Chemistry, 59: 433-437.
14. Matura, R., Ukeda, H., Sawamura, M. 2006. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 2309-2313.
15. Viuda, M. M., Ruiz, N., Y., Fernandez, L. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) Essential Oils. Food Control, 19, 1130-1138.
16. Stashenko, E. E., Martinez, R., Pinzon, M.H., Ramirez, J. 1996. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (*Citrus sinensis*). Journal of Chromatography A, 752, 217-222.
17. Cuquerella, J. 1990. Efectos de distintos recubrimientos cerosos y plásticos en la fisiología postcosecha y en la calidad de frutos cítricos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
18. Day, B. 1993. Fruit and vegetables. En Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods. Ed. R. Parry, Blackie Academic & Professional, London, UK, pp. 115-133.

19. Kader, A.A. 1992. Modified atmospheres during transport and storage. En Postharvest Technology of Horticultural Crops. Ed. A.A. Kader, Division of Agriculture Natural Resources, University of California 3311, 85-92.
20. Hagenmaier, R.D. 2000. Evaluation of a polyethylene-candelilla coating for 'Valencia' oranges. Postharv. Biol. Technol. 19(2), 147-154.
21. Ahmed, M.; Khan, I. 1987. Effect of waxing and cellophane lining on chemical quality indices of citrus fruits. Plant Foods for Human Nutrition 37, 47-57.
22. Cohen, E.; Shalom, Y.; Rosenberger, I. 1990. Postharvest ethanol build up and off-flavor in 'Murcott' tangerine fruits. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(5), 775-778.
23. Ke, D.; Kader, A.A. 1990. Tolerance of 'Valencia' oranges to controlled atmospheres as determined by physiological responses and quality attributes. J. Am. Soc. Hort. Sci. 115, 779-783.
24. Kader, A.A. 2002. Postharvest biology and technology: an overview. En: Postharvest Technology of Horticultural Crops. Ed. A.A. Kader, Division of Agricultural and Natural Resources. pp 39-48.
25. Biale, J. 1960. Postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. Adv. Food Res. 10, 293-354.
26. Parker, M., wardoswki, W., Dewey, D. 1984. A damage test for oranges in a commercial packing house line. Proc. Fla. State Hort. Soc. 94, 136-137.
27. Kader, A.A. 1985. Ethylene induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. Postharvest technology of horticultural crops. 20(81), 54-57.
28. Mishra, V.K., Gamage, T.V. 2007. Postharvest physiology and of fruits and vegetables. 19-43. En: Handbook of Food Preservation Autor M. Shafiur Rahman. Published by CRC press.
29. Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publ. Co, Inc.
30. Ben-Yehoshua, S.; Burg S.P.; Young R. 1985. Resistance of citrus fruit to mass transport of water vapour and other gases. Plant Physiol. 79, 1048.
31. Martínez-Jávega, J.M., Navarro, P., Cuquerella, J., del Río, M.A. 1999. Aplicaciones del frío en postcosecha de cítricos: panorama actual. Rev. Levante Agrícola, n°348, Especial postcosecha, pp. 253-262.
32. Waks, J.; Chalutz, E.; Schiffmann-Nadel, M.; Lumenic, E. 1985. Relationship among ventilation of citrus storage room, internal fruit atmosphere, and fruit quality. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110, 398-402.
33. Thompson, J.F. 2002. Storage systems, in: Kader, A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops. Regents of the University of California, Division of Agricultural and natural Resources, Oakland, CA, pp. 113-128.
34. Woods, J.L. 1990. Moisture loss from fruits and vegetables. Postharvest news and information 1(3), 195-199.
35. Ben-Yehoshua, S. 1969. Gas exchange, transpiration and commercial deterioration in storage of oranges fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94, 524-526.
36. Jiménez-Cuesta, M.; Cuquerella, J.; Martínez-Jávega, J.M. 1983. Los recubrimientos plásticos en la comercialización de los cítricos. Levante Agrícola N° 247/248, 168-172.

37. Grierson, W. 2002. Role of temperature in the physiology of crop plants: Pre and Postharvest. En: Handbook of plant and crop physiology. Eds. Mohammad and Pessarakli. Pub. CRC, p.973.
38. Agustí, M.; Almela, V.; Zaragoza, S.; Gazzola, R.; Primo Milo, E. 1997. Alleviation of peel pitting of fortune mandarin by the polyterpene pinolene. *Journal of Horticultural Science* 72(4), 653-658.
39. Martínez-Jávega, J.M., del Río, M.A. 1998. Desórdenes fisiológicos en cítricos. En: Manejo poscosecha de frutas y verduras en Iberoamérica. Ed. R. Báez. CYTED-RITED, Hermosillo, México. Pp. 57.62.
40. Roger, S. 1998. Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización. Ed. Comité de gestión para la exportación de cítricos. Castellón. pp. 153.
41. Tuset, J.J. 1987. Podredumbre de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana (España), pp. 206.
42. Tuset, J.J. 1999. Perspectivas del control de podredumbres en poscosecha de cítricos. *Rev. Levante Agrícola* 348, 272-280.
43. Martínez-Jávega, J.M. 1995. Tendencias actuales en la conservación refrigerada de frutas, como marcadores de la calidad higiénica de los frutos. *Lérida. Microbiología SEM* 11, 111-114.
44. Ben-Yehoshua, S.; Porat, R. 2005. Heat treatments to reduce decay. Chapter 2. En: *Environmentally Friendly Technologies for Agricultural Produce Quality*. Author Shimshon Ben-Yehoshua. Published by CRC Press, pp. 11-42.
45. Artés, F. 2000. Tratamientos alternativos para preservar mejor la calidad de los cítricos refrigerados. *Levante Agrícola* 352, 229-238.
46. Smilanick, J.L.; Brown, E.G.; Eckert, J.W. 2006. The biology and control of postharvest diseases. En. *Fresh citrus fruits*, 2d. Ed. Edited by Wilfred F. Wardowski, William M. Miller, David J. Hall and William Grierson.
47. Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments of horticultural crops. *Hort. Rev.* 22, 91-121. Paull, R.E.; Chen, N.J. 2000. Heat treatments and fruit ripening. *Postharv. Biol. Technol.* 21, 21-37.
48. Rodov, V.; Ben-Yehoshua, S.; Kim, J.J.; Shapiro, B.; Itta, Y. 1992. Ultraviolet illumination induces scoporone production in Kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117, 788-792.
49. Palou, L.; Smilanick, J.L.; Usall, J.; Viñas, I. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by not water, sodium carbonate sodium bicarbonate. *Plant Disease* 85(4), 371-376.
50. Wilson, C.L.; Wisniewski, M. 1989. Biological control of postharvest disease. *Annual Rev. Phytopathol* 27, 425-442.
51. Echeverría, E.D.; Ismail, M. 1987. Changes in sugar and acids of citrus fruits during storage. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 100, 50-52.
52. Brezmes Llecha, J.; Saiz Laudo, G.; Llobet Valero, E.; Vilanova Salas, X.; Correig Blanchar, X. 1999. Diseño de una nariz electrónica para la determinación no destructiva del grado de maduración de la fruta dulce. *Fruticultura Profesional* 105, 6-16.

53. Burdon, J.N. 1997. Postharvest handling of tropical and subtropical fruit for export. Chapter 1. CAB International, 1997. Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits. Ed. S.K. Mitra.
54. Del Río, M.A.; Martínez-Jávega, J.M. 1997. Fisiopatías en post-recolección de cítricos. *Phytoma España* 90, 1081-1083.
55. Liu, F.W. 1992. Sistemas de almacenamiento para productos hortícolas. En: *Fisiología y tecnología poscosecha de productos hortícolas*. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo. Edita Limusa. México. 103-117.
56. Arpaia, M.; Kader, A. 2000. Recomendaciones para preservar la calidad poscosecha de los cítricos. *Levante Agrícola* 352, 239-243.
57. Lee K.; Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* 20, 207-220.
58. Miller, E.V.; Heilman, A.S. 1952. Ascorbic acid and physiological breakdown in the fruits of the pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Science* 116, 505-506.
59. Wills, R.H.; Lee, T.H., McGlasson; W.B., Hall, E.G.; Graham, D. 1984. Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas en post-recolección. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, p.195.
60. Kramer, G.F.; Wang, C.Y.; Conway, W.S. 1991. Inhibition of softening by polyamine application in 'Golden Delicious' and 'McIntosh' apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116, 813-817.
61. Ponappa, T.; Scheerens, J.C.; Miller, A.R. 1993. Vacuum infiltration of polyamines increases firmness of strawberry slices under various storage conditions. *J. Food Sci.* 58, 361-364.
62. Meir, S.; Philosoph-Hadas, S.; Laurie, S.; Droby, S.; Akerman, M.; Zauberman, G.; Shapiro, B.; Cohen, E.; Fuchs, Y. 1996. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Can. J. Bot.* 74, 870-874.
63. Cuquerella, J.; Saucedo, C.; Martínez-Jávega, J.M.; Mateos, M. 1988. Influencia de la temperatura y envolturas plásticas en la conservación de mandarinas 'Fortune'. *Actas de Horticultura de la SECH.* 2, 410-417.
64. Schirra, M.; D'Hallewin, G. 1997. Storage performance of 'Fortune' mandarins following hot water dips. *Postharv. Biol. Technol.* 10, 229-238.
65. Laurie, S.; Klein, J.D.; Watkins, C.; Ross, G.; Boss, P.; Ferguson, I.F. 1993. Prestorage heat treatment of tomatoes prevents chilling injury and reversibility inhibits ripening. *Acta Horticulturae* 343, 283-285.
66. Whitaker, B.D. 1993. A reassessment of heat stress as a means of reducing chilling injury in tomato fruit. En *Physiological Basis of Postharvest Technologies*. *Acta Horticulturae* 343, 281-282.
67. Artés, F. 1995. Revisión: Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la posrecolección. II Tratamientos térmicos cíclicos. *Revista Española de ciencia y Tecnología de Alimentos* 35, 139-149.
68. Artés, F.; Cano, A.; Fernandez-Trujillo, J.P. 1996. Pectolytic Enzyme Activity during Intermittent Warming Storage of Peaches. *J. Food Sci.* 61, 311-313.
69. Schirra, M.; Mulas, M. 1995. Fortune mandarin quality following restorage water dips and intermittent warming during cold storage. *HortSci.* 30(3), 560-561.

70. Schirra, M.; D'Hallewin, G. 1997. Storage performance of 'Fortune' mandarins following hot water dips. *Postharv. Biol. Technol.* 10, 229-238.
71. Wild, B.L.; Hood, C.W. 1989. Hot dip treatments reduce chilling injury in long-term storage of Valencia oranges. *HortScience (USA)* 24(1), 109-110.
72. Wills, R.; McGlasson, B.; Graham, D.; Joyce, D. 1998. *Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetable and ornamentals.* Ed. Cab International, New York, U.S.A. p.262.
73. Baldwin, E.A. 1994. Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future. Eds. J.M. Krochta; E.A. Baldwin; M.O. Nisperos- Carriedo, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, U.S.A., pp. 24-64.
74. Ke, D.; Kader, A.A. 1990. Tolerance of 'Valencia' oranges to controlled atmospheres as determined by physiological responses and quality attributes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115, 779-783.
75. Beaudry, R.M. 1999. Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharv. Biol. Technol.* 15, 293-303.
76. Artés, F. 2000. Tratamientos alternativos para preservar mejor la calidad de los cítricos refrigerados. *Levante Agrícola* 352, 229-238.
77. Alonso, M.; Jacas, J.; del Río, M.A. 2005a. Carbon dioxide diminishes cold tolerance of third instar larvae of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) in 'Fortune' mandarins: Implications for citrus quarantine treatments. *Postharvest Biol Technol* 36, 103-111.
78. Follett, P.A.; Neven, L.G. 2006. Current trends in quarantine entomology. *Annual Review of Entomology* 51, 359-385.
79. Neven, L.G.; Rehfield-Ray, L. 2006. Confirmation and efficacy tests against codling moth and oriental fruit moth in apples using combination heat and controlled atmosphere treatments. *J. Econ. Entomol.* 99(5), 1620-1627.
80. Palou, L.; Jacas, J.A.; Marcilla, A.; Alonso M.; del Río, M.A. 2008. Physico-chemical and sensory quality of 'Clemenules' mandarins and survival of the Mediterranean fruit fly as affected by complementary cold and carbon dioxide quarantine treatments. *Postharvest Biology and Technology* 48, 443-450.
81. Mitchell, G.; Kader, A.A. 1992. Postharvest treatment for insect control. En: *Postharvest Technology of Horticultural Crops.* Ed. A.A. Kader, Univ. of California 33, 161-165.
82. Martínez-Solano, J.R.; Sánchez-Bel, P.; Valedenegro-Espinoza, M.; Martínez-Madrid, C.; Sánchez, A.; Romojaro, F. 2001. Efectos de la ionización con electrones acelerados sobre las frutas y hortalizas destinadas al consumo en fresco. *Publ. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación* 11, 28-38.
83. Hallman, G.J. 1999. Ionizing radiation quarantine treatments against tephritid fruit flies. *Postharv. Biol. Technol.* 16, 93-106.
84. Yu, L.; Reitmeier, C.A.; Love, M.H. 1996. Strawberry texture and pectin content as affected by electron beam irradiation. *J. Food Sci.* 61(4), 844-846.
85. Tomas-Barberan, F.A.; Espin, J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruit and vegetables. *Journal of the Food Science and Agriculture* 81, 853-876.

86. Bhat, R.; Sridhar, K.R.; Bhushan, B. 2007. Free radicals in velvet bean seeds (*Mucuna pruriens* L. DC.) and their status after gamma irradiation and conventional processing. *LWT Food Science and Technology* 40, 1570-1577.
87. González-Aguilar, G.A.; Zavaleta-Gatica, R.; Tiznado-Hernández, M.E. 2007b. Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biology and Technology* 45, 108-116.
88. Miller, W.R.; McDonald, R.E.; Chaparro, J. 2000. Tolerance of selected orange and mandarin hybrid fruit to low-dose irradiation for quarantine purposes. *HortSci.* 35(7), 1288-1291.
89. Mahrouz, M.; Lacroix, M.; D'Aprano, G.; Oufedjikh, H.; Boubekri, C.; Gagnon, M. 2002. Effect of gamma-irradiation combined with washing and waxing treatment on physicochemical properties, vitamin C, and organoleptic quality of citrus clementina. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7271-7276.
90. O'Mahony, M.; Wong, S.Y.; Odbert, N. 1985. Sensory evaluation of 'Navel' oranges treated with low doses of gamma-radiation. *J. Food Sci.* 50, 639-646.
91. Oufedjikh, H.; Mahrouz, M.; Lacroix, M.; Amiot, M.J.; Taccini M. 1998. The influence of gamma irradiation on flavonoids content during storage of irradiated clementina. *Radiat. Phys. Chem.* 52, 107-112.
92. Oufedjikh, H.; Mahrouz, M.; Amiot, M.J.; Lacroix, M. 2000. Effect of gamma-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. *J. Agric. Food Chem.* 48; 559-565.
93. Vanamala, J.; Cobb, G.; Turner, N.D.; Lupton, J.R.; Yoo, K.S.; Pike, L.M.; Patil, B.S. 2005. Bioactive compounds of grapefruit (*Citrus paradise* cv. Rio Red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying. *J. Agric. and Food Chem.* 53, 3980-3985.
94. Patil, B.S.; Vanamala, J.; Hallman, G. 2004. Irradiation and storage influence on bioactive components and quality of early and late season 'Rio Red' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Postharv. Biol. Technol.* 34, 53-64.
95. Wang, C.Y. 2000. Postharvest techniques for reducing low temperature injury in chilling-sensitive commodities. En: *Improving Postharvest Technologies of fruits, vegetables and ornamentals*. Eds. F. Artés, M.I. Gil, M.A. Conesa. IIR Conference, Murcia 2000. pp.468-473.
96. Davis, P.L.; Hofmann, R.C. 1973a. Effects of coatings on weight loss and ethanol buildup in juice of oranges. *J. Agric. Food Chem.* 21, 455- 458.
97. Hardenburg, R.E. 1967. Wax and related coatings for horticultural products. Ed. U.S.D.A., Agric. Res. Serv. Publ., AR, 51-15.
98. Plotto, A.; Baker, B. 2005. Review of wax-based and other coatings for fruits and vegetables submitted to IFOAM. Technical Paper, pp. 1-24.
99. Hall, D.J. 1981. Innovations in citrus waxing-an overview. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 94, 258-263.
100. Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O.; Hagenmaier, R.D.; Baker, R.A. 1997. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technol.* 51(6), 56-62.
101. Hagenmaier, R.D. 1998. Wax microemulsion formulations used as fruit coatings. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 111, 251-255.

102. Llovera, A.; Ortóla, M.D.; Chiralt, A. 2002. Recubrimientos utilizados en frutos cítricos. Una revisión. II Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Lleida, España, sep 18-20.
103. Cuquerella, J.; Salvador, A.; Monterde, A.; Navarro, P.; Martínez-Jávega, J.M. 2004. Influencia de los tratamientos poscosecha en la evolución de los parámetros de calidad de mandarinas y naranjas. *Rev. Agrícola*. Ed. COITA de Valencia y Castellón 12, 24-28.
104. Kester, J.J.; Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology* 40(12), 47-58.
105. Krochta, J.M.; De-Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology* 51(2), 61-74.
106. Han, J.H.; Gennadios, A. 2005. Edible films and coatings: A review. En: *Innovations in Food Packaging*. Chap. 15. Han, J.H (Ed.). Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, pp. 239-262.
107. Wu, Y.; Weller, C.L.; Hamouz, F.; Cuppet, S.L.; Schnepf, M. 2002. Development and applications of multicomponent edible coatings and films: A review. *Advances in food and Nutrition Research* 44, 347- 394.
108. Galed, G.; Fernández-Valle, M.E.; Martínez, A.; Heras A. 2004. Application of MRI to monitor the process of ripening and decay in citrus treated with chitosan solutions. *Magn. Reson. Imaging* 22, 127- 137.
109. Chien, P.J.; Sheu, F.; Lin, H.R. 2007. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chem.* 100, 1160-1164.
110. Bautista-Baños, S.; Hernández-Lauzardo, A.N.; Velázquez-Del Valle, M.G.; Hernández-Lopez, M.; Ait Barka, E.; Bosquez-Molina, E.; Wilson C.L. 2006. Chitosan as potential natural compounds to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop. Prot.* 25, 108- 118.
111. Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharv. Biol. Technol.*, 41:164-171.
112. Krochta, J.M. 1997. Edible composite moisture-barrier films. En: *Packaging yearbook: 1996*. Blakistone, B. (Ed.), National Food Processors Association, Washington, DC.
113. Pérez-Gago, M.B.; Krochta J.M. 2005. Emulsion and bi-layer edible films. In J.H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. pp. 384-402.
114. Togrul, H.; Arslan, N. 2004. Carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in coating of mandarin. *J. Food Eng.* 62, 271-279.
115. Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *Journal of the Food Science and Agriculture* 83, 430-439.
116. Mohr, H., Schopfer, P.: *Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1995. 629.

117. Cuquerella, J. 1990. Efectos de distintos recubrimientos céreos y plásticos en la fisiología postrecolección y en la calidad de frutos cítricos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
118. Wills, R.H.; Lee, T.H., McGlasson; W.B., Hall, E.G.; Graham, D. 1984. Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas en post-recolección. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, p.195.
119. Flanzky C., 1999. Enología, Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. P. 233.
120. Kays, S. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products: Van Nostrand Reinhold. New York. p. 355–407.
121. Wills, R.H.; Lee, T.H., McGlasson; W.B., Hall, E.G.; Graham, D. 1984. Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas en post-recolección. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, p.195.
122. Baldwin E.A. 1993. Citrus fruit. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA eds, Biochemistry of Fruit Ripening, Chapman & Hall, London. p. 107-149.
123. Nisperos-Carriedo, M.O. and P.E. Shaw. 1990. Comparison of volatile flavor components in fresh and processed orange juices. J. Food Agr. Chem. 38:1048-1052.
124. Carlo Nicolosi-Asmundo, Cecilia M. Cataldi-Lupo, Salvatore Campisi, and Carlo Russo. 1987. Lipids in citrus fruit juice. 1. Lipid content during orange ripening in eastern Sicily. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35: 6, 1023-1027.
125. S. Nagy, H. E. Nordby and S. Nemeč. 1980. Composition of Lipids in Roots of Six Citrus Cultivars Infected with the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus mosseae*. New Phytologist. Vol. 85: 3. p. 377-384.
126. Gaillard, J.P. 1978. Etudes sur les fruitiers tropicaux (autres que bananiers, ananas, citrus). Fruits, v. 33: 9, p. 543-665.
127. Hitchcock, C, and B. W. Nichols. 1971. Plant lipid biochemistry. Academic Press, London. p. 387.
128. Sala, J.M., Romero, R., Giner, C., 1971. Rev. Agroquim. Tecnol. Alim. J.J. 1. p. 89-103.
129. Sinclair, W. B., D. M. Eny. 1947. Ether-soluble organic acids and buffer properties of citrus peels. Bot. Gaz. 108. p. 398-407.
130. Herrero E. M., Acerete L. A., 1947. Las heladas en la producción naranjera. Ed. Ministerio de Agricultura. Madrid. p. 54.
131. Primo, E., Royo Iranzo. 1968. Detección de adulteración en zumos cítricos. Características de la curva de neutralización y sus variaciones como consecuencia de las adulteraciones. A.T.A. 8: 3. p. 353.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar un recubrimiento comestible formulado a partir de subproductos generados durante el proceso agroindustrial de los cítricos y evaluar su efecto en la calidad y el metabolismo poscosecha de frutos cítricos mediante aproximación metabolómica aplicando principalmente una plataforma GC/qEIMS y otras técnicas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Obtener pectina y aceites esenciales por hidrodestilación de residuos agroindustriales de cítricos (naranja/mandarina), provenientes de una zona de producción referenciada en el estudio.

2.2.2 Caracterizar la pectina y los aceites esenciales obtenidos estableciendo la identidad y funcionalidad para su incorporación en una nueva formulación de recubrimiento comestible hidrocoloidal.

2.2.3 Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de los aceites esenciales caracterizados sobre los hongos: *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.

2.2.4 Obtener una formulación de recubrimiento comestible a partir de pectina y aceites esenciales, optimizada a partir de la capacidad para retener volátiles y su actividad antifúngica.

2.2.5 Desarrollar un conjunto de métodos cromatográficos (HPLC/DAD y GC/qEIMS) que permitan estudiar por aproximación metabolómica diversos perfiles químicos: polifenoles, constituyentes volátiles (C10/C15), carbohidratos (mono, di y trisacáridos), aminoácidos, ácidos grasos (C₄/C₂₄) saturados, mono y poli-insaturados y ácidos orgánicos polares, presentes en zumos de cítricos, que permitan determinar marcadores de cambio en el metabolismo de frutos cítricos.

2.2.6 Aplicar materiales de recubrimiento en una línea de producción industrial, en frutos con índice de madurez comercial y evaluar su estatus metabólico y calidad poscosecha.

3. PRODUCCIÓN DE ZUMOS Y GENERACIÓN DE RESIDUOS EN LA AGROINDUSTRIA CITRÍCOLA: OBTENCIÓN DE MATERIALES GRAS PARA RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

3.1 Introducción

La fase industrial de la cadena productiva de cítricos reúne a los productores de jugos, concentrados, néctares, pulpas, mermeladas y otras industrias. Los residuos agroindustriales de cítricos (RAIC) en la industria de zumos, concentrados y néctares, están constituidos por cáscaras (albedo/flavedo), semillas, membranas y vesículas de jugo, representan aproximadamente el 50% del peso de la fruta entera original. Estos materiales pueden emplearse en el desarrollo de materias primas de mayor valor agregado y beneficio para la industria citrícola. Adicionalmente, el eslabón poscosecha es uno punto crítico en la cadena productiva de Colombia, y allí se observan problemas que afectan la productividad y competitividad [132], entre ellos: cosecha inadecuada, deficiente selección, clasificación y almacenamiento; baja calidad externa del fruto; insuficiente tecnología disponible para mejorar presentación, así como abundantes desechos y pérdidas; de hecho, se estima que las pérdidas poscosecha, desde que los frutos son recogidos hasta que llegan al consumidor final, están entre 12% y 25%, según datos del acuerdo de competitividad firmado en el centro-occidente del país [133]. Existe una permanente producción de residuos aprovechables tanto del sector de cosecha y transformación de cítricos, lo cual pone de manifiesto un importante problema de gestión de este material orgánico por parte de los generadores, a un alto costo económico y ambiental, lo que justifica plenamente su utilización a través de usos innovadores [134].

En la práctica, se observa que la apariencia física de los residuos obtenidos por el uso de las diferentes tecnologías de exprimido se deben a la forma como los componentes mecánicos de estas maquinas afectan los tejidos del fruto. También es notable que la degustación de los zumos producidos traiga diferencias al consumidor. Estas dos observaciones traen de por medio el hecho de que los residuos no son equivalentes. No se dispone de fuentes que aporten información respecto al tipo de impacto tecnológico

y/o sus consecuencias en los productos y residuos desde la perspectiva de la caracterización química. Por ello, dado el interés de esta investigación en el aprovechamiento de este tipo de residuos, resulta conveniente hacer una valoración de las diferencias químicas, rendimiento y calidad en términos de la producción de AE y la obtención de pectina, con esto se puede justificar la selección de la tecnología que produzca mejores resultados en la elaboración de zumos y en la generación de residuos mas aprovechables.

En la investigación y desarrollo de aditivos y materias primas para su uso en alimentos, cosméticos y recubrimientos comestibles es satisfactorio el enfoque de seguridad y eficacia que propone la administración alimentos y medicamentos (FDA, Food and drug admistration, USA), a través de la designación “generalmente reconocido como seguro” (GRAS, Generally recognized as safe), esta denominación cuenta con un inventario de sustancias consideradas por comités de expertos y por lo tanto están exentas de requisitos de tolerancia de aditivos incluso por otras agencias federales (FFDCA, Federal Food, Drug, and Cosmetic Act), la pectina y los aceites esenciales de cítricos son aceptados bajo la denominación GRAS para su uso en la producción de recubrimientos comestibles (Code of Federal Regulations, USA. 2003).

3.1.1 Pectina

Constituye una mezcla de polisacáridos que se encuentra en la lamela interna de la pared celular de plantas superiores. La pectina es un polisacárido lineal, polidisperso y polimolecular y su composición varía con la fuente y las condiciones utilizadas para el aislamiento, de allí la dificultad para su caracterización [136]. Se acepta que la pectina consiste principalmente de cadenas de ácido D-galacturónico (GalA) unidas por medio de una unión glicosídica α -1,4 e interespaciadas a través de enlaces α -1,2 con ramnosa, como se observa en la figura 3; estos ácidos urónicos tienen grupos carboxílicos, algunos de los cuales se encuentran en forma natural como metilésteres o convertidos en carboxamida por tratamientos con amoniaco. El grado de esterificación (GE) afecta a las propiedades de solubilidad y gelificación, pectinas con GE por encima del 50% han

sido etiquetados de alto metoxilo e inferior al 50% como pectinas de bajo metoxilo [137].

Según cuántos grupos carboxílicos están esterificados en la cadena o polímero, Kertesz los clasificó dándole diferentes nombres [138]:

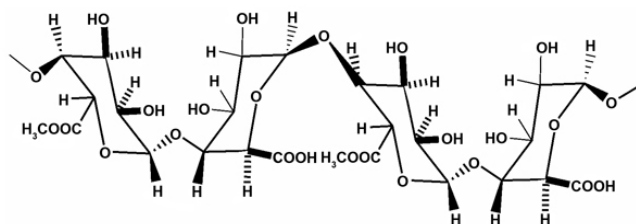
Protopectinas, si todos los carboxilos están esterificados. Estas son insolubles en agua y se hallan en mayor cantidad en los tejidos de los frutos no maduros o verdes.

Ácidos pectínicos: Si solo una parte pero mayoritaria de los carboxilos está esterificada. Estos compuestos son capaces de formar geles si las condiciones de sólidos solubles y pH son adecuadas. Las sales de estos ácidos se llaman pectinatos.

Pectinas: Son los ácidos pectínicos, solubles en agua caliente, con un contenido medio de éster metílico. La principal característica es su capacidad de formar geles en presencia de suficientes sólidos solubles, ácidos o iones polivalentes.

Ácidos pécticos: Estos compuestos no poseen grupos carboxílicos esterificados. Las sales de estos se denominan pectatos y reaccionan fácilmente con los iones calcio de las células para producir compuestos insolubles en los jugos de frutas, dando un precipitado visible comúnmente en la separación de fases o abanderamiento en los néctares.

Figura 3. Estructura de la pectina, un polímero de las paredes celulares de los vegetales, formadas por la polimerización del ácido galacturónico



Tomado de: BeMiller. 1996. [135].

Las pectinas pueden contener desde unos pocos cientos hasta 1000 unidades de sacáridos en una configuración irregular tipo cadena, esto corresponde a pesos moleculares promedio entre 50000 y 150000 daltons [138].

Se conocen diferentes estudios que buscan optimizar la utilización de la pectina en formulaciones de recubrimientos comestibles para proteger productos perecederos de

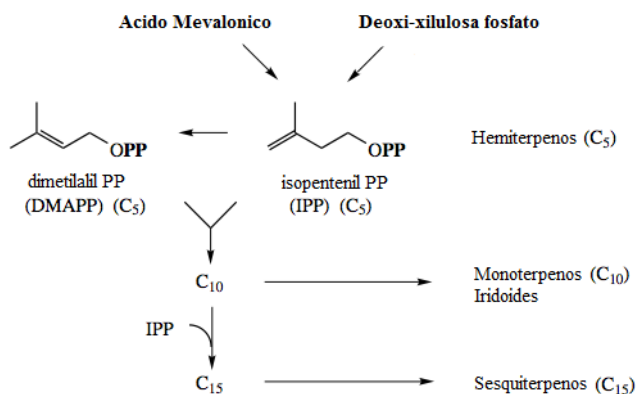
amplio consumo como: naranja, mandarina, mango, aguacate y otros, con el objetivo de mejorar la apariencia, calidad y extender la vida comercial de estos productos [139], [140], [141].

3.1.2 Aceites esenciales

Son mezclas homogéneas de moléculas provenientes de una misma familia química, terpenoides. Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos [142], [143]. Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides (Cadby et al., 2002). Son inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, hidróxido de amonio) [144], [145], [146]. Típicamente. Los terpenoides son una familia de hidrocarburos neutros y/o oxigenados, con uno o varios anillos insaturados y con la presencia de 10 o 15 carbonos en su estructura. Tienen una bajísima presión de vapor a condiciones ambientales: 200 a 300 Pa. [142]; Al carecer de átomos de oxígeno, son casi inmiscibles en agua y en el caso contrario, su solubilidad es mayor, pero aun baja con respecto a otros compuestos análogos; son inestables fotoquímicamente, generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes en las que se encuentran familias: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos) Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos [142].

En el caso de los cítricos, los componentes principales pertenecen a la familia de los mono y sesquiterpenos, ambos grupos de sustancias encuentran su origen biogenético en la condensación de Isopentenilpirofosfato (IPP) con dimetilalilpirofosfato (DMAPP), gracias a la articulación de un complejo enzimático es posible obtener mezclas de buen número de componentes y abundantes isómeros, con amplia variabilidad funcional y estructural [147], como se ve en la figura 4.

Figura 4. Condensación de unidades de DMAPP con IPP, precursores básicos de compuestos terpénicos.

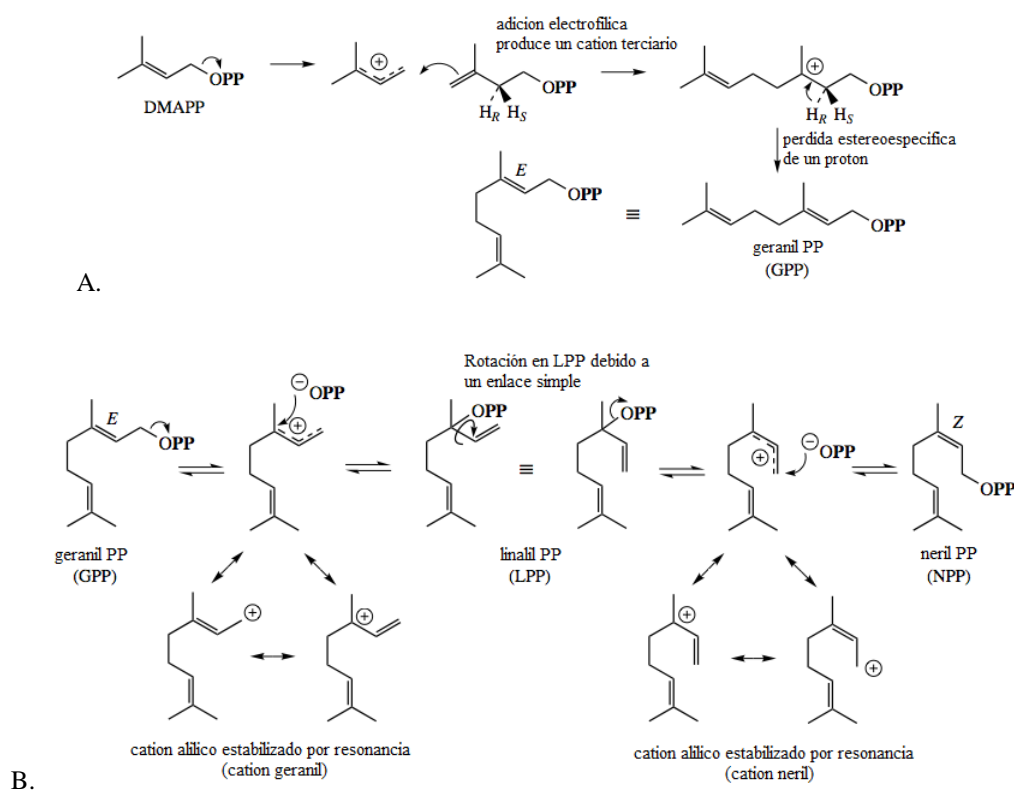


3.1.2.1 Origen biosintético de Monoterpenos

La unión de DMAPP y IPP en la vía de la prenil transferasa produce geranyl difosfato (GPP) como se observa en la fig 5A, se ha propuesto que está involucrada la ionización catiónica del DMAPP para obtener un catión alílico que reacciona con el doble enlace de IPP, seguido por la pérdida de un protón (H_R). Esto produce una unidad de monoterpeno difosfato, geranyl difosfato, en el cual el doble enlace nuevo es trans (E). Por esto linalil pirofosfato (LPP) y neril pirofosfato (NPP) corresponden a los isómeros de GPP, es probable que se formen a partir del GPP por ionización del catión alílico. Cada uno puede permitir a sus veces un cambio en el enlace del grupo difosfato (al carbono terciario en LPP) o un cambio en la estereoquímica del doble enlace (a Z en NPP) como se ve en la fig 5B, estos tres compuestos a través de relativamente cambios simples, pueden dan origen a un rango de monoterpenos lineales bastante comunes en aceites esenciales.

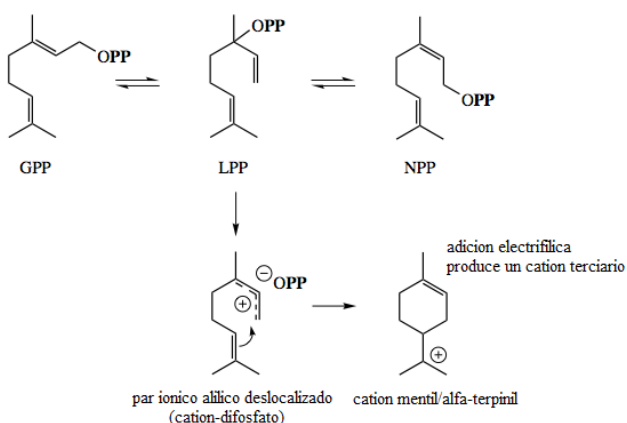
Las sustancias resultantes pueden ser hidrocarburos, alcoholes, aldehídos o ésteres, incluso, acetatos. El número de monoterpenos se hace más diverso a través de reacciones de ciclación, obteniéndose sistemas mono o bicíclicos.

Figura 5. Biogénesis de monoterpénos, origen de precursores básicos tipo geranil, Linalil y Neril.



Estas ciclaciones no se dan a partir del precursor GPP, dada su estereoquímica E del doble enlace que lo hace poco favorable para la formación del anillo. NPP o LPP, sin embargo tienen estereoquímica favorable, sea uno o ambos parecen ser los precursores del sistema mentano monocíclico, la formación de este se ve en la fig 6, generando un carbocatión denominado mentil o alfa-terpinil, el cual posee el núcleo mentano. Se ha visto que las enzimas monoterpéno ciclasas aceptan los tres difosfatos, siendo el LPP el mejor sustrato, también parece que tiene la capacidad de isomerizar los sustratos inicialmente y de ciclarlos al final. Es conveniente también considerar las especies involucradas en la ciclación como el catión alílico deslocalizado y estrechamente unido al anión difosfato y la formación del enlace debido a la proximidad de los electrones π del doble enlace.

Figura 6. Biogénesis de monoterpénos, aparición del catión mentil o alfa-terpinil.



Clásicamente se proponen diferentes tipos de mecanismo orgánicos para justificar el destino que puede seguir un carbocatión, enfrentamiento con nucleófilos (típicamente agua), pérdida de protones (vía reacciones de eliminación), ciclaciones y posiblemente rearrreglos tipo Wagner-Meerwein (W-M).

El recién generado catión mentil podría ser atacado por agua, en cual caso se obtendría alfa-terpineol, por otro lado, podría perderse un protón para dar limoneno, como se observa en la figura 7. Alternativamente, plegando la cadena lateral catiónica hacia el doble enlace (a través de las características superficiales del enzima) permitiría repetir el mecanismo de ciclación y producir los cationes bicíclicos: bornil y pinil, de acuerdo a cual extremo del doble enlace esté involucrado formando los nuevos enlaces, como se observa en la figura 8. El borneol podría formarse por la adición de agua, la oxidación de un alcohol secundario podrá formar una cetona como el alcanfor. Como alternativa a la descarga del catión por efecto de un nucleófilos y la subsecuente pérdida de un protón podría generar un alqueno, de esta forma aparecen α -pineno y β -pineno a partir del catión pinil. Es menos común la pérdida de protones que lleven a la formación de anillos ciclopropano, dando origen al 3-careno, un representante bastante común del núcleo carano.

Básicamente, la química de terpenoides está basada en la reactividad de carbocaciones, aunque en la naturaleza, estos cationes no deben existir como especies aislables, sino más bien estrechamente vinculados pares de iones con un contra-anión, por ejemplo, el ion difosfato. La analogía con la química de carbocatión se justifica, ya que una alta

proporción de terpenoides naturales tienen esqueletos que han sufrido procesos de rearrreglos. Estos arreglos del tipo W-M, en el que átomos de carbono o hidruro pueden migrar para conseguir una mayor estabilidad para un catión terciario contra uno de carácter secundario, o por reducción de la tensión del anillo, dan racionalización mecanicista de la ruta biosintética.

Figura 7. Biogénesis de monoterpenos, reacción del catión mentil para formar limoneno y terpineol.

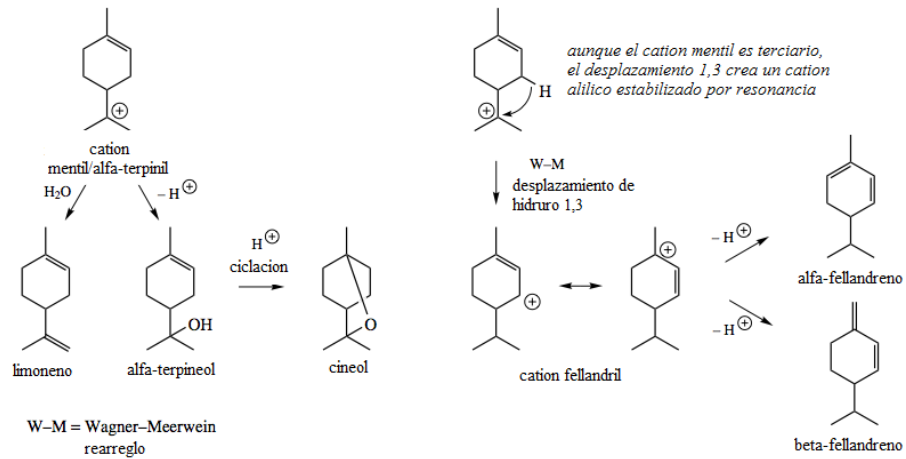
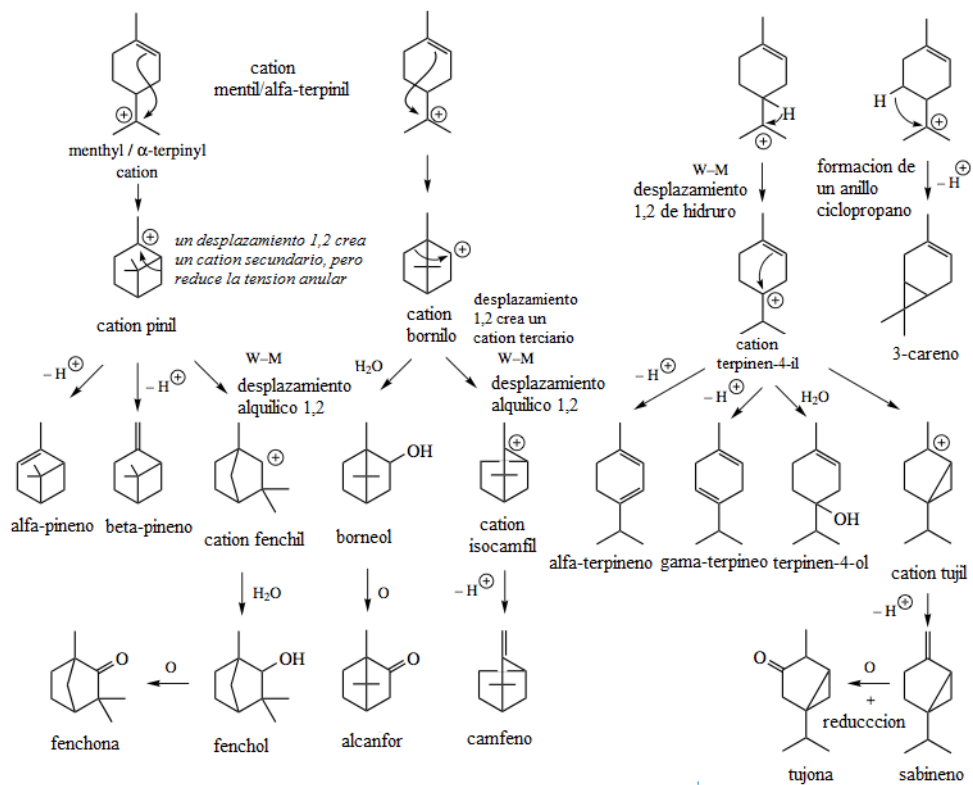


Figura 8. Biogénesis de monoterpenos, formación de los cationes bicíclicos pinilo y bornilo.



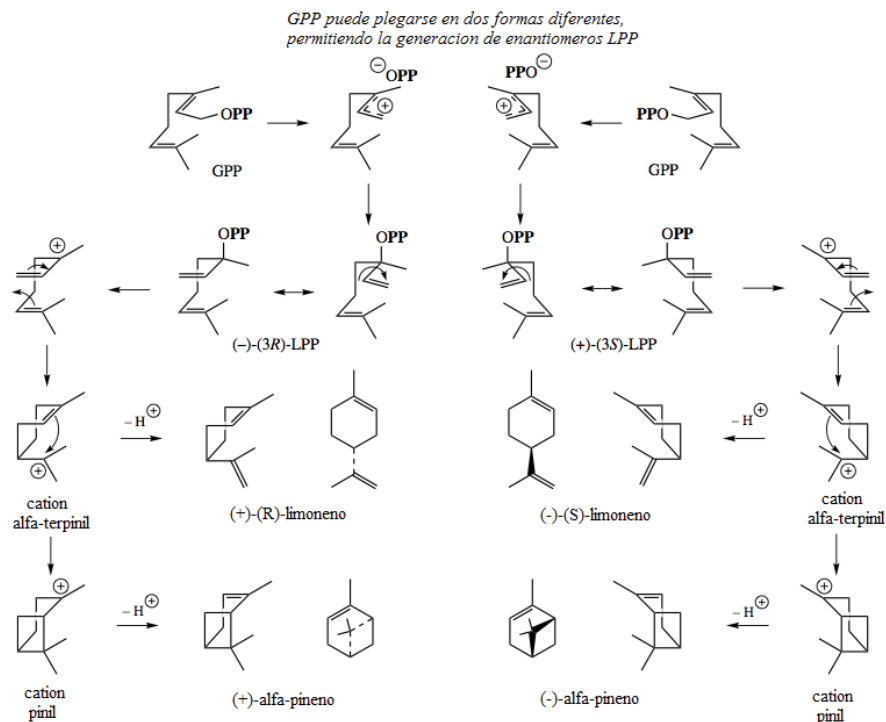
El catión mentil, aunque es un catión terciario, se puede convertir en un catión alílico estabilizado por resonancia a través de un desplazamiento 1,3 de hidruro, como se observa en figura 7. Esto permite la formación de α y β -felandrenos por pérdida de un protón en el carbocatión fellandril. El carbocatión bicíclico pinil, que posee un anillo tensionado de cuatro miembros, se arregla para convertirse en un anillo menos tensionado de cinco miembros como es el catión fenchil, figura 8, un proceso de mayor importancia que compensa el hecho de la conversión de un carbocatión terciario a uno secundario, apareciendo de esta forma el esqueleto tipo fenchano, ejemplificado por el fenchol y la fenchona.

El carbocatión terciario isocamfil se forma mediante un rearrreglo W-M del carbocatión secundario bornil, el produce el camfeno. Un desplazamiento de hidruro convierte el catión mentil a catión terpien-4-il, en el cual solo hay cambio de posición para la carga positiva, permitiendo la formación de alfa-terpineno, gama-terpineno, alfa-terpineol isómero, terpinen-4-ol. Un ciclación adicional en el catión terpinen-4-il genera el esqueleto tujano, de los cuales son bien conocidos el sabineno y tujona. Como tal terpinen-4-ol es el principal componente antibacteriano del aceite *Melaleuca alternifolia*, mientras que tujona ha alcanzado cierta relevancia por sus efectos neurotóxicos en el ajeno de *artemisia absinthium*, ahora prohibido en muchos países.

Respecto a las características estereoquímicas de los monoterpenos resultantes. Los sistemas enzimáticos presentes en los diferentes organismos controlaran el plegamiento de los diferentes esqueleto-sustratos y definir de esta forma la estereoquímica de los productos finales. La mayoría de los monoterpenos son ópticamente activos, se conocen muchos ejemplos donde las formas enantiómericas de una sustancia se obtienen específicamente de diferentes fuentes, por ejemplo, la carvona está presente en cítricos y en otras especies donde (+)-carvona presente en *Carum carvi*, comúnmente llamada alcaravea, y (-)-carvona detectada en *Mentha spicata*, conocida como hierbabuena. Contrariamente el limoneno, es el principal componte de los AE de cítricos, existen dos enantiómeros: R-limoneno y S-limoneno, los cuales se obtienen conjuntamente de naranja, mandarina y limón con ratios enantiómericos variables según la especie. (R)-(+)-limoneno exhibe un aroma de cítrico fresco tipo naranja y posee un umbral olfativo de 200 ppb. Por otro lado (S)-(-)-limoneno presenta un aroma pesado similar a la

trementina con nota olfativa a limón, con un umbral de 500 ppb. Los enantiómeros individuales pueden producir respuestas biológicas diferentes, especialmente dadas por la respuesta de los receptores olfativos en la nariz, de esta forma el olor característico de la alcaravea se debe a (+)-carvona mientras que (-)-carvona huele a hierbabuena, y R-limoneno y S-limoneno identifica los olores de las naranjas y del limón, respectivamente. Como ejemplo del origen de este tipo de relación estereoquímica, la figura 9 muestra la aparición de las formas enantioméricas del limoneno y el pineno. Esta muestra el precursor GPP plegado en dos conformaciones de imágenes especulares, conduciendo a la formación de enantiómeros individuales de LPP, esto se puede explicar mediante reacciones de carbocaciones análogas para obtención de las especies ópticamente activas. En los casos en los que una planta produce los dos enantiómeros, es cuando se presentan dos sistemas enzimáticos por separado, cada uno capaz de elaborar un enantiómero en particular.

Figura 9. Biogénesis de monoterpenos, origen enantiomérico de limoneno y pineno.



Adicionalmente, un enzima acepta GPP como sustrato, cataliza su isomerización a LPP y lo convierte en un producto final sin la liberación de intermediarios. A veces, productos múltiples en cantidades variables, por ejemplo, limoneno, mirceno, α -pineno

y β -pineno, se sintetizan por la misma enzima, reflejando en común la misma química de carbocaciones involucrada en estas biosíntesis, y sugiriendo que el enzima esta predominantemente aportando un ambiente adecuado para plegar y ciclar al sustrato. Las reacciones adicionales como la oxidación de alcoholes acetonas, como por ejemplo borneol a alcanfor, formación de anillos heterocíclicos como en la formación de α -terpineol en cineol, requieren la ayuda de sistemas enzimáticos adicionales. En otros sistemas, una sustancia puede estar presente como una mezcla compleja de esteroisómeros. La menta (*Mentha piperita*) típicamente produce (-)-mentol, con pequeñas cantidades de los estero isómeros (+)-neomentol, (+)-isomentol y (-)-isomentol, cuatro de los ocho posibles isómeros. Las relaciones metabólicas de estos compuestos aparecen establecida en la figura 10, la cual ilustra como la estereoquímica de cada centro se puede establecer por medio de procesos de reducción esteroespecíficos en los dobles enlaces o grupos carbonílicos. La ruta muestra también que funciones oxigenadas se pueden introducir en la molécula en posiciones activadas por dobles enlaces adyacentes (oxidación alílica), también por ataque a carbocaciones con agua.

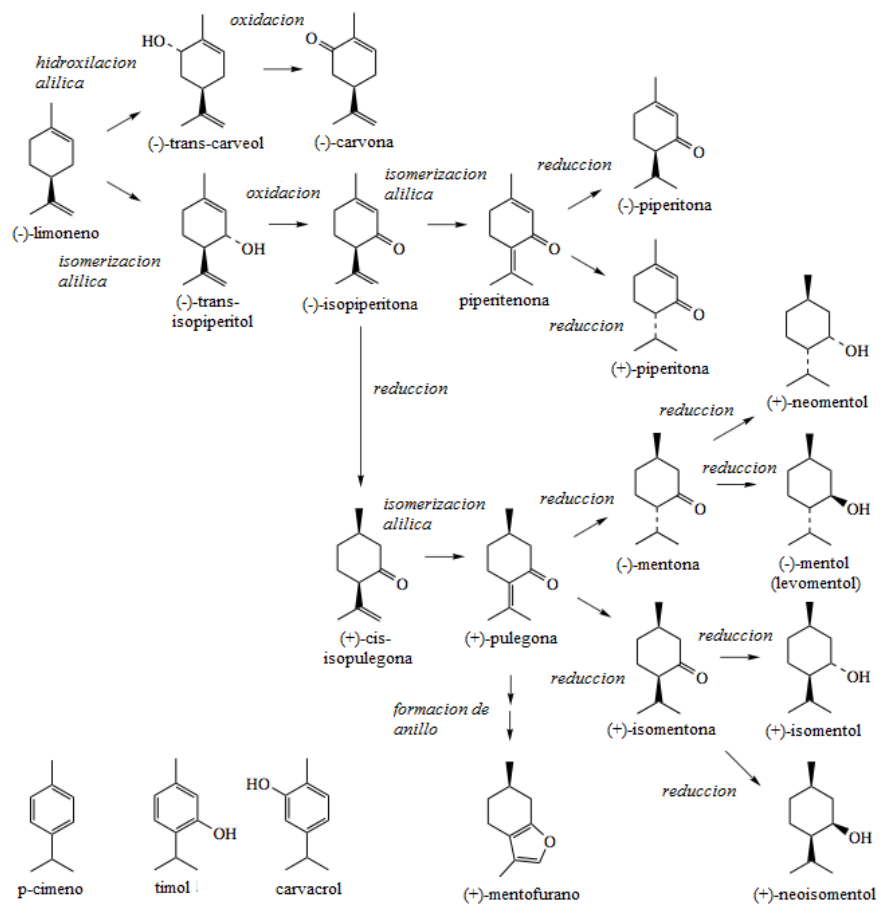
p-Cimeno y los derivados fenólicos timol y carvacrol que son comunes en cítricos, son representativos de un pequeño grupo de compuestos aromáticos que se producen en la naturaleza a partir de unidades de isopreno, además de otras rutas de aromáticos que involucran al acetato y al shikimato.

3.1.2.2 Origen biosintético de Sesquiterpenos

La adición de una unidad adicional C5 de IPP a geranil difosfato por medio de prenil transferasa permite obtener la unidad precursora fundamental sesquiterpénica, farnesil difosfato (FPP), ver figura 4., de nuevo, una ionización inicial de GPP y la pérdida del protón de C-2 de IPP es estereoquímicamente análoga al perdido en la isoprenilación previa. FPP puede dar inicio a series de sesquiterpenos lineales y cíclicos. A causa del incremento en la longitud de la cadena un doble enlace adicional, también lo harán el numero de posible modos de ciclaciones, y también un enorme rango de estructuras

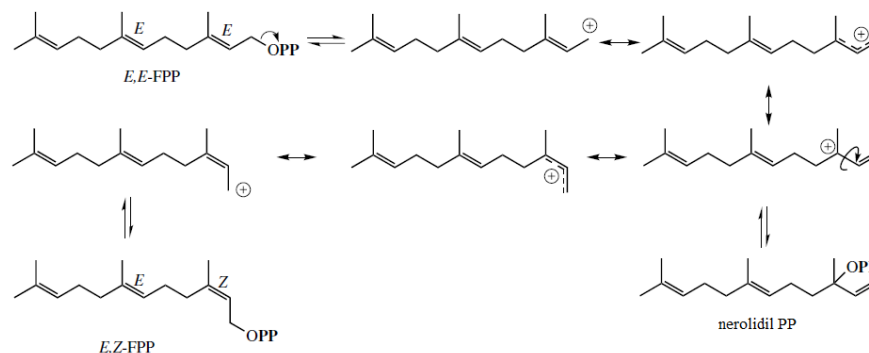
mono, di y tri-cíclicas podrán resultar. La estereoquímica del doble enlace más cercano al difosfato puede adoptar una configuración E como en FPP o Z vía ionización como ocurre con geranil/neril PP, ver figura 11, en algunos sistemas, el difosfato terciario nerolidil PP (NPP) (comparar con Linalil PP) se ha implicado como el más inmediato precursor en vez de farnesil PP. Esto conduce diferentes posibilidades por plegamiento

Figura 10. Biogénesis de monoterpenos, algunas reacciones adicionales para obtener productos oxigenados.



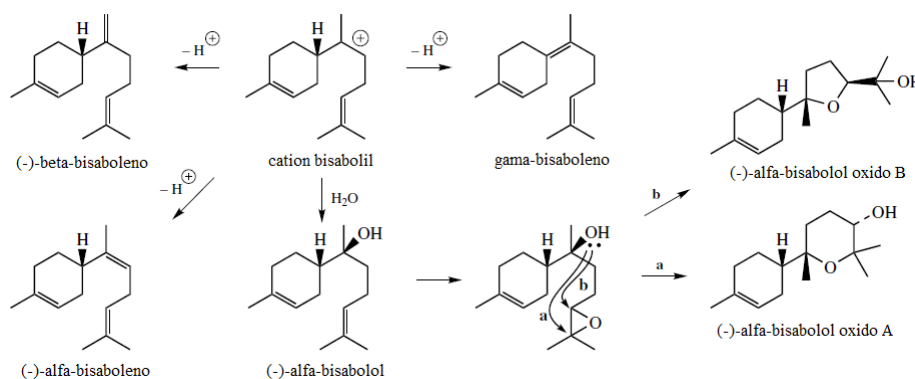
de la cadena carbonada, dirigido por supuesto por el enzima involucrada y la ciclación favorecida para el ataque electrofílico del doble enlace más cercano. Al igual que en monoterpenos, la química de carbocaciones permite explicar la aparición de la mayoría de esqueletos estructurales.

Figura 11. Biogénesis de sesquiterpenos, formación del difosfato terciario NPP.



Uno de estos sistemas cíclicos, el catión bisabolil, es análogo al sistema mentano de los monoterpenos, con modificaciones adicionales en el anillo de seis miembros puede dar lo que aparentan ser variantes de monoterpenos con una extensión de cadena hidrocarbonada, como es el caso de γ -bisabolene, como se observa en la figura 12, y otros compuestos relacionados, tales como zingibereno y β -sesquifellandreno. Los sesquiterpenos son en general menos volátiles que los monoterpenos, el simple ataque del agua al catión bisabolil lleva a la obtención de α -bisabolol. Los llamados bisabol óxidos A y B también están presentes, probablemente derivados de bisabolol por ciclación a través de un epóxido intermediario.

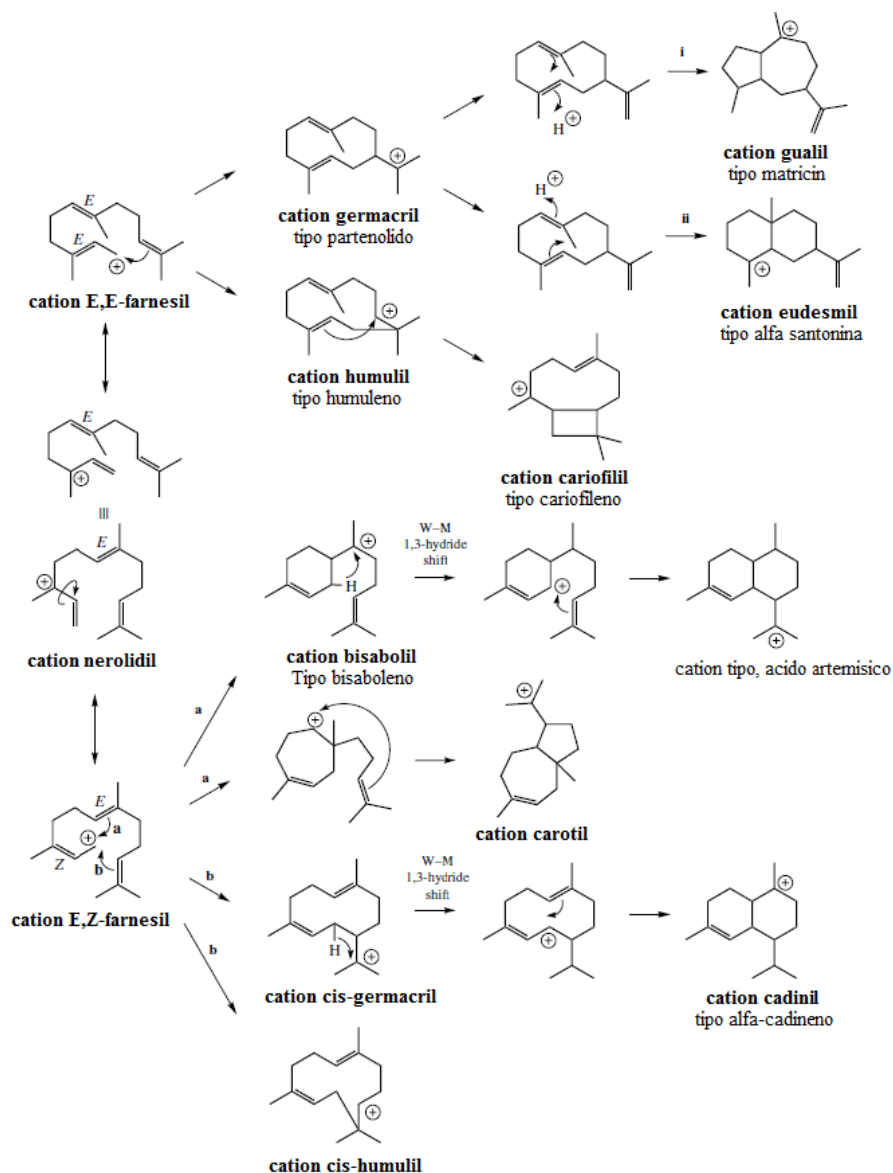
Figura 12. Biogénesis de sesquiterpenos, formación de compuestos oxigenados.



Otro tipo de ciclaciones producen sistemas anulares de más de seis carbonos, los de siete, diez y once son frecuentes como se observa en la figura 13. Son representativos dos sistemas macrocíclicos, el de diez carbonos (cationes germacril y cis-germacril) y el

de once carbonos (cationes humulil y cis-humulil), que solo difieren en la estereoquímica asociada con el doble enlace. Como tal, esto afecta las ciclaciones sucesivas y es responsable de la amplia variabilidad de los derivados sesquiterpénicos.

Figura 13. Biogénesis de compuestos sesquiterpénicos.



La propuesta de biosintética para estos grupos de sustancias se adaptó según las referencias de Grayson y Wise [148], [149]. Las figuras se extrajeron en su totalidad de la obra de Dewick [150].

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales de partida

Para caracterizar los RAIC dado su aspecto, se realizó un muestreo en las líneas de extracción de la planta de jugos Frudelca SA, Itagui-Antioquia. De la siguiente manera.

Se cosecharon frutos de mandarina Clementina (*Citrus clementina*, Hort. Ex. Tanaka) y naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) osbeck). Con índices de madurez comercial y cosechadas de árboles adultos sanos en la Hacienda La Cristalina (Támesis, Antioquia) (5° 42'N, 75° 40'W, y 775 metros sobre el nivel del mar). Posteriormente en la planta de producción, los frutos se seleccionaron cuidadosamente por tamaño y ausencia de daños físicos. Los frutos se dividieron aleatoriamente en tres lotes de 100 unidades. Cada lote se desinfectó en hipoclorito de sodio 150 ppm (NaClO, comercial) de durante 3 minutos. Los frutos se exprimieron mediante el uso de dos tecnologías, Zumex® y FMC®, después del proceso de expresión estos zumos se conservaron en congelación a -20 °C hasta el momento de su análisis mediante extracción de espacio de cabeza con microextracción en fase sólida (HS/SPME, por su significado en inglés), utilizando viales de vidrio de 15 ml con tapa/septa de PTFE/Silicona. Igualmente, muestras de cascaras de ambas especies vegetales se conservaron a la misma temperatura para el posterior análisis de contenido/composición de aceite esencial y extracción de pectina.

3.2.1.1 Extracción de Pectina de Residuos Agroindustriales

Se conocen diferentes métodos para la extracción de polisacáridos solubles como alginato, carragenanos y pectinas a partir de material vegetal [151], [152], [153], [154]. La pectina es generalmente hidrolizada y extraída con agua acidificada (pH 1-3) a una temperatura entre 60 a 90°C por un tiempo que varía entre 30 minutos y varias horas. Generalmente la extracción se lleva a cabo en reactores con agitación lenta seguida por separación usando filtración. El paso final de purificación consiste en precipitar y lavar las pectinas con alcohol, secar y pulverizar el precipitado.

Dadas las facilidades de nuestro laboratorio, se realizaron tres ensayos de extracción de pectina tomando como base algunas referencias bibliográficas, con el objeto de probar el rendimiento a una escala de 20 gr y plantear posteriormente un diseño experimental para mejorar el rendimiento de extracción en cantidades superiores a 1 kg. La tabla 5 presenta las condiciones del ensayo inicial y las características de los productos.

Tabla 5. Ensayos de extracción de pectinas a diferentes condiciones experimentales.

Ensayo	Condiciones	Peso bruto de producto	Observaciones
1	Peso material 20 gr húmedo pH 1,73 Temperatura 90°C Agitación 500 rpm Agente acidificante H ₃ PO ₄ Agente precipitante Etanol 4:1 Tiempo 30 min Relación material: solvente 1:10	0,54 gr	Pasta color crema, quebradiza.
2	Peso material 20 gr húmedo pH 1,73 Temperatura 90°C Agitación 500 rpm Agente acidificante H ₃ PO ₄ Agente precipitante Etanol 4:1 Tiempo 60 min Relación material: solvente 1:10	1,24 gr	Requiere nuevos lavados y reprecipitación, material pigmentado.
3	Peso material 20 gr húmedo pH 1,73 Temperatura 70°C Agitación 1000 rpm Agente acidificante Acido cítrico Agente precipitante Etanol 4:1 Tiempo 60 min Relación material: solvente 1:5	1.45 gr	Requiere nuevos lavados y reprecipitación, material pigmentado.

Considerando las variables (tiempo, temperatura, pH y relación material vegetal: solvente) se desarrolló un diseño un experimento factorial completo (2⁴) de cuatro factores a dos niveles, para definir las variables activas, sobre el rendimiento de la extracción de pectinas y las características funcionales del producto, como se expresa en la tabla 6.

Las mediciones de pH, se realizaron por medio de un potenciómetro (Handylab pH 12, Schott-Geräte GmbH, Mainz, Germany). Los reactivos, para la extracción de pectinas (Acido fosfórico, A. cítrico y alcohol etílico) se adquirieron grado análisis de la marca Merck GmbH, Darmstadt, Alemania.

Tabla 6. Diseño experimental factorial 2⁴ para optimización de condiciones de extracción de sustancias insolubles en etanol en condiciones de laboratorio.

Corrido experimental	Temperatura (°C)	pH	Relación materia orgánica /solvente	Tiempo (h)
1	65	2	01:10	1
2	65	2	01:10	3
3	75	2	01:10	1
4	65	1	01:20	3
5	70	1,5	01:15	2
6	65	1	01:20	1
7	65	1	01:10	1
8	65	2	01:20	1
9	75	2	01:10	3
10	65	1	01:10	3
11	75	1	01:20	1
12	65	2	01:20	3
13	75	1	01:20	3
14	75	1	01:10	1
15	75	1	01:10	3
16	75	2	01.20	1
17	75	2	01:20	3

Los ensayos de extracción en cantidades superiores a 1 Kg de material vegetal se realizaron en una unidad de extracción de material vegetal que posee las siguientes características técnicas: El proceso de obtención de pectinas requiere a su vez de varios procesos independientes, a realizarse en modo secuencial: calentamiento, filtración y separación de sólidos, almacenamiento de la solución para agregar un 75% del volumen adicional de Etanol, enfriamiento a 5°C, decantado, extracción del decantado y posterior filtración y extracción de un porcentaje de su humedad. Todas las piezas y elementos que estuvieron en contacto directo con el material en el proceso fueron fabricados en materiales de baja susceptibilidad a la corrosión, acero inoxidable 304. Los elementos que no hacen contacto directo con el material en proceso, como las bases de soporte fueron fabricadas en acero estructural y recubiertos con base anticorrosiva y pintura para evitar daños. El Diseño, construcción e instalación de los equipos fue realizado por la compañía de ingeniería Dimaq (Colombia, 2009).

3.2.1.2 Hidrodestilación de AE de residuos agroindustriales

Cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado “destilación por arrastre de vapor” [148]. Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima está en contacto íntimo con el agua generadora del vapor, se le llama “hidrodestilación”. Cuando se usa vapor saturado, pero la materia no está en contacto con el agua generadora, sino con un reflujo del condensado formado en el interior del destilador y se asume que el agua es el agente extractor, se le denomina “hidroextracción” [155]. En esta memoria, se adoptará el término hidrodestilación, para definir el proceso para obtener el aceite esencial mediante el uso de vapor a presión atmosférica, a partir de RAIC previamente cortados y en base húmeda. La generación de vapor forma parte del recipiente donde se almacena el material vegetal, el vapor efluente, que extrae al aceite esencial está a presión atmosférica y el material vegetal forma un lecho compacto por el que se transmite el calor uniformemente mediante la utilización de una manta de calentamiento. El proceso se describe de esta manera: conforme se calienta el agua y el lecho vegetal se libera el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se evapora. Al ser soluble en el vapor circundante, se “arrastra”, corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto de salida del hidrodestilador. En el condensador, la mezcla se condensa y enfría hasta temperatura ambiente. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable. La cual, se separa en un decantador de vidrio refrigerado formando dos fases, una acuosa también llamada agua floral y otra fase que forma propiamente el aceite esencial. Posteriormente, los AE se retiraron del recipiente, se secaron con Sulfato de sodio anhidro (NaSO_4 , Merck, Darmstadt, Alemania.), se filtraron y se conservaron en envases de vidrio con tapa/septa de PTFE/Silicona (Supelco. Bellefonte, EE.UU) a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Posterior al pesaje, Cascaras de naranja Valencia y mandarina Clementina, exprimidas industrialmente se trituraron en una licuadora industrial de gran volumen, este material se humectó con 1 litro de una solución al 5% (p/v) de cloruro de sodio (NaCl , comercial) (Relación peso/volumen 1:1) para que durante el proceso de calentamiento se produzca un efecto salting-out y mejorar la liberación de los compuestos orgánicos

GmbH, Wertheim, Germany), este instrumento consta de un recipiente calibrado por el fabricante en su volumen a una temperatura específica. Antes de su uso el recipiente se limpio con mezcla sulfocromica preparada en el laboratorio, según método (Merck, 2005). Se procedió a pesar el picnómetro vacío (m_1), se introdujo una cierta cantidad de liquido hasta el enrase y se pesó de nuevo (m_2), La muestra se atempero a 20 °C para realizar los pesajes. El cociente de ambos pesajes produjo el peso del aceite en el recipiente, el cual se dividió por el volumen calibrado del picnómetro (25,256 ml), para obtener la densidad de las muestras en unidades de gr/ml a 20 °C.

El Pesaje analítico de reactivos y material de vidrio, se realizo en una balanza Ohaus Explorer (USA, 2000), con una precisión d: 0,1 mg.

3.2.3 Análisis de zumos y aceites esenciales mediante cromatografía de gases

3.2.3.1 Instrumentación

La adquisición de los cromatogramas y espectros de masas se realizó utilizando las siguientes condiciones generales: Cromatógrafo de gases Agilent technologies 7890 (Wilmington, Delaware, EE.UU), equipado con automuestreador ALS 7683B y detector selectivo de masas MSD 5975C, el gas de arrastre usado en todos los experimentos fue Helio UAP 5,0. Se utilizaron dos columnas capilares, así mismo, se modificaron las condiciones de operación cromatográficas y de adquisición de masas, estas condiciones se mencionan en cada caso. Para efectos de cuantificación de componentes se utiliza normalización de aéreas a partir del factor de respuesta del n-undecano, y se procedió a determinar porcentajes relativos de aéreas. Este procedimiento permitió conocer la relación de concentración de cada componente en las muestras, siendo posible determinar adecuadamente la variabilidad de la composición dado el objetivo del estudio.

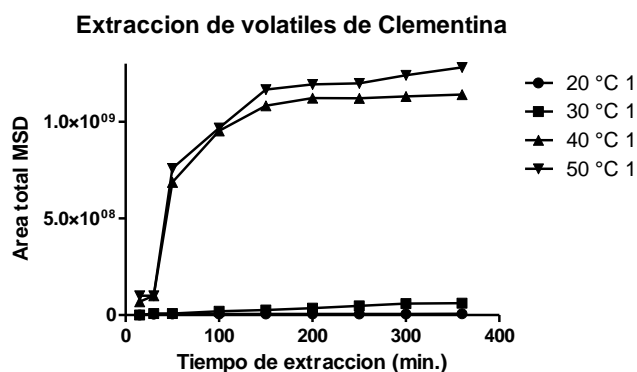
3.2.3.2 Implementación de un método para el análisis de volátiles mediante HS/SPME para zumos

Los zumos se sometieron después de descongelación a microextracción en fase sólida. Dadas las características de los analitos y sus cantidades relativas se requirió de la optimización de las condiciones de análisis, se llevó a cabo variando las cantidades de muestra: 5,0, 7,5, 9,0 ml en viales de headspace de 15 ml, se utilizó la suma total de las áreas de todas las señales como criterio de selección para las mejores condiciones a lo largo del desarrollo del procedimiento. El muestreo de los volátiles se optimizó a partir de la selección de dos fibras de microextracción: polidimetilsiloxano (PDMS) y divinilbenceno/Carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Las fibras se acondicionaron en el puerto de inyección del GC, como lo recomienda el fabricante (Supelco, North Harrison, EE.UU.). La elección de la fibra óptima para la extracción de analitos se llevó a cabo a temperatura ambiente con una proporción (1/1) para volúmenes de muestra/espacio de cabeza, en ambas ocasiones el equilibrio y la extracción se fijaron en 1 h con una velocidad de agitación constante (800 rpm). El tiempo de equilibrio para el análisis de la muestra se seleccionó por variación del tiempo (15 a 60 min). El tiempo y la temperatura de extracción se determinó mediante un experimento combinando cuatro temperaturas diferentes: 20, 30, 40, 50 ° C y siete tiempos de muestreo: 15, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 360 min. Para conseguir efecto salting-out, se aplicaron 100 µl de solución saturada de NaCl. Después del muestreo, de fibra de SPME se insertó en el inyector del GC a 260 °C para la desorción de los volátiles (1 min). Todos los experimentos se realizaron a tres replicas y los resultados se reportan como la media de ellos.

Para el desarrollo de este método se utilizó un patrón de AE de mandarina Italiano (*Citrus reticulata*, Fluka FCC, Kosher, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU) y muestras de m. Clementina y n. Valencia propias. Se seleccionó la triple fibra DVB/CAR/PDMS debido a su buen desempeño cuantitativo y cualitativo dada la amplia capacidad de extracción de metabolitos. La optimización del tiempo de equilibrio se hizo a temperatura ambiente y la máxima respuesta MSD se midió después de un tiempo de equilibrio de 40 minutos. Las condiciones óptimas de extracción para el análisis de las muestras se establecieron así: tiempo de extracción de 120 minutos a 40 °C, la figura 15

muestra la relación entre la temperatura y el tiempo de extracción con la respuesta total del detector. El coeficiente de variación (CV) calculado sobre la base del área total de los picos que se obtuvo a partir de la señal MSD para las muestras fue de 3,32% <CV <4,45% indicando que el instrumento y el método son fiables. De la misma manera, el CV de los compuestos más importantes (en términos de limoneno) fue siempre inferior al 3%.

Figura 15. Respuesta cromatográfica para extracción de volátiles de zumos de m. Clementina con una fibra DVB/CAR/PDMS



Los análisis se realizaron utilizando dos columnas capilares: HP-1MS 1% fenilpolimetilsiloxano (PMS) y HP-5MS 5% PMS, ambas columnas fueron del mismo fabricante y con las mismas dimensiones (30 m, 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25 μm , J&W Scientific, EE.UU.). El uso de ambas columnas con diferente polaridad en las fases estacionarias permitió: (a) para resolver la superposición de los compuestos que, lamentablemente podrían coeluir, y (b) una mejor identificación de los componentes mediante el cálculo de índices de retención relativos (IRR). La temperatura del horno se programó desde 40 °C (8 min) a 200 °C con una tasa de calentamiento de 5 °C/min y luego permaneció isotérmicamente a 200 °C para finalizar el análisis. La temperatura del inyector se estableció en 260 °C, en modo Split (150:1, usando un liner SPME 0,75 mm, Agilent 5188-6471). Las temperaturas del MSD en la cámara de ionización y cuádrupolo se programaron en 230 y 150 °C, respectivamente. Los espectros de masas y la corriente total de iones (TIC) se adquirieron en modo scan a 4.70 scans⁻¹ con una energía de ionización de 70 eV, en el rango de masas m/z 30-350. Las señales cromatográficas se controlaron por su homogeneidad, con la ayuda de iones extraídos de fragmentos de característicos para optimizar la resolución, la simetría

de las señales, y la identificabilidad de los compuestos. Las aéreas de los compuestos se normalizaron mediante estandarización interna (ISTD) con undecano (10 μ l, 2000 ppm/pentano. Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO. EE.UU.)

3.2.3.3 Análisis de aceites esenciales mediante inyección líquida

Las muestras de AE se inyectaron a un volumen de 1 μ l y a una concentración del 30%, siguiendo las mismas condiciones instrumentales descritas en 3.2.3.2. Naturalmente cambiando el liner por uno apto para la inyección split de muestras líquidas (150:1, usando un liner de 4 mm, Agilent 5183-4711).

3.2.3.4 Identificación mediante espectrometría de masas y Análisis Multivariado (PCA) de componentes volátiles

La identificación de los componentes se basó: (a) en la comparación de IRR en dos columnas, las cuales se calibraron con una serie de C₇-C₂₈ n-alcanos (Supelco, North Harrison Road, Bellefonte, PA) por interpolación lineal utilizando un software para la deconvolución automática de los espectros y el procesamiento de las señales (AMDIS 2.68). Además, en algunos casos se utilizaron las siguientes bases de datos: (a) <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>; (b) NIST/EPA/NIH 2008 y (c) <http://webbook.nist.gov/chemistry> (d) comparación con índices de retención y espectros según Adams, R.P; 2001 [156] y (e) comparación con espectros de sustancias de nuestra colección de estándares.

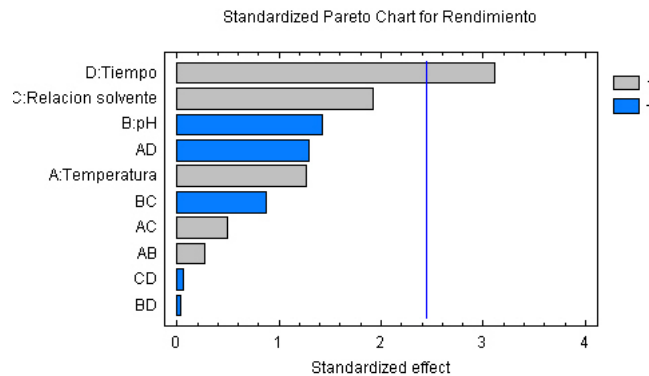
Los volátiles identificados se someterán por análisis multivariado de componentes principales (Principal component analysis, PCA), para determinar marcadores de cambio en la composición dada la significancia de la variabilidad de las variables en la matriz de correlación, se tendrán en cuenta los factores: técnicas de extracción de zumos y especie vegetal (AE y fracción volátil en zumos), para este efecto, no se tendrán en cuenta las sustancias traza ($\leq 0,001\%$). Se utilizara el software Minitab[®] 16. 1.0.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Extracción de pectina

En los ensayos iniciales de optimización de extracción, se partió de un material constituido por una mezcla de albedo y flabedo húmedos (50 gr; H.R: 70,36%). A diferencia de algunos autores, se partió del material húmedo, para reducir el gasto energético por secado, ya que posteriormente este material se rehidrata. Según los datos obtenidos y a partir del análisis del diseño experimental, se observa que los parámetros que tienen un mayor efecto en el rendimiento de extracción de sólidos insolubles en etanol (potencialmente pectinas) son el tiempo de hidrólisis y la relación materia orgánica/volumen de solvente; encontrándose en general, mejores rendimientos a medida que se aumenta el tiempo de hidrólisis. En la figura 16 se representan gráficamente los efectos de cada variable en el proceso, estos datos muestran los cambios generados por cada factor con respecto a la variable respuesta rendimiento, como se observa, en las condiciones experimentales empleadas, el tiempo de hidrólisis mejora el rendimiento, mientras que otros factores como el pH podrían dar lugar a su disminución (sin embargo este efecto no es estadísticamente significativo), posiblemente por la hidrólisis de grupos susceptibles como los esterés.

Figura 16. Estimación de los efectos principales que afectan el rendimiento en la extracción de sustancias insolubles en alcohol.



Estos resultados muestran rendimientos superiores al 10 % y a tiempos superiores a tres horas como se observa en la tabla 7, lo cual está de acuerdo con las expectativas de rendimiento para este tipo de procesos, al comparar con lo descrito por otros autores [157], [158], [159], [160], incluso, teniendo en cuenta que se partió de material intacto, se obtienen sólidos con color crema claro bastante adecuado para el propósito de los objetivos y comparativamente muy parecido al de las pectinas comerciales. El corrido

experimental numero 11 reportó un rendimiento del 15% que no está de acuerdo a comportamiento estadístico de los resultados, por ello no se tuvo en cuenta.

Tabla 7. Rendimiento en la extracción de sustancias insolubles en alcohol, según diseño experimental factorial 2⁴

Corrido experimental	Temperatura (°C)	pH	Relación materia orgánica/solvente	Tiempo (h)	Rendimiento
1	65	2	01:10	1	3,1
2	65	2	01:10	3	7,6
3	75	2	01:10	1	8
4	65	1	01:20	3	13,7
5	70	1,5	01:15	2	3,7
6	65	1	01:20	1	7,2
7	65	1	01:10	1	3,2
8	65	2	01:20	1	3,2
9	75	2	01:10	3	8,5
10	65	1	01:10	3	12,7
11	75	1	01:20	1	15
12	65	2	01:20	3	11,8
13	75	1	01:20	3	13,4
14	75	1	01:10	1	4,3
15	75	1	01:10	3	10,7
16	75	2	01.20	1	6,2
17	75	2	01:20	3	12,9

El rendimiento de la extracción de pectina es similar a los reportados para otras fuentes de residuos de cítricos, donde se encuentran rendimientos del 16.9% para la naranja Navel, del 20.0% para la naranja Valencia, del 23.02% para la naranja dulce y del 16.01% para la mandarina Satsuma. Para la toronja en base seca se han informado rendimientos del 28.4-33.7% [159].

3.3.2 Hidrodestilación de aceites esenciales

La densidad es una magnitud que expresa la relación entre la masa y el volumen de un cuerpo. La densidad es una magnitud intensiva. Por lo que permite caracterizar a una sustancia diferenciándola de otras. Los cambios apreciables en la densidad permiten suponer que en relación a la masa, la composición de los aceites hidrodestilados en

ambas especies es diferente, la variación de la densidad dado el experimento de extracción de zumos es significativa, por que se observan diferencias en el orden de 0.015 y 0.028 centésimas, en las dos especies como se observa en la tabla 8. Adicionalmente, también se aprecian cambios en cuanto al contenido de AE en los residuos vegetales, hay pérdidas significativas en los rendimientos, estos deltas en el rendimiento se hacen notorios al comparar los residuos de ambas tecnologías, reportando valores de 0.067 y 0.164 (Clementina y Valencia) que representan pérdidas del 23.26 y 33.33% (respectivamente) en AE cuando se emplea tecnología Zumex, lo cual es bastante considerable dado que en el contexto general, el rendimiento de estos aceites es bastante bajo y además se trata de un sistema multicomponente.

La diferencia entre los valores de densidad y rendimiento están relacionados con el efecto mecánico dada la relación entre los frutos y el principio de funcionamiento de las maquinas, por ello, es importante mencionar que en virtud de las notorias diferencias que existen entre los tejidos de la piel y al diámetro de frutos de ambas especies vegetales, los resultados no están asociados a la forma en que las maquinas afectan a cada una de las especies en particular, por el contrario se puede observar que estos equipos operan produciendo zumos y residuos en forma característica, no importando las particularidades de cada especie, lo cual es relevante dado el alto valor de las propiedades organolépticas y funcionales, incluso la trazabilidad y denominación de origen en el mercado internacional de zumos frescos y procesados, naturalmente, también para la selección de tecnología y residuos para la explotación comercial de AE.

Tabla 8. Densidad y rendimiento de aceites esenciales hidrodestilados en base húmeda (69,45 %H).

Material vegetal	Densidad (n:3) \pm SD (gr/ml) 20 °C	(%) Rendimiento (n:3) \pm SD
m. Clementina ZUMEX	0,859 \pm 0,003	0,221 \pm 0,003
m. Clementina FMC	0,844 \pm 0,002	0,288 \pm 0,006
n. Valencia ZUMEX	0,876 \pm 0,005	0,328 \pm 0,004
n. Valencia FMC	0,848 \pm 0,005	0,492 \pm 0,003

El impacto tecnológico sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas (funcionales) en zumos de cítricos ha sido poco difundida, en particular, un estudio realizado en dos clones de limón (*Citrus limón*, clones: Verna y Fino) y tres tecnologías de extracción (Expresión manual, FMC e Indelicato System) muestra un comportamiento diferencial

en cuanto a la sensibilidad que poseen algunos grupos de sustancias a estos modos de extracción [161], [162], obteniéndose marcadas diferencias, en acuerdo con algunos de nuestros resultados.

3.3.3 Composición química de aceites esenciales hidrodestilados

Estos materiales presentaron diferencias significativas respecto a la composición porcentual de los constituyentes en la mezcla total de volátiles, se observa como el limoneno (compuesto mayoritario) reporta cambios cuantitativos de más del 20% cuando se emplean las dos técnicas de extracción en ambas especies vegetales. Es bastante notorio que en estos aceites esenciales las sustancias más sensibles al proceso de extracción de los frutos se dan a índices de retención superiores a 1100 (HP-5ms), ver anexo 1, zona en donde es común encontrar monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos al final de los cromatogramas, estas sustancias se encuentran notoriamente deprimidas en los aceites extraídos de residuos producidos por maquinas zumex y en forma contraria, abundan en aceites de residuos de maquinas fmc, de hecho, el aspecto de los cromatogramas de los AE de mandarina relacionados con esta última tecnología presentan un perfil químico similar al de un patrón de aceite esencial de *Citrus reticulata* (Fluka FCC) obtenido por expresión, lo que significa que FMC produce residuos con un balance cuali-cuantitativo de componentes similar al que originalmente se encuentra el aceite en los frutos. En la tabla 9 se observan los compuestos que identifican a cada especie dadas las condiciones experimentales de extracción de zumo del estudio, adicionalmente, en el anexo 1 se observa como la tecnología de extracción produce cambios cuantitativos críticos en metabolitos que son sensibles para cada una de las especies, pudiendo de esta forma establecer los marcadores de tecnología de extracción para los residuos de naranja y mandarina en las condiciones del estudio. Lo anterior es importante para definir la calidad y trazabilidad de origen de los residuos y/o aceites.

En relación al origen biogenético y a la amplia variabilidad estructural de los componentes volátiles, el metabolismo terpenico en cítricos expresa un quimiotipo bien definido para cada una de sus especies, en este estudio, el quimiotipo está dado en base

al contenido de limoneno (94-97%, en condiciones normales, para ambas frutas), siendo el grupo de los monoterpenos quien ocupa el segundo lugar en orden cuantitativo, con representación importante de alfa-tujeno, alfa y beta-pineno, beta mirceno y alfa-fellandreno, igualmente entre los sesquiterpenos se destacan el selineno, valenceno, biciclogermacrano, 10-epi-gama-eudesmol y germacrano B en el caso de naranja, y (E,E)-alfa-farneceno, alfa-muuroleno, beta-copaeno y beta-farneseno en mandarinas. En ambas especies aparecen también aldehídos muy comunes como octanal, decanal y dodecanal, y alcoholes como n-octanol, linalool, 4-terpineol, alfa-terpineol, entre otros.

Mediante análisis multivariado (PCA) de los grupos de muestras de mandarina y naranja se obtiene una dispersión que forma cuatro cluster, como se observa en la figura 17, dos de ellos están diferenciados por el contenido de alfa-terpineol para m. clementina y gama-terpineno en n. valencia, estos dos marcadores no definen la identidad con exactitud quimotaxonómica pero clasifican las muestras según procedencia tecnológica y especie, como una adecuada distancia entre ellas, esta diferenciación viene dada por el hecho de que ambas técnicas imparten pérdidas a cada uno de estos marcadores en forma característica, de esta manera se observan cambios muy significativos al expresar estas diferencias como cocientes Fmc/Zumex (cF/Z) para cada marcador, en n. Valencia cF/Z para gama-terpineno y alfa-terpineol es 111.48 y 0.97, respectivamente; en el caso de m. Clementina se obtuvieron cocientes de 1.10 y 10.07.

El perfil cromatográfico identifica los aceites provenientes de las dos especies (en zumos FMC) y establece en este caso, que los AE extraídos de residuos de extractores Zumex no poseen una variabilidad amplia que permita obtener una distancia significativa entre los clusters, como ocurre en las muestras de maquinas FMC, por ello, los clusters de AE Zumex se definen principalmente con base al contenido de limoneno, característica que no muy útil para la definir la identidad de la especie con base en el quimiotipo de su aceite, lo cual se ha establecido para ambas especies vegetales, tanto en condiciones tropicales y subtropicales. La distancia que existe entre los cuatro grupos de muestras es suficiente para establecer el impacto tecnológico en los residuos generados, aspecto que está de acuerdo con las diferencias encontradas en la densidad de los materiales.

Tabla 9. Principales componentes identificados en AE de n. Valencia y m. Clementina provenientes de residuos de dos tecnologías de extracción de zumos.

S ¹	Compuesto	IRR ²		Porcentaje relativo de aéreas ± SD en AE de RAIC, n: 6			
		HP1	HP5	NV Zumex	NV FMC	MC Zumex	MC FMC
1	2-butanona	571	594	0,003 ± 0,00	0,008 ± 0,00	ND	ND
2	5-metilfurano	585	600	0,003 ± 0,00	0,002 ± 0,00	ND	ND
3	dimetilvinilcarbinol	600	623	0,003 ± 0,00	0,013 ± 0,00	ND	ND
4	hexanal	777	802	0,003 ± 0,00	0,006 ± 0,00	ND	ND
5	furfural	808	836	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,018 ± 0,00
6	(E)-2-hexenal	813	841	0,003 ± 0,00	0,025 ± 0,00	ND	ND
7	(Z)-3-hexenal	834	855	0,003 ± 0,00	0,016 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,050 ± 0,00
8	n-hexanol	847	871	0,003 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,040 ± 0,00
9	isoamil acetato	856	877	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,010 ± 0,00
10	2-heptanona	864	892	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,010 ± 0,00
11	α-tujeno	920	924	0,003 ± 0,00	0,438 ± 0,00	0,019 ± 0,00	0,010 ± 0,00
12	1R-α-pineno	932	939	0,641 ± 0,02	2,573 ± 0,00	1,439 ± 0,01	1,070 ± 0,00
13	Campheno	945	954	0,003 ± 0,00	0,021 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,010 ± 0,00
14	2,6,6-trimetil-2-viniltetrahidropirano	957	972	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,030 ± 0,00
15	Sabineno	968	974	0,117 ± 0,02	0,176 ± 0,01	0,874 ± 0,00	0,250 ± 0,03
16	β-Pineno	972	979	0,026 ± 0,01	0,900 ± 0,01	0,137 ± 0,006	0,080 ± 0,01
17	β-mirceno	987	992	2,33 ± 0,006	5,26 ± 0,11	4,93 ± 0,01	4,21 ± 0,02
18	3-metilen-1,5,5-trimetilciclohexeno	991	995	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,020 ± 0,00
19	Octanal	990	999	0,102 ± 0,01	0,110 ± 0,00	0,249 ± 0,01	0,020 ± 0,00
20	α-fellandro	995	1001	0,084 ± 0,01	0,214 ± 0,00	0,180 ± 0,00	0,260 ± 0,00
21	delta-2-careno	996	1003	0,067 ± 0,01	0,001 ± 0,00	0,174 ± 0,00	0,210 ± 0,00
22	α-Terpineno	1008	1017	0,040 ± 0,01	0,383 ± 0,00	0,381 ± 0,00	0,480 ± 0,01
23	p-Cimeno	1015	1025	0,003 ± 0,00	0,150 ± 0,00	0,054 ± 0,01	0,060 ± 0,00
24	limoneno	1021	1032	93,43 ± 0,55	70,29 ± 0,34	82,04 ± 0,27	55,13 ± 0,20
25	β-ocimeno	1030	1037	0,051 ± 0,01	0,285 ± 0,00	0,083 ± 0,00	0,110 ± 0,01
26	gama-Terpineno	1045	1060	0,122 ± 0,01	13,60 ± 0,016	0,655 ± 0,01	0,720 ± 0,00
27	n-octanol	1052	1068	0,308 ± 0,02	0,085 ± 0,009	0,537 ± 0,00	0,310 ± 0,01
28	(E)-linalool oxido	1066	1073	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,110 ± 0,01
29	Terpinoleno	1076	1089	0,052 ± 0,01	0,770 ± 0,001	0,228 ± 0,00	0,740 ± 0,00
30	linalool	1082	1097	1,047 ± 0,01	1,442 ± 0,000	2,360 ± 0,01	2,950 ± 0,01
31	hotrienol	1087	1101	ND	ND	0,033 ± 0,00	0,040 ± 0,01
32	nonanal	1089	1102	0,071 ± 0,01	0,039 ± 0,001	ND	ND
33	1,3,8-p-mentatrieno	1096	1110	ND	ND	0,011 ± 0,00	0,020 ± 0,01
34	(Z)-p-Menth-2-en-1-ol	1099	1119	0,018 ± 0,00	0,018 ± 0,001	ND	ND
35	β-terpineol	1127	1144	0,003 ± 0,00	0,055 ± 0,001	0,047 ± 0,00	0,400 ± 0,01
36	isopulegol	1137	1150	0,003 ± 0,00	0,009 ± 0,001	ND	ND
37	citronelal	1141	1153	0,003 ± 0,00	0,060 ± 0,001	ND	ND
38	ocimeno	1141	1155	ND	ND	0,002 ± 0,00	0,010 ± 0,00
39	(E)-β-terpineol	1152	1163	0,003 ± 0,00	0,012 ± 0,00	0,028 ± 0,00	0,060 ± 0,00
40	4-terpineol	1168	1178	0,163 ± 0,02	0,386 ± 0,01	1,414 ± 0,01	1,910 ± 0,02

*Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas,
Estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.*

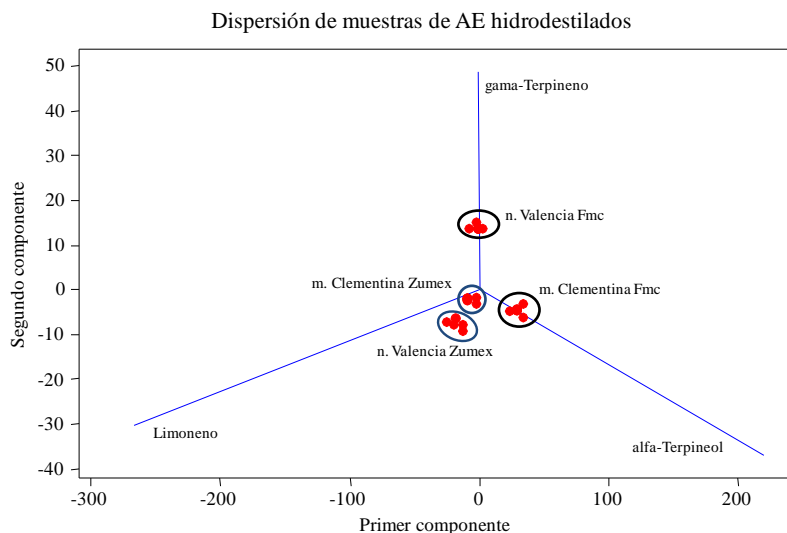
41	α -terpineol	1179	1189	0,763 \pm 0,02	0,743 \pm 0,00	2,914 \pm 0,01	29,330 \pm 0,17
42	decanal	1191	1202	0,278 \pm 0,01	0,158 \pm 0,00	0,496 \pm 0,00	0,300 \pm 0,00
43	n-octil acetato	1197	1214	0,003 \pm 0,00	0,008 \pm 0,00	0,002 \pm 0,00	0,110 \pm 0,00
44	(E)-carveol	1203	1217	0,003 \pm 0,00	0,017 \pm 0,00	0,029 \pm 0,00	0,060 \pm 0,01
45	β -Citronellol	1213	1226	0,003 \pm 0,00	0,133 \pm 0,00	0,098 \pm 0,00	ND
46	(Z)-carveol	1216	1229	ND	ND	0,012 \pm 0,000	0,040 \pm 0,00
47	Nerol	1218	1231	0,041 \pm 0,00	0,074 \pm 0,00	0,032 \pm 0,00	0,130 \pm 0,01
48	o-metil-timol	1222	1235	0,003 \pm 0,00	0,087 \pm 0,00	ND	ND
49	(Z)-citral	1224	1238	0,003 \pm 0,00	0,026 \pm 0,00	ND	ND
50	carvone	1227	1243	0,003 \pm 0,00	0,014 \pm 0,00	ND	ND
51	geraniol	1237	1253	0,044 \pm 0,01	0,024 \pm 0,00	ND	ND
52	n-decanol	1244	1270	0,019 \pm 0,01	0,001 \pm 0,00	0,120 \pm 0,01	0,170 \pm 0,01
53	(E)-citral	1252	1272	0,026 \pm 0,01	0,030 \pm 0,00	ND	ND
54	perillaldehido	1255	1274	0,003 \pm 0,00	0,061 \pm 0,00	0,018 \pm 0,01	ND
55	Timol	1273	1290	0,003 \pm 0,00	0,271 \pm 0,00	ND	ND
56	cuminol	1277	1291	0,003 \pm 0,00	0,015 \pm 0,00	ND	ND
57	o-metoxi-acetofenona	1279	1291	0,003 \pm 0,00	0,010 \pm 0,00	ND	ND
58	δ -elemeno	1326	1338	0,003 \pm 0,00	0,045 \pm 0,00	ND	ND
59	α -terpineol-acetato	1338	1349	ND	ND	0,002 \pm 0,00	0,010 \pm 0,00
60	citronellil acetato	1348	1353	0,003 \pm 0,00	0,058 \pm 0,00	ND	ND
61	neril acetato	1350	1362	0,003 \pm 0,00	0,067 \pm 0,00	ND	ND
62	α -copaeno	1361	1377	0,003 \pm 0,00	0,052 \pm 0,00	0,033 \pm 0,00	0,050 \pm 0,00
63	geranil acetato	1365	1381	0,003 \pm 0,00	0,015 \pm 0,00	ND	ND
64	β -cubebeno	1367	1388	ND	ND	0,013 \pm 0,01	0,010 \pm 0,00
65	β -elemeno	1378	1391	0,003 \pm 0,00	0,046 \pm 0,00	ND	ND
66	dodecanal	1385	1409	0,019 \pm 0,01	0,018 \pm 0,00	0,058 \pm 0,01	0,070 \pm 0,00
67	(Z)-cariofileno	1403	1410	0,003 \pm 0,00	0,055 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	0,030 \pm 0,00
68	β -copaeno	1417	1432	ND	ND	0,015 \pm 0,00	0,020 \pm 0,00
69	β -farneseno	1429	1443	ND	ND	0,009 \pm 0,00	0,020 \pm 0,00
70	α -cariofileno	1440	1455	0,003 \pm 0,00	0,042 \pm 0,00	0,002 \pm 0,00	0,010 \pm 0,00
71	germacrano D	1471	1485	0,003 \pm 0,00	0,173 \pm 0,00	0,014 \pm 0,00	0,020 \pm 0,00
72	β -selineno	1482	1490	0,003 \pm 0,00	0,018 \pm 0,00	ND	ND
73	valenceno	1486	1496	0,021 \pm 0,00	0,018 \pm 0,00	ND	ND
74	biciclogermacrano	1490	1500	0,003 \pm 0,00	0,030 \pm 0,00	ND	ND
75	(E,E)- α -farneceno	1491	1502	ND	ND	0,043 \pm 0,0	0,060 \pm 0,00
76	α -muuroleno	1494	1508	0,003 \pm 0,00	0,026 \pm 0,00	0,015 \pm 0,00	0,020 \pm 0,00
77	delta-Cadineno	1519	1523	0,003 \pm 0,00	0,077 \pm 0,00	0,041 \pm 0,00	0,060 \pm 0,00
78	germacrano B	1554	1561	0,003 \pm 0,00	0,189 \pm 0,00	ND	ND
79	cariofileno epoxido	1567	1583	0,003 \pm 0,00	0,012 \pm 0,001	ND	ND
80	10-epi-gama-eudesmol	1610	1624	0,003 \pm 0,00	0,012 \pm 0,00	ND	ND
81	gama-eudesmol	1608	1632	ND	ND	0,002 \pm 0,000	0,010 \pm 0,00
82	α -cadinol	1645	1654	0,003 \pm 0,00	0,010 \pm 0,00	ND	ND
83	β -sinensal	1676	1700	ND	ND	0,015 \pm 0,00	0,020 \pm 0,00
84	α -sinensal	1726	1752	ND	ND	0,142 \pm 0,00	0,110 \pm 0,00

¹ Numeración de las señales cromatográficas identificadas.

² Índices de retención relativa en dos columnas capilares.

ND: No detectado.

Figura 17. Componentes principales de AE de n. Valencia y m. Clementina provenientes de residuos de dos tecnologías de extracción de zumos.



3.3.4 Composición química de la fracción volátil de zumos de n. Valencia y m. Clementina mediante HS/SPME/GC/MS

Algunos investigadores han estudiado compuestos volátiles de cítricos utilizando diferentes métodos analíticos y como resultado de esto se han descrito más de 200 componentes responsables del aroma y sabor [163]. Todos los compuestos volátiles identificados en los zumos dadas las condiciones experimentales se han reportado previamente en las dos especies de cítricos estudiadas [164] como se aprecia en la tabla 10. No obstante, el perfil químico de la fracción volátil en estos zumos presentó diferencias significativas como puede verse en el anexo 2, encontrándose igualmente, como en el caso de los AE hidrodestilados del numeral anterior, tres zonas de hallazgos bien diferenciadas en los cromatogramas, en este caso, la fracción de monoterpenos presenta una composición cualitativa similar en los zumos de ambas tecnologías, y respecto a la zona de monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos se encuentra la principal variabilidad cuali-cuantitativa. El análisis HS-SPME/GC/MS condujo a la identificación de 69 compuestos representativos que representaron más del 99,34 % de

la fracción volátil total identificada para todas las muestras, lo cual permite establecer adecuadamente el impacto tecnológico en la calidad organoléptica de estos productos.

Los zumos de la técnica Zumex presentan componentes volátiles principales en ambas especies, monoterpenos cíclicos (95% y 97%, en naranja y mandarina, respectivamente), representados principalmente por limoneno; los monoterpenos no cíclicos (0,03% y 0,75), principalmente β -mirceno; compuestos no terpénicos (0,50% y 0,61), principalmente n-octanal y n-decanal; y sesquiterpenos (0,87%), principalmente α -copaeno, trans-cariofileno y valenceno en naranja, y en mandarina (0,05%), representados por delta-cadineno y (E,E)-alfa-farneceno. Para la tecnología FMC los componentes volátiles presentaron una distribución porcentual diferente, aproximadamente, los monoterpenos cíclicos (91,40% y 93,20%, en naranja y mandarina, respectivamente), representados por limoneno, beta-mirceno, beta-pineno, sabineno y 1R-alfa-pineno; los compuestos no terpénicos (2,66% y 2,47%), principalmente n-octanal y n-decanal. Otros componentes como monoterpenos no cíclicos, sesquiterpenos y sus productos oxigenados se encuentran drásticamente deprimidos, sin destacarse alguno en particular. Otros compuestos reportados en la tabla 10 se identificaron específicamente en cada especie y constituyen la base metabólica para su identificación.

Los consumidores juzgan la aceptabilidad de alimentos en gran medida sobre la base del sabor y el aroma. Estas dos propiedades están constituidas por reacciones complejas del gusto y receptores olfativos con compuestos en el alimento. Algunos compuestos en la fracción volátil de zumos de cítricos están relacionados con descriptores sensoriales. Así, una mezcla compleja tendrá una respuesta compleja. Al comparar el total del área cromatográfica de las muestras, se obtiene que los zumos de tecnología fmc presentaron una fracción volátil muy baja en condiciones HS (13,45% y 11,62%, para naranja y mandarina, respectivamente) respecto a los zumos zumex. De esta manera, se observa que los zumos zumex presentan un alto contenido de aceite esencial, expresado por una relación de aéreas totales zumex:FMC, fue aproximadamente 9:1 en todos los casos. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la compleja calidad sensorial de los zumos, la cual podría explicarse por la mayor presencia de compuestos relacionados con

descriptores de pungencia en boca (irritante), oleoso y notas verdes para productos zumex.

Tabla 10. Compuestos volátiles extraídos mediante HS/SPME de N. Valencia y m. Clementina), usando extractores industriales de zumos. Porcentajes relativos de área (%) \pm SD (n= 6).

S ¹	Compuesto	IRR ²		Porcentaje relativo de aéreas normalizadas \pm SD en zumos			
		HP1	HP5	NV ZUMEX	NV FMC	MC ZUMEX	MC FMC
1	2-butanona	571	594	0,01 \pm 0,000	0,04 \pm 0,004	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
2	5-metilfurano	585	600	0,03 \pm 0,000	0,02 \pm 0,016	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
3	Dimetilvinilcarbinol	600	623	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
4	Hexanal	777	802	0,01 \pm 0,000	0,05 \pm 0,025	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
5	Furfural	808	836	0,12 \pm 0,000	0,07 \pm 0,061	0,01 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
6	α -Tujeno	920	930	0,00 \pm 0,000	0,33 \pm 0,190	0,14 \pm 0,010	0,05 \pm 0,010
7	1R- α -pineno	932	939	0,34 \pm 0,000	4,00 \pm 0,220	0,00 \pm 0,000	9,64 \pm 0,070
8	Camfeno	945	954	0,32 \pm 0,000	0,11 \pm 0,160	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
9	Sabineno	968	974	0,01 \pm 0,000	2,23 \pm 1,282	0,17 \pm 0,041	5,54 \pm 0,159
10	β -Pineno	972	979	0,03 \pm 0,000	4,58 \pm 2,638	0,00 \pm 0,000	7,11 \pm 0,238
11	β -Mirceno	987	992	0,02 \pm 0,000	4,67 \pm 0,688	0,80 \pm 0,017	5,95 \pm 0,098
12	Octanal	990	999	0,05 \pm 0,000	1,09 \pm 0,614	0,31 \pm 0,007	1,09 \pm 0,028
13	α -Phellandreno	995	1001	0,01 \pm 0,000	1,13 \pm 0,647	0,01 \pm 0,000	1,33 \pm 0,007
14	delta-2-careno	996	1003	0,03 \pm 0,000	0,27 \pm 0,145	0,03 \pm 0,000	0,27 \pm 0,036
15	α -Terpineno	1008	1017	0,02 \pm 0,000	0,06 \pm 0,033	0,02 \pm 0,000	0,07 \pm 0,010
16	p-Cimeno	1015	1025	0,05 \pm 0,001	0,09 \pm 0,045	0,05 \pm 0,002	0,00 \pm 0,000
17	limoneno	1021	1032	95,35 \pm 0,080	76,08 \pm 0,097	97,51 \pm 0,034	65,49 \pm 0,127
18	β -Phellandreno	1028	1032	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,01 \pm 0,000
19	(Z)- β -Ocimeno	1030	1037	0,09 \pm 0,001	0,09 \pm 0,052	0,01 \pm 0,001	0,09 \pm 0,004
20	(E)- β -Ocimene	1035	1049	0,01 \pm 0,001	0,01 \pm 0,003	0,00 \pm 0,000	0,01 \pm 0,000
21	γ -Terpineno	1045	1060	0,17 \pm 0,001	0,17 \pm 0,099	0,04 \pm 0,004	0,17 \pm 0,015
22	(Z)-sabineno hidrato	1053	1069	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 0,000	0,00 \pm 0,000
23	p-menta-3,8-dieno	1064	1073	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
24	Terpinoleno	1076	1089	0,12 \pm 0,001	0,11 \pm 0,066	0,01 \pm 0,000	0,12 \pm 0,010
25	Linalool	1082	1097	0,39 \pm 0,001	0,89 \pm 0,444	0,39 \pm 0,005	0,89 \pm 0,184
26	(E)-sabineno hidrato	1088	1100	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
27	α -Campholenal	1111	1130	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
28	(E)-Limonene oxide	1121	1139	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
29	Camphene hydrate	1131	1149	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
30	Citronelal	1141	1153	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
31	Pineno oxido	1138	1157	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
32	Phellandral	1151	1159	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
33	(E)- β -terpineol	1152	1163	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
34	4-Terpineol	1168	1178	0,34 \pm 0,001	0,34 \pm 0,198	0,04 \pm 0,007	0,14 \pm 0,059
35	α -Terpineol	1179	1189	0,85 \pm 0,001	0,85 \pm 0,488	0,02 \pm 0,002	0,05 \pm 0,003
36	phellandreno epoxido	1182	1191	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
37	(Z)-piperitol	1185	1195	0,00 \pm 0,002	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
38	Myrtenol	1176	1194	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
39	matil-alfa-ciclogeraniato	1180	1200	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
40	Decanal	1191	1202	0,46 \pm 0,001	1,57 \pm 0,810	0,29 \pm 0,003	1,38 \pm 0,074
41	(E)-Piperitol	1103	1210	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
42	β -Citronellol	1213	1226	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000
43	Carvona	1227	1243	0,00 \pm 0,001	0,00 \pm 0,001	0,01 \pm 0,000	0,00 \pm 0,000

44	etil-salicilato	1250	1272	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
45	Perillaldehido	1255	1274	0,36 ± 0,001	0,06 ± 0,001	0,01 ± 0,000	0,00 ± 0,000
46	Timol	1273	1290	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
47	Cuminol	1277	1291	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
48	o-metoxi-acetofenona	1279	1291	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
49	δ-Elemeno	1326	1338	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
50	α-cubebeno	1330	1351	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,01 ± 0,000	0,00 ± 0,000
51	α-copaeno	1361	1377	0,12 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,000	0,02 ± 0,010
52	β-cubebeno	1367	1388	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,53 ± 0,015
53	Dodecanal	1385	1409	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,02 ± 0,000	0,00 ± 0,000
54	α-(Z)-bergamoteno	1394	1415	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
55	(E)-cariofileno	1402	1420	0,44 ± 0,001	0,04 ± 0,022	0,00 ± 0,000	0,04 ± 0,000
56	α-(E)-bergamoteno	1417	1436	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,01 ± 0,000	0,00 ± 0,000
57	(Z)-α-Bisaboleno	1419	1438	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
58	α-cariofileno	1440	1455	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,01 ± 0,000	0,00 ± 0,000
59	Germacrano D	1471	1485	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,01 ± 0,000	0,00 ± 0,000
60	β-Selineno	1482	1490	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
61	valenceno	1486	1496	0,31 ± 0,001	0,11 ± 0,020	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
62	biciclogermacrano	1490	1500	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
63	β-Ionona	1475	1494	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
64	(E,E)-alfa-farneseno	1491	1504	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,02 ± 0,000	0,00 ± 0,000
65	α-muuroleno	1494	1508	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
66	δ-cadineno	1519	1523	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000	0,03 ± 0,000	0,00 ± 0,000
67	(E)-Nerolidol	1543	1564	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
68	β-Sinensal	1676	1700	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
69	α-sinensal	1726	1752	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000

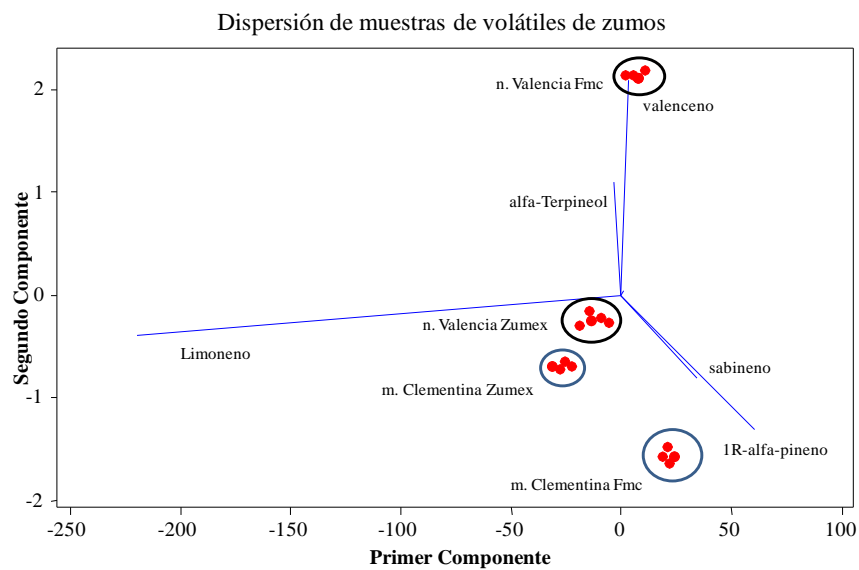
¹ Numeración de las señales cromatográficas identificadas.

² Índices de retención relativa en dos columnas capilares.

ND: No detectado

El análisis multivariado, PCA del grupo de muestras presento una dispersión semejante al grupo de AE, se forman cuatro cluster, como se observa en la figura 18, a su vez diferenciados por marcadores de identidad de especie, los cuales se encuentran en una relación cuantitativa definida por la tecnología de expresión, valenceno y alfa-terpineol para n. valencia y 1R-alfa-pineno y sabineno para mandarina clementina. En zumos, estas tecnologías producen comparativamente perdidas de contenido de muchos de los componentes, en el caso del limoneno, se observan perdidas de aproximadamente de 20 y 31% en naranja y mandarina, respectivamente. Los cluster que caracterizan a las muestras de tecnología zumex presentan mayor relación con el componente limoneno, cuya concentración es mayor en ambas especies y además posee una relación inversa con los marcadores mencionados anteriormente.

Figura 18. Componentes principales de volátiles de zumos de n. Valencia y m. Clementina obtenidos por dos tecnologías de extracción.



3.4 Referencias Bibliográficas

132. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2002. Acuerdo de Competitividad de la Cadena Productiva de Citricultura Tropical de Montaña Centro Occidente de Colombia.
133. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005. Observatorio Agro cadenas Colombia. Documento de trabajo no. 107. La cadena de cítricos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005 Bogotá D.C.
134. May, C.D. 1990. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12. p. 79-99.
135. BeMiller, J. N., Whistler, R. L. 1996. Carbohydrates, In *Food Chemistry*. New York. Marcel Deker. p. 157-223.
136. Novoselskaya, I.L., et al. 2000. Trends in the science and applications of pectins. *Chemistry of Natural Compounds*, 36. p. 1-10.
137. May, C.D. 1990. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12 p. 79-99.
138. Sakamoto, T., R. Hours, A., 1995. Enzymic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. *Process Biochemistry* 30: 5. P. 403-409.
139. Watada A, N Ko, D Minott. 1996. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biol. Technol.* 9. p.115-125.
140. Carbonell X., 1995. La alimentación del Próximo Siglo. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología*. CSIC. 7. Madrid. p. 64-71.
141. Donhowe IG, Fennema O., 1994. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. In: *Edible coatings and films to improve Food quality*. JM Krochta, EA Baldwin, M Nisperos-Carriedo (eds.). Lancaster: Technomic Publishing Co. p 1-24.
142. Günther, E. 1948. *The Essential Oils*. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York.
143. Teuscher, E. Anton, R. Lobstein, A. 2005. *Plantes Aromatiques. Épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Editions Tec & Doc, Paris.
144. Parry, E. J. 1921. *The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes*. 4th Edition. Van Nostrand Co., New York.
145. Muñoz, F. 2002. *Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado*. 4 ED. Ed. Mundi-Prensa: Madrid.
146. Peter, K.V., 2004. *Handbook of Herbs and Spices*. Woodhead Publishing Limited: London.
147. Lahlou, M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* 18. p. 435-448.
148. Grayson, D. H. 2000. Monoterpenoids. *Natural Product Reports* 17: 4. p. 385-419.
149. Wise, M. L., Croteau, R. 1999. in *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoid Biosynthesis*. Elsevier Science Ed. Vol 2. Oxford. p. 97-153.
150. Dewick, P.M. 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley and Sons (Electronic). p. 172-195.

151. Kalapathy, U., Proctor, A., 2001. Effect of acid extraction and alcohol precipitation condition on the yield and purity of soy hull pectin, *Food Chem.* 73:1. p. 393–396.
152. Joye, D.D., Luzio, G.A., 2000. Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH, *Carbohydr. Polym.* 43: 4. p. 337–342.
153. Fishman, M.L., Chau, H.K., 2000. Characterisation of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure, *Carbohydr. Res.*, 323: 4. p. 126–138.
154. El-Nawawi, S.A., Shehata, F.R., 1987. Extraction of pectin from Egyptian orange peel. Factors affecting the extraction. *Biol. Wastes*, 20: 4. p. 281–290.
155. Parry, E. J. *The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes.* 4th Edition. Van Nostrand Co., NY, USA, 1921.
156. Adams, R.P. 2001. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy.* Allured, Carol Stream USA.
157. Mesbahi G, Jamalian J, Farahnaky A. 2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloid.* 19: 4. p. 731-738.
158. Liu Y, Shi J, Langrish TAG. 2006. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chem Eng J.* 3: 120. p. 203-209.
159. Devia JE. 2003. Proceso para producir pectinas cítricas. *Revista Universidad Eafit.* 39: 129. p. 21-30.
160. Wang YC, Chuang YC, Hsu HW. 2007. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chem.* 106: 1. p. 277-284.
161. Marín, F.R., Martínez, M., Uribealago, S. S., Frutos, M.J., 2002. Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chem.* 78. p. 319–324.
162. Marín, F. R., Soler-Rivas, C., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry* 100: 2. p 736-741.
163. Hôgnadóttir A, Rouseff RL. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatographyolfatometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 998 (1-2). p. 201-211.
164. Reinhard, H., Sager, F., 2008. Citrus juice classification by SPME-GC-MS and electronic nose measurements. *LWT - Food Science and Technology* 41: 10. p. 1906-1912.

4. ANALISIS METABOLOMICO EN DOS INDICES DE MADURACION Y CINCO PROCEDENCIAS DE CULTIVO

4.1 Introducción

4.1.1 Relación Metabolismo-Ambiente

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en un organismo. Estos complejos procesos interrelacionados son la base de la vida a escala molecular, y permiten las diversas actividades de las células: crecer, reproducirse, mantener sus estructuras, responder a estímulos, a condiciones de stress, etc. La economía de estas actividades celulares impone sobre sus recursos la obligación de organizar estrictamente las reacciones químicas del metabolismo en vías o rutas metabólicas, donde una molécula precursora (sustrato) es transformada en otra (producto), y esta a su vez funciona como sustrato para generar otro producto, siguiendo una secuencia de reacciones bajo la intervención de diferentes complejos bioquímicos, obteniéndose así, una expresión metabólica. En el estudio de la bioquímica vegetal hay de por medio una relación eco-fisiológica que puede explicar la trayectoria que siguen diferentes procesos y caracteres como, procesos fisiológicos, la base morfológica externa e interna, así como las manifestaciones bioquímicas y potencialidades genéticas a su vez correlacionándolas con el ambiente donde se desarrollan. Esta relación eco-fisiológica se ha modelado mediante la teoría de los sistemas [165], en la categoría de los sistemas abiertos, en este caso la planta intercambia materia y energía con el medio ambiente. Este sistema abierto está influenciado por el medio que lo rodea, por lo que todas sus funciones se ven afectadas de una u otra manera por la temperatura, humedad, disponibilidad de agua, radiación, presión atmosférica, etc. Esto quiere decir que las condiciones que lo rodean afectan el funcionamiento de este sistema abierto, de manera que una especie cualquiera, natural o cultivada en un ambiente determinado deberá ajustar sus mecanismos fisiológicos y morfológicos ante un ambiente cambiante, exhibiendo una respuesta o comportamiento que se traduce morfológica (altura, tamaño de hoja, productividad, etc.) y fisiológicamente (respiración y fotosíntesis a ciertos niveles, producción de ciertos

compuestos orgánicos, etc.) de tal forma que podrá estudiarse con métodos adecuados para conocer su estatus [166], [167], [168]. Estos estudios de relación metabolismo-ambiente traen de por medio una consideración fundamental para un grupo de factores que afectan (perturban) directamente al sistema abierto, el ruido [169]. Estas perturbaciones de base se manifiestan en forma diferente cuando se desarrollan en condiciones ex-situ, especies tropicales y subtropicales desarrolladas en zonas templadas, o especies de climas mediterráneos cultivadas en zonas tropicales o subtropicales, por ejemplo, como es el caso de los cítricos y la amplia variabilidad de su calidad.

Un ruido puede definirse como cualquier perturbación que afecta el normal funcionamiento de un sistema. Desde este punto de vista en la sociedad moderna hay muchos ruidos que están afectando o que podrían afectar potencialmente al sistema estudiado, algunos ejemplos: crecimiento de la población que compite por espacios, contaminación del agua, suelo y aire, escasez de agua, debilitamiento de la capa de ozono que ocasiona una mayor entrada de radiación UVB con efectos directos sobre centros fotosintético [170], lluvia ácida, etc. Según la teoría de los sistemas podríamos hablar de ruidos en el ambiente, es decir, efectos nuevos que van a tender a alejar el sistema organismo-ambiente de las condiciones óptimas en que se encontraba. Dejando al organismo vegetal ante un posible estado de estrés como respuesta a los cambios.

4.1.2 Estrés vegetal

Levitt (1980), propuso una definición para el estrés, que es: "cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para un organismo viviente". El significado de estrés en inglés es el de justamente presionar, estrechar, oprimir. Hay que distinguir entre el agente o factor que produce el estrés y el resultado o alteración causada. Muchas veces se utiliza el término estrés para indicar ambas cosas. Otros autores denominan agente estresante o estresor al factor perturbador, por ejemplo una helada, y estrés al resultado obtenido. El mismo autor sugirió que se llame "strain" (deformación) a la alteración producida y "estrés" al efecto o factor.

Se pueden distinguir básicamente dos tipos de estrés: los originados por factores bióticos y los originados por factores abióticos. Un ejemplo de estrés biótico sería el que ejerce un conjunto de especies sobre otras especies. Como es el caso de las invasiones producidas por especies patógenas (bacterias, hongos, otros) e incluso otros vegetales (hierbas invasoras) que compiten en los campos por nutrientes y agua con las especies cultivadas. Por otro lado, entre los principales tipos de estrés por factores abióticos tenemos: Térmico (altas y bajas temperaturas (enfriamiento, congelamiento)), Hídrico (agua en exceso (anegamiento) o sequía), Químico (sales, iones, gases, herbicidas), Físico (vientos, presiones altas o bajas, sonidos, electricidad, magnetismo, gravedad alta o baja), Radiación (infrarroja, visible, UV, ionizante).

Clásicamente, el metabolismo se ha estudiado por aproximación reduccionista y se concentra en una ruta metabólica específica, también se dan los estudios en paralelo, que consisten en la identificación de los metabolitos presentes en una célula o tejido; al estudio de todo el conjunto de estas moléculas se le denomina metabolómica. La metabolómica puede definirse como la ciencia -ómica que permite obtener un perfil metabólico de una muestra biológica compleja, a través de la combinación de técnicas analíticas que generan gran cantidad de datos y del análisis estadístico multivariante de ellos.

4.1.3 Metabolómica (Aproximación mediante metabolite profiling)

Los cambios globales en la transcripción de genes (transcriptóma) y en la relación proteica: cantidad/actividad (proteóma), producen certeramente un efecto definitivo en el metabolismo y el contenido de metabolitos (metabóloma) en las células, tejidos y órganos de las plantas. En el pasado, los estudios del metabolismo vegetal se centraron en uno o unos pocos genes, proteínas y/o sus metabolitos. Se han desarrollado nuevas herramientas para medir los niveles de miles de transcripciones de genes y proteínas en paralelo, lo que facilita el estudio no sesgado de los sistemas biológicos [171], [172], [173], [174]. Para complementar estas tecnologías "ómicas" se utiliza la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, junto con herramientas de bioinformática para monitorear los cambios en los niveles de cientos de metabolitos en los diferentes

órganos. Los métodos descritos en este capítulo proporcionan información cualitativa y semi-cuantitativa sobre el metaboloma en el género citrus.

El metaboloma de un organismo constituye un conjunto de metabolitos producidos por el organismo durante su ciclo de vida bajo todas las condiciones posibles, en especial en la relación metabolismo-ambiente. A diferencia del transcriptoma y el proteoma, que se pueden definir con bastante precisión con referencia a una secuencia completa del genoma, el metaboloma es difícil llegar a establecer. La química que abarca el metaboloma es varios órdenes de magnitud más complejo que la química relativamente simple de los ácidos nucleicos y proteínas. Así, el análisis integral de metaboloma de un organismo es un desafío de gran proporción, y que no se ha realizado plenamente para cada especie y en particular para cítricos, máximo cuando se consideran las condiciones tropicales del país. Las distintas especies vegetales contienen decenas de miles de diferentes metabolitos, y el reino vegetal se cree que produce cientos de miles de metabolitos distintos [175].

No existe una plataforma analítica única que permita medir todos los metabolitos en un organismo. La búsqueda del metaboloma se ha traducido en una serie casi desconcertante de sistemas de extracción, separación y detección, muchos de los cuales se han optimizado para el análisis de ciertas clases de compuestos. Estos incluyen sistemas de separación como cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida (LC), y numerosos sistemas de detección, incluyendo, espectrometría de masas (MS), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), ultravioleta y visible (UV-VIS), entre otros [176], [177], [178], [179], [180].

En el contexto analítico se conocen diferentes aproximaciones metodológicas para el estudio del metabolismo por aproximación metabolómica, entre ellas se encuentran principalmente los siguientes.

4.1.3.1 Metabolomics/Metabolómica

Identificación y cuantificación no sesgada de todos los metabolitos en un sistema biológico. La preparación de la muestra no debe excluir a ningún metabolito, la selectividad y la sensibilidad de la técnica analítica debe ser de alta.

4.1.3.2 Metabolite profiling/perfilamiento metabólico

Identificación y cuantificación de un determinado número de metabolitos pre-definidos, generalmente relacionada con una o varias vías metabólicas específicas. La preparación de la muestra está dirigida a grupos de compuestos, se emplean instrumentos para aislar los compuestos de interés de posibles efectos de la matriz antes de la detección, por lo general con separación cromatográfica antes de la detección por espectrometría de masas.

4.1.3.3 Metabolic fingerprinting/Identificación dactilar del metabolismo

Es una metodología de alto flujo, un análisis rápido y global de las muestras para proporcionar la clasificación de especímenes. Generalmente, no se emplea cuantificación e identificación metabólica. Una herramienta de evaluación para discriminar entre muestras de diferentes estados u origen biológico. Preparación de la muestra es sencilla y se requieren tiempos de análisis bajos.

4.1.3.4 Metabolite target analysis/Análisis de Metabolitos Target

Análisis cualitativo y cuantitativo de uno o unos pocos metabolitos relacionados con una reacción metabólica específica. Se requiere preparación de la muestra amplia y la separación de otros metabolitos, este enfoque es empleado especialmente cuando se requieren bajos límites de detección. En general, la separación cromatográfica utiliza espectrometría de masas o detección UV.

4.1.3.5 Metabonomics/Metabonómica

Consiste en la evaluación de los cambios en los niveles de metabolitos endógenos de los tejidos y fluidos biológicos que resultan de los procesos patológicos, enfermedades o los tratamientos terapéuticos.

El acoplamiento de sistemas de separación de alta resolución y sistemas de detección que aportan información estructural, tales como CG-MS, permite el análisis relativamente no sesgado de miles de metabolitos conocidos y desconocidos, que pueden proporcionar una visión novedosa para el sistema biológico en estudio. La

expresión del metabolismo vegetal en condiciones basales y de estrés puede establecerse analíticamente mediante aproximación metabolómica, utilizando herramientas de metabolite profiling con el objeto de establecer el estatus metabólico para un grupo de muestras, determinando cuales son los marcadores de cambio en la población de estudio y permitiendo establecer el impacto de agentes estresores en el metabolismo vegetal [181].

4.1.4 Aplicación metabolómica en el estudio del metabolismo de cítricos

Dados los objetivos propuestos en este trabajo, se requiere establecer una plataforma metabolómica para la adquisición de datos mediante el uso de un sistema GC/qEIMS, como se mencionó antes, esta tecnología permite generar adecuadamente un perfil metabólico representativo de su estatus, producto de su relación con el medio externo.

Actualmente, la aplicación de técnicas ómicas en frutas y cítricos están principalmente enfocadas en aspectos relacionados con la identificación de variedades, diferenciación de la calidad y propiedades organolépticas (nuevos marcadores químicos de calidad sensorial), determinación de autenticidad y adulteraciones en zumos y derivados, evaluación nutrabólica y desarrollo de alimentos funcionales, entre otros. Respecto a su uso en estudios del impacto metabólico sobre cítricos en poscosecha por materiales de recubrimientos comestibles y patógenos (según factores bióticos o abióticos), es un campo de aplicación explorado a muy baja escala en esta comunidad científica, que no arroja a la fecha una producción científica destacable [182], [183].

En este capítulo se efectuó la adaptación metodológica de la disciplina metabolómica, mediante metabolite profiling, se crean nuevas librerías de compuestos volátiles (C10/C15) y no volátiles (constitutivos de SST) carbohidratos (mono, di y trisacáridos), aminoácidos, ácidos grasos saturados, mono y poli-insaturados (C4/C24) y ácidos orgánicos polares presentes en zumos, además se aplicaran herramientas informáticas de deconvolución automatizada y análisis multivariado con el objeto de definir la estandarización de las condiciones de preparación de muestras, operación y adquisición instrumental y análisis de datos.

Se realizará la cuantificación de hesperidina dada la importancia que posee la molécula dentro de fracción de glico-polifenoles en este género vegetal (mayoritario, en mandarina), se establecerá si este compuesto puede marcar variabilidad en la evolución de la madurez, La hesperidina es un flavanon-glicósido (Flavanona, 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxi-, 7-(6-O- α -L-ramnosil-D-glucosido)) que se encuentran en abundancia en cítricos, su forma aglicón se llama hesperetina. Hesperidina ha cobrado interés farmacéutico y en nutrición humana por su impacto positivo en los sistemas bioquímicos que contribuyen al mantenimiento de la integridad vascular.

Como aplicación de las condiciones de análisis establecidas se realizó un experimento que busca establecer marcadores de evolución de la madurez en ejes específicos del metabolismo primario y secundario, usando como modelo mandarina clementina cultivada bajo las condiciones de cinco lotes de producción en la zona citrícola del municipio de Tamesis-Ant.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Caracterización de las muestras

El experimento consistió en un diseño de bloques incompletos al azar con tres grupos de edades de siembra, la unidad experimental estuvo constituida por cinco sub-bloques por bloque (5 repeticiones de 2 árboles), en donde la ubicación de cada árbol se definió por el patrón de siembra y topografía del terreno. La unidad de muestra fue de 15 frutos en el estrato medio por cada árbol. Durante este procedimiento se tomaron dos series de muestras, para índices de madurez en donde se aprecia un color verde en la piel (en etapa verde) y otra serie donde se observa la piel del fruto color amarillo-naranja (etapa madura). De la siguiente forma abreviada, N° muestras para metabolómica: 5 parcelas x 5 grupos de árboles x 2 IM = 50, la procedencia y características generales de los lotes de cultivo se presentan en la tabla 11.

Posterior al muestreo en los lotes de producción de la hacienda la cristalina, los frutos se trasladaron en empaques independientes al laboratorio, donde se extrajo el zumo de los

frutos con un extractor eléctrico construido en acero inoxidable (Breville 800 CPXL, Citrus press), el cual permite aplicar una presión uniforme a los frutos. El zumo se homogenizo y se procedió a almacenar en alícuotas de 50 ml en viales plásticos estériles (Benton Dickinson, 35-2070. EE.UU.) a una temperatura de -20°C hasta el momento de realización de las pruebas.

Tabla 11. Características de lotes de producción de mandarina clementina sometidos a muestreo.

Características de cultivo	Nombre del lote de cultivo				
	Crucero (CR)	Medio (M)	Portada (PT)	Porvenir (PV)	Fátima (F)
Código	A68	A87	A88	A82	A67
Altitud (msnm)	1378	1290	1356	1398	1398
No. de arboles	1982	770	1433	1715	1239
Patrón	L.R.P, C.P.B, Carrizo	Fl. Dr., CPB	Fl. Dr	Fl. Dr	M.C y Fl. Dr
Fecha de siembra	Nov 2004	Nov 2005	Abril 2006	May 2005	Nov 2004
Distancia de siembra	7x5	6x4	6x4	6x4	3x5
Tipo de suelo	Arenolimoso	Arenolimoso	Arenolimoso	Arenolimoso	Arenolimoso
Profundidad efectiva (m)	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Textura	franco	franco	franco	franco	franco
Temp. diurna (°C)	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7
Temp. nocturna (°C)	20.1	20.1	20.1	20.1	20.1
Humedad. Rel. (%)	64.4	64.4	64.4	64.4	64.4
Pluviometría (mm)	1907	1907	1907	1907	1907
Régimen de heladas	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Horas de frío	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

L.R.P Lima Rangpur
C.P.B Citrumelo CPB 4475
Carrizo Citrange Carrizo
M.C Mandarino Cleopatra
Fl. Dr Flying Dragon

Con el fin de relacionar los marcadores resultantes en el estudio metabólico con los parámetros de madurez poscosecha se procedió a la determinación de estos, mediante el uso de métodos generales de análisis.

Los parámetros de madurez analizados fueron los siguientes:

Diámetro ecuatorial, se determinó utilizando un calibrador pie de rey digital (Craftsman profesional. EE.UU.).

Sólidos Solubles Totales (°Brix), se determino con un refractómetro digital (Atago digital refractometer PR-1, Atago Co., Ltd, Tokyo, Japan).

Acidez total, mediante titulación con NaOH 0.1 N y fenolftaleína, los resultados se expresan como g de ácido cítrico en 100 mL de zumo.

Determinación de IM, se calculo mediante la ecuación III.

$$\text{Indice de madurez} = E (\text{°Brix}) / A (\% \text{ acidez})$$

Medición de pH, se midió con un peachímetro digital (Handylab pH 12, Schott-Geräte GmbH, Mainz, Germany).

4.2.2 Contenido de Hesperidina mediante HPLC/DAD

4.2.2.1 Instrumentación

La adquisición de los cromatogramas y la integración de la señal se realizo mediante el uso de un cromatógrafo liquido Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), equipado con una bomba cuaternaria y detector de fotodiodos monitoreando a 280 nm. Las condiciones de análisis se establecieron así: fase móvil agua: acetonitrilo 80:20 en modo isocrático. Se empleó una columna Agilent Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU. 993967-902), el caudal en la columna fue de 0.85 ml/min. La inyección de las muestras se realizo en modo automático.

4.2.2.2 Preparación de muestras

Debido a la baja solubilidad de los flavonoides en el zumo, se procedió a extraer la heperidina con dimetilsulfóxido (DMSO) durante cuatro veces, la separación de la fase orgánica se realizo el mismo número de veces por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Sorvall-Thermo, Waltham, MA, EE.UU.). El análisis se realizó en el sobrenadante DMSO, este método de análisis se utiliza rutinariamente en el laboratorio, el cual fue validado para los siguientes atributos: la linealidad, precisión, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. Los resultados se expresaron como mg de hesperidina/L de zumo.

4.2.3 Metabolite profiling mediante GC/MSD

La metodología que se presenta a continuación se desarrolló a partir de seis etapas, se ilustra el proceso para el análisis de la fracción de azúcares en zumos de cítricos.

4.2.3.1 Extracción de metabolitos de la muestra

Debe ser lo más completa posible, mientras que al mismo tiempo evite la degradación o modificación de los metabolitos.

Perfiles de metabolitos volátiles mediante HS/SPME, se realizó mediante la aplicación descrita en el sección 3.

Perfiles de ácidos grasos. FAMES, la metodología empleada no requiere la extracción de los análogos.

Análisis químico de la fracción de SST (Perfiles de metabolitos polares-TMS), la metodología empleada no requiere la extracción de los análogos.

4.2.3.2 Derivatización

Los metabolitos que no sean volátiles o aptos para cromatografía de gases deben vaporizarse, Es muy frecuente este tipo de reacciones: TMS y TBDMS, Metilación y Metoximación para el análisis de perfiles metabólicos.

Perfiles de metabolitos volátiles mediante HS/SPME, no requiere derivatización.

Perfiles de ácidos grasos FAMES, Los ácidos grasos contenidos en zumos de cítricos deben derivatizarse para ser analizados por cromatografía de gases, se convierten a su forma de metil ester, de allí el nombre internacionalmente conocido para la metodología (FAMES, Fatty acid methyl esters), para ello se aplica una reacción de transesterificación y luego se extraen los FAMES con un solvente apolar.

En un vial de vidrio con tapa rosca y septa se transfieren 500 microlitros de zumo, se secan a 40 °C con circulación de aire. Posteriormente, se adicionan 10 microlitros de ISTD (C19:0 1 mg/L ml en piridina), se añade 1 ml de H₂SO₄ 2,0 % (v/v) en metanol

analítico. Esta mezcla se calentó a 80 °C durante 1 h, al final se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 500 microlitros de solución 5% de NaCl y se agitó con un vortex, se extrajo con porciones de 1 mililitro de hexano (3x1 ml). Se concentraron las extracciones hexánicas hasta sequedad, al final se redisolvió en 500 microlitros de hexano y se transfirió a un vial de cromatografía.

Análisis químico de la fracción de SST (Perfiles de metabolitos polares-TMS), para la derivatización de estos compuestos polares se siguieron las recomendaciones de la guía de derivatización del proveedor del reactivo, realizando adaptación dadas las características de la muestra, de la siguiente manera. 50 microlitros de zumo se adicionaron en un vial de vidrio junto a 20 microlitros de ISTD (Ribitol 50 ppm en metanol/agua 50/50), se secó a 40 °C con circulación de aire. Posteriormente, se adicionan 50 microlitros de piridina analítica y 50 microlitros de BSTFA+TMCS 99:1 (Supelco, North Harrison. EE.UU. 3-3148), se procedió a la reacción durante 2 horas a una temperatura de 80 °C, al final de este tiempo, se evaporó el líquido mediante corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en 100 microlitros de hexano.

4.2.3.3 Separación por GC

Implica la estandarización de condiciones de inyección, programación de la temperatura y elección de fase estacionaria de columna. Los métodos descritos en este numeral utilizan una columna capilar ZB-5 MSi guardian (30 m., 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25 µm, Zebron, Phenomenex. EE.UU. 7HG-G018-11-GGA).

Perfiles de metabolitos volátiles mediante HS/SPME, las condiciones de análisis se establecieron de acuerdo a la aplicación descrita en la sección 3.

Perfiles de ácidos grasos. FAMES, Las muestras se inyectaron a un volumen de 1 microlitro en modo split (5:1, 260°C), con un flujo constante de Helio (1 ml/min), el horno permaneció programado así: 50°C por 6 min; 50-200°C a 6°C/min por 10 min; 200-310°C a 10°C/min por 1 min. Para la estandarización del método y cuantificación de los análisis se utilizó una mezcla estándar de FAMES (Supelco 37 FAME Mix, Supelco Bellefonte, PA. EE.UU. Cat. 47885-U)

Análisis químico de la fracción de SST (Perfiles de metabolitos polares-TMS), Las muestras se inyectaron a un volumen de 1 microlitro en modo split (5:1, 270°C), con un flujo constante de Helio (1 ml/min), el horno permaneció programado así: 70°C por 7 min; 70-130°C a 15°C/min por 3 min; 130-155°C a 8°C/min por 16 min; 155-250°C a 8°C/min por 10 min; 250-310°C a 18°C/min por 1 min.

4.2.3.4 Ionización

Los compuestos que se eluyen del GC, Los métodos descritos en este numeral utilizan ionización de Impacto electrónico (EI), la fuente de iones se programo a una temperatura de 230°C, con una energía de ionización de 70 eV, se obtuvieron patrones de fragmentación reproducibles durante el proceso de estandarización de métodos utilizando material de referencia.

4.2.3.5 Detección de iones clave

Se realizó la adquisición de espectros y cromatogramas (TIC) mediante el uso de un detector selectivo de masas, cuádrupolo simple (sQUAD). Programado a una temperatura de 150°C, se seleccionaron diferentes rangos de adquisición de masas positivas en modo scan: volátiles HS/SPME (35-350 daltons; 4 espectros/sec.); FAMES (40-400 daltons; 3,7 espectros/sec.); metabolitos polares-TMS (40-700 daltons; 2 espectros/sec.). El detector estuvo sintonizado en modo automático a lo largo de todos los experimentos.

4.2.3.6 Evaluación de los datos (Data Analysis)

Se utilizó la información cromatografía y espectral adquirida para la construcción de librerías de componentes para cada uno de los métodos descritos. Así, los tiempos de retención se emplearon para la determinación de índices de retención relativa y los espectros de masas permitieron realizar comparación espectral con librerías comerciales (NIST/EPA/NIH 2008) y librerías públicas especializadas:

<http://csbdb.mpimgolm.mpg.de/index.html> (The Golm Metabolome Database-Hosted at Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology).

<http://lipidlibrary.aocs.org/index.html> (supported by AOCS. American Oil Chemists' Society); <http://webbook.nist.gov/chemistry> (National Institute of Standards and Technology. EE.UU).

Adicionalmente, para el desarrollo la plataforma se utilizó material de referencia certificado, el cual permitió resolver problemas de identificación, calibración y cuantificación en los casos en lo que fue necesario. Igualmente como en la sección 3 se utilizó un software para la deconvolución automática de los espectros y el procesamiento de las señales (AMDIS 2,68), el cual permitió además, integrar iones selectivos para cuantificación y corrección de coelución de metabolitos y cálculo de índices de retención. La composición de las muestras procesadas se reportan en tablas donde aparece la identificación de los componentes de grupos de compuestos más sobresalientes por su concentración y variabilidad en el grupo de muestras, también se reportan los iones base (base m/z) que se aislaron para la integración de las señales y comparación de IRR en forma automatizada.

4.3 Resultados y discusión

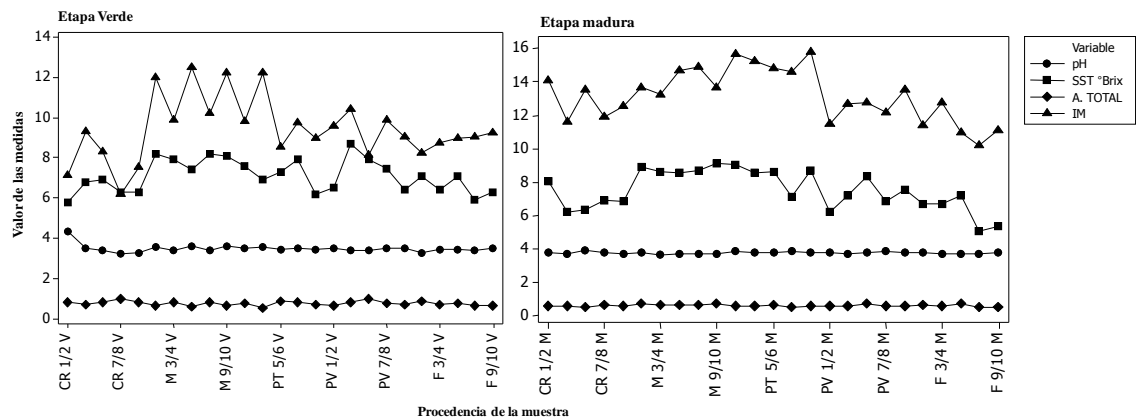
4.3.1 Caracterización de las muestras

Las muestras presentaron un diámetro promedio de 48.5 y 49.9 mm en las etapas verde y madura respetivamente, la tabla 12 presenta la media y desviación estándar de las mediciones de parámetros de madures para cada conjunto de 25 muestras en las dos etapas, en la etapa verde el aspecto de la piel de los frutos presenta una coloración verde con distribución homogénea, siendo muy sobresaliente la rugosidad debida al gran tamaño de las glándulas que almacenan el AE, en la etapa madura se observa una coloración desigual con combinación de tonalidades entre verde-amarillo y naranja, lo que dificulta la precepción visual de su estado de maduración.

Tabla 12. Parámetros poscosecha: pH, SST, Acidez total e IM en dos etapas de maduración de m. Clementina.

	Etapa verde, n:25				Etapa madura, n: 25			
	pH	SST °Brix	A. Total	IM	pH	SST °Brix	A. Total	IM
MEDIA	3,49	7,10	0,76	9,44	3,74	7,47	0,57	13,15
SD	0,20	0,81	0,11	1,58	0,06	1,19	0,06	1,57

Figura 19. Distribución de valores de pH, SST, °Brix, A. Total e IM en dos etapas de maduración de m. Clementina.



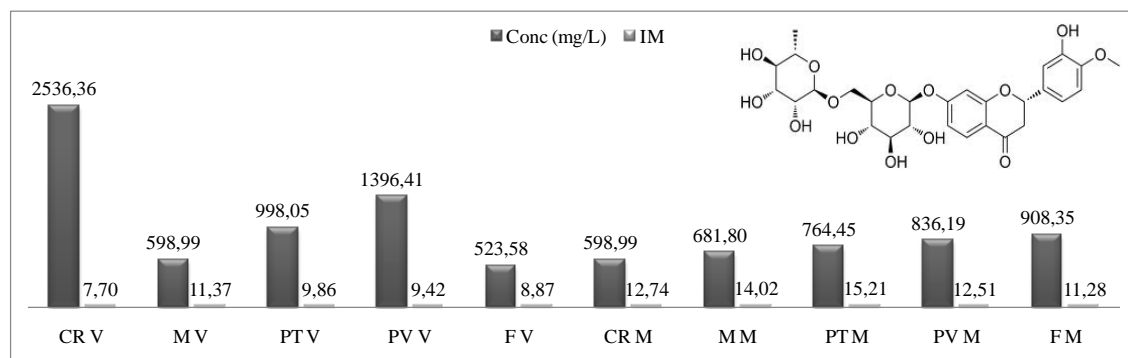
En ambas etapas de madures se observa una tendencia similar para los valores de pH y acides total, ver figura 19, el pH de los zumos en ambas etapas no representa un cambio significativo en la evolución de la madures, mientras que la acidez total representa una disminución aproximadamente del 25% entre valores de IM de 9 a 13. Respecto a los valores de SST e IM, se observa como aparece una distancia mayor entre ambas líneas en la etapa madura, este comportamiento está relacionado con cambios metabólicos para algunos grupos de compuestos que son críticos en cada etapa de maduración, de esta manera los ácidos orgánicos representan cuantitativamente un papel más importante que los azucares en IM de 9, por otro lado una disminución del 25% en los ácidos orgánicos dan cuenta de su utilización para la formación de otros grupos de metabolitos que responden a la expresión de valores más altos de IM, con mayor sensibilidad a estos cambios en IM 13. Los valores de IM en ambas etapas muestran que los lotes de producción M y PT expresan una tendencia de valores más altos entre los cinco, lo cual sigue preliminarmente, la existencia de variabilidad en la calidad dadas las condiciones eco-fisiológicas. Durante la evolución de la madures se observa como pequeños cambios en los valores de SST y acides total producen una respuesta

cuantitativamente significativa sobre el IM, se conoce bien el comportamiento de estos valores durante el proceso de formación maduración del fruto en los diferentes cítricos [184]; así mismo su relación con la aceptabilidad y calidad organoléptica, sin embargo, la información sobre los cambios químicos que acontecen con los grupos de compuestos principales en la fracción de SST de los zumos es todavía bastante parcial y corresponde al estudio de grupos estrechos de metabolitos, aspecto que se aborda más adelante.

4.3.2 Contenido de Hesperidina mediante HPLC/DAD

La hesperidina es el polifenol glicosidado más abundante en el zumo de mandarina Clementina; como se observa en la figura 20, su contenido no reportó tendencias cuantitativas para los IM promedio de 9 y 13.

Figura 20. Contenido de hesperidina en zumo de mandarina Clementina en diferentes índices de maduración y procedencias de cultivo.



Los valores más altos de hesperidina se registraron en la etapa verde (crucero, portada y porvenir), entre ellos crucero en etapa verde presentó una variación significativa en su contenido dada la maduración, con un IM de 7,70 registró 2536.36 mg/L y paso a 598,99 mg/L en el IM 13. Estos resultados evidenciaron que su contenido no está relacionado con la evolución y el metabolismo normal de la maduración. Algunos autores han presentado modelos que explican la regulación de flavonoides y otras familias de metabolitos, principalmente en términos de la radiación UV-B y la temperatura, que implica cambios en la expresión génica, la actividad enzimática y la acumulación de metabolitos de defensa [184].

4.3.3 Metabolite profiling mediante GC/qEIMS

Se crearon librerías (tipo Target compound) para la identificación y cuantificación automatizada de más de 400 metabolitos presentes en los zumos, estos componentes presentaron una amplia variabilidad estructural y de pesos moleculares (114-1296 Dalton), los reportes de las librerías se alinearon manualmente, de esta forma se obtuvieron 211 targets que presentaron una distribución homogénea entre las muestras del estudio, los targets seleccionados se cuantificaron mediante el uso de factores de respuesta según el grupo de sustancias, las sustancias traza se descartaron durante el análisis estadístico multivariado, por presentar valores cercanos a cero en comparación con las sustancias mayoritarias.

4.3.3.1 Perfiles de metabolitos volátiles mediante HS/SPME

En la fracción volátil de los zumos se identificaron 65 componentes que permitieron la selección de marcadores de maduración en el grupo de muestras, las cuales se distribuyen en dos clusters que representan las dos etapas de maduración, el cluster de la etapa verde se caracteriza por su mayor contenido de gama-terpineno, 4-terpineol y alfa-sinensal, los cuales se encuentran presentes en la etapa madura pero en cantidades inferiores, una relación de IM 9/13 presenta el siguiente panorama para estos tres metabolitos 2:1, 10:1 y 4:1, respectivamente. La etapa madura está caracterizada por el aumento en la concentración de linalool, decanal y camfeno, los cuales presentaron respectivamente una relación de IM 9/13 de 1:3, 1:2 y 1:2 (en algunas zonas de cultivo). Como se observa en la figura 24, los componentes principales gama terpineno y linalool caracterizan los cambios principales en la evolución de la maduración entre los índices 9 y 13.

4.3.3.2 Perfiles de ácidos grasos, FAMES

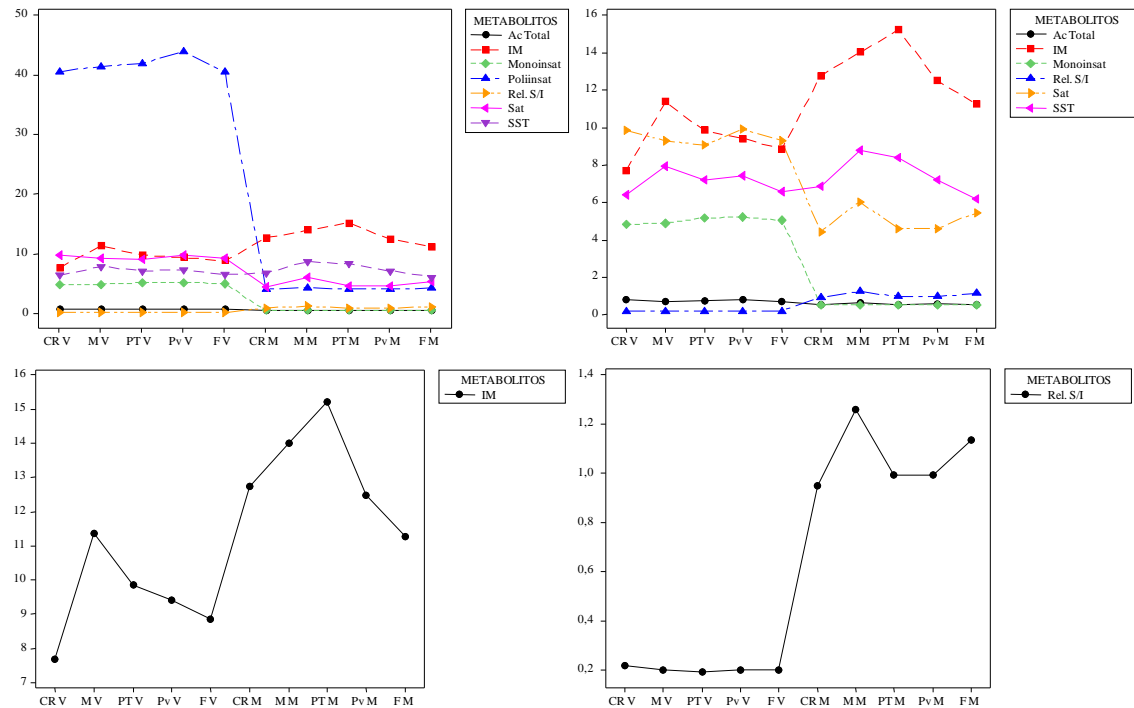
Se identificaron 12 cadenas de ácidos grasos predominantes en los zumos centrifugados, estas sustancias se comportaron cuantitativamente en forma sensible y caracterizaron las muestras conforme al cambio de índice de maduración, ver tabla 14.

Los grupos de muestras presentaron una disminución importante en la expresión de ácidos grasos, la etapa verde presentó un total promedio de 55 ppm, el cual disminuyó hasta un valor de aproximadamente 9 ppm, lo que representa una disminución del 83% en la expresión metabólica de este grupo de sustancias. Como se observa en la figura 21, la etapa verde está caracterizada por niveles altos de cadenas poliinsaturadas, cuya disminución marca fuertemente la relación química de las cadenas de ácidos grasos, relación saturado/insaturado (Rel. S/I) desde valores de 0.2 (IM 9) hasta 1 (IM 13). La evolución de estos valores está acompañada por cambios marcados en la composición cualitativa de esta fracción de metabolitos, como se observa en la parte superior de la figura 21.

Estos cambios cualitativos están marcados básicamente por la disminución en la concentración de los poliinsaturados C18:2n6t y C18:2n6c, que reportan un balance cis/trans de aproximadamente de 0.48 y 3,46 para las etapas verde y madura respectivamente. Mediante análisis de componentes principales (PCA) se observa cómo la diferenciación de las muestras se da en función de la variabilidad de dos componentes principales saturados (C4:0 y C14:0) junto a al ácido linoleico (C18:2n6t), el cual decrece a menos de 1 ppm. Se observó en los clusters principales de maduración la formación agrupaciones de muestras dado su origen geográfico en la zona de producción, ver figura 25.

El perfil de ácidos grasos FAME permitió la diferenciación de la evolución de la maduración y la definición del origen de las muestras, esto constituye a este tipo de metabolitos como un grupo idóneo para el estudio del estatus metabólico dadas las condiciones eco-fisiológicas de cultivo, además los factores de respuesta de los análisis en condiciones de impacto electrónico (ng/L) permitieron caracterizar variaciones en la expresión metabólica dada la evolución de la maduración, como se observa en la parte inferior de la figura 21, se produce una inflexión marcada en la línea Rel. S/I de la misma forma como ocurre con la línea que describe al IM.

Figura 21. Perfiles cuantitativos de ácidos grasos marcadores de maduración y origen geográfico en mandarina clementina.

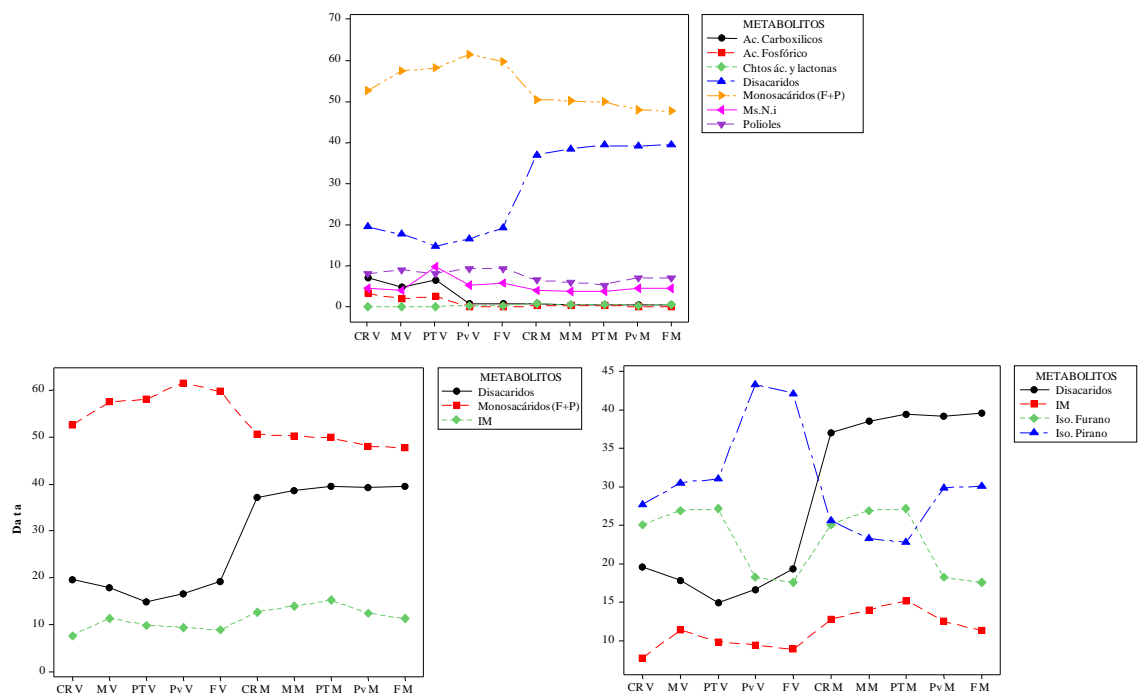


4.3.3.3 Perfiles de metabolitos polares-TMS

Se identificaron 56 componentes con relevancia cuantitativa en la composición de los SST de mandarina Clementina; estas sustancias se agruparon en diferentes fracciones químicas de moléculas, como se observa en la tabla 15. Entre ellas se destacan algunos grupos de metabolitos en cada etapa de maduración. Se observa cómo los dos grupos principales de sustancias (carbohidratos y ácidos, incluyendo el fosfato) asumen los cambios críticos de los que dependen las lecturas de IM, en las etapas verde y madura se observó un predominio cuantitativo de los monosacáridos sobre los demás grupos de metabolitos, sin embargo, existe una reducción importante para estos dos grupos de componentes al pasar al IM 13, 16% para los monosacáridos, por otro lado, los ácidos presentan un comportamiento desigual en dos de las zonas de cultivo (Porvenir y Fátima) en donde permanecen en cantidades inferiores a 1% en la fracción (aspecto que puede ser organolépticamente importante en estos zumos), las demás zonas de cultivo presentan valores que decrecieron como máximo un 90%. Como se observa en la parte

superior de la figura 22, el descenso en los niveles de monosacáridos y ácidos vienen acompañados de aumentos en los niveles de los disacáridos al aumentar el IM, los disacáridos mayores en la etapa verde fueron sucrosa, turanosa y leucrosa, mientras que en la etapa madura estos mismos incrementan su concentración y se registró la aparición de cantidades importantes de isómeros de isomaltulosa y otras especies estructuralmente relacionadas (ver tabla 15, etapa madura).

Figura 22. Perfiles cuantitativos de metabolitos marcadores de maduración y origen geográfico en mandarina clementina.



En la parte inferior de la figura 22, se observa como en dos zonas de producción se presentan cambios significativos en los perfiles químicos de las sustancias analizadas (Porvenir y Fátima), en ambas etapas de maduración existe una relación inversa en el ratio isomérico Pirano:Furano, lo cual es significativo al considerar el sistema fisicoquímico que se establece según la expresión de los metabolitos dadas las relaciones eco-fisiológicas en los cultivos de origen, en cada etapa de maduración.

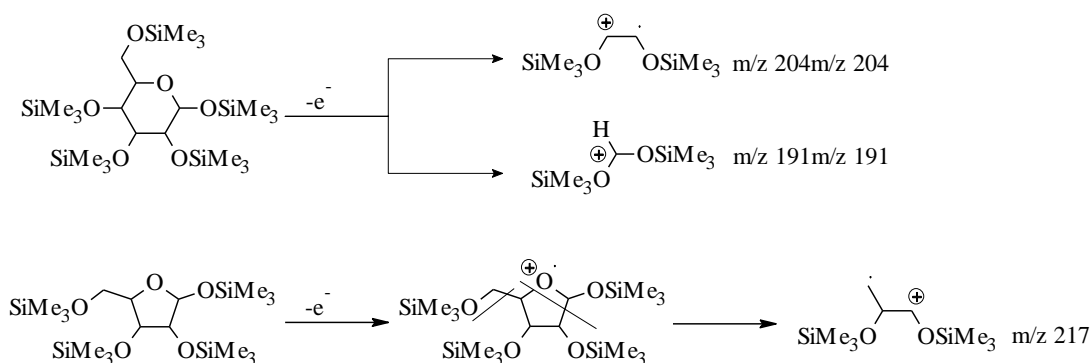
Los zumos azucarados se pueden considerar como soluciones acuosas de cuatro pseudo-componentes: azúcar, aminoácidos, ácidos carboxílicos, y material mineral denominado

ceniza. El pseudo-componente azúcar está representado principalmente por sacarosa, glucosa y fructosa, los aminoácidos por los ácidos aspártico y glutámico, los ácidos carboxílicos por ácido láctico y succínico, y la materia mineral por Na y KCl. Con bastante anterioridad se han modelado sistemas para estudiar la dinámica de los carbohidratos en solución, Por esto aparecen explicaciones alternativas para los equilibrios de anómeros y tautómeros, ellas toman en cuenta la solvatación, pH, fuerza iónica y otras, como factores determinantes en la composición de equilibrio. Dado que la conversión α/β es ácido-base catalizada, el disolvente afecta a la cinética [185]. En soluciones acuosas las constantes de velocidad mínima (K_{\min}) para mutarotaciones piranos/piranos se observan en a $2.5 < \text{pH} < 6.5$. Para los procesos que implican tautomería piranos/furanosa (por ejemplo, fructosa) K_{\min} ocurre a pH 4.0. La dependencia de k al pH es especialmente marcada durante las etapas iniciales de la reacción. El mecanismo implica la transferencia de protones desde el catalizador ácido al azúcar, seguido por la transferencia de un protón al catalizador base. El ataque de protones causa la apertura lenta del anillo para producir una especie intermedia, el cierre del anillo es rápido. Por otra parte, el mecanismo podría verse como la estabilización de un estado de transición pseudo-acíclico por el solvente. La "polaridad" del disolvente se dice que afecta igualmente a k . Efectos salinos en k también se han observado, pero no se han explicado por mecanismos convencionales. Del mismo modo, los efectos catalíticos de todos los aminoácidos en la mutarrotación esperan todavía una explicación adecuada [186].

Los monosacáridos (pentosas y hexosas) presentaron dos señales cromatográficas, debido a las respectivas configuraciones $1-\alpha$ y $1-\beta$ de los OH en los anillos pirano y furano. Como se observa en la tabla 15, estos isómeros se presentaron en las muestras en cantidades importantes dada la expresión de los metabolitos. De acuerdo a la dinámica que expresa cada molécula en solución acuosa se identificaron 4 isómeros para cada una de ellas, las cuales se asignaron a 3 monosacáridos principales (Glucosa, fructosa y galactosa), adicionalmente se detectaron otros isómeros acompañantes (α -D-(+)-xilopiranos, β -D-(-)-ribofuranosa, otros). Los espectros de masas de los sacáridos con configuración de anillo pirano (5C) presentaron principalmente el fragmento de m/z 204. El ion m/z 217 caracterizó la fragmentación del anillo de furano (4C). Estas dos señales se utilizaron como iones clave para identificar y cuantificar los carbohidratos

(especialmente monosacáridos). En algunos casos se detectaron pequeñas cantidades de formas tautoméricas de compuestos de anillo abierto (formas cetol y/o aldol de monosacáridos) conjuntamente con los isómeros cíclicos. La identificación de los tautómeros se realizó principalmente mediante índices IRR y comparación con literatura [187]. La figura 23 presenta una propuesta para el origen de los iones que caracterizaron la fragmentación de monosacáridos mediante impacto electrónico [188].

Figura 23. Fragmentos característicos para la identificación de residuos de mono, di y trisacáridos.



Otros compuestos como los disacáridos se identificaron aislando las señales que producen patrones de fragmentación con presencia del ion m/z 361 en compañía de 217, 204 y 191, como se observa en la tabla 15.

Mediante análisis multivariado (PCA) se observó como la evolución de la maduración está marcada por la formación de clusters de muestras cuyo metabolismo expresa una relación inversa para metabolitos ácidos y azúcares, como se observa en la figura 26, por ello en la etapa verde aparecen sus marcadores: ácido acetoacético, succínico y málico. En la etapa madura, hay aumento en la concentración del grupo de los disacáridos, en el que se destaca la leucrosa.

En referencia a las zonas de cultivo Fátima y Porvenir se presentó marcación de origen geográfico dados los niveles de concentración del ácido acetoacético y L-galactan-1,4-lactona, ver figuras 26 y 27, la cual debe estar en equilibrio con su respectivo ácido aldónico. En ambas etapas de maduración ambos marcadores presentan relación directa, por ello el equilibrio de lactonización podría estar favorecido por las condiciones en donde el ácido acetoacético está en concentraciones mayores. En ambas etapas de

maduración se observa una diferenciación considerable en la aparición de productos de oxidación, como se observa con los grupos de carbohidratos ácidos y lactonas en la tabla 15. El sistema fisicoquímico que se forma en el zumo dada la composición de los principales pseudo-componentes es responsable del equilibrio mutarrotacional y tautomérico, aspecto que constituye un rasgo significativo para definir la idoneidad de nichos de cultivo, la calidad general de los frutos y su origen dadas las condiciones del experimento.

El análisis químico de la fracción de sólidos solubles totales permitió adquirir la variabilidad de la expresión metabólica con un nivel importante de sensibilidad sobre las características del sistema fisicoquímico de la matriz de análisis, permitiendo identificar relaciones químicas de isómeros y confórmers para compuestos clave en los procesos de desarrollo y maduración de mandarina clementina.

Tabla 13. Metabólitos volátiles extraídos mediante HS/SPME de diferentes lotes de mandarina Clementina.

Porcentaje de área relativo \pm SD de componentes de volátiles de zumos de lotes de m. Clementina mediante HS/SPME, n:5								
P. ¹	Compuesto	Base m/z ²	IRR ³	Etapa verde				
				Crucero	Medio	Portada	Porvenir	Fátima
1	Isoamil acetato	43	877	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
2	2-Heptanona	43	892	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
3	α -Thujeno	93	924	0,014 \pm 0,003	0,012 \pm 0,001	0,013 \pm 0,002	0,013 \pm 0,000	0,010 \pm 0,000
4	1R- α -Pino	93	939	0,343 \pm 0,011	0,336 \pm 0,041	0,268 \pm 0,010	0,227 \pm 0,008	0,280 \pm 0,002
5	Campheno	93, 79	954	0,567 \pm 0,001	0,354 \pm 0,029	0,134 \pm 0,006	0,385 \pm 0,013	0,333 \pm 0,020
6	Sabineno	93	974	0,061 \pm 0,005	0,033 \pm 0,003	0,036 \pm 0,003	0,000 \pm 0,000	0,034 \pm 0,003
7	β -Pino	93	979	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
8	β -Myrcene	93, 41, 69	992	2,263 \pm 0,048	2,275 \pm 0,011	2,025 \pm 0,023	1,575 \pm 0,044	1,981 \pm 0,016
9	Octanal	43, 56, 84	999	0,053 \pm 0,004	0,045 \pm 0,005	0,040 \pm 0,002	0,029 \pm 0,000	0,040 \pm 0,001
10	α -Phellandreno	93	1001	0,408 \pm 0,022	0,416 \pm 0,021	0,190 \pm 0,002	0,282 \pm 0,001	0,321 \pm 0,014
11	delta-2-careno	93, 121, 136	1003	0,147 \pm 0,012	0,108 \pm 0,025	0,085 \pm 0,003	0,079 \pm 0,004	0,093 \pm 0,010
12	α -Terpineno	121, 93, 136	1017	0,148 \pm 0,012	0,075 \pm 0,013	0,080 \pm 0,008	0,071 \pm 0,003	0,121 \pm 0,031
13	p-Cimeno	93, 134	1025	0,014 \pm 0,000	0,012 \pm 0,018	0,008 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,012 \pm 0,000
14	limoneno	68, 93	1030	93,518 \pm 0,087	94,120 \pm 0,061	95,307 \pm 0,033	95,375 \pm 0,243	94,475 \pm 0,058
15	β -Ocimeno	93, 79, 91	1037	0,003 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000
16	trans- β -Ocimene	93	1050	0,046 \pm 0,001	0,016 \pm 0,002	0,024 \pm 0,004	0,018 \pm 0,001	0,088 \pm 0,001
17	γ -Terpineno	93, 136, 121	1060	0,427 \pm 0,003	0,446 \pm 0,023	0,375 \pm 0,013	0,413 \pm 0,017	0,444 \pm 0,004
18	n-Octanol	56, 55, 57	1068	0,033 \pm 0,003	0,047 \pm 0,019	0,035 \pm 0,009	0,030 \pm 0,003	0,026 \pm 0,001
19	Terpinoleno	93, 121, 136	1089	0,112 \pm 0,004	0,107 \pm 0,001	0,106 \pm 0,000	0,121 \pm 0,019	0,128 \pm 0,015
20	Linalool	71, 93, 55	1097	0,452 \pm 0,004	0,371 \pm 0,006	0,280 \pm 0,005	0,331 \pm 0,016	0,369 \pm 0,006
21	Nonanal	57, 70, 98	1102	0,023 \pm 0,006	0,022 \pm 0,014	0,015 \pm 0,003	0,019 \pm 0,001	0,017 \pm 0,001
22	4-Terpineol	71, 111, 93	1178	0,202 \pm 0,013	0,128 \pm 0,015	0,107 \pm 0,006	0,207 \pm 0,004	0,183 \pm 0,008
23	α -Terpineol	59, 93, 121	1189	0,027 \pm 0,007	0,032 \pm 0,002	0,016 \pm 0,001	0,038 \pm 0,000	0,023 \pm 0,001

24	decanal	43, 57, 70	1202	0,495 ± 0,021	0,423 ± 0,005	0,404 ± 0,019	0,344 ± 0,016	0,403 ± 0,003
25	n-Octil acetato	43, 56, 70	1214	0,018 ± 0,003	0,020 ± 0,002	0,016 ± 0,008	0,007 ± 0,000	0,020 ± 0,001
26	trans-Carveol	109, 84	1217	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
27	β-Citronellol	69, 41	1226	0,008 ± 0,000	0,012 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,000 ± 0,000
28	cis-Carveol	84, 134	1229	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
29	nerol	69, 41	1231	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
30	o-metil-timol	149	1235	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
31	(Z)-Citral	41, 69	1238	0,046 ± 0,005	0,058 ± 0,006	0,053 ± 0,005	0,055 ± 0,000	0,051 ± 0,001
32	carvona	82	1243	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
33	geraniol	69, 41	1253	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
34	n-decanol	43, 55, 70	1270	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
35	(E)-Citral	41, 69	1272	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
36	Perillaldehido	68	1274	0,035 ± 0,001	0,039 ± 0,001	0,016 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,027 ± 0,001
37	Timol	135	1290	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
38	cuminol	135, 150, 105	1291	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
39	o-metoxi-acetofenona	135, 77, 150	1291	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
40	δ-Elemeno	121,136, 93	1338	0,018 ± 0,001	0,012 ± 0,000	0,012 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,017 ± 0,000
41	alfa-terpineol-acetato	43, 121, 93	1349	0,032 ± 0,001	0,034 ± 0,007	0,022 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,035 ± 0,002
42	Citronellil acetato	43, 69,81	1353	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
43	Neril acetato	69, 93	1362	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
44	alfa-copaeno	161, 119, 105	1377	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
45	Geranil acetato	69, 43	1381	0,018 ± 0,000	0,009 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,021 ± 0,000	0,016 ± 0,001
46	beta-cubebeno	161	1388	0,008 ± 0,000	0,010 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,021 ± 0,000	0,007 ± 0,000
47	β-Elemeno	81, 93	1391	0,016 ± 0,004	0,018 ± 0,000	0,006 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,007 ± 0,000
48	Dodecanal	41, 43	1409	0,071 ± 0,001	0,094 ± 0,002	0,049 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,078 ± 0,000
49	(Z)-cariofileno	93, 91, 79	1410	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
50	beta-copaeno	161, 91, 105	1432	0,024 ± 0,005	0,013 ± 0,000	0,006 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,021 ± 0,001
51	beta-farneseno	41, 69, 93	1443	0,010 ± 0,001	0,008 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,008 ± 0,001	0,005 ± 0,000

52	α -cariofileno	98, 80	1455	0,021 \pm 0,001	0,013 \pm 0,000	0,007 \pm 0,000	0,025 \pm 0,000	0,015 \pm 0,001
53	Germacrano D	161, 105, 91	1485	0,012 \pm 0,001	0,013 \pm 0,000	0,003 \pm 0,000	0,028 \pm 0,000	0,006 \pm 0,000
54	β -Selineno	41, 204, 105	1490	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
55	biciclogermacrano	93, 121	1500	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
56	(E,E)-alfa farneceno	41, 93	1502	0,084 \pm 0,001	0,047 \pm 0,004	0,035 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,039 \pm 0,003
57	alfa-Muuroleno	105, 16, 204	1508	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
58	delta-Cadineno	161, 134, 204	1523	0,053 \pm 0,002	0,058 \pm 0,004	0,074 \pm 0,001	0,045 \pm 0,004	0,054 \pm 0,003
59	Germacrano B	121, 93, 41	1561	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
60	Cariofileno epoxido	43, 41, 79	1583	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
61	10-epi-gama-eudesmol	189, 161, 204	1624	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
62	gama-eudesmol	189, 161, 204	1632	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,074 \pm 0,001	0,081 \pm 0,004
63	alfa-cadinol	43, 95, 121	1654	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
64	beta-Sinensal	93, 55, 41	1700	0,012 \pm 0,001	0,005 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,003 \pm 0,000
65	alfa-sinensal	55, 93, 134	1752	0,158 \pm 0,002	0,163 \pm 0,018	0,132 \pm 0,014	0,122 \pm 0,007	0,135 \pm 0,002
Etapas maduras								
P. ¹	Compuesto	Base m/z²	IRR	Crucero	Medio	Portada	Porvenir	Fátima
1	isoamil acetato	43	877	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
2	2-Heptanona	43	892	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
3	α -Thujeno	93	924	0,035 \pm 0,005	0,045 \pm 0,005	0,034 \pm 0,003	0,035 \pm 0,001	0,027 \pm 0,001
4	1R- α -Pino	93	939	0,306 \pm 0,007	0,337 \pm 0,006	0,300 \pm 0,005	0,238 \pm 0,005	0,153 \pm 0,003
5	Campheno	93, 79	954	0,797 \pm 0,042	0,480 \pm 0,027	0,313 \pm 0,013	0,494 \pm 0,027	0,216 \pm 0,010
6	Sabineno	93	974	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
7	β -Pino	93	979	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
8	β -Myrcene	93, 41, 69	992	2,177 \pm 0,002	2,218 \pm 0,009	2,028 \pm 0,012	1,700 \pm 0,020	1,644 \pm 0,010
9	Octanal	43, 56, 84	999	0,049 \pm 0,003	0,042 \pm 0,001	0,035 \pm 0,004	0,022 \pm 0,001	0,016 \pm 0,001
10	α -Phellandreno	93	1001	0,444 \pm 0,013	0,421 \pm 0,017	0,278 \pm 0,009	0,325 \pm 0,008	0,219 \pm 0,005
11	delta-2-careno	93, 121, 136	1003	0,153 \pm 0,011	0,087 \pm 0,002	0,069 \pm 0,002	0,055 \pm 0,002	0,054 \pm 0,007
12	α -Terpino	121, 93, 136	1017	0,118 \pm 0,002	0,077 \pm 0,002	0,047 \pm 0,001	0,052 \pm 0,002	0,073 \pm 0,001

13	p-Cimeno	93, 134	1025	0,012 ± 0,001	0,007 ± 0,000	0,007 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
14	Limoneno	68, 93	1032	93,335 ± 0,056	93,999 ± 0,066	94,656 ± 0,043	94,940 ± 0,061	95,371 ± 0,018
15	β-Ocimeno	93, 79, 91	1037	0,007 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
16	trans-β-Ocimeno	93	1050	0,054 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,017 ± 0,000	0,013 ± 0,001
17	γ-Terpineno	93, 136, 121	1060	0,232 ± 0,002	0,167 ± 0,006	0,114 ± 0,003	0,135 ± 0,005	0,223 ± 0,004
18	n-Octanol	56, 55, 57	1068	0,051 ± 0,003	0,071 ± 0,007	0,027 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,010 ± 0,001
19	Terpinoleno	93, 121, 136	1089	0,059 ± 0,003	0,064 ± 0,001	0,049 ± 0,002	0,042 ± 0,001	0,049 ± 0,001
20	Linalool	71, 93, 55	1097	0,863 ± 0,008	0,814 ± 0,005	0,893 ± 0,004	0,876 ± 0,005	0,837 ± 0,006
21	Nonanal	57, 70, 98	1102	0,034 ± 0,002	0,022 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,018 ± 0,000	0,002 ± 0,000
22	4-Terpineol	71, 111, 93	1178	0,016 ± 0,001	0,022 ± 0,002	0,059 ± 0,002	0,057 ± 0,003	0,057 ± 0,003
23	α-Terpineol	59, 93, 121	1189	0,029 ± 0,002	0,019 ± 0,000	0,020 ± 0,000	0,014 ± 0,000	0,023 ± 0,001
24	Decanal	43, 57, 70	1202	0,754 ± 0,007	0,776 ± 0,007	0,722 ± 0,002	0,816 ± 0,010	0,912 ± 0,030
25	n-Octil acetato	43, 56, 70	1214	0,026 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,015 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,008 ± 0,000
26	trans-Carveol	109, 84	1217	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
27	β-Citronellol	69, 41	1226	0,043 ± 0,007	0,008 ± 0,000	0,009 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
28	cis-Carveol	84, 134	1229	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
29	Nerol	69, 41	1231	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
30	o-Metil-thimol	149	1235	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
31	(Z)-Citral	41, 69	1238	0,017 ± 0,001	0,018 ± 0,000	0,015 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,009 ± 0,000
32	Carvone	82	1243	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
33	Geraniol	69, 41	1253	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
34	n-Decanol	43, 55, 70	1270	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
35	(E)-Citral	41, 69	1272	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
36	Perillaldehido	68	1274	0,041 ± 0,001	0,025 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,000 ± 0,000
37	Timol	135	1290	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
38	cuminol	135, 150, 105	1291	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
39	o-metoxi-acetofenona	135, 77, 150	1291	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
40	δ-Elemeno	121,136, 93	1338	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,000	0,012 ± 0,000	0,006 ± 0,000	0,000 ± 0,000

41	alfa-terpineol-acetato	43, 121, 93	1349	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,013 ± 0,000	0,003 ± 0,000
42	Citronellil acetato	43, 69,81	1353	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
43	Neril acetate	69, 93	1362	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
44	alfa-copaeno	161, 119, 105	1377	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
45	Geranil acetato	69, 43	1381	0,052 ± 0,007	0,005 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,002 ± 0,000
46	beta-cubebeno	161	1388	0,006 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,000 ± 0,000
47	β-Elemeno	81, 93	1391	0,000 ± 0,000	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
48	Dodecanal	41, 43	1409	0,056 ± 0,004	0,079 ± 0,001	0,071 ± 0,003	0,043 ± 0,002	0,026 ± 0,002
49	(Z)-cariofileno	93, 91, 79	1410	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
50	beta-copaeno	161, 91, 105	1432	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
51	beta-farneseno	41, 69, 93	1443	0,012 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
52	α-cariofileno	98, 80	1455	0,018 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
53	Germacrano D	161, 105, 91	1485	0,009 ± 0,000	0,010 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,005 ± 0,000	0,000 ± 0,000
54	β-Selineno	41, 204, 105	1490	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
55	biciclogermacrano	93, 121	1500	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
56	(E,E)-alfa farneceno	41, 93	1502	0,063 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,012 ± 0,001
57	alfa-Muuroleno	105, 16, 204	1508	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
58	delta-Cadineno	161, 134, 204	1523	0,037 ± 0,000	0,028 ± 0,002	0,040 ± 0,000	0,028 ± 0,001	0,011 ± 0,000
59	Germacreno B	121, 93, 41	1561	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
60	Cariofileno epoxido	43, 41, 79	1583	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
61	10-epi-gama-eudesmol	189, 161, 204	1624	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
62	gama-eudesmol	189, 161, 204	1632	0,000 ± 0,000	0,043 ± 0,001	0,047 ± 0,003	0,019 ± 0,001	0,000 ± 0,000
63	alfa-cadinol	43, 95, 121	1654	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
64	beta-Sinensal	93, 55, 41	1700	0,011 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,002 ± 0,000
65	alfa-sinensal	55, 93, 134	1752	0,047 ± 0,004	0,025 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,000	0,025 ± 0,000

¹ Pico cromatográfico, orden de elución.

² Pico base en el espectro de masas. La primera señal corresponde al 100% de intensidad (seleccionado como ion para integración de área de pico).

³ Índice de retención relativo en columna capilar ZB 5MSi.

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos en zumo de mandarina clementina en dos etapas de maduración.

Concentración en ppm \pm SD y composición porcentual de la fracción lípida presente en zumo de mandarina Clementina, n:5												
Etapa Verde												
P. ¹	Designación	Base m/z ²	Crucero		Medio		Portada		Porvenir		Fátima	
			Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%
1	C4:0	74	0,006 \pm 0,000	0,01	0,022 \pm 0,006	0,04	0,024 \pm 0,001	0,04	0,015 \pm 0,002	0,03	0,020 \pm 0,001	0,04
2	C8:0	74	0,122 \pm 0,002	0,22	0,091 \pm 0,005	0,16	0,085 \pm 0,001	0,15	0,085 \pm 0,001	0,14	0,100 \pm 0,007	0,18
3	C10:0	74	0,133 \pm 0,004	0,24	0,096 \pm 0,005	0,17	0,098 \pm 0,004	0,17	0,193 \pm 0,212	0,33	0,095 \pm 0,004	0,17
4	C12:0	74	0,171 \pm 0,003	0,31	0,164 \pm 0,005	0,29	0,168 \pm 0,002	0,30	0,168 \pm 0,002	0,29	0,161 \pm 0,003	0,29
5	C14:0	74	0,320 \pm 0,013	0,58	0,268 \pm 0,007	0,47	0,249 \pm 0,007	0,46	0,259 \pm 0,007	0,44	0,249 \pm 0,007	0,47
6	C15:0	74	0,249 \pm 0,007	0,45	0,180 \pm 0,004	0,32	0,184 \pm 0,004	0,32	0,180 \pm 0,004	0,30	0,180 \pm 0,004	0,33
7	C16:0	74	8,517 \pm 0,157	15,40	8,159 \pm 0,481	14,65	7,936 \pm 0,099	14,10	8,666 \pm 0,417	14,67	8,115 \pm 0,351	14,77
8	C18:2n6t	67	27,474 \pm 1,645	49,69	27,940 \pm 1,042	50,17	28,820 \pm 0,523	51,31	30,312 \pm 1,726	51,30	27,444 \pm 1,538	49,99
9	C18:1n9c	55	4,270 \pm 0,183	7,72	4,338 \pm 0,183	7,79	4,608 \pm 0,739	8,19	4,608 \pm 0,739	7,80	4,473 \pm 0,327	8,14
10	C18:2n6c	67	13,148 \pm 0,039	23,78	13,547 \pm 0,628	24,33	13,198 \pm 0,039	23,37	13,656 \pm 0,494	23,11	13,148 \pm 0,039	23,92
11	C18:1n9t	55	0,554 \pm 0,021	1,00	0,563 \pm 0,019	1,01	0,567 \pm 0,002	1,01	0,607 \pm 0,053	1,03	0,567 \pm 0,002	1,03
12	C18:0	74	0,328 \pm 0,009	0,59	0,331 \pm 0,007	0,59	0,328 \pm 0,009	0,58	0,339 \pm 0,011	0,57	0,364 \pm 0,016	0,66
Total			55,292		55,691		56,270		59,089		54,957	
Σ Saturados			9,846		9,303		9,073		9,906		9,294	
Σ Monoinsaturados			4,824		4,901		5,176		5,215		5,040	
Σ Poliinsaturados			40,622		41,487		42,018		43,968		40,622	
Relación Sat/Insat			0,217		0,201		0,192		0,201		0,204	

Concentración en ppm \pm SD y composición porcentual de la fracción lípida presente en zumo de mandarina Clementina, n:5												
Etapa Madura												
P. ¹	Designación	Base m/z ²	Crucero		Medio		Portada		Porvenir		Fátima	
			Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%
1	C4:0	74	0,004 \pm 0,001	0,05	0,003 \pm 0,000	0,024	0,002 \pm 0,000	0,03	0,004 \pm 0,000	0,04	0,013 \pm 0,002	0,13
2	C8:0	74	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,000	0,000 \pm 0,000	0,00	0,101 \pm 0,004	0,00	0,000 \pm 0,000	0,00
3	C10:0	74	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,000	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,00
4	C12:0	74	0,095 \pm 0,005	1,04	0,100 \pm 0,009	0,923	0,093 \pm 0,004	1,01	0,097 \pm 0,007	1,05	0,084 \pm 0,006	0,82
5	C14:0	74	0,186 \pm 0,005	2,03	0,158 \pm 0,003	1,456	0,171 \pm 0,001	1,86	0,173 \pm 0,005	1,88	0,158 \pm 0,003	1,54
6	C15:0	74	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,000	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,00	0,000 \pm 0,000	0,00
7	C16:0	74	3,988 \pm 0,096	43,70	5,589 \pm 0,561	51,639	4,152 \pm 0,128	45,06	4,145 \pm 0,135	44,92	4,993 \pm 0,135	48,78
8	C18:2n6t	67	0,935 \pm 0,037	10,25	0,959 \pm 0,065	8,857	0,940 \pm 0,055	10,20	0,926 \pm 0,026	10,04	0,963 \pm 0,061	9,41
9	C18:1n9c	55	0,130 \pm 0,002	1,43	0,133 \pm 0,001	1,226	0,135 \pm 0,011	1,47	0,133 \pm 0,005	1,44	0,131 \pm 0,001	1,28
10	C18:2n6c	67	3,238 \pm 0,081	35,47	3,318 \pm 0,113	30,655	3,172 \pm 0,054	34,43	3,198 \pm 0,063	34,66	3,318 \pm 0,126	32,41
11	C18:1n9t	55	0,377 \pm 0,006	4,13	0,375 \pm 0,005	3,469	0,371 \pm 0,003	4,03	0,374 \pm 0,008	4,05	0,379 \pm 0,006	3,70
12	C18:0	74	0,174 \pm 0,005	1,90	0,189 \pm 0,004	1,75	0,167 \pm 0,001	1,92	0,177 \pm 0,001	1,92	0,197 \pm 0,015	1,92
Total			9,127		9,191		9,214		9,227		10,235	
Σ Saturados			4,447		6,038		4,595		4,597		5,445	
Σ Monoinsaturados			0,507		0,508		0,506		0,507		0,509	
Σ Poliinsaturados			4,173		4,276		4,112		4,124		4,281	
Relación Sat/Insat			0,950		1,262		0,995		0,993		1,137	

¹ Pico cromatográfico, orden de elución en columna capilar ZB 5MSi

² Pico base en el espectro de masas. La primera señal corresponde al 100% de intensidad (seleccionado como ion para integración de área de pico).

Tabla 15. Perfil de metabolitos polares TMS de los sólidos solubles totales.

Concentración relativa al factor de respuesta del ribitol \pm SD y porcentaje relativo de metabolitos TMS en zumo de mandarina clementina, n:5													
T ¹	Componentes	IK	Base m/z TMS ²	Crucero		Medio		Etapa verde		Porvenir		Fátima	
				Conc.	%	Conc.	%	Portada		Conc.	%	Conc.	%
Ácidos carboxílicos													
1	Acido láctico	1080	117, 147	3,74 \pm 0,04	0,01	3,6 \pm 0,16	0,01	5,0 \pm 0,01	0,01	4,7 \pm 0,5	0,01	0,0 \pm 0,0	0,00
2	Acido glicólico	1083	147	4,07 \pm 0,06	0,01	5,2 \pm 0,28	0,01	1,8 \pm 0,22	0,00	2,8 \pm 0,2	0,00	2,0 \pm 0,1	0,00
3	Acido pirúvico	1095	147,217	21,76 \pm 0,51	0,04	4,7 \pm 0,34	0,01	0,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
4	Acido β -Hidroxipirúvico	1135	103, 204	105,30 \pm 0,98	0,17	107,9 \pm 1,61	0,17	91,0 \pm 1,96	0,15	36,5 \pm 2,9	0,06	35,9 \pm 1,7	0,06
5	Acido etil-pipecólico	1167	84	4,73 \pm 0,90	0,01	6,2 \pm 0,09	0,01	1,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
6	L-Prolina	1175	70	9,65 \pm 0,22	0,02	6,9 \pm 0,59	0,01	0,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
8	Acido benzoico	1244	179, 105	8,59 \pm 0,74	0,01	3,8 \pm 0,04	0,01	3,5 \pm 0,12	0,01	5,4 \pm 0,8	0,01	1,4 \pm 0,1	0,00
9	L-Serina	1259	116, 132	11,10 \pm 0,87	0,02	2,1 \pm 0,07	0,00	0,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
11	Acido acetoacético	1296	231, 147	45,14 \pm 0,73	0,07	39,7 \pm 1,24	0,06	45,4 \pm 1,84	0,07	241,9 \pm 7,1	0,39	206,1 \pm 2,9	0,33
13	Acido succínico	1319	147	71,45 \pm 0,18	0,12	39,1 \pm 1,25	0,06	35,8 \pm 3,71	0,06	29,9 \pm 1,1	0,05	29,1 \pm 0,7	0,05
14	Acido 2-metil succínico	1333	147	16,58 \pm 0,09	0,03	11,7 \pm 1,10	0,02	11,5 \pm 0,78	0,02	2,6 \pm 0,3	0,00	0,6 \pm 0,0	0,00
15	Acido glicérico	1345	147, 189	26,97 \pm 0,57	0,04	14,8 \pm 1,71	0,02	19,1 \pm 1,86	0,03	0,2 \pm 0,0	0,00	2,1 \pm 0,0	0,00
16	Acido itacónico	1351	147	41,83 \pm 0,34	0,07	40,1 \pm 2,97	0,06	38,8 \pm 2,39	0,06	22,1 \pm 1,2	0,04	28,5 \pm 0,4	0,05
17	Acido 2-metilen-1,4-butanodioico	1360	147	34,64 \pm 0,15	0,06	4,5 \pm 0,20	0,01	5,0 \pm 0,10	0,01	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
21	Acido D(-)-citramálico	1456	147, 273	7,37 \pm 0,66	0,01	0,2 \pm 0,02	0,00	0,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
22	Acido málico	1502	147	3706,6 \pm 5,98	6,08	2555,1 \pm 14,28	4,12	3573,5 \pm 73,30	5,76	169,1 \pm 5,2	0,27	150,7 \pm 1,5	0,24
24	Acido treónico	1565	147,292	12,61 \pm 0,35	0,02	8,3 \pm 0,53	0,01	9,3 \pm 0,91	0,01	23,0 \pm 2,5	0,04	19,1 \pm 0,8	0,03
35	D(-)-acido quínico	1906	217	170,07 \pm 0,69	0,28	119,8 \pm 1,45	0,19	149,3 \pm 7,85	0,24	27,8 \pm 1,7	0,04	29,1 \pm 1,4	0,05
48	Acido trans-ferúlico	2106	217, 305, 318	31,76 \pm 0,67	0,05	12,3 \pm 0,33	0,02	17,7 \pm 2,24	0,03	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
					7,11		4,81		6,46		0,91		0,81
10	Acido fosfórico	1282	299	2025,87 \pm 8,76	3,33	1221,7 \pm 12,77	1,97	1586,0 \pm 22,62	2,56	62,2 \pm 2,3	0,10	45,1 \pm 1,4	0,07

Monosacáridos (Ms)													
39	Ms.N.i 1	1974	305, 147, 612	2738,79 ± 1,30	4,50	2477,5 ± 20,29	3,99	4540,0 ± 42,40	7,31	3311,0 ± 73,2	5,33	3657,1 ± 95,3	5,89
40	Ms.N.i 2	1978	305, 147, 540	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
					4,50		3,99		9,87		5,33		5,89
Isómeros furano													
26	β-D(-)-Ribofuranosa	1662	217	0,00 ± 0,00	0,00	3,7 ± 0,96	0,01	3,7 ± 0,06	0,01	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
28	α-D-(+)-fructofuranosa	1861	217, 147	10665,82 ± 5,48	17,51	9690,8 ± 79,48	15,61	9780,5 ± 71,31	15,76	9339,4 ± 73,8	15,05	10865,8 ± 170,3	17,5
29	β-D-(+)-fructofuranosa	1874	217, 204	3202,36 ± 4,51	5,26	6264,8 ± 93,71	10,09	4810,6 ± 75,85	7,75	5410,5 ± 89,3	8,72	2651,4 ± 86,6	4,27
30	α-D-(+)-glucofuranosa	1883	217	58,04 ± 0,07	0,10	45,4 ± 2,72	0,07	54,9 ± 3,41	0,09	158,2 ± 10,4	0,25	164,1 ± 3,6	0,26
32	β-D-(+)-Galactofuranosa	1890	217	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
33	α-D-(+)-Galactofuranosa	1898	217	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
34	β-D-(+)-glucofuranosa	1901	217	4075,09 ± 2,07	6,69	3696,9 ± 20,42	5,96	3626,7 ± 86,40	5,84	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
					29,55		31,74		29,44		24,02		22,04
Isómeros pirano													
27	α-D (+)-xilopiranososa	1734	204	51,74 ± 0,53	0,08	43,9 ± 2,81	0,07	53,3 ± 1,68	0,09	7,0 ± 0,4	0,01	10,5 ± 0,2	0,02
36	α-D (-)-Fructopiranososa	1939	204, 191, 217	7693,18 ± 2,68	12,63	7984,9 ± 39,16	12,86	8682,9 ± 30,89	13,99	8329,5 ± 70	13,42	7966,8 ± 121,2	12,8
37	α-Galactopiranososa	1958	204, 217, 191	198,82 ± 1,51	0,33	133,0 ± 2,79	0,21	94,2 ± 7,25	0,15	112,4 ± 5,3	0,18	167,9 ± 6,6	0,27
38	β-Galactopiranososa	1965	204, 191, 217	512,21 ± 11,15	0,84	747,6 ± 21,69	1,20	577,5 ± 77,70	0,93	5223,1 ± 43	8,42	3933,1 ± 68,1	6,34
41	α-D-(+)-Glucopiranososa	1986	204, 147, 217	180,5 ± 71,40	0,30	211,2 ± 20,02	0,34	246,7 ± 16,36	0,40	23,3 ± 1,2	0,04	11,0 ± 0,5	0,02
42	β-D (-)-Fructopiranososa	1994	204, 191, 217	1642,44 ± 3,48	2,70	2037,6 ± 33,84	3,28	1481,4 ± 62,49	2,39	3400,7 ± 47	5,48	3122,5 ± 58,8	5,03
44	β-D-(+)-Glucopiranososa	2031	191, 204, 217	6562,99 ± 111,65	10,77	7809,1 ± 96,10	12,58	8109,4 ± 85,90	13,06	9799,8 ± 72	15,79	10937,9 ± 121,4	17,6
					27,65		30,56		31,00		43,33		42,1
Poliol													
7	1,3-dihidroxi-2-propanona	1223	103	55,02 ± 0,51	0,09	32,4 ± 3,44	0,05	31,5 ± 1,44	0,05	422,1 ± 9,7	0,68	429,4 ± 8,7	0,69
12	Glicerol	1305	147	7,14 ± 0,80	0,01	5,7 ± 0,77	0,01	4,0 ± 0,46	0,01	1,1 ± 0,1	0,00	1,3 ± 0,0	0,00
19	2-Metil-1,4-butanodiol	1403	147	0,00 ± 0,00	0,00	3,2 ± 0,08	0,01	3,3 ± 0,04	0,01	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00

*Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas,
Estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.*

20	D(-)-Eritrosa (cetol)	1418	147, 204	71,16 ± 0,86	0,12	63,5 ± 1,72	0,10	75,4 ± 2,36	0,12	138,8 ± 10,6	0,22	159,8 ± 6,2	0,26
23	Treitol	1517	147	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
43	chiro-inositol	2001	318, 305, 217	1851,87 ± 0,05	3,04	2379,3 ± 32,08	3,83	1893,6 ± 50,83	3,05	2130,8 ± 90,8	3,43	2016,7 ± 77,1	3,25
45	scyllo-inositol	2074	318, 305, 217	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
49	myo-inositol	2136	305, 318, 217	2959,64 ± 6,97	4,86	3086,8 ± 92,74	4,97	3068,0 ± 53,66	4,94	3147,0 ± 10	5,07	3225,3 ± 41,5	5,20
					8,12		8,98		8,18		9,41		9,40
Carbohidratos ácidos y lactonas													
18	Acido trans-1,4-lactona-treonico	1385	147	9,48 ± 0,47	0,02	13,0 ± 1,75	0,02	3,9 ± 0,12	0,01	10,0 ± 0,4	0,02	12,1 ± 1,3	0,02
25	Acido tetrónico	1585	147,292	28,85 ± 0,63	0,05	20,4 ± 1,39	0,03	15,7 ± 1,69	0,03	2,6 ± 0,0	0,00	2,0 ± 0,2	0,00
31	L-galactan-1,4-lactona	1888	217, 204	64,05 ± 0,95	0,11	55,4 ± 1,44	0,09	74,0 ± 1,44	0,12	174,2 ± 13,9	0,28	213,2 ± 11,5	0,34
46	Acido α-D-galactofuranuronico	2082	217, 147, 539	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
47	Acido β-D-galactofuranuronico	2086	217, 147, 539	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
					0,17		0,14		0,15		0,30		0,37
Disacaridos (Ds)													
50	D(+)-Sucrosa	2711	361, 217, 437	5864,36 ± 13,42	9,63	6336,1 ± 59,66	10,21	5111,6 ± 90,84	8,23	5347,2 ± 92,8	8,61	6503,6 ± 87,9	10,4
51	D(+)-Turanosa	2787	361, 147, 217	3242,15 ± 12,52	5,32	2583,8 ± 38,50	4,16	1988,7 ± 77,27	3,20	2527,6 ± 94,3	4,07	2295,4 ± 28,5	3,70
52	isomaltulosa (α-palatinosa)	2812	217, 361	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
53	isomaltulosa (β-isomero)	2834	217, 361	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
54	Ds.N.i 1	2846	217, 361	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
55	D-Leucrosa	2853	361, 204	2822,7 ± 46,39	4,63	2134,4 ± 51,81	3,44	2148,3 ± 81,31	3,46	2423,8 ± 76,7	3,90	3171,4 ± 76,3	5,11
56	Ds.N.i 2	2902	217, 289, 437	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
					19,58		17,81		14,90		16,59		19,2
Etapas Maduras													
Crucero													
Medio													
Portada													
Porvenir													
Fátima													
T¹	Componentes	IK²	m/z ion TMS³	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%	Conc.	%
Ácidos carboxílicos													
1	Acido láctico	1080	117, 147	0,55 ± 0,03	0,00	0,2 ± 0,02	0,00	0,2 ± 0,02	0,00	0,8 ± 0,0	0,00	0,8 ± 0,0	0,00

*Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas,
Estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.*

2	Acido glicólico	1083	147	0,42 ± 0,07	0,00	0,7 ± 1,10	0,00	0,9 ± 0,11	0,00	1,0 ± 0,0	0,00	1,0 ± 0,1	0,00
3	Acido pirúvico	1095	147,217	0,42 ± 0,02	0,00	0,4 ± 0,09	0,00	0,5 ± 0,01	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
4	Acido β-Hidroxipirúvico	1135	103, 204	13,81 ± 0,13	0,02	16,9 ± 1,38	0,03	16,9 ± 0,50	0,03	259,2 ± 22,0	0,42	237,1 ± 29,0	0,38
5	Acido etil-pipecólico	1167	84	0,00 ± 0,00	0,00	0,2 ± 0,01	0,00	0,2 ± 0,01	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
6	L-prolina	1175	70	0,00 ± 0,00	0,00	1,8 ± 0,05	0,00	1,9 ± 0,06	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
8	Acido benzoico	1244	179, 105	0,45 ± 0,03	0,00	0,9 ± 0,19	0,00	0,9 ± 0,02	0,00	1,5 ± 0,1	0,00	1,5 ± 0,1	0,00
9	L-serina	1259	116, 132	0,00 ± 0,00	0,00	2,2 ± 2,32	0,00	2,6 ± 0,34	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
11	Acido acetoacético	1296	231, 147	56,01 ± 0,91	0,09	37,5 ± 1,19	0,06	38,2 ± 1,27	0,06	49,3 ± 2,1	0,08	53,3 ± 2,6	0,09
13	Acido succínico	1319	73, 147	1,80 ± 0,01	0,00	1,7 ± 0,08	0,00	1,0 ± 0,01	0,00	0,7 ± 0,1	0,00	0,7 ± 0,0	0,00
14	Acido 2-metil succínico	1333	73, 147	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
15	Acido glicérico	1345	73, 147, 189	1,59 ± 0,01	0,00	1,5 ± 0,20	0,00	0,9 ± 0,01	0,00	0,7 ± 0,1	0,00	0,7 ± 0,0	0,00
16	Acido ticónico	1351	147	0,00 ± 0,00	0,00	0,4 ± 0,02	0,00	0,4 ± 0,01	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
17	Acido 2-metilen-1,4-butanodioico	1360	147	0,00 ± 0,00	0,00	0,1 ± 0,00	0,00	0,1 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
21	Acido D(-)-Citramálico	1456	147, 273	0,00 ± 0,00	0,00	0,6 ± 0,09	0,00	0,9 ± 0,08	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
22	Acido málico	1502	73, 147	302,12 ± 0,55	0,49	179,0 ± 3,35	0,29	180,4 ± 2,67	0,29	19,4 ± 1,3	0,03	22,3 ± 1,6	0,04
24	Acido treónico	1565	147,292	10,39 ± 0,09	0,02	8,8 ± 1,03	0,01	6,7 ± 0,29	0,01	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
35	D(-)-acido quínico	1906	217	65,07 ± 0,42	0,10	38,7 ± 2,93	0,06	38,5 ± 1,86	0,06	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
48	Acido trans-ferúlico	2106	217, 305, 318	1,64 ± 0,02	0,00	2,4 ± 0,13	0,00	2,4 ± 0,11	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
					0,73		0,47		0,47		0,54		0,51
10	Acido fosfórico	1282	299	166,36 ± 1,16	0,27	230,9 ± 8,41	0,37	234,9 ± 7,46	0,38	16,7 ± 1,9	0,03	14,7 ± 1,7	0,02
	Monosacáridos (Ms)												
39	Ms.N.i 1	1974	305, 147, 612	2072,30 ± 3,93	3,34	1995,9 ± 58,33	3,22	2007,7 ± 72,34	3,23	2682,2 ± 124,4	4,32	2702,8 ± 50,0	4,35
40	Ms.N.i 2	1978	305, 147, 540	469,17 ± 2,28	0,76	426,3 ± 10,67	0,69	418,3 ± 10,08	0,67	148,0 ± 24,2	0,24	149,2 ± 25,4	0,24
					4,09		3,90		3,91		4,56		4,60
	Isómeros furano												
26	β-D(-)-Ribofuranosa	1662	217	0,00 ± 0,00	0,00	0,2 ± 0,02	0,00	0,2 ± 0,01	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00

*Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas,
Estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.*

28	α -D-(+)-fructofuranosa	1861	217, 147	9380,39 \pm 14,98	15,11	9185,7 \pm 127,90	14,80	9239,8 \pm 89,58	14,89	6770,1 \pm 92,1	10,91	6304,6 \pm 93,1	10,1
29	β -D-(+)-fructofuranosa	1874	217, 204	2847,22 \pm 4,35	4,59	3820,1 \pm 72,89	6,15	3862,1 \pm 162,37	6,22	2901,7 \pm 59,8	4,68	2948,4 \pm 95,1	4,75
30	α -D-(+)-glucofuranosa	1883	217	157,51 \pm 3,14	0,25	151,1 \pm 4,18	0,24	141,9 \pm 2,93	0,23	165,9 \pm 9,9	0,27	158,9 \pm 13,7	0,26
32	β -D-(+)-Galactofuranosa	1890	217	439,87 \pm 1,69	0,71	369,5 \pm 14,82	0,60	397,5 \pm 7,04	0,64	855,3 \pm 74,9	1,38	820,9 \pm 28,2	1,32
33	α -D-(+)-Galactofuranosa	1898	217	2713,69 \pm 3,96	4,37	3192,4 \pm 81,63	5,14	3194,6 \pm 65,57	5,15	620,2 \pm 63,1	1,00	676,9 \pm 73,8	1,09
34	β -D-(+)-glucofuranosa	1901	217	0,00 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,00	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
					25,03		26,94		27,13		18,23		17,5
Isómeros pirano													
27	α -D (+)-xilopiranososa	1734	204	33,24 \pm 1,99	0,05	15,5 \pm 2,57	0,02	16,3 \pm 0,54	0,03	13,2 \pm 1,6	0,02	15,2 \pm 1,6	0,02
36	α -D (-)-Fructopiranososa	1939	204, 191, 217	6521,22 \pm 18,39	10,51	6169,5 \pm 39,62	9,94	6306,3 \pm 96,55	10,16	6428,8 \pm 85,4	10,36	6480,6 \pm 126,1	10,4
37	α -Galactopiranososa	1958	204, 217, 191	296,97 \pm 1,02	0,48	210,6 \pm 5,96	0,34	266,1 \pm 5,32	0,43	208,0 \pm 15,7	0,34	209,7 \pm 17,1	0,34
38	β -Galactopiranososa	1965	204, 191, 217	1164,56 \pm 7,89	1,88	1240,2 \pm 30,33	2,00	1093,6 \pm 23,90	1,76	3001,8 \pm 74,7	4,84	3026,2 \pm 62,5	4,88
41	α -D-(+)-Glucopiranososa	1986	204, 147, 217	160,74 \pm 3,95	0,26	194,6 \pm 12,67	0,31	165,6 \pm 10,94	0,27	66,4 \pm 8,6	0,11	66,9 \pm 8,8	0,11
42	β -D (-)-Fructopiranososa	1994	204, 191, 217	1540,23 \pm 14,80	2,48	1247,3 \pm 19,35	2,01	911,7 \pm 48,70	1,47	2969,0 \pm 78,6	4,78	2992,3 \pm 85,2	4,82
44	β -D-(+)-Glucopiranososa	2031	191, 204, 217	6142,67 \pm 21,70	9,90	5411,1 \pm 30,25	8,72	5364,7 \pm 51,93	8,64	5850,0 \pm 65,8	9,43	5897,8 \pm 73,4	9,50
					25,55		23,34		22,76		29,87		30,1
Polioles													
7	1,3-dihidroxi-2-propanona	1223	103	13,79 \pm 0,91	0,02	9,0 \pm 0,19	0,01	9,6 \pm 0,18	0,02	384,9 \pm 55,7	0,62	382,0 \pm 9,6	0,62
12	Glicerol	1305	147	1,51 \pm 0,01	0,00	2,0 \pm 0,18	0,00	2,4 \pm 0,20	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
19	2-Metil-1,4-butanodiol	1403	147	0,00 \pm 0,00	0,00	0,9 \pm 0,01	0,00	0,6 \pm 0,07	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00
20	D(-)-Eritrosa (cetol)	1418	147, 204	114,41 \pm 1,90	0,18	100,8 \pm 2,72	0,16	107,1 \pm 2,56	0,17	195,8 \pm 22,2	0,32	187,3 \pm 23,4	0,30
23	Treitol	1517	147	71,70 \pm 1,15	0,12	62,7 \pm 2,00	0,10	68,8 \pm 1,50	0,11	88,3 \pm 8,6	0,14	91,9 \pm 9,7	0,15
43	<i>chiro</i> -inositol	2001	318, 305, 217	1344,24 \pm 23,43	2,17	981,8 \pm 24,29	1,58	902,9 \pm 57,16	1,45	1267,3 \pm 97,2	2,04	1277 \pm 6 126,0	2,06
45	<i>scyllo</i> -inositol	2074	318, 305, 217	146,15 \pm 13,38	0,24	417,9 \pm 10,22	0,67	105,7 \pm 2,37	0,17	81,9 \pm 6,1	0,13	82,5 \pm 2,3	0,13
49	<i>myo</i> -inositol	2136	305, 318, 217	2306,03 \pm 17,69	3,72	2157,6 \pm 78,61	3,48	2176,9 \pm 91,41	3,51	2417,7 \pm 57,8	3,90	2437,2 \pm 27,8	3,93
					6,44		6,01		5,44		7,15		7,18
Carbohidratos ácidos y lactonas													
18	Acido trans-1,4-lactona-treónico	1385	147	5,43 \pm 0,53	0,01	4,2 \pm 0,03	0,01	4,3 \pm 0,32	0,01	0,0 \pm 0,0	0,00	0,0 \pm 0,0	0,00

*Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas,
Estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.*

25	Acido tetrónico	1585	147,292	0,00 ± 0,00	0,00	0,1 ± 0,01	0,00	0,0 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,00	0,0 ± 0,0	0,00
31	L-galactan-1,4-lactona	1888	217, 204	246,95 ± 3,23	0,40	162,6 ± 3,67	0,26	191,1 ± 5,22	0,31	101,6 ± 13,2	0,16	114,1 ± 9,8	0,18
46	Acido α-D-galactofuranurónico	2082	217, 147, 539	132,51 ± 9,97	0,21	70,7 ± 1,94	0,11	71,2 ± 2,15	0,11	79,3 ± 5,2	0,13	79,9 ± 3,7	0,13
47	Acido β-D-galactofuranurónico	2086	217, 147, 539	130,48 ± 7,62	0,21	38,8 ± 1,63	0,06	39,8 ± 1,74	0,06	90,3 ± 6,9	0,15	91,0 ± 10,4	0,15
					0,83		0,45		0,49		0,44		0,46
	Disacáridos (Ds)												
50	D(+)-Sucrosa	2711	361, 217, 437	8445,41 ± 66,05	13,61	8490,7 ± 39,69	13,68	8665,7 ± 32,54	13,96	7710,4 ± 54,1	12,42	7786,7 ± 97,0	12,55
51	D(+)-Turánosa	2787	361, 147, 217	3809,52 ± 61,26	6,14	3691,2 ± 76,84	5,95	4440,3 ± 97,57	7,15	5547,0 ± 64,1	8,94	5592,2 ± 67,3	9,01
52	isomaltulosa (α-palatinosa)	2812	217, 361	424,30 ± 15,25	0,68	439,7 ± 8,27	0,71	444,8 ± 7,29	0,72	47,9 ± 6,5	0,08	48,3 ± 6,9	0,08
53	isomaltulosa (β-isómero)	2834	217, 361	4309,91 ± 23,85	6,94	4576,4 ± 27,03	7,37	4655,9 ± 85,72	7,50	5741,1 ± 90,4	9,25	5787,4 ± 123,3	9,32
54	Ds.N.i 1	2846	217, 361	2252,52 ± 32,09	3,63	2187,6 ± 59,76	3,52	2200,9 ± 94,61	3,55	1550,8 ± 61,3	2,50	1563,2 ± 68,1	2,52
55	D-Leucrosa	2853	361, 204	2655,24 ± 44,99	4,28	2725,8 ± 68,01	4,39	2407,2 ± 87,26	3,88	2212,4 ± 54,3	3,56	2230,6 ± 98,1	3,59
56	Ds.N.i 2	2902	217, 289, 437	1097,65 ± 33,82	1,77	1792,5 ± 43,41	2,89	1658,1 ± 38,60	2,67	1521,5 ± 46,3	2,45	1533,6 ± 72,7	2,47
					37,05		38,51		39,43		39,20		39,5

¹ Numeración de identificación en Target compound library.

² Índice de retención relativo en columna capilar ZB 5MSi.

³ Pico base en el espectro de masas. La primera señal corresponde al 100% de intensidad (seleccionado como ion para integración de área de pico).

Figura 24. Dispersión de muestras de zumo de mandarina clementina en dos etapas de madures, según componentes principales volátiles.

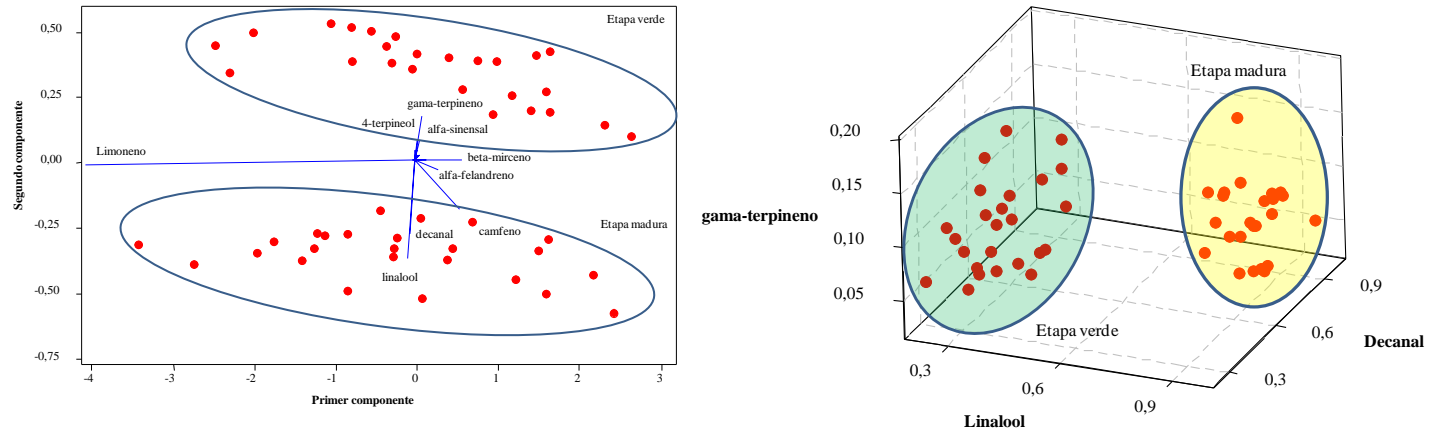


Figura 25. Dispersión de muestras de zumo de mandarina clementina en dos etapas de madures, según componentes principales lipídicos.

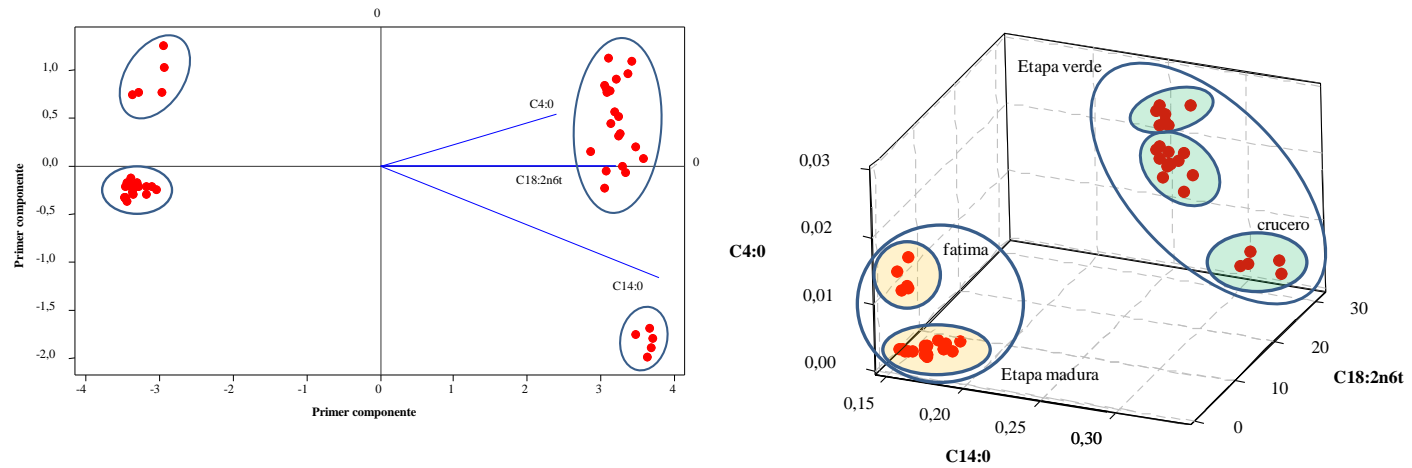


Figura 26. Dispersión de muestras de zumo de mandarina clementina en dos etapas de maduras, según componentes polares de sólidos solubles totales.

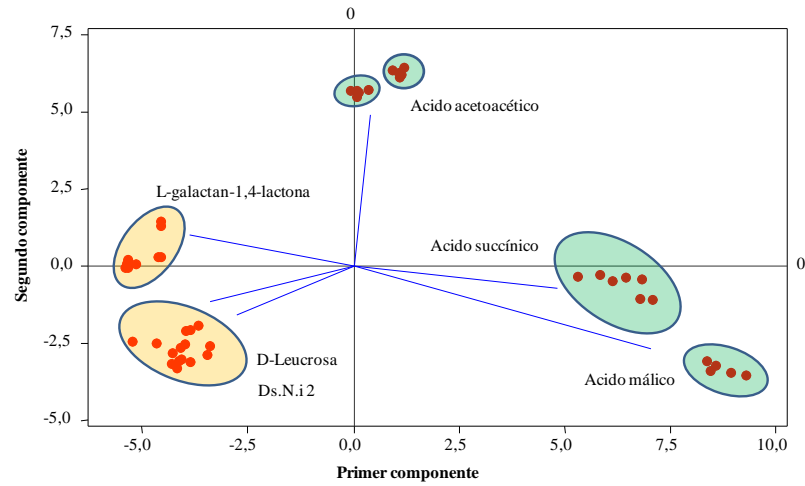
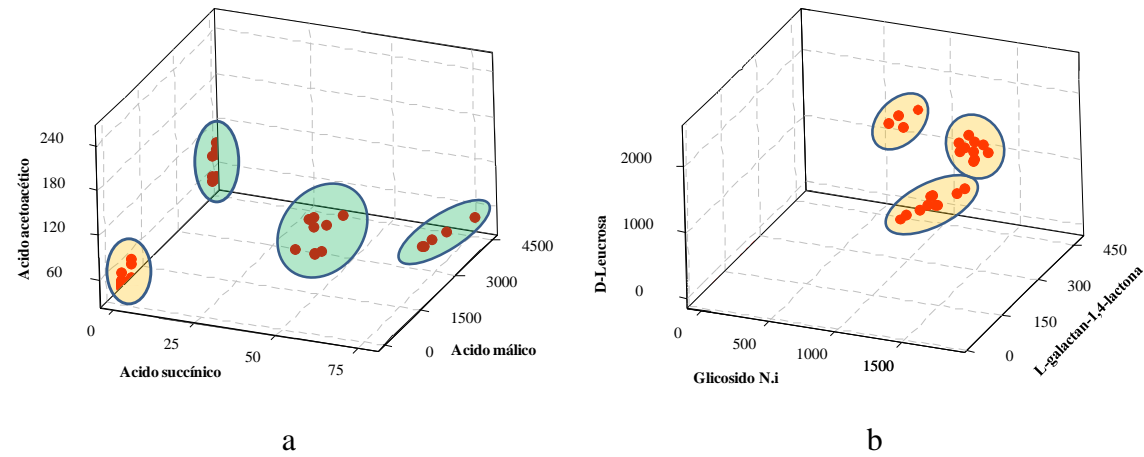


Figura 27. Dispersión de muestras de de mandarina según procedencia de cultivo en dos etapas de maduras, según fracción de componentes de SST.



4.4 Referencias Bibliográficas

165. Von Bertalanffy, L., 1968. General Systems Theory, George Braziller. New York.
166. Lips, S.H., 1998. Nitrogen, stress and plant growth regulation, In: H.S. Srivastava, R.P. Singh, Nitrogen Nutrition and Plant Growth, Oxford and IBH Publishing, India. p. 283–304.
167. Ho, L.C., 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Plant Mol. Biol.* 39. p. 355–378.
168. Burger, Y., Sa'ar, U., Paris, H.S., Lewinsohn, E., Katzir, N., Tadmor, Y., Schaffer, A.A., 2006. Genetic variability for valuable fruit quality traits in *Cucumis melo*. *Isr. J. Plant Sci.* 54. p. 233–242.
169. Moing, A., Rothan, C., Svanella, L., Just, D., Diakou, P., Raymond, P., Gaudille`re, J., Monet, R., 2000. Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. *Physiol. Plant* 108. p. 1–10.
170. González, J.A. 1997. El efecto de la radiación ultravioleta (UVB) sobre los ecosistemas naturales y cultivados en los países andinos de América Latina: ¿Un nuevo problema ambiental? En: Forno, R. y M. Andrade (eds). 1997. Naturaleza y Efectos de la Radiación Ultravioleta y la Capa de Ozono. p. 91-103. Instituto de Investigaciones Físicas - Universidad Mayor de San Andrés (La Paz - Bolivia).
171. Ebenhöf O., Heinrich R., 2001. Evolutionary optimization of metabolic pathways. Theoretical reconstruction of the stoichiometry of ATP and NADH producing systems. *Bull Math Biol* 63: 1. p. 21-55.
172. Krämer M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer S., 2003. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng* 5: 4. p. 277-83.
173. Heymsfield, S., Waki, M., Kehayias, J., Lichtman, S., Pierson R., 1991. Chemical and elemental analysis of humans in vivo using improved body composition models. *Am J Physiol* 261: 2 Pt 1. p. 190-8.
174. Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 10:14). p. 1677-94.
175. Pichersky, E., Gang, D., 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Sciences* 5. p. 439-445.
176. Trethewey, RN., Krotzky, AJ., Willmitzer, L., (1999) Metabolic profiling : a Rosetta stone for genomics? *Current Opinion in Plant Biology.* 2. p. 83-85.
177. Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, RN., Willmitzer, L., 2000b. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18. p. 1157-1161.
178. Sumner, LW., Mendes, P., Dixon RA., 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 626, 817-36.
179. Weckwerth, W., 2003. Metabolomics in Systems Biology. *Annual Review of Plant Biology* 54. p. 669-689.
180. Kopka, J., Fernie, A., Weckwerth, W., Gibon, Y., and Stitt, M., 2004. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biology.* 5. p. 109.
181. Dunn, W. B. D. I. Ellis., 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 24: 4. p. 285-294.

182. L. Vaclavik, A., Schreiber, O., Lacina, T., Cajka, J., Hajslova., 2011. Liquid chromatography/mass spectrometry based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices. *Metabolomics*. DOI 10.1007/s11306-011-0371-7.T.
183. Cajka, K. Riddellova, M. Tomaniova, J. Hajslova: Ambient mass spectrometry employing a DART ion source for metabolomic fingerprinting/profiling: A powerful tool for beer origin recognition. *Metabolomics* 7(4) (2011) 500–508.
184. Woo, H.-H., B. Jeong, and M. Hawes, Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. *Biotechnology Letters*, 2005. 27(6): p. 365-374.
185. Engelsen, S. B., Monteiro, C., de Penhoat, C. H., & Perez, S. (2001).The diluted aqueous solutions of carbohydrates as inferred frommolecular dynamics simulations and NMR spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, 93, p. 103–127.
186. Galema, S. A., Blandamer, M. J., & Engberts, J. B. F. N. (1992).Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. Kinetic medium effects. *Journal of Organic Chemistry*,57, 1995–2001.
187. P.M. Medeiros, B.R.T. Simoneit, Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2, 1141, 2007, pp. 271–278.
188. Mogosanu, G. Dan., Grumezescu A, M., 2011. Identification of sugars from *Silene albae* using GC-MS technique. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*. 73: 2. p. 101-108.

5. FORMULACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE HIDROCOLOIDAL ANTIFÚNGICO.

5.1 Introducción

El uso de recubrimientos para frutas y hortalizas es una práctica antigua que se desarrolló para imitar las cubiertas naturales de los productos vegetales comestibles.

Existen reportes que datan de los siglos XII y XIII en los que se menciona que en China se realizaba la inmersión en cera de naranjas y limas para retardar la pérdida de agua [189], [190]. Durante el S. XVI se practicaba en Inglaterra el “enmantecado”, esto es, el recubrimiento con grasa de productos alimentarios para prevenir también la pérdida de humedad de éstos. En el S. XIX se emplearon películas a base de gelatina para la preservación de carnes y otros alimentos; alrededor de los 30’s ya se encontraban comercialmente disponibles ceras parafínicas que se derretían con calor para el recubrimiento de cítricos [191], y en los comienzos de los años 50’s se desarrollaron emulsiones aceite-agua con cera de carnauba para el recubrimiento de frutas frescas y hortalizas [189], [192]. Desde mediados de los 50’s a mediados de los 80’s se realizó bastante trabajo orientado al uso de películas y recubrimientos para extender la vida comercial y mejorar la calidad de alimentos frescos, congelados y procesados, el cual se ha reportado tanto en la literatura científica como en muchas patentes. Desafortunadamente, gran parte de este trabajo es de valor limitado debido a la carencia de datos cuantitativos de las características de barrera de los recubrimientos.

En la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de recubrimientos de alto desempeño que permitan una protección efectiva de la calidad de los bienes de consumo y ofrezcan además, seguridad en el plano alimentario para el consumidor. Por ello el enfoque en la ciencia de las películas comestibles de matriz hidrocoida.

Los hidrocoloides son polímeros hidrofílicos, de origen vegetal, animal, microbiano o sintético, que generalmente contienen muchos grupos hidroxilo y puede ser polielectrolitos (por ejemplo, alginato, carragenina, carboximetilcelulosa, goma árabiga,

la pectina y la goma xantana, por ejemplo) [193]. Hoy en día, son ampliamente utilizados como soluciones formadoras de película para llevar a cabo y controlar la textura, sabor y vida útil de los alimentos. Los materiales hidrocoloidales, es decir, proteínas y polisacáridos, se utiliza ampliamente para la formación de películas y recubrimientos comestibles. Todos los hidrocoloides se utilizan total o parcialmente solubles en agua y se utilizan principalmente para aumentar la viscosidad de la fase continua (fase acuosa) es decir, como agente gelificante o espesante. También se utilizan como emulsionantes, ya que su efecto estabilizador en emulsiones se deriva de un aumento de la viscosidad de la fase acuosa de la película comestible. El movimiento cinético de las gotas de oleosas se reduce, lo que resulta en una menor tasa de floculación y coalescencia en la película [194].

5.1.1 Materiales de los recubrimientos comestibles

De acuerdo con Krochta [195], una película comestible se define como aquella capa delgada de material comestible formada sobre un alimento como un recubrimiento, o colocada (lo que implica que debe ser pre-formada) sobre o entre los componentes de los alimentos. Su propósito: es el de inhibir o reducir la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, pigmentos, etc, servir como vehículo para aditivos alimentarios (antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes, colorantes), y/o mejorar la integridad mecánica o características de manejo del alimento en cuestión. En algunos casos las películas comestibles con buenas propiedades mecánicas pueden llegar a sustituir las películas de empaque sintéticas.

Actualmente las películas y cubiertas comestibles encuentran una amplia variedad de aplicaciones: cubiertas de chocolate para nueces y frutas, cubiertas de cera para frutas y hortalizas, fundas para salchichas, etc. Los retos técnicos involucrados en producir alimentos y conservarlos con calidad estable, indican que el uso de este tipo de recubrimientos y películas será mayor de lo que actualmente es. Sin embargo, a pesar de que la información técnica disponible para la elaboración de películas comestibles es amplia, no es universal para todos los productos, lo que implica un reto para el desarrollo de recubrimientos y películas específicas para cada alimento.

Las películas y recubrimientos comestibles se elaboran con biopolímeros naturales de alto peso molecular que proporcionan una matriz macromolecular con resistencia cohesiva alta. Los tipos de macromoléculas que se emplean para este propósito son hidrocoloides (proteínas, polisacáridos) los cuales debido a su naturaleza hidrofílica, son muy sensibles al agua. Los otros componentes mayoritarios en la formulación lo constituyen los lípidos, (eventualmente resinas y/o ceras), pero también pueden incluir plastificantes, emulsificantes, agentes tensoactivos (surfactantes), agentes de liberación controlada de compuestos, lubricantes, etc., por lo que realmente se trata de formulaciones multicomponente [196].

5.1.1.1 Polisacáridos

Los polisacáridos son utilizados en sistemas de alimentos como agentes espesantes, estabilizantes, gelificantes, emulsionantes [197]. Estos comprenden una fuente de recursos abundantes y renovables de agentes hidrofílicos formadores de películas con un amplio rango de viscosidades, permeabilidad a los gases relativamente baja, pero poca resistencia a la transferencia de vapor de agua. Para el uso de este tipo de materiales se dispone de una lista amplia de polisacáridos utilizados en recubrimientos y películas, como se observa en la tabla 16. La calidad de estos materiales está definida por la FDA (FDA 21 CFR, EE.UU) y son aceptados para su uso en alimentos por la normatividad Colombiana.

5.1.1.2 Pectina

Al igual que con polímeros de celulosa, la longitud de la cadena también afecta la solubilidad y la viscosidad. La disolución en agua de las pectinas en polvo tiene lugar en tres etapas: dispersión, hinchado y disolución. Para la dispersión del polvo es necesaria una fuerte agitación a fin de separar bien los gránulos de pectina e impedir la formación de grumos que serían posteriormente insolubles. Una vez dispersada, la pectina necesita un tiempo (función de la temperatura, de la concentración, de la dureza del agua, etc.) para hidratarse en la etapa conocida como hinchado. Finalmente cuando las moléculas han fijado una cantidad suficiente de agua, entre 15 y 25 veces su propio peso según las condiciones de trabajo, se obtiene una solución homogénea.

Cuando se utiliza pectina como formador de película en recubrimientos, este polímero aporta un poco de brillo al producto y forma una superficie adherente. Las pectinas de bajo metoxilo se pueden asociar con iones de calcio para formar geles [198]. Los recubrimientos hechos con materiales de pécticos en general tienen altos índices de transmisión de vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica [199], [200], que pueden mejorarse por la adición de parafina o cera de abejas. La resistencia a la tracción de las películas de ácido pectíco aumenta con una disminución en el contenido de metoxilo [201], porque la eliminación de los grupos éster conduce a un aumento transversal de unión entre los grupos carboxilos residuales. Miers, informó que los recubrimientos de pectina de resistencia aceptable presentaron un contenido de metoxilo de 4% o menos y viscosidades intrínsecas de 3.5 o superior [201]. Las pectinas son generalmente considerados GRAS [202].

Tabla 16. Polisacáridos utilizados en formulación de recubrimientos.

Sustancia	Clasificación
Agar	GRAS, agente saborizante y de secado, estabilizador, espesante, acabado de superficies.
Algínato	GRAS, emulsificador estabilizador, espesante
Carragenanos	emulsificador estabilizador, espesante, agente gelificador
Quitosan	emulsificador estabilizador, espesante
Dextrinas	GRAS, estabilizador, espesante
Etil celulosa	Compactante, componente de recubrimientos protectores para vitaminas y tabletas minerales
Furceleran (Danish agar)	Emulsificador, estabilizador espesante
Sales de furceleran	Emulsificador, estabilizador espesante
Goma arábica (goma acacia)	GRAS, emulsificador
Goma ghatti	GRAS, emulsificador
Goma karaya	GRAS, estabilizador, espesante
Goma tragacanto	GRAS, ayudante de formulación, emulsificante
Goma guar	GRAS, emulsificante
Hodroxipropil celuosa	Emulsificante, formador de película, coloide protector, espesante
Hidroxipropilmetilcelulosa	Emulsificante, formador de película, coloide protector, espesante
Metilcelulosa	GRAS, GMP
Metiletilcelulosa	Emulsificante, antiespumante
Almidón modificado	Aditivo alimentario
Pectinas	GRAS, GMP
Carboximetilcelulosa sódica	GRAS, GMP
Goma xantan	Estabilizante, emulsificante, espesante, agente suspensor

Tomado de: Baldwin, E.A. 2007. [203].

5.1.1.3 Goma Tragacanto

La goma tragacanto es un polisacárido obtenido por incisión de tallos de varias especies del género *Astragalus* (*Astragalus gummifer*, Labillardière), que se encuentran en regiones montañosas de Turquía, Siria, Irak, Irán y Rusia. La goma es una mezcla de polisacáridos con diferentes porciones estructurales insolubles y solubles en agua. El Bassorin (porción de amilosa) constituye el 60-70% de la goma, es la principal parte insoluble en agua, mientras que el resto del material se compone de porciones solubles en agua, conocido como Tragacantin, el cual por hidrólisis produce arabinosa, L-fucosa, D-xilosa, D-galactosa y ácido D-galacturónico. La goma tragacanto también contiene pequeñas cantidades de celulosa, almidón, proteínas y cenizas, tiene un peso molecular aproximado de 840.000 daltons [204].

La goma tragacanto se utiliza como emulsionante y agente de suspensión en una variedad de formulaciones farmacéuticas. Se utiliza en cremas, geles, emulsiones y en diversas concentraciones, según la aplicación de la formulación, de manera similar, se utiliza en cosméticos y alimentos productos, como diluyente en formulación de tabletas.

Entre las ventajas potenciales de los recubrimientos a base de polisacáridos se pueden mencionar que no son grasos, son películas de bajas calorías y pueden emplearse para extender la vida comercial de frutas y hortalizas sin alto riesgo de desarrollar condiciones de anaerobiosis, por lo que su aplicación en la agricultura se ha vuelto popular debido a sus propiedades para modificar la atmósfera interna de una manera similar a las atmósferas controladas [205].

5.1.1.4 Lípidos

Los lípidos son un grupo de compuestos hidrofóbicos, comúnmente presentes como ésteres de glicerol, se presentan en forma neutra y como ácidos grasos. También incluyen las ceras, que son ésteres de alcoholes de cadena larga monovalentes y ácidos grasos [206]. Una lista de los componentes lipídicos de uso común en recubrimientos se reporta en la tabla 17. Los ácidos grasos y alcoholes en su forma libre son carentes de integridad estructural y durabilidad pero presentan buena capacidad formadora de película. Debido a la naturaleza frágil de estos compuestos, los lípidos se incorporan a

menudo en una matriz estructural de otra sustancia, como un polisacárido [207]. Los componentes lipídicos, por lo tanto, deberán incorporarse en recubrimientos de materiales compuestos formado por al menos dos materiales. La matriz de soporte, si se compone de polímeros hidrofílicos, pueden afectar la resistencia de la película a la transmisión de vapor de agua [208]. En general, los aceites no son tan resistentes a los gases y a la transferencia de vapor de agua como son las ceras en estado sólido [209], [210]. En un estudio realizado el alcohol estearílico fue el más resistente a la transmisión de O₂, probablemente debido a su capacidad de cristalizar con superposición de plaquetas con una dirección perpendicular a la dirección del flujo de gas [211], [212]. En general, los recubrimientos que incluyen lípidos sólidos hasta un 75% pueden utilizarse para mejorar el desempeño del material sin disminuir la capa barrera contra la humedad, pero los sólidos por debajo del 25% han producido un aumento de la permeabilidad en condiciones de ensayo [213].

Tabla 17. Sustancias grasas utilizadas en formulación de recubrimientos

Sustancia	Clasificación
Aceites	
Monoglicerido acetilado	Recubrimiento termoadhesivo removible
aceite de castor	Coberturas para golosinas y tabletería
Ácidos grasos de fuentes comestibles: Capríco, láurico, mirístico, oleico, palmítico, esteárico.	Agente liberador; lubricante; protector de frutas y vegetales frescos
Aceite mineral	Recubrimiento termoadhesivo removible
Aceite de maní	GRAS, recubrimientos comestibles
Sales de ácidos grasos	Emulsionante, antiaglomerante
Aceite de soya	GRAS, recubrimientos comestibles
Hidrocarburos sintéticos de parafina de petróleo	Componentes de recubrimientos en frutas y vegetales
Aceite mineral blanco	Componente para recubrimientos de fusión en caliente para carnes
Ceras	
Cera de abejas	GRAS, abrillantador de superficie
Candelilla	GRAS, lubricante, abrillantador de superficie
Carnauba	GRAS, lubricante, abrillantador de superficie
Cera parafina	Componente de recubrimientos
Cera de petróleo	Componente de microcápsulas de saborizantes, antiespumante, protector de coberturas para queso, frutas y verduras frescas.

Tomado de: Baldwin, E.A. 2007. [203]

5.1.1.4.1 Aceites

El aceite de parafina, aceite mineral, aceite de ricino, aceite de colza, monoglicéridos acetilados, y vegetales (maní, maíz y soja) se han utilizado solos o en combinación con otros ingredientes para recubrir productos alimenticios. El aceite mineral blanco es un producto derivado del petróleo, que consiste en una mezcla de parafina líquida y e hidrocarburos de nafta. Está aprobado para su uso como un agente de liberación alimentario y como capa protectora para frutas frescas y hortalizas [206]. Los ácidos grasos y poligliceridos son derivados de aceites vegetales y se consideran GRAS [202]. Son de uso general junto con glicéridos como emulsionantes. Entre los varios aceites probados en formulaciones de recubrimiento, el aceite de parafina presento la mayor resistencia al agua, seguido por aceite vegetal y aceite mineral ligero [214]. Los acetogliceridos son muy flexibles en forma polimórfica y estables en forma cristalina. Estas grasas modificadas tienen uso como recubrimientos protectores y como plastificantes [215]. La mayoría de los aceites usados en recubrimientos se consideran aditivos directos de alimentos con las restricciones que varían según la FDA [202]. La parafina y el aceite mineral se permiten como agentes de liberación y lubricantes, antiespumantes, o formadores de capa, el aceite de ricino está aprobado como un agente de liberación y para la formulación de recubrimientos. Los aceites vegetales son generalmente considerados GRAS, mientras que los monoglicéridos acetilados se consideran aditivos alimentarios, con algunas otras restricciones que están hechas de grasa comestible [202].

5.1.1.4.2 Ceras

La parafina, cera de carnauba, cera de abeja, candelilla y las ceras de polietileno y se han utilizado en productos de recubrimiento alimentarios, solos o en combinación con otros ingredientes. La cera de parafina es una fracción de destilado de petróleo crudo [216]. La parafina sintética está formada por la polimerización catalítica de etileno y se permite su uso en alimentos en los Estados Unidos. Se utiliza como recubrimiento protector de frutas, verduras y queso, como base en formulación de chiclets, antiespumante, y como componente en la microencapsulación de aromas [206].

La cera de carnauba es el exudado de las hojas de palmera “el árbol de la vida” (Copemica cerifera) en Brasil. La cera de abejas o "cera blanca" es secretada por las abejas y la cera de candelilla es un exudado de la candelilla (*Euphorbia antisphilitica*), que es una planta que crece en México y el sur de Texas. Estas ceras naturales se consideran GRAS [202] en los Estados Unidos y se utilizan en fabricación de chiclets, caramelos, y recubrimientos comestibles.

La cera de abeja se compone de un 70-75% de una mezcla de ésteres de varios Monoalcoholes de cadenas lineales pares, de C₂₄ a C₃₆ de carbonos, esterificados con ácidos de cadena lineal. Estos ácidos también tienen el mismo número de átomos de carbono, hasta C₃₆. El éster principal es el miricilpalmitato. También están presentes algunos ácidos libres (alrededor del 14%) y carbohidratos (12%), así como aproximadamente el 1% de cera libre de alcoholes y ésteres de ácido graso esteárico.

5.1.2 Agentes antimicrobianos y antifúngicos en RC

Los agentes químicos antimicrobianos más comúnmente utilizados en los sistemas alimentarios, han sido los ácidos benzoico, propiónico, sórbico, el benzoato de sodio y el sorbato de potasio, los cuales se pueden incorporar en películas y recubrimientos comestibles para inhibir la proliferación de bacterias, mohos y levaduras [205]. De hecho, los compuestos antimicrobianos, cuando establecen contacto con los alimentos, inhiben el crecimiento de los microorganismos presentes en la superficie [198]. Sin embargo, debido a los problemas de toxicidad en los consumidores, la demanda de alimentos naturales ha estimulado la búsqueda de bioconservantes naturales en películas comestibles. Los bioconservantes más utilizados como antibacterianos son la lisozima y la nisina, estos presentan efecto bactericida sobre bacterias Gram (+), pero también presentan un efecto fuerte en bacterias Gram (-) cuando se combinan con agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Otros bioconservantes útiles para preservar la integridad de películas y recubrimientos comestibles son las bacteriocinas, como lacticin, pediocin y enzimas antimicrobianas, tales como la quitinasa y glucosa oxidasa [217]. También se conoce el uso del enzima lactoperoxidasa (LPS) [218], [219], [220], que tiene propiedades antimicrobianas y antioxidantes; se

encuentra en las glándulas mamarias, salivales y lagrimales de los mamíferos y en las secreciones respectivas. LPS muestra un efecto bactericida sobre bacterias Gram (+) y efecto bacteriostático en bacterias Gram (+). LPS también presenta actividad antifúngica y antiviral [221]. Otros compuestos antimicrobianos naturales también se han incorporados en proteínas y matrices basadas en polisacáridos, tales como los aceites esenciales, el de romero, ajo y orégano, hierba de limón o aceite de canela, a diferentes concentraciones.

Desde la edad media, los aceites esenciales se han utilizado ampliamente como bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios, incluso, como insecticidas, como medicamentos y en cosmética. Especialmente, en la actualidad diferentes sectores productivos los utilizan en productos de alto valor: farmacéutico, sanitario, cosmética, agricultura y alimentación. Debido a la modalidad de extracción, en su mayoría por destilación a partir de plantas aromáticas y en virtud de su metabolismo, contienen una gran variedad de moléculas volátiles, como los terpenos y sesquiterpenos, fenoles y componentes alifáticos. En ensayos in vitro, muchos de ellos se han caracterizado como entidades fisicoquímicamente antioxidantes. Sin embargo, otros estudios muestran que en células eucariotas, los aceites esenciales pueden actuar como prooxidantes que afectan a las membranas internas de células y orgánulos como las mitocondrias. Dependiendo de la composición y la concentración, exhiben efectos citotóxicos en las células vivas, aunque son por lo general no genotóxicos [222].

Estos hallazgos sugieren que, al menos en parte, los efectos beneficiosos encontrados en los aceites esenciales se deben a efectos prooxidantes en el nivel celular. La principal ventaja de los aceites esenciales es que se pueden utilizar en cualquier alimento y se consideran generalmente reconocidos como seguros, siempre y cuando sus efectos se alcancen al máximo, con el mínimo cambio en las propiedades organolépticas de los alimentos y sin riesgo de toxicidad [223].

5.1.3 Emulsificación

Los recubrimientos en emulsión son aceites y/o ceras dispersas en agua o alguna otra solución hidrofílica. En una macroemulsión se han dispersado partículas de lípidos y/o cera de tamaños de que van de 2×10^3 a 1×10^5 amstrong, y en microemulsiones de 1×10^3 a 2×10^3 amstrong. La manipulación de la cera implica su fusión y posterior incorporación en la fase que contiene agua [224]. La cera de carnauba y cera de abejas forman microemulsiones estables con los emulsionantes adecuados, formando una capa brillante, mientras que por lo general las macroemulsiones imparten un poco de brillo al producto recubierto [225]. Existen diferentes tecnologías y métodos para la preparación de emulsiones, aplicables a la industria de recubrimientos comestibles; en la formación de este tipo de dispersiones están involucrados tres factores que definen el éxito del proceso:

- Acción mecánica, para interponer una sustancia en otra se precisa de una fuerza exterior que se aplica normalmente mediante agitación. Con ello se pretende aumentar la superficie de contacto de las dos fases de forma que la fase discontinua quede finamente dividida en el seno de la fase continua, formándose un sistema homogéneo [225].
- Acción sobre la energía de superficie, las gotas en la emulsión además de estar sometidas a la fuerza de la gravedad y a una inercia estática que las separa y hace que dos líquidos inmiscibles estén separados, están sometidas a una energía de superficie. Para que las dos fases se unan hay que vencer esa energía de superficie bien agitando (mecánicamente) o bien con un tensoactivo (este disminuirá la tensión superficial) [225].
- Tensión superficial, es lo que hay que vencer para que dos líquidos inmiscibles se hagan miscibles. No se mezclan porque hay una repulsión entre ellas al mezclarse por la existencia de una tensión interfacial. Al agitar se pretende aumentar la superficie de contacto de la fase externa con la fase interna. Esta superficie de contacto se puede aumentar, bien aumentando la energía o bien disminuyendo la tensión superficial. La tensión superficial se consigue disminuir añadiendo un tensoactivo [225].

5.1.2 Materiales y métodos

5.2.1 Selección de materiales para un RC

La selección de un material formador de película, sus constituyentes y del aditivo bioactivo está en función del objetivo, la naturaleza del producto y el método de preparación y aplicación [192], [226]. De esta manera, para el caso de frutos cítricos, las propiedades de transferencia de masa selectiva deseadas de una película comestible tendrían que permitir el desarrollo normal de la maduración, senescencia y respiración de los frutos sin riesgo de anaerobiosis, limitando en gran medida su deshidratación durante el almacenamiento.

Diferentes investigaciones con recubrimientos comestibles hidrocoloidales han propuesto la mezcla de cuatro componentes principales como se observa la tabla 18, los cuales deben cumplir un rol básico en la formulación.

Tabla 18. Componentes básicos de una formulación de recubrimiento comestible

Componente	Función	Cantidad
Pectina	Formador de película, suspensor	2-3 %
Sorbitol	Plastificante	0,9-1,8%
Cera de abejas	Impermeabilizante, abrillantador de superficies	0,8, 1.6 g
Componente antimicrobiano	Antifúngico, fungistático	1% *

* Cantidad a optimizar mediante bioensayos.

Las sustancias hidrofóbicas como las ceras y aceites no solubles en agua resultan ser eficientes para retardar la transferencia de agua a través de las películas; sin embargo si se emplean como componente único o principal, se obtienen películas gruesas y quebradizas. Por ello es necesario establecer un balance cuantitativo de los constituyentes básicos. Adicionalmente, se requiere una optimización de condiciones de formulación en atención a la incorporación y retención de volátiles en la película de recubrimiento.

Dados los objetivos de esta investigación se propuso la optimización de una formulación de recubrimiento comestible hidrocoloidal con propiedades antifúngicas y/o fungistáticas, mediante la optimización de la formulación que se presenta en la tabla

18 y mediante la incorporación de aceites esenciales de cítricos, que aporten protección contra patógenos del género *Penicillium*. Durante el desarrollo metodológico se incorporan otros agentes a la formulación con el objeto de mejorar sus propiedades constitutivas y funcionales.

5.2.1.1 Características de los materiales empleados

Pectinas, se utilizaron pectinas con diferente origen y propiedades químicas en los ensayos de formulación del recubrimiento.

1. Pectina extraída mediante metodología descrita en el numeral 3.2.1.1, se realizó la precipitación de sustancias insolubles y se acidularon a pH 1. Enero de 2011
2. Pectina extraída mediante metodología descrita en numeral 3.2.1.1, se realizó la precipitación de sustancias insolubles y se acidularon a pH 4. Febrero de 2011
3. Pectina rápida grado alimentos USP. (Bellchem, Medellín-Col.)
4. Pectin from citrus fruits. (Sigma, P9135-Batch 079K0042. EE.UU.)
5. Pectin esterified, from citrus fruit. (Sigma, P9561-Batch 018K1650. EE.UU.)
6. Pectin esterified potassium salt, from citrus fruit. (Sigma, P9436-Batch 069K0976. EE.UU.)

Goma tragacanto grado alimentos USP. (Bellchem, Medellín-Col.)

Aceites vegetales, En los ensayos de formulación de recubrimiento se utilizaron dos aceites vegetales comestibles, adquiridos del mercado; ambos aceites se caracterizaron en cuanto al perfil químico de sus cadenas de ácidos grasos mediante metodología FAMES, descrita en el capítulo 2. Las condiciones cromatográficas, la identificación y cuantificación de componentes se realizó según lo descrito en la misma sección. Los aceites se nombraron como Aceite O (AO) y Aceite P (AP).

Cera de abejas, Cera de abejas grado USP. (Bellchem, Medellín-Col.)

Sorbitol, Sorbitol grado USP. (Bellchem, Medellín-Col.)

Recubrimientos comerciales tipo cera, CWI (Waterwax-2I, Fomesa Fruitech. ceras + 0,2% de Imazalil) y PZT (Cerabrix, T.A.O Química S.A. Colofonia modificada 20% + 0,05% de Tiabendazol).

5.2.2 Aceites esenciales, hidrodestilación y caracterización química

Se obtuvieron aceites esenciales de mandarina Clementina en dos etapas de maduración, descritos en el capítulo 2. Los residuos material de partida se obtuvieron con un extractor eléctrico construido en acero inoxidable descrito en el numeral 4.2.1, Se utilizaron condiciones de hidrodestilación descritas en el numeral 3.2.1.2, en este caso se utilizó la trampa de destilación número dos de la USP. El material vegetal se puso en un balón de destilación de 10 litros, se aplicó calor con una manta de calentamiento, el calor se suministró en forma rápida, obteniendo mayor exposición al calor en la periferia respecto al centro de la masa.

5.2.2.1 Caracterización química de AE hidrodestilados

Cada muestra de aceite esencial se diluyó en metanol hasta un 30%, las condiciones instrumentales se aprecian en el anexo 1. La identificación de los componentes volátiles se efectuó como se describe en el numeral 3.2.3.4. la composición de los principales componentes de estos aceites esenciales se ven en la tabla 19.

5.2.3 Actividad antifúngica in vitro de AE y componentes volátiles

5.2.3.1 Cepas de organismos patógenos

Para el estudio se adquirieron cepas de *Penicillium digitatum* ATCC 10030 (Pd) y *Penicillium italicum* ATCC 10129 (Pi) del cepario de University Boulevard (Manassas, Virginia, EE.UU.). Los organismos se conservaron a 26°C y 24°C en medios

PDA (Papa Dextrosa Agar) y PSA (Papa Sucrosa Agar), respetivamente. Ambos medios se adquirieron en la compañía Merck GmbH, Darmstadt, Alemania.

5.2.3.2 Ensayo de actividad antifúngica in vitro.

La actividad antifúngica *in vitro* se realizó mediante el método de difusión en agar con la modificación propuesta por Viuda-Martos [227]. Las muestras volátiles se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO, Merck GmbH, Darmstadt, Alemania) y posteriormente se mezclaron con medio de cultivo PDA y PSA a una temperatura de 40°C, después, se adicionaron en cajas petri (5 cm de diámetro). Para este ensayo se evaluaron concentraciones de 30, 40 y 50 ppm. La concentración de esporas se ajustó a 1×10^6 esp/ml usando un hematocitometro. Un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro tomado de un hongo de 7 a 10 días de crecimiento se colocó en el centro de la caja de petri y se incubó a 26 °C para Pd y a 24°C para Pi. La efectividad de los tratamientos se evaluó al día 12 y 10, respectivamente (70% de crecimiento del control). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición micelial. Cada tratamiento se realizó a tres replicas. Se aplicaron métodos estadísticos convencionales para calcular las medias y las desviaciones estándar y análisis estadístico (ANOVA) para determinar las diferencias ($p < 0,05$). Se aplicó la prueba de Tukey's para determinar diferencias significativas entre las medias de los niveles y factor principal. El análisis estadístico de los datos de la prueba se realizó con el software Statgraphics Plus 2.0.

5.2.4 Actividad antifúngica in vivo de recubrimientos

Se seleccionaron frutos de naranja Valencia, provenientes de la zona de producción citrícola en Támesis-Ant., los cuales fueron recolectados por personal de la empresa C.I. Agrícolas Unidas S.A. en la Finca La Cristalina, con un índice de madurez (IM) comercial, sin daños o defectos, y con una adecuada apreciación macroscópica de la calidad. Los frutos se sanitizaron con detergente neutro, posteriormente se inocularon todos los frutos, excepto los de control absoluto (CA). Las condiciones de manipulación y preparación de los inoculos de esporas en suspensión para ambos patógenos se realizaron como en el numeral 5.2.3.2, En este caso se realizó una herida para inocular

ambos patógenos, en la zona ecuatorial del fruto (sin perforar la pulpa, para simular la inoculación natural) de 1,5 mm de profundidad y 1 mm de diámetro. Con una micropipeta se inocularon 20 µL de suspensión a una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Después de inoculados se dejaron a temperatura ambiente hasta el siguiente día.

Los frutos inoculados y con 24 horas de exposición a los patógenos, se recubrieron por aspersión manual, posteriormente se acondicionaron en almacenamiento: Para ello, se emplearon dos cuartos fríos. Se realizó una simulación de condiciones comerciales de almacenamiento, la siguiente manera:

Comercialización directa (CD) de 1 y 2 semanas, a temperatura ambiente: las cajas, se dejaron, en promedio, a 23°C.

Frigoconservación durante 2, 3 y 4 semanas, en refrigeración y posterior comercialización, durante 7 días, a 23°C. (F+CD).

Exportación a EE.UU., sometiendo la fruta, a una temperatura entre 0,8° y 1,8°C, durante 18-21 días (cuarentena), seguido de un período de comercialización de 7 días, a 23°C (comercialización) (Q+CD).

La concentración de sólidos totales (ST) de las ceras se modificó dependiendo de las condiciones experimentales para algunos grupos de frutas. En comercialización directa CD, se usó una concentración de 18% y en almacenamiento en frío 10%, para evitar el desarrollo de off-Flavors dado que el período de almacenamiento fue más prolongado.

Los recubrimientos se aplicaron según la siguiente codificación:

1. Cera comercial + IMZ 18% ST, 13,5 ST y 10% ST (CWI 18, CWI 13,5 y CWI 10)
2. Cera comercial + TBZ 18% ST y 10% ST (PZT 18 y PZT 10)
3. Formulación FRCF: 0.5% AE (F 0.5), 1% AE (F 1), 1.5% AE (F 1.5)
4. Control absoluto: sin cera y sin inóculo (CA)

5.2.5 Diseño experimental de ensayos de formulación

La realización de los ensayos de formulación inició con el planteamiento de un diseño experimental factorial (2^4), 16 corridos experimentales x 1 repetición, 32 corridos (ver anexo 4), mediante el cual se establecerá la relación cuantitativa óptima de los componentes básicos mencionados en la tabla 18. Los ensayos de formulación posteriores siguen el mismo esquema original pero con la incorporación de otros componentes.

5.2.6 Preparación de formulaciones

Todos los ensayos de formulación utilizaron la misma forma de preparación de emulsiones, se calentaron por separado, la fase acuosa y la fase oleosa a 60-70°C, posteriormente se agregó la fase externa sobre la fase interna bajo agitación a 17000 rpm utilizando un homogenizador (Ultra turrax T18. IKAR-Werke. GmbH & Co. KG in Staufen, Alemania), en esta etapa los componentes oleosos alcanzaron una temperatura de 75°C y la fase acuosa que contiene los volátiles previamente homogenizados presentó 40°C. Se mantuvo la agitación (10 minutos) hasta el endurecimiento de la emulsión a una temperatura de 35°C. Los materiales se pesaron en balanza analítica, las formulaciones se preservaron a temperatura ambiente y en envases estériles con cierre hermético para evitar la pérdida de volátiles. Con este método se consiguieron formulas estables en el tiempo (más de 6 meses).

5.2.7 Evaluación de la compatibilidad de componentes

Todas las formulaciones se evaluaron mediante cuatro aspectos: formación de película, fluidez del material en el envase y sobre vidrio, adherencia al vidrio y observaciones. Para esto se procedió a colocar una cantidad de 5 gramos de formulación sobre cajas de petri, los cuales se dejaron reposar sobre una superficie plana y se procedió a las observaciones descritas. La apariencia de las formulas en estado húmedo y seco a 24 y 48 horas se fijo fotográficamente sobre una superficie de campo blanco/negro, con lo

que fue posible observar aglomeración de materiales, formación de vesículas de aire, y otros defectos.

5.2.8 Evaluación de la retención de volátiles

Alícuotas de 2 gramos de formulación se adicionó un ISTD de volátiles (5 microlitros, n-undecano; 1000 ppm/cloroformo) con homogenización por vortex. Las formulas preparadas y estandarizadas se pesaron sobre fragmentos de papel bond (75 gr/m²), se dejaron secar a 21°C y 85% de HR, posteriormente se tomaron muestras de los materiales secos a 24 horas y 7 días después para establecer los perfiles de volátiles retenidos. Estos fragmentos se insertaron en viales de cromatografía y se adiciona 250 microlitros de metanol: la extracción de los volátiles retenidos junto al ISTD se realizo mediante la aplicación de ultrasonido por un tiempo de 60 minutos (60 Khz, Ultarsonik 28H. EE.UU) a temperatura ambiente. Posteriormente las extracciones se analizaron con cromatografía de gases. Las condiciones de análisis cromatográfico aparecen descritas en el anexo 1. Se utilizo un detector MS. Los parámetros de adquisición de masas fueron inicialmente en modo SCAN y posteriormente fue necesario en modo Single Ion Monitoring (SIM).

El primer ensayo de formulación se realizó con una mezcla de compuestos estándar para evaluar cuantitativamente la incorporación de volátiles. La mezcla de ensayo se formó con: n-octanal, limoneno, trans-ocimeno, gama-terpineno, terpinoleno, beta-linalool, alfa-terpineol, carvacrol, metil-N-metilantranilato. Las características cuantitativas del ensayo aparecen en el anexo 4. Los demás ensayos de formulación utilizan AE hidrodestilados.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Aceites esenciales, hidrodestilación, caracterización química

5.3.1.1 Caracterización química

Mediante hidrodestilación se obtuvieron 10 muestras de aceite esencial, los cuales reportan una composición que se caracterizó por cambios muy apreciables en el contenido porcentual de limoneno en ambas etapas de maduración. Como se aprecia en la tabla 19, en cada etapa de maduración la composición es cambiante y no es posible encontrar diferenciación por IM, como si es posible con la fracción de volátiles evaluada en la sección 4. En ensayos preliminares de hidrodestilación (no reportados en esta memoria) se observó que el calentamiento rápido del material vegetal conduce a perfiles químicos alterados y no reproducibles de AE, lo cual se aprovechó en este caso, para la obtención de muestras de AE con composición variable, dado nuestro objetivo de establecer la bioactividad AE de cítricos en los patógenos de interés.

El análisis multivariado (PCA) de las muestras de mandarina presenta un panorama de la dispersión química de los AE obtenidos, no es posible encontrar componentes principales de significancia estadística (27,114% de variabilidad para el componente principal 1) en la matriz de correlación. Por esto no se puede explicar la variabilidad de la composición en términos de los factores que caracterizan las muestras, esto es: la especie de origen y dos estados de maduración. Todos los componentes presentan una relación inversa con el componente mayoritario, la fracción menor está representada por más de 77 componentes, los cuales presentan igualmente muy alta dispersión, como se aprecia en la figura 24.

Figura 28. Dispersión de muestras de AE según componentes volátiles principales.

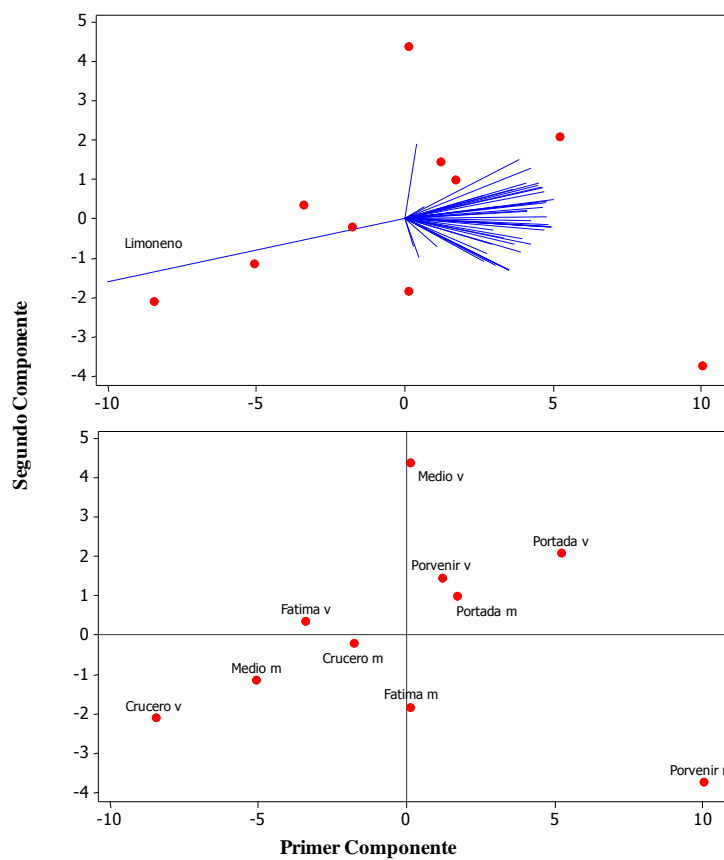


Tabla 19. Principales componentes de aceites esenciales hidrodestilados de mandarina Clementina.

Porcentaje de área relativo de componentes de aceites esenciales de lotes de m. Clementina													
Pico	Compuesto	Etapa verde							Etapa madura				
		IK HP1	IK HP5	Crucero	Medio	Portada	Porvenir	Fátima	Crucero	Medio	Portada	Porvenir	Fátima
1	Hexanal	777	802	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	(E)-2-Hexenal	813	841	0,013	0,027	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	(Z)-3-Hexenal	834	855	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	n-Hexanol	847	871	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	isoamil acetato	856	877	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	2-Heptanona	864	892	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	α -Thujeno	920	924	0,010	0,000	0,029	0,043	0,018	0,016	0,000	0,000	0,039	0,027
8	1R- α -Pino	932	939	0,628	1,955	2,044	1,746	1,176	1,171	0,760	1,847	1,606	1,139
9	Campheno	945	954	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	Sabineno	968	974	1,902	2,783	3,296	3,729	2,591	2,960	1,363	2,393	3,149	3,845
11	β -Pino	972	979	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	β -Myrcene	987	992	1,914	6,344	6,367	5,223	3,503	3,707	2,665	5,692	5,839	3,424
13	Octanal	990	999	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14	α -Phellandreno	995	1001	0,495	1,844	1,282	0,984	3,630	1,286	1,061	1,269	1,823	1,424
15	delta-2-careno	996	1003	0,122	0,301	0,306	0,436	0,233	0,179	0,000	0,275	0,000	0,000
16	α -Terpineno	1008	1017	0,000	0,000	0,000	0,009	0,011	0,000	0,002	0,000	0,005	0,028
17	p-Cimeno	1015	1025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	Limoneno	1021	1032	91,494	76,524	75,831	79,346	82,927	82,164	88,411	78,787	74,099	80,241
19	β -Ocimeno	1030	1037	0,025	0,031	0,060	0,049	0,037	0,048	0,018	0,043	0,057	0,048
20	γ -Terpineno	1045	1060	0,073	0,153	0,244	0,238	0,212	0,151	0,108	0,139	0,323	0,311
21	n-Octanol	1052	1068	0,029	0,132	0,128	0,085	0,068	0,117	0,086	0,179	0,169	0,138
22	trans-linalool oxido	1066	1073	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	Terpinoleno	1076	1089	0,043	0,120	0,229	0,207	0,103	0,081	0,059	0,123	0,280	0,104

24	Linalool	1082	1097	1,810	5,179	4,655	3,743	3,368	4,390	2,585	4,804	5,770	4,925
25	Hotrienol	1087	1101	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
26	Nonanal	1089	1102	0,020	0,065	0,064	0,041	0,031	0,039	0,031	0,054	0,078	0,044
27	1,3,8-p-mentatrieno	1096	1110	0,000	0,027	0,033	0,022	0,025	0,028	0,016	0,038	0,038	0,038
28	(Z)-p-Menth-2-en-1-ol	1099	1119	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,023	0,020	0,010
29	β -Terpineol	1127	1144	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	Isopulegol	1137	1150	0,061	0,171	0,208	0,156	0,087	0,149	0,074	0,228	0,252	0,117
31	Citronelal	1141	1153	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	Ocimenol	1141	1155	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
33	(E)- β -terpineol	1152	1163	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
34	4-Terpineol	1168	1178	0,150	0,299	0,434	0,346	0,399	0,330	0,212	0,272	0,444	0,604
35	α -Terpineol	1179	1189	0,099	0,358	0,357	0,261	0,223	0,251	0,196	0,318	0,356	0,312
36	Decanal	1191	1202	0,210	0,730	0,770	0,548	0,391	0,572	0,506	0,888	1,009	0,538
37	n-Octil acetato	1197	1214	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,022	0,022	0,018
38	trans-Carveol	1203	1217	0,008	0,026	0,096	0,061	0,013	0,018	0,012	0,026	0,113	0,015
39	β -Citronellol	1213	1226	0,008	0,029	0,040	0,027	0,018	0,028	0,017	0,044	0,063	0,027
40	cis-Carveol	1216	1229	0,021	0,060	0,060	0,048	0,035	0,046	0,031	0,031	0,054	0,057
41	Nerol	1218	1231	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
42	o-Metil-thimol	1222	1235	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
43	(Z)-Citral	1224	1238	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
44	Carvone	1227	1243	0,007	0,021	0,037	0,022	0,013	0,022	0,014	0,038	0,051	0,023
45	Geraniol	1237	1253	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
46	n-Decanol	1244	1270	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
47	(E)-Citral	1252	1272	0,030	0,091	0,074	0,060	0,054	0,075	0,055	0,042	0,075	0,090
48	Perillaldehido	1255	1274	0,019	0,082	0,088	0,068	0,045	0,055	0,040	0,072	0,108	0,058
49	Timol	1273	1290	0,006	0,027	0,045	0,033	0,017	0,015	0,012	0,018	0,033	0,012
50	Cuminol	1277	1291	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000
51	o-metoxi-acetofenona	1279	1291	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

52	Carvacrol	1286	1299	0,283	0,192	0,161	0,145	0,123	0,165	0,133	0,156	0,265	0,141
53	δ-Elemeno	1326	1338	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
54	α-terpineol-acetato	1338	1349	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
55	Citronellil acetato	1348	1353	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
56	neril acetato	1350	1362	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
57	α-copaeno	1361	1377	0,019	0,074	0,079	0,069	0,044	0,038	0,038	0,062	0,088	0,036
58	Geranil acetato	1365	1381	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000
59	β-cubebeno	1367	1388	0,018	0,069	0,076	0,062	0,040	0,039	0,039	0,070	0,084	0,035
60	β-Elemeno	1378	1391	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	Dodecanal	1385	1409	0,025	0,101	0,119	0,091	0,055	0,083	0,081	0,148	0,194	0,090
62	(Z)-cariofileno	1403	1410	0,000	0,000	0,025	0,022	0,016	0,014	0,010	0,028	0,039	0,014
63	β-copaeno	1417	1432	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
64	β-farneseno	1429	1443	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
65	α-cariofileno	1440	1455	0,007	0,000	0,019	0,018	0,013	0,012	0,010	0,000	0,029	0,014
66	Germacrano D	1471	1485	0,010	0,032	0,046	0,038	0,023	0,025	0,026	0,044	0,071	0,026
67	β-Selineno	1482	1490	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000
68	biciclogermacrano	1490	1500	0,018	0,000	0,062	0,054	0,032	0,033	0,011	0,033	0,062	0,045
69	(E,E)-alfa farneceno	1491	1502	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,009	0,018	0,027	0,010
70	α-Muuroleno	1494	1508	0,013	0,050	0,058	0,048	0,033	0,027	0,029	0,044	0,059	0,025
71	delta-Cadineno	1519	1523	0,000	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,020	0,000
72	Germacreno B	1554	1561	0,056	0,096	0,204	0,158	0,080	0,109	0,067	0,119	0,212	0,142
73	Cariofileno epoxido	1567	1583	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
74	10-epi-gama-eudesmol	1610	1624	0,027	0,094	0,113	0,100	0,062	0,053	0,052	0,081	0,123	0,054
75	gama-eudesmol	1608	1632	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
76	α-cadinol	1645	1654	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000
77	β-Sinensal	1676	1700	0,009	0,000	0,086	0,072	0,022	0,026	0,012	0,022	0,089	0,429
78	α-sinensal	1726	1752	0,089	0,242	0,921	0,667	0,170	0,303	0,179	0,321	1,016	0,429
	Porcentaje de identificación			99,49	98,14	98,63	98,93	99,83	98,68	98,91	98,65	98,06	98,96

5.3.1.2 Actividad antifúngica de aceites esenciales

Los aceites esenciales evaluados presentan capacidad para inhibir la esporulación de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* a diferentes concentraciones, en la tabla 20 aparecen los valores del porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de las muestras en los días 12 y 10 de su desarrollo, respectivamente.

En el caso de *Penicillium digitatum*, se observan efectividades mayores a una concentración de 30 ppm, en donde se destacan muestras como Medio V. y M. con una concentración de limoneno de 76,52% y 88,41%, respectivamente. Las muestras con menor efectividad fueron Portada M. y Porvenir M. que contienen 78,78% y 74,09% de limoneno. En general se aprecia una mejor respuesta de inhibición del crecimiento micelial con cambios en la concentración para las muestras en etapa verde.

Tabla 20. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de aceites esenciales en patógenos del genero *penicillium*.

		Porcentaje de inhibición (%)					
Item	Aceites esenciales	<i>Penicillium digitatum</i>			<i>Penicillium italicum</i>		
		30 ppm	40 ppm	50 ppm	30 ppm	40 ppm	50 ppm
1	Crucero V.	81,14	96,38	97,61	27,41	42,3	63,62
2	Medio V.	97,53	98,38	100	25,65	49,97	67,49
3	Portada V.	89,14	98,76	100	26,42	40,25	74,7
4	Porvenir V.	89,22	98,76	95,23	37,79	69,84	85,92
5	Fátima V.	78,28	95,14	100	25,58	43,99	64,81
6	Crucero M.	89,14	96,38	100	17,99	43,54	67,82
7	Medio M.	93,91	95,14	100	25,08	26,88	62,65
8	Portada M.	34,9	45,04	46,47	44,2	44,74	66,14
9	Porvenir M.	46,87	92,84	100	33,79	62,41	85,82
10	Fátima M.	79,43	92,76	98,76	35,43	43,54	67,82
11	Italian mandarin	84,83	96,55	100	44,19	68,39	80,87

Las muestras evaluadas presentan menor efectividad en *Penicillium italicum*, a 40 ppm no se obtienen inhibiciones de crecimiento del 70%, solamente hay efectividades importantes al nivel superior de concentración, en este caso las muestras marcadas como Porvenir V. y Porvenir M. presentan la mejor inhibición de crecimiento, situación

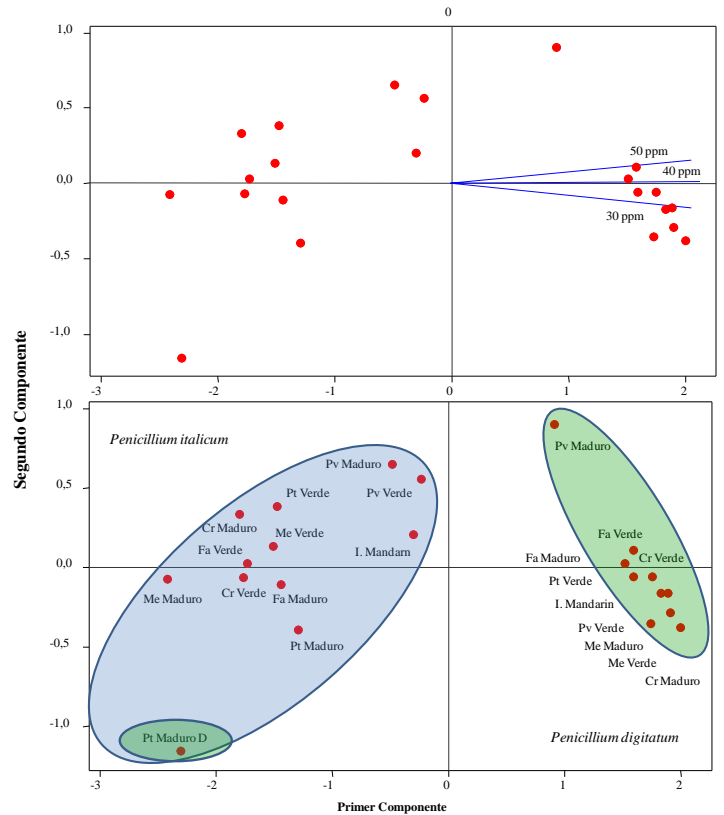
que es contraria al caso de *P. digitatum*, en donde ellas no sobresalen entre el grupo de muestras por su actividad a 30 ppm.

El análisis PCA de los datos de inhibición de las muestras presenta un panorama en el que se observa que ambos organismos presentan una susceptibilidad marcadamente diferente a la toxicidad de las muestras. En el gráfico de dispersión de la figura 29, se observa como las muestras se agrupan acumulando muy poca distancia entre ellas, caso contrario sucede con el cluster que forma las muestras evaluadas en *penicillium italicum*, en donde la marcada dispersión entre los puntos se explica por la amplia variabilidad química de los AE hidrodestilados. En el caso de *P. italicum* se ve claramente que la variabilidad química es crítica, y es relativamente resistente a la composición de algunas muestras. Caso contrario ocurre en *P. digitatum*, donde la mayoría de las muestras se agrupan a menor distancia, por lo que se aprecia que el efecto concentración y composición no son críticos para el control de su crecimiento, siendo el patógeno más sensible a estos aceites esenciales.

La efectividad de las muestras para inhibir el crecimiento micelial en ambos patógenos no está relacionada con la concentración del componente mayoritario (limoneno), como se constata con el contraste entre las muestras Medio (V. y M.) y Porvenir (V. y M.) que reportan una desigual efectividad respecto al efecto del cambio de concentración y al organismo patógeno, pero tienen en común que poseen una inferior proporción de limoneno respecto a un estándar de aceite de mandarina (95,7%), que es menos efectivo en las condiciones del estudio. Dado esto, se puede explicar que la efectividad de las muestras tiene más relación con la composición cualitativa de la fracción volátil menor del AE y la distribución cuantitativa de sus componentes, esto se observa cuando al incrementarse la concentración (en 10 ppm) se obtienen cambios marcados en la efectividad, el significado de estos cambios corre por cuenta de la relación de los componentes minoritarios (77 identificados) y en especial de los más diluidos, incluso en orden de trazas ($\leq 0,001\%$), los cuales deben ser los más potentes.

Solamente una muestra marcada como Portada M. presenta la composición menos efectiva para controlar a ambos patógeno.

Figura 29. Dispersión de muestras de AE según componentes principales (concentración) en cepas de patógenos del genero *penicillium*.



Cr: cruceiro; Me: medio; Pt: portada; Pv: porvenir; F: fátima.

5.3.2 Actividad fungistática de componentes volátiles

Se evaluaron 22 componentes volátiles representativos de AE de cítricos y también presentes en otras especies vegetales. La tabla 21 presenta el valor de sus porcentajes de inhibición micelial. Como control antifúngico se aplicó Tiabendazol a una concentración de 100 ppm (dosis recomendada para su uso en poscosecha), obteniendo porcentajes de inhibición de 25 y 40% de inhibición de crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum*, respectivamente.

Comparativamente, el limoneno ocupa los lugares menores de efectividad a 30 ppm entre los compuestos evaluados, aspecto que tiene relación con los hallazgos de bioactividad en los aceites esenciales de mandarina clementina. En este sentido, el componente mayoritario no explica la potencia del AE, lo cual, en términos de defensa

de AE de mandarina evaluadas y sus porcentajes relativos se pueden ver en la tabla 19, solamente el compuesto 3 reporta cantidades traza. En forma comparativa, la muestra de Italian mandarin, no es más efectiva que muchos de los componentes individuales, pero muestra también como pese a tener una riqueza del 95.7% de limoneno su efectividad se ve incrementada por la fracción menor de volátiles.

Pocos estudios han enfatizado en los mecanismos bioquímicos de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de cítricos [228], [229], [230]. Los aceites esenciales de cítricos son una mezcla compleja de compuestos volátiles que muestran, entre otras propiedades, actividad antifúngica mediante la reducción o la inhibición de la proliferación de hongos por completo de una manera dosis-respuesta. Esta actividad se puede producir por un solo componente principal o por el efecto sinérgico o antagónico de varios compuestos [231]. Algunos autores han atribuido la capacidad antifúngica a la presencia de componentes como D-limoneno, linalool o citral [232], [233], [234], [235], [236], [237], resultados que no son afines con los expuestos en este documento.

Otros autores atribuyen esta capacidad a los compuestos fenólicos: la anfipaticidad de estos compuestos puede explicarse por sus interacciones con biomembranas y por lo tanto la actividad antimicrobiana [238]. De hecho, la parte hidrofílica de la molécula interactúa con la parte polar de la membrana, mientras que el anillo de benceno hidrofóbico y las cadenas laterales alifáticas pueden internarse en la parte hidrófoba, al interior de la membrana bacteriana [239]. Además, la participación del grupo hidroxilo en la formación de enlaces de hidrógeno y la acidez de estos compuestos fenólicos pueden aportar otras explicaciones posibles para la actividad.

Se han propuesto mecanismos de acción posibles por los cuales se puede reducir o inhibir totalmente el crecimiento del micelio. Se acepta comúnmente que la toxicidad de los componentes volátiles se encuentra a nivel de la funcionalidad y la estructura de la membrana celular y eventualmente mitocondrial [240], [241]. Uribe [242], relaciona las bajas concentraciones de AE con cambios en la estructura celular, lo que inhibe la respiración y altera la permeabilidad de la membrana celular microbiana, mientras que con altas concentraciones, producen daños graves a la membrana y hay pérdida de la homeostasis, lo que lleva a la muerte celular.

Otros autores mencionan que la actividad antimicrobiana se produce por la interacción provocada por AE en los sistemas enzimáticos relacionados con la producción de energía y la síntesis de los componentes estructurales de las células microbianas [243]. Los componentes de los aceites esenciales atraviesan la membrana celular, hacen interacción con las enzimas y las proteínas de la membrana, produciendo así un flujo de protones hacia el exterior de la célula, que induce cambios en las células y, en última instancia, su muerte [244], lo cual está en concordancia con el trabajo publicado por Daferera [245], en el que explican como la actividad antifúngica de AE puede deberse a la formación de enlaces de hidrogeno entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos con los sitios activos de algunas enzimas blanco.

Se informa además que la actividad antimicrobiana está relacionada con la habilidad de los terpenos que no sólo afectan a la permeabilidad, sino también a otras funciones de las membranas celulares, estos compuestos pueden atravesar las membranas celulares, por lo que penetran en el interior de la célula e interactúan con sitios críticos de importancia intracelular [239]. También se ha publicado que la toxicidad se puede explicar porque algunos componentes monoterpénicos podrían incrementar la concentración de peróxidos lipídicos tales como hidroxil, alkoxil y alkoperoxil radicales, por lo que se podría dar muerte celular, lo que se describe como un mecanismo pro-oxidante.

5.3.3 Análisis del perfil de ácidos grasos de aceites comerciales empleados en formulación.

Se realizó la identificación de las cadenas de ácidos grasos principales en dos aceites vegetales comestibles, como se observa en la tabla 22, el reporte de la composición se asemeja a lo establecido para formulaciones de aceites comestibles, la relación de ácidos grasos saturado/insaturado indicó diferencias significativas en la química de las cadenas hidrocarbonadas, en cuanto a la presencia de dobles enlaces que aportan que aportan fluidez y menor punto de fusión en la mayoría de estas sustancias. En relación al peso molecular se observa que los componentes C16 ($C_{16}H_{32}O_2$:256 daltons) y C18 ($C_{18}H_{36}O_2$: 284 daltons) representan los grupos de ácidos grasos principales.

Tabla 22. Aceites vegetales empleados en el diseño de la formulación, AO y AP comercial.

Porcentaje en peso de ácidos grasos \pm SD, n:3					
Item	Designación	IK	Base m/z	AO	AP
1	C4:0	728	74	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
2	C12:0	1524	74	0,00 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
3	C14:0	1724	74	0,01 \pm 0,00	0,37 \pm 0,00
4	C16:1 isómero	1898.8	55	0,09 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
5	C16:1n7	1903	55	0,78 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
6	C16:0	1922	74	10,71 \pm 0,00	22,40 \pm 0,01
7	C17:1	2003	55	0,07 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
8	C17:0	2022	74	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
9	C18:2n6t	2092	67	7,56 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
10	C18:1n9c	2098	55	58,93 \pm 0,01	36,56 \pm 0,02
11	C18:3n3	2099	79	0,02 \pm 0,00	0,67 \pm 0,02
12	C18:2n6c	2101	67	19,97 \pm 0,00	37,28 \pm 0,00
13	C18:0	2122	74	1,73 \pm 0,00	2,52 \pm 0,00
14	C20:1	2299.6	55	0,05 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
15	C20:0	2330	74	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
	Σ Saturados			12,53	25,44
	Σ Monoinsaturados			59,92	36,62
	Σ Poliinsaturados			27,55	37,94
	<i>Relación Insat/Sat</i>			6,98	2,93

Con frecuencia se utiliza el ácido linoleico en estudios de formulación de recubrimientos, siendo necesario la incorporación de agentes antioxidantes como el BHT o BHA por ejemplo, para protegerlos de la oxidación, aspecto que es crítico cuando se trata de formulaciones que contienen más de 60% en agua y abundantes iones. Por ello, para las grasas incorporadas es un reto de estabilidad en periodos de almacenamiento comercial. En esta investigación se optó por la utilización de una fuente de ácidos grasos de origen vegetal como AO y AP dado que fueron productos comerciales, estabilizados y protegidos, no siendo necesaria la adición de antioxidantes sintéticos que pueden aportar toxicidad.

5.3.4 Evaluación de la compatibilidad de componentes

Mediante el diseño experimental propuesto en el anexo 4, se seleccionaron algunos corridos experimentales teniendo en cuenta las características macroscópicas evaluadas, entre este grupo se destacaron los corridos C8, C26 y C9, C31, estas formulas presentan una adecuada formación de película (más transparentes y con brillo), fluyen libremente en el envase cónico que las preserva y se desplazan sobre una superficie de vidrio cuando se ponen en un plano inclinado de 30°, además, presentan una adecuada adherencia al vidrio cuando están secas, mediante un examen con estéreo microscopio de los materiales secos, la película que forman no presentaron incorporación de vesículas de aire y no formaron aglomerados sólidos significativos, las formulas destacadas presentaron en húmedo y en seco algunos puntos sólidos dispersos, posiblemente debidos a la cera de abejas. Otras formulaciones presentan defectos que se derivan de incompatibilidades a las cantidades de componentes utilizados y por este motivo se descartaron. Como ilustración, el anexo 5 presenta el aspecto macroscópico de algunas formulaciones destacadas por sus buenas propiedades. Adicionalmente, aparece el aspecto de la aplicación de la formula seleccionada sobre frutos de naranja Valencia.

5.3.5 Evaluación de la retención de volátiles en película formada

Las formulaciones que contienen aceite esencial, según el diseño experimental (16 de ellas), se evaluaron en cuanto a su capacidad para retener la mezcla de componentes volátiles de referencia a 24 horas de exposición al ambiente, posterior a la preparación de las muestras, se procedió a rastrear cada compuesto en modo scan para identificar su presencia en las formulaciones, pudiendo obtenerse sus índices de retención relativa, algunos compuestos presentaron relaciones señal ruido muy bajas (S/N: 10,7) y otras no se detectaron en las diferentes formulaciones, por lo que se procedió a cuantificar cada sustancia en modo SIM. Las condiciones cromatográficas, los parámetros de adquisición SIM y las características del método de cuantificación aparecen descritas en el anexo 4.

La tabla 1, anexo 6 presenta los valores cuantitativos de los compuestos volátiles retenidos por la película de recubrimiento en condiciones experimentales. Las formulaciones realizadas no tienen la capacidad para retener el total de los nueve compuestos incorporados en las formulaciones, solamente el par de replicas conformado por los corridos C9/C31 presentaron la propiedad de retener siete de los compuestos, todas las formulas presentan pérdidas apreciables de los volátiles, conteniendo solamente unos pocos microgramos/100 gramos de película seca. El nivel bajo de cuantificación de fue de 0,5 ppm para los análisis, por debajo de este no se registro la presencia de n-octanal y beta-linalool, que significa que son compuestos sensibles a la pérdida, se evaporan rápidamente lo cual constituyó un aspecto de reto para la optimización de retención de volátiles del recubrimiento. Se observó que los corridos experimentales C9 y C31 coinciden cuantitativamente bien en los 7 compuestos evaluados, aspecto que la define como la formulación de mejor retención de volátiles. Esta fórmula corresponde a un contenido de 4% de pectina, 1,8% de sorbitol, 0,8% de cera de abejas y 1% de aceite esencial, presentó el mejor desempeño de incorporación de los materiales, mostrando mejor apariencia y la formación de una película transparente, se seleccionó esta formulación para la realización de las pruebas posteriores de optimización.

5.3.6 Mejoramiento de la capacidad de retención de volátiles

Se mejoraron las propiedades de la formulación constituida por 4% de pectina, 1,8% de sorbitol, 0,8% de cera de abejas y 1% de aceite esencial (formulación 1), como se observa en el anexo 7 se introducen dos materiales adicionales, la goma tragacanto por sus propiedades emulgentes y estabilizantes permitió la incorporación de un aceite vegetal, en este caso los aceites vegetales descritos como AO y AP poseen una composición química que los diferencia en forma apreciable, permitiendo evaluar el efecto de la relación Sat/Insat sobre la retención de compuestos volátiles y sobre la apariencia macroscópica de los corridos experimentales, realizados mediante el plan experimental que se observa en la tabla 1, anexo 7.

Las formulaciones resultantes presentaron en general una mejor apariencia macroscópica, se aprecian mucho más blancas y sin partículas visibles, lo que las hace aceptables por su buen aspecto, todos los corridos experimentales presentaron una disminución considerable en su fluidez, que es comprensible por la incorporación de la goma tragacanto, lo más destacable en el experimento, es la observación en que las formulas que contienen AP presentan un aspecto de semisólido al enfriarse, los corridos que contienen AO presentan mejor fluidez a temperatura ambiente, lo cual es necesario para garantizar la aplicabilidad en una línea industrial de recubrimientos de poscosecha. La evaluación de la capacidad de retención de volátiles se realizó a un tiempo de 7 días de exposición al ambiente, se puede apreciar en la tabla 23.

En este ensayo se utilizó un AE de mandarina clementina hidrodestilado previamente, el cual reportó una composición en la que se identificaron 80 componentes (el % de identificación de sustancias fue del 99,94) y un porcentaje relativo de limoneno de 92,52. En los corridos experimentales se observan grupos de compuestos cuya presencia tiene significancia destacada, tal es el caso de los aldehídos ($n-C_8$, $n-C_9$, $n-C_{10}$, $n-C_{12}$) que sugieren que estas formulaciones ofrecen estabilidad ante procesos Redox para compuestos muy reactivos como son los aldehídos, los cuales podrían degradarse fácilmente a alcoholes o ácidos, también se observa la presencia de compuestos fenólicos (carvacrol y timol) que aseguran la presencia de un par de componentes con potente actividad antifúngica en la película. El porcentaje de limoneno se asemeja al del AE empleado, sin embargo se observó que la fracción volátil menor se encuentra porcentualmente aumentada para cada uno de 28 componentes restantes en la mayoría de los corridos, este cambio es más acentuado para los monoterpenos oxigenados y en especial para los fenoles, situación que puede explicarse por que este tipo de sustancias presenta mayor afinidad polar por la matriz hidrocoloidal formada, en forma contraria a los componentes hidrocarbonados de baja polaridad que constituyen a estos aceites esenciales.

Se destaca también la retención de alfa y beta-sinensal, los cuales por ser de naturaleza sesquiterpénica, pertenecen al grupo de sustancias de mayor peso molecular, además son oxigenados, lo que explica su presencia en la película seca después de 7 días de exposición al ambiente.

La capacidad de retención de volátiles de todos los corridos fue muy superior a la que presento la formulación 1, nuevas formulas presentan contenido de los compuestos que se consideraron como sensibles en la fórmula 1 (n-octanal y beta-linalool), es destacable que en este experimento la intensidad de las señales cromatográficas/MS para los compuestos reportados presentaron buena intensidad en modo SCAN, lo que asegura que la fracción de componentes volátiles retenidos están presentes en una cantidad superior en la película formada.

El par de corridos experimentales C3 y C5 presentaron el mejor perfil de retención de volátiles, en ellos, se observa una mayor cantidad de componentes fenólicos y una composición representativa de todos los volátiles que componen la matriz del experimento, adicionalmente, estas formulas pertenecen al grupo de corridos que presentan mejor fluidez y mejor calificación por su aspecto macroscópico.

Los resultados obtenidos permiten seleccionar la formulación conformada por pectina 4%, sorbitol, 1,8%, cera de abejas 0,8%, aceite esencial 1%, goma tragacanto 1%, aceite vegetal (AO) 1% (formulación 2) para la optimización del material de recubrimiento en cuanto a la mejora de la fluidez sin desmejorar la retención de volátiles. Las demás formulaciones se descartaron. En la tabla 2, anexo 7, se describe un plan experimental mediante el cual se evaluaron diferentes proporciones de goma tragacanto y aceite vegetal AO, en esta oportunidad no se observó una mejora significativa de la fluidez del material, tampoco aparecieron defectos debidos a los cambios propuestos, por ello se conserva el concepto de la formulación anterior que ahora pasará a denominarse formulación 3 (Pectina 4%, sorbitol, 1,8%, cera de abejas 0,8%, aceite esencial 1%, goma tragacanto 1%, aceite vegetal (AO) 1%).

Tabla 23. Componentes volátiles retenidos en ensayo de incorporación de aceites vegetales (AO y AP)

Compuesto ²	Porcentaje relativo de aéreas normalizadas ¹																
	AE ³	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16
α -Tujeno	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1R- α -Pino	0,56	0,3	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4	0,2	0,4	0,6	0,5	0,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Camfeno	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sabineno	1,22	1,2	1,3	1,7	1,3	1,4	1,3	1,1	1,4	1,3	1,5	0,9	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
β -Pino	1,98	2,2	2,3	3,0	1,1	2,4	2,4	2,2	2,3	2,3	2,4	1,4	2,6	2,4	2,4	2,5	2,4
Octanal	0,04	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
α -felandreno	0,56	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
delta-2-careno	0,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
α -Terpino	0,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
p-Cimeno	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Limoneno	92	95	94	92	95	93	94	95	94	94	94	97	94	93	94	93	94
β -Ocimeno	0,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
γ -Terpino	0,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
n-Octanol	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Terpinoleno	0,05	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Linalool	1,99	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2
Nonanal	0,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Citronelal	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4-Terpineol	0,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
α -Terpineol	0,11	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0

Decanal	0,27	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1
Timol	0,02	0,1	0,2	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Carvacrol	0,03	0,1	0,1	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0
Dodecanal	0,01	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10-epi-gama-eudesmol	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
γ -eudesmol	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
α -cadinol	0,03	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
β -sinensal	0,02	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
α -sinensal	0,05	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

¹ Áreas normalizadas de componentes volátiles mediante estandarización interna (factor de repuesta n-C₁₁) y peso de la muestra.

² Compuestos identificados espectralmente, sus índices de retención fueron concordantes a los anteriormente calculados.

³ Valores porcentuales de los componentes del AE utilizado en los ensayos de formulación.

5.3.7 Selección de pectinas

Como un aspecto importante para la obtención del un prototipo de recubrimiento comestible, útil para ser evaluado *in vivo* en condiciones de comercialización, se consideró la evaluación de pectinas de diferente origen y características químicas, el plan experimental del anexo 8 presenta las características del ensayo y la fijación fotográfica de las características más relevantes de los corridos experimentales efectuados con base en la formulación 3.

Se ensayaron 6 tipos de pectinas y se obtuvieron en cada caso replicas idénticas en cuanto a su apariencia y capacidad de formación de película, la pectina 1 (Extraída mediante metodología a pH 1) produjo recubrimientos líquidos, con presencia de abundantes partículas solidas de color pardo, posiblemente debidas a material vegetal de partida, como se observa en detalle en la figura 2 del anexo 8, al ser aplicada en frutos forma una película quebradiza que se desprende al aplicar fuerza en el fruto, esta pectina se descarta por no permitir la formación de película y por desmejorar la apariencia del fruto.

Las pectinas 2 y 3, presentaron resultados similares al formar película, la apariencia de los corridos experimentales en placa de vidrio (húmedo y seco) solo admiten diferencia en cuanto a la aparición de algunas partículas solidas que contiene la pectina 2 (Extraída mediante metodología a pH 4), la fluidez de ambos materiales es similar y al aplicarse sobre frutos se obtienen películas con buena adherencia y flexibilidad que resisten la aplicación de fuerza sobre el fruto. El tamaño de las partículas de la pectina 2 no sobresalen en la piel del fruto siendo un material de rendimiento aceptable y de similar desempeño con la pectina comercial 3. Las formulaciones que contienen pectina 3 se destacan por presentar mayor brillo.

Las formulación que contienen la pectina 4 producen una película en la que se aprecia abundante incorporación de aire (película seca sobre placa de vidrio), siendo este un defecto mayor que sugiere su descarte por perdida de la estabilidad de la emulsión. La película que se forma sobre los frutos, presenta un aspecto homogéneo, opaco y resiste la aplicación de fuerza mecánica.

Como se observa en las figuras respectivas, las formulaciones que contienen las pectinas 5 y 6 presentan defectos mayores que permitieron el descartarse de su uso en la formulación 3. Se observa como la pectina 5 produce una película que se quiebra espontáneamente durante el secado sobre superficie de vidrio, la formación de quiebres y la aparición de partículas que dan apariencia de moteado caracterizaron estas formulaciones, frutos recubiertos con esta fórmula presentaron desprendimiento de la película sobre la piel, como se observa en la figura 3 del anexo 8. Finalmente, las formulas que poseen pectina 6, forman una masa semisólida que no fluye, por lo que no forman película, por el contrario, al secarse sobre vidrio se forma una masa seca con 4 milímetros de espesor en su tope. Al impregnar frutos se observa como el material seco forma aglomerados sobre la piel del fruto, estos aglomerados se distribuyeron a través de todo el fruto sin formar película.

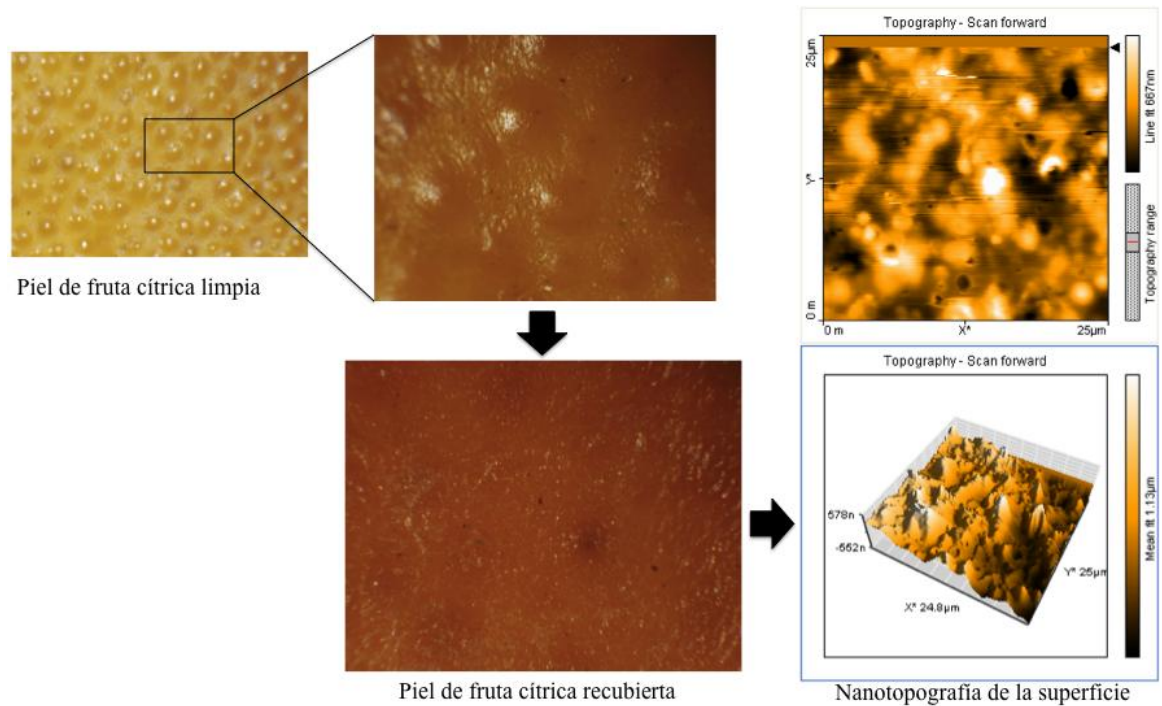
Dados los resultados del experimento, se seleccionó la pectina 3 para la constitución de la formulación a utilizarse en un ensayo de recubrimiento *in vivo*.

5.3.8 Características de la formulación final

La formulación 3 se seleccionó por la calidad de sus propiedades macroscópicas y por su capacidad para retener compuestos volátiles y está constituida por la pectina 3. En adelante esta formulación se nombrará como formulación de recubrimiento comestible final (FRCF).

Como se observa en la figura 30, se obtuvo un recubrimiento comestible con buena capacidad de formación de película, el material se impregnó adecuadamente sobre la piel de los frutos, presento buena adherencia y resistencia a la aplicación de fuerza mecánica, las propiedades cosméticas del recubrimiento son adecuadas y sobresalientes. Al tacto, no se percibieron sensaciones adherentes, lo que lo diferencia bastante de muchas formulaciones comerciales. Visualmente los frutos se apreciaron en forma natural. El análisis de la película mediante microscopía AFM permitió calcular la longitud seccional de la película según la topografía resultante en estado sólido, la cual presento una media de 26 nanómetros, la rugosidad y cobertura formada sugiere una adecuada compatibilidad con las características de la piel de los frutos.

Figura 30. Imágenes estéreo microscópicas y nanotopografía de la superficie de la formulación FRCF.



Un grupo de 15 frutos recubiertos se sometió a almacenamiento en condiciones de refrigeración a $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$, para evaluar el desempeño del recubrimiento en frío. La inspección de aparición de defectos en la película se realizó cada dos días mediante un estéreo microscopio, durante 7 días, no se observó la aparición de defectos en el material y tampoco cambios en las características de la piel de los frutos relacionados con daños por frío.

Finalmente, Se estableció el signo de la emulsión mediante el uso de los métodos de dilución y de tinción con azul de metileno con observación microscópica, revelando una fase interna conformada por los componentes oleosos (O/A), la viscosidad promedio de tres preparaciones fue de $90 \pm 1,80$ cps, medido en un viscosímetro digital Brookfield (LVF; Brookfield Engineering Laboratorios, Inc Middleboro, Massachussets, EE.UU). La concentración de sólidos se estableció en un valor de 8,6 % y el pH se ajustó a un valor de 8,6 con la adición de una amina volátil, con lo que se obtuvo un olor frutal cítrico levemente amoniacal. El color de la formulación fue blanco intenso.

5.3.9 Actividad antifúngica in vivo de recubrimientos

Se evaluó la capacidad antifúngica de la formulación FRCF junto a dos formulaciones comerciales tipo cera como controles de efectividad.

Aunque la actividad fungistática de los AE de cítricos *in vitro* está ampliamente demostrada, en condiciones de campo o de comercialización no es fácil obtener el mismo control sobre organismos patógenos en los frutos. Por esto, su aplicación debe ser controlada, ya que estas sustancias aplicadas directamente pueden ser fitotóxicas. Además, su efecto *in vivo*, puede depender de una cantidad de factores externos como el índice de madurez, la temperatura, humedad relativa y las condiciones ambientales de origen de los frutos entre otras.

Como se observa en la Figura 31, el recubrimiento FRCF con respecto a las ceras comerciales, fue significativamente más efectivo para el control de Pd y Pi durante una semana a 23°C y una dosis de 1.5% de AE. Esta fórmula alcanzó un control de pudrición del 83% bajo las condiciones de ensayo. Con dos semanas de almacenamiento se redujo significativamente el control de los patógenos (39.3%), aunque siguió siendo superior a los demás tratamientos, los cuales perdieron su efectividad. En segundo lugar de efectividad se ubicó la cera comercial CWI 18 con control de patógenos de 62.1 y 29.6% a una y dos semanas de comercialización directa, respectivamente. Se observó una relación directa entre la efectividad para el control de los patógenos y la concentración de AE en las tres formulaciones de FRCF, lo cual demostró la retención de los volátiles durante las dos semanas de la simulación experimental.

En frío, el recubrimiento comestible pierde efectividad y fue la menor concentración de aceite la que se mostró más efectiva, ver figuras 32 y 33, aunque en el posterior período a 23°C ningún recubrimiento mostró efectividad sobre los patógenos; esto se interpretó como el efecto inhibitorio de las condiciones de frío sobre el hongo, en conjunto con el recubrimiento. En frío, la cera comercial PZT, mostró mejor control que los demás recubrimientos. En general, los fungicidas son más efectivos cuando son aplicados en agua, que en ceras [246], lo que puede explicar la baja efectividad en el control de los patógenos encontrada con las ceras comerciales evaluadas.

Figura 31. Porcentaje de frutos podridos por *Penicillium digitatum* y *P. Italicum* en simulación de comercialización directa con la formula FRCF.

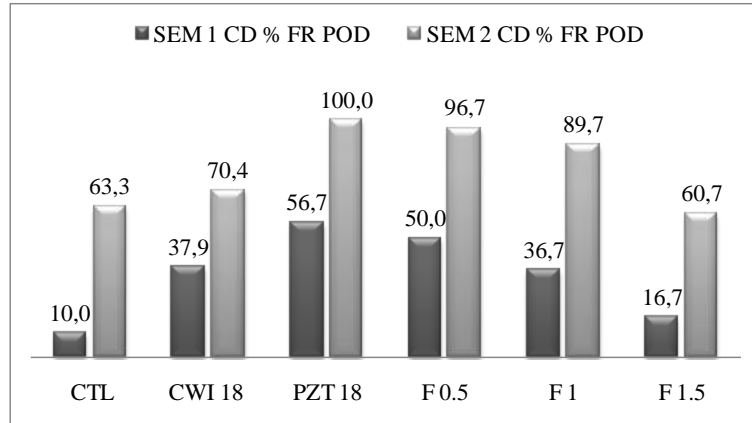


Figura 32. Porcentaje de frutos podridos por *Penicillium digitatum* y *P. Italicum* en simulación de exportación y posterior comercialización con la formulación FRCF.

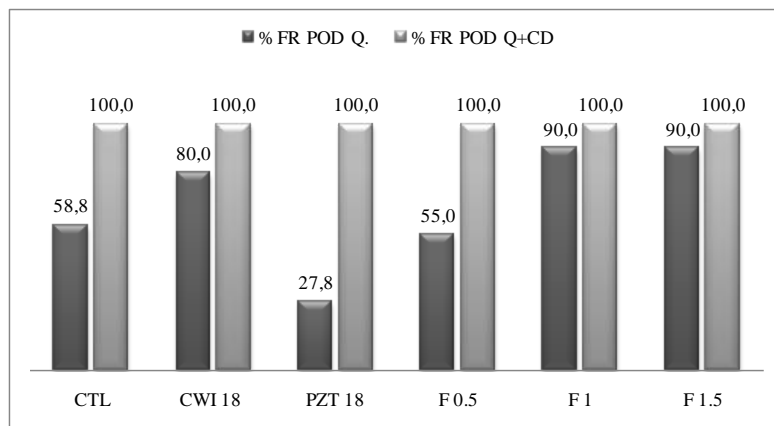
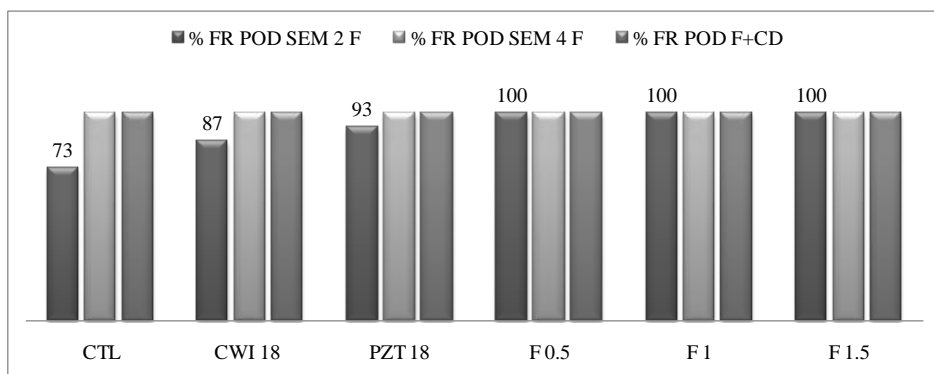


Figura 33. Porcentaje de frutos podridos por *Penicillium digitatum* y *P. Italicum* en simulación de frigoconservación y posterior comercialización directa con la formulación FRCF.



5.4 Referencias Bibliográficas

189. Kaplan, H.J. 1986. Washing, Waxing and Color Adding. En Fresh Citrus Fruits. W.F. Wardowski, S. Nagy y W. Grierson, eds., Westport, CT: AVI Publishing Co. p. 379.
190. Greener, D.I. y Fennema, O. 1989. Evaluation of Edible Bilayer Films for Use as Moisture Barriers for Food. *J. Food Sci.* 54. p. 1400-1406.
191. Nussinovitch, A. y S. Lurie. 1995. Edible Coatings for Fruits and Vegetables. *Postharvest News and Information* 6. p. 53N-57N.
192. Kester, J.J. y Fennema, O.R. 1986. Edible Films and Coatings. A Review. *Food Technol.* 40. p. 47-59.
193. Eric, D., 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids* 23:6. p. 1473-1482.
194. Dickinson, E., 2006a. Colloid science of mixed ingredients. *Soft Matter*. 2. p. 642-652.
195. Krochta, J.M. y De Mulder-Johnston C. 1997. Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technol.* 51(2): 61-74.
196. Gennadios, A. y Weller, C.L., 1990. Edible Films and Coatings from Wheat and Corn Proteins. *Food Technol.* 44. p. 63-67.
197. Ganz, A. J., 1977. Cellulose hydrocolloids, *Food Colloids* (H. P. Graham, ed.), AVI Pub. Co., Westport, CT. p. 383.
198. Kester, J. J., Fennema, O. R., 1986. Edible films and coatings: a review, *Food Technol.* 40. p. 47.
199. Schultz, T. H., Miers, J. C., Owens, H. S., Maclay, W. D., 1949. Permeability of pectinase films to water vapor, 1. *Phys. Colloid. Chem.* 53. p. 1320.
200. Schultz, T. H., Owens, H. S., Maclay, W. D., 1948. Pectinase films, *J. Colloid. Sci.* 53.p. 53.
201. Miers, J. C., Swenson, H. A., Schultz, T. H., Owens, H. S., 1953. Pectinase and pectate coatings. I. General requirements and procedures, *Food Technol.* 7. p. 229.
202. U.S. FDA, 1966. Code of Federal Regulations 21: Parts 1-99.
203. Baldwin, E.A. 2007. Surface treatments and edible coatings in food preservation. In: Rahman, M.S., editor. *Handbook of Food Preservation*. 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 477-507.
204. Mohammadifar, M. A., Musavi, S. M. 2006. Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*). *International Journal of Biological Macromolecules* 38: 1. p. 31-39.
205. Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible Coatings and Films Based on Polysaccharides. En: *Edible coatings and Films to Improve Food Quality*. J.M. Krochta, E.A. Baldwin y M. Nisperos-Carriedo (Eds.) Technomic, Lancaster, Pensilvania, EUA. p. 305-336.
206. Hernandez, E., 1994. Edible coatings from lipids and resins, *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality* (J. M. Krochta, E. A. Baldwin, and M. O. Nisperos-Carriedo, eds.), Technomic Publishing Company, Lancaster, PA, p. 279.
207. Donhowe, G., Fennema, O., 1994. Edible films and coatings: characteristics, fonnation, definitions and testing methods, *Edible Coatings and Films to Improve*

- Food Quality (J. M. Krochta, E. A. Baldwin, and M. O. Nisperos-Carriedo, eds.), Technomic Publishing Company, Lancaster, PA, p. I.
208. Kester, J. J., Fennema, O., 1989. Tempering influence on oxygen and water vapor transmission through a stearyl alcohol film, *JAOCs* 66. I. p. 154.
209. Kamper, S. L., Fennema, O., 1984. Water vapor permeability of edible bilayer films, *J. Food Sci.* 49. p. 1478.
210. Kamper, S. L., Fennema, O., 1984. Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer film, *J. Food Sci.* 49. p. 1482.
211. Fennema, J. J., Kester, O. 1989. Resistance of lipid films to oxygen transmission, *JAOCs* 66. p. 1130.
212. Kester, J. J., Fennema, O., 1989. Resistance of lipid films to water vapor transmission, *JAOCs* 8. p. 1139.
213. Hallman, G. H., Nisperos-Carriedo, M. O., Baldwin, E. A. Campbell, C. A., 1994. Mortality of Caribbean fruit fly imrnatures in coated fruits, *J. Econ. Entomol.* 87. p. 752.
214. Baldwin, E. A., 1994. Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present, and future, *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality* (I. M. Krochta, E. A. Baldwin, and M. O. NisperosCarriedo, eds.), Technomic Publishing Company, Lancaster, PA. p. 25.
215. Kester, J. J., Fennema, O. R., 1986. Edible films and coatings: a review, *Food Technol.* 40. p. 47.
216. Bennett, H., 1975. *Industrial Waxes*, Vol. I, Chemical Pub. Co., New York.
217. P. Zapico, M. Medina, P. Gaya and M. Nunez, Synergistic affect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *International Journal of Food Microbiology.* 40 (1998), pp. 35–42.
218. Mecitoğlu, M., Yemenicioğlu, Ä., 2007. Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. *Food Chemistry* 10:2. p. 726-733.
219. Min, S., Krochta, J.M., 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrosylate, and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science.* 70 . p. 87–94.
220. Appendini, P., Hotchkiss, J.H., 1997. Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packaging Technology and Science.* 10.p. 271–279.
221. Han, J.H., 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technology.* 54: 3. p. 56–65.
222. Appendini, P., Hotchkiss, J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 3. p. 113–126.
223. Tharanathan, R.N., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science Technology.* p. 14.
224. O. Mengual, G. Meunier, I. Cayre, K. Puech, P. Snabre, 1999. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152. p. 111–123.
225. Troy, David A., Remington, Joseph P., Beringer, Paul., 2006. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 21 ed. Philadelphia. p. 325–336, 886–87.

226. Debeaufort, F. y Voilley, A. 1995. Effect of Surfactants and Drying Rate on Barrier Properties of Emulsified Edible Films. *International J. Food Sci. Technol.* 30:183-190.
227. Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J.A. Pérez-Alvarez. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* 73: R117-R124.
228. Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A., Ruberto, G., 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology.* 43:1/2, p. 73–79.
229. Sharma, N., & Tripathi, A., 2006a. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogen. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 22. p. 587–593.
230. Shukla, A. C., Shahi, S. K., & Dixit, A., 2000. Epicarp of *Citrus sinensis*: A potential source of natural pesticides. *Indian Phytopathology.* 53. p. 468–471.
231. Deba, F, Xuan TD, Yasuda, M, Tawata, S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control* 19. p. 346-352.
232. Alma, M. H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Digrak, M., Efe, F. T., & Yilmaz, N. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3911–3914.
233. Bezic, N., Skocibusic, M., & Dunkic, V., 2005. Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica.* 64:2. p. 313–322.
234. Rasooli, I., Moosavi, M. L., Rezaee, M. B., & Jaimand, K., 2002. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *Journal of Agricultural Science and Technology.* 4:3/4. p. 127–133.
235. Rodov, V., Ben-Yoshua, S., Fang, D. Q., Kim, J. J., & Ashkenazi, R., 1995. Preformed antifungal compounds of lemon fruit: Citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 43. p. 1057–1061.
236. Sonboli, A., Babakhani, B., & Mehrabian, A. R., 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosciences.* 61:3/4. p. 160–164.
237. Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., et al., 2006. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry.* 97: 4. p. 719–724.
238. Veldhuizen, E. J., Tjeerdma-van Bokhoven, J. L., Zweijtzer, C., Burt, S. A., & Haagsman, H. P., 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54. p. 1874–1879.
239. Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Trombetta D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55:15. p. 6300-6308.

240. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Wigand, H., & Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. 1. p. 119–128.
241. Sikkema, J., de Bont, J. A. M., & Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 59. p. 201–222.
242. Uribe, S., Ramirez, J., & Peña, A., 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*. 161. p. 1195–1200.
243. Conner, D. E., & Beuchat, L. R., 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*. 49. p. 429–434.
244. Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., & Nafhdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*. 18: 12. p. 1518–1523.
245. Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G., 2000. GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 48. p. 2576–2581.
246. Broun, G.E. 1983. Control of Florida citrus decay with Guazatine. En: *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 96. p. 335–337.

6. DESEMPEÑO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE EN UNA LINEA INDUSTRIAL DE CITRICOS, EVALUACIÓN DE LA CALIDAD POSCOSECHA E IMPACTO METABÓLICO

6.1 Introducción

La calidad de los cítricos se puede definir como el conjunto de propiedades inherentes a un producto que permite distinguir entre unos y otros frutos; además tienen importancia en la determinación del grado de aceptación por el consumidor e implica una combinación de características, propiedades y atributos que le darían al producto un valor como alimento y mercancía. En esta definición se superponen los conceptos de calidad nutricional, calidad higiénica, calidad organoléptica, calidad simbólica y calidad de consumo [247].

El establecimiento de regulaciones de calidad para el consumo de los frutos cítricos se vinculó al auge de este cultivo en los Estados Unidos. En 1924 se establecieron por primera vez índices de calidad interna en California y Florida. Las investigaciones realizadas por Harding [248], sentaron las bases de los índices de calidad externa e interna que se emplean en la actualidad en los frutos cítricos para el consumo en fresco y como materia prima para la transformación industrial, regulados en un documento legal por primera vez en el Código Legal de la Florida (1949). En otras regiones del mundo se adoptaron los mismos índices, enfatizando unos y otros en función del área, destino comercial de la fruta y mercado [249].

En esta investigación se aplica la determinación de diferentes índices de calidad externa e interna y la evaluación simulada en condiciones de vida útil comercial de cítricos, dada la evaluación del impacto del uso de recubrimientos comestibles.

6.2 Materiales y métodos

Se estudió el desempeño de la formulación FRCF obtenida en la sección 5, sobre la calidad y vida útil durante la etapa de comercialización de naranja Valencia, bajo

condiciones de aplicación en una línea de tratamiento industrial (lavadora, túnel de secado, aplicador de cera, túnel de secado y seleccionador de frutos, Tecnofruta Levante, S.L., Valencia-España).

6.2.1 Características y diseño del experimento de recubrimiento

Se seleccionaron frutos de naranja Valencia, provenientes de la zona de producción citrícola en Tàmesis-Ant., los cuales fueron recolectados por personal de la empresa C.I. Agrícolas Unidas S.A. en la Finca La Cristalina, con un índice de madurez (IM) comercial, sin daños o defectos, y con una adecuada apreciación macroscópica de la calidad. Los frutos de naranja valencia se sometieron al procedimiento de satinización que aplica el productor (detergente neutro en agua) y posteriormente se procedió a la aplicación de los recubrimientos utilizando aspersion: 1. formulación desarrollada (FRCF, Pectina 4%, sorbitol, 1,8%, cera de abejas 0,8%, aceite esencial 1%, goma tragacanto 1%, aceite vegetal (AO) 1%); 2. CWI y 3. PZT. La concentración de sólidos totales (ST) de las ceras se modificó dependiendo de las condiciones experimentales para algunos grupos de frutas, en comercialización directa CD, se usó una concentración de 18% y en almacenamiento en frío 10%, para evitar el desarrollo de off-flavors dado que el período de almacenamiento es más prolongado. Los frutos recubiertos se separaron por grupos en canastas plásticas (30 y 70 frutos) y se rotularon según el diseño del experimento.

Los recubrimientos se aplicaron según la siguiente codificación:

5. Cera comercial + IMZ 18% ST, 13,5 ST y 10% ST (CWI 18, CWI 13,5 y CWI 10)
6. Cera comercial + TBZ 18% ST y 10% ST (PZT 18 y PZT 10)
7. Formulación FRCF: 1% AE (F1)
8. Control absoluto: sin cera (Control de entrada, Controles por semana)

Los grupos de muestras se sometieron a diferentes condiciones de almacenamiento. Para ello se realizó una simulación de condiciones, así:

Comercialización directa (CD) a un periodo de 1 y 2 semanas con temperatura ambiente. Las cajas se dejaron en promedio a 25°C.

Frigoconservación durante 2, 4, 6 y 8 semanas en refrigeración a 7°C y posterior comercialización, durante 7 días a 25°C. (F+CD).

Exportación a EE.UU: se sometió la fruta a una temperatura de 0,8°-1,8°C, durante 18-21 días (cuarentena, Q), seguido de un período de comercialización de 7 días, a 25°C (comercialización, CD). (Q+CD).

Al final de cada período de almacenamiento se evaluó la incidencia de daños y alteraciones, en los siguientes puntos, CD: días 9 y 16; F+CD: días 16 y 30; Q+CD: días 26 y 32 del ensayo. En cada salida se midieron las lesiones presentes en los frutos y se anotaron las observaciones respectivas. En las salidas se retiraron los contenedores de las cámaras de frío, se realizaron los conteos y mediciones, se anotaron las observaciones, se tomó registro fotográfico, se eliminaron los frutos podridos y se regresaron las cajas con frutos a las cámaras hasta completar el período de almacenamiento. En los casos en los que fue necesario el control de condiciones experimentales de frigoconservación para almacenamiento en comercialización y cuarentena bajo las diferentes temperaturas, se utilizaron las cavas de la empresa C.I. Agrícolas Unidas S.A. Para esto, se dispuso de dos cavas, una a 7°C y otra a 1°C. De igual manera, cuando la fruta se sometió a temperatura ambiente, ésta, permaneció en las mismas instalaciones de la empresa, en un cuarto dispuesto para ello. El análisis estadístico de los datos, se realizó mediante software Statgraphics centurión XVI, versión 15.2, se empleó el modelo de análisis de varianza ANOVA y de diferencias mínimas entre las medias, estos se establecieron a partir del Test de LSD (Fisher's Least Significant Difference–Diferencia Mínima Significativa de Fisher), con un nivel de confianza del 95%.

6.2.3 Efecto de recubrimientos sobre la calidad y vida útil

Se evaluaron parámetros relacionados con la calidad externa, con la calidad interna y la fisiología de los frutos; para ello, se utilizaron lotes de 30 frutos por tratamiento, para

determinar la pérdida de peso y lotes de 70 frutos para determinar los demás parámetros. En total se aplicaron 2780 frutos para el desarrollo del experimento.

6.2.3.1 Evaluación de la calidad externa de los frutos

Diámetro: se midió el diámetro ecuatorial de cada fruto con un pie de rey, expresándose el resultado en milímetros.

Peso: Se midió individualmente empleando una balanza analítica y se expresaron como porcentaje de pérdida de peso respecto al peso inicial.

Firmeza: se determinó mediante un ensayo de compresión, con un texturómetro para determinar la firmeza del fruto. Se utilizó un analizador de textura (TA-XT2i. Stable Micro Systems, Vienna Court. UK) con una celda de carga de 10 Kg, aplicando una fuerza de 10 N en la zona ecuatorial del fruto, se empleó un ensayo tipo compresión-descompresión con un plato P 7100. Los resultados se expresan como porcentaje de deformación ecuatorial con respecto al diámetro inicial del fruto.

Índice de color: se utilizó un colorímetro (SP62, X-RITE Grand Rapids MI. EE.UU.), con sistema iluminante D65, observador 2 (especulante), utilizando el sistema Hunter-Lab, expresado a través del índice de color (1000a/L.b), con el fin de determinar cambios en el color de los frutos.

Rendimiento del zumo: para medir la cantidad de zumo de la fruta se pesaron 30 frutos formando tres (3) grupos de 10 frutos cada uno. Posteriormente, se cortaron los frutos en dos piezas y se extrajo el zumo de cada uno de los grupos por separado, con un extractor eléctrico. El rendimiento del zumo se expresó como porcentaje de volumen de zumo (ml) por peso de fruto (g).

6.2.3.2 Evaluación de la calidad interna de los frutos

Índice de madurez: para cada uno de los tres zumos, se determinaron: los sólidos solubles (°Brix), medidos con un refractómetro digital.

La acidez se determinó por titulación con hidróxido sódico 0,1N, de la misma forma que en el capítulo 2. Las medidas se realizaron a tres replicas. El índice de madurez, se expresó como el cociente °Brix/acidez total.

Vitamina C: se determinó en 3 alícuotas de zumo de 10 frutos cada uno. Se aplicó el método de titulación con indofenol, según método de determinación vitamina C AOAC 967.21.

6.2.3.3 Determinación de marcadores metabólicos relacionados con estrés en frutos

Se empleó la metodología descrita en el numeral 4.2.3 para el análisis mediante metabolite profiling de la fracción de compuestos orgánicos volátiles, ácidos grasos (FAMES) y el estudio químico de la fracción de sólidos solubles totales (SST-TMS).

6.2.3.4 Desórdenes fisiológicos

Se evaluaron alteraciones provocadas por la exposición del fruto al frío (pitting y SERB) visual e individualmente en 100 frutos por tratamiento. Los diferentes grados de desorden o pudrición se clasificaron de 0-3. Las alteraciones, se calificaron como ligeras (=1), cuando el área afectada fue inferior al 10%, medias (=2), cuando el área afectada abarcó entre un 10% y un 20% del fruto, y severas (=3), cuando sobrepasaron el 20% del fruto. Para frutos sanos, se asignó una puntuación de 0. Adicionalmente, se realizó un conteo de frutos afectados. La expresión de los resultados fue como porcentaje de índice de deterioro (% ID), con respecto al total de frutos afectados por tratamiento.

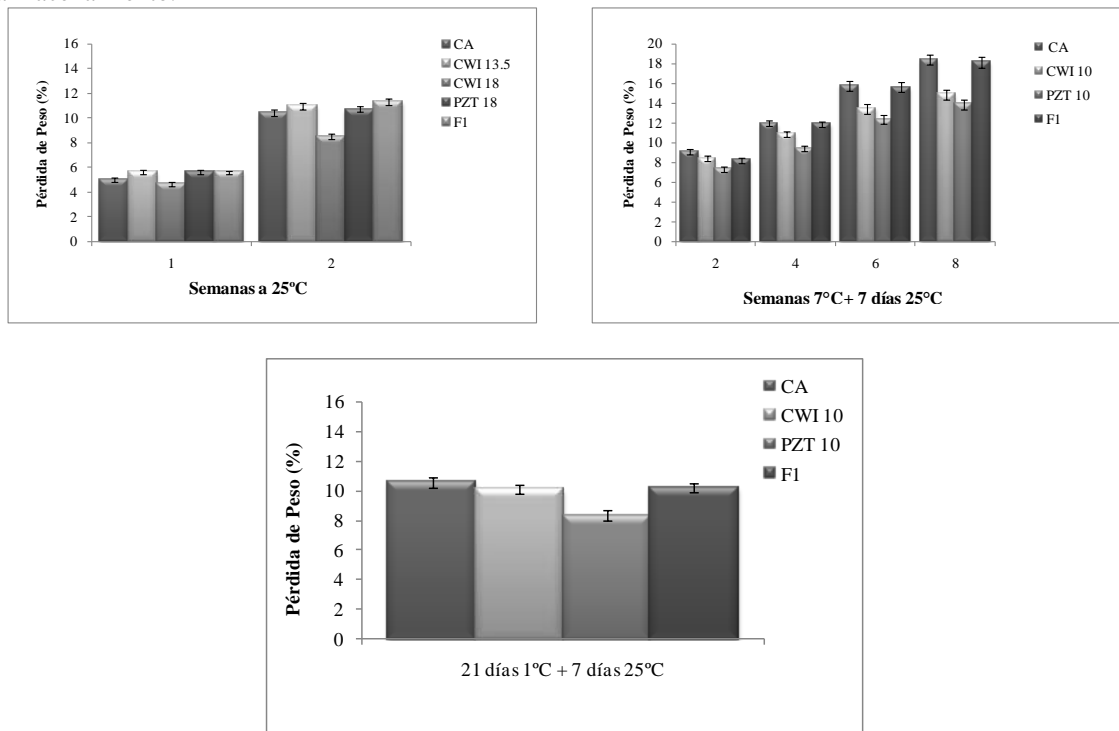
6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Evaluación de la calidad externa de los frutos

6.3.1.1 (%) Pérdida de peso

La pérdida de peso durante el almacenamiento es una consecuencia de la transpiración del fruto, proceso físico que sigue durante todo el periodo de almacenamiento. En este proceso están involucrados tres eventos importantes: (1) el movimiento del agua como líquido y vapor, desde los espacios intercelulares hasta la cutícula; (2) la disolución y difusión de las moléculas de agua en y a través de la membrana cuticular; (3) la desorción del agua, en la superficie exterior [250]. En la Figura 34, se aprecian los resultados de este parámetro para la evolución de la pérdida de peso en los frutos testigo y recubiertos.

Figura 34. Pérdida de peso (%) de frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.



En la simulación de comercialización directa, no hubo diferencias significativas entre el recubrimiento FRCF y las demás ceras comerciales; además, todos los tratamientos evaluados alcanzaron el límite comercial de aceptación de pérdidas de peso en comercialización directa (5%). Así mismo, después de 2 semanas, la pérdida de peso fue

superior al 5%, en todos los tratamientos, aunque CWI 18% se comportó significativamente mejor que los demás tratamientos. El aumento de la concentración de sólidos totales en la cera, forma una mayor barrera al intercambio de los gases, aunque se corre el riesgo de la aparición de malos sabores en el interior de los frutos, por consecuencia de la generación de atmósferas anaerobias y por consiguiente de fermentaciones.

La pérdida de agua provocó pérdidas de peso en el orden del 5% en la comercialización directa, del 7% en la frigoconservación y hasta el 16% en la simulación del proceso de conservación frigorífica y posterior comercialización [251]. Bajo las condiciones de simulación en cuarentena a EE.UU., no se observaron diferencias significativas en el control de pérdida. Comparando la fruta que sirvió de control absoluto, contra el recubrimiento comestible evaluado y las ceras comerciales, todos los tratamientos alcanzaron pérdidas muy inferiores al 16%, tope permitido en un proceso completo de conservación y comercialización. La conservación a baja temperatura es la tecnología poscosecha más utilizada y eficaz para alargar el período de vida útil de frutas y hortalizas. Por ello, mantener las frutas dentro de sus rangos óptimos de temperatura y humedad relativa es el factor más importante en el mantenimiento de su calidad. La temperatura de almacenamiento debe ser siempre superior a la del punto de congelación, para los productos no sensibles al frío y a la temperatura mínima recomendada [19]. Respecto al tratamiento cuarentenario, tratándose de un requerimiento normativo (tratamiento cuarentenario por frío) en principales países importadores (EE.UU., Europa y Japón) y dado que no se verificaron diferencias significativas entre tratamientos, el recubrimiento FRCF, presenta la ventaja de no presentar contenido o residualidad de sustancias de control toxicológico, factor limitante en la actualidad en el contexto de la seguridad alimentaria y en la aceptación de exportaciones, donde los países imponen límites máximos de residuos (LMR), cada vez más reducidos.

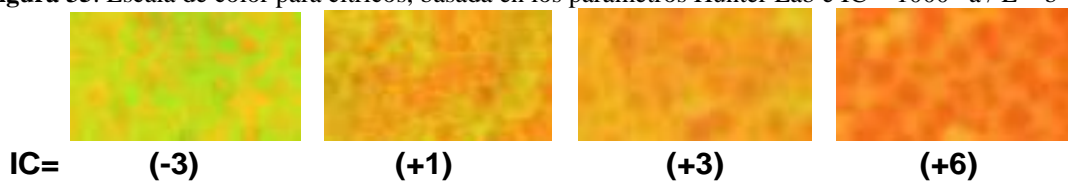
Durante las semanas 4 a 8 en condiciones de frigoconservación, los frutos recubiertos con FRCF presentaron mayor pérdida de peso, durante este tiempo se pierde efectividad en el control de pérdida de peso, las ceras comerciales de referencia tuvieron un mejor desempeño.

En el almacenamiento a 7°C más 7 días a temperatura ambiente, el FRCF ofreció un control de peso del orden del 0,9%, durante 2 semanas, mientras que la cera comercial PZT 10%, suministró un control de peso de 4,6%, durante 8 semanas y la cera CWI 10% del 3,5%. La temperatura y el tiempo de almacenamiento tienen influencia sobre la pérdida de peso de los frutos de pomelo “Rio Red”, verificando que los frutos almacenados a las temperaturas más elevadas y durante el período de tiempo más largo, presentaron las mayores pérdidas de peso [252]. Otros autores [91], observaron también, que las bajas temperaturas, reducen la transpiración. Según Hagenmaier [253], la pérdida de peso puede medir el efecto del estrés en la fisiología de los frutos.

6.3.1.2 Índice de Color

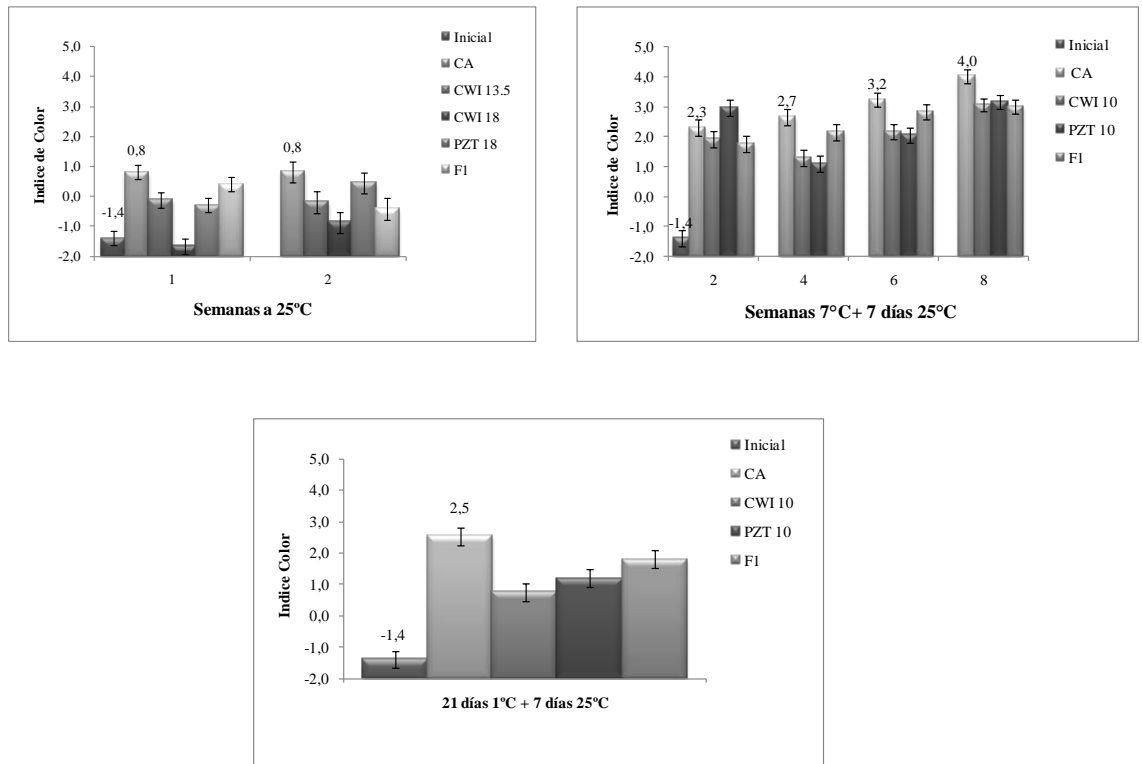
Según Navarro, 2007, la degradación de las clorofilas de la piel de los cítricos durante la maduración y la senescencia, supone una pérdida de la coloración verde y un desenmascaramiento de los carotenos que son pigmentos de color amarillo y naranja, con el consiguiente cambio de color. Conforme avanzan estos dos procesos se pierden las tonalidades amarillas, predominando las naranjas, que permanecen inalteradas durante la senescencia. El índice de color (IC) es un indicador de este viraje de color, que experimentan los cítricos y su medida aporta información útil de frutos sometidos a tratamientos de desverdización, puesto que permite evaluar la eficiencia de los mismos. Dependiendo del producto vegetal y del índice de color externo inicial, los recubrimientos se pueden aplicar para conservar el color o permitir su cambio. En este caso, los frutos se recolectaron con un índice de color externo inicial de -1,4., Ver figura 26, con presencia de tonos verdes claros con matices amarillentos, dado el interés de mejorar este aspecto con la formulación FRCF se quiso conseguir un tono orientado al naranja, lo que es positivo si se consideran los estándares de exportación, donde normalmente se exigen naranja en los frutos. Los resultados se aprecian en la figura 27.

Figura 35. Escala de color para cítricos, basada en los parámetros Hunter Lab e $IC = 1000 * a / L * b$



Tomado de: Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales 2006

Figura 36. Evolución del índice de color en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.



En todas las condiciones de almacenamiento, el color externo de los frutos evolucionó a tonos color naranja con matices amarillentos (0,8, 2,5, 4,0, en comercialización directa, cuarentena y frigoconservación, respectivamente), lo que corresponde a un aumento en el índice de color de los mismos. En general, los recubrimientos redujeron el cambio de color en todas las condiciones de almacenamiento en comparación con el control, aunque el recubrimiento FRCF, en la mayoría de las salidas registró los IC más elevados, siendo el producto más favorable para su aplicación.

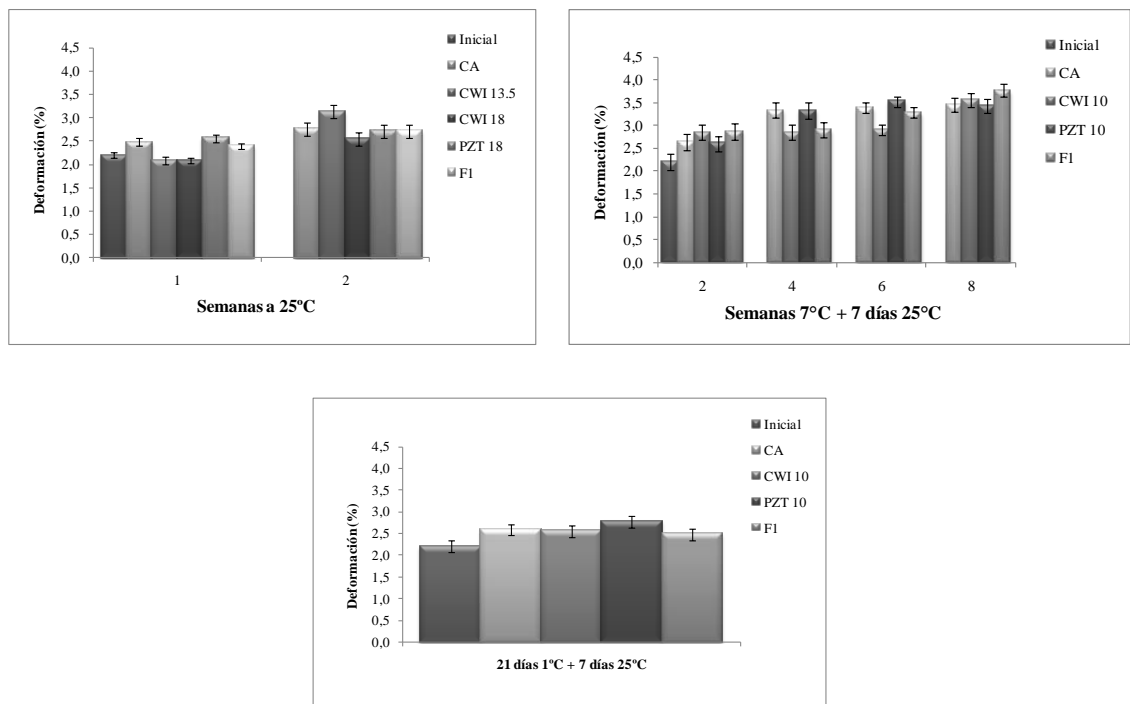
6.3.1.3 Firmeza (% deformación)

La firmeza es un parámetro de cosecha muy importante, debido a que durante el posterior almacenamiento y comercialización se va a producir un ablandamiento progresivo de los frutos (pérdida de firmeza), con la consecuente pérdida de calidad. Este parámetro está relacionado con las propiedades mecánicas del fruto, fue medido en términos de la resistencia de la corteza del fruto a la compresión. La pérdida de agua es una de las principales causas de deterioro, no sólo en los cítricos, sino en la mayoría de

los productos hortofrutícolas, debido a que además de pérdidas cuantitativas de peso, produce pérdidas de apariencia de firmeza. En estos productos la deshidratación es mayor dada la superficie del fruto, siendo la zona perpendicular la más susceptible.

El ablandamiento o pérdida de firmeza de la pulpa de las frutas, se debe a la degradación de las pectinas y de las hemicelulosas de las paredes celulares y, en ella, intervienen procesos de hidrólisis enzimática y procesos no enzimáticos, como los cambios en el pH o fuerza iónica del medio que envuelve la pared celular. Una refrigeración adecuada y el uso de atmósferas modificadas o controladas, ralentiza los procesos de senescencia del fruto en general, y el ablandamiento de la pulpa en particular [254]. La Figura 28, representa la deformación producida en los frutos, tras aplicar una fuerza de compresión de 10N. Por tanto, un incremento de los valores de deformación de las naranjas, indica una pérdida de firmeza o turgencia.

Figura 37. Porcentaje de deformación en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.



Se observa cómo en los grupos de frutos al inicio se presentó un incremento en el porcentaje de deformación, aspecto que se debe a la propia naturaleza del cultivo utilizado. En general, la deformación de los frutos aumentó al prolongar el tiempo de almacenamiento. A 25°C, durante una semana, la cera CWI fue la más efectiva, así

como en frigoconservación, hasta la sexta semana, mientras que en cuarentena, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. El recubrimiento comestible FRCF, se mostró efectivo hasta la cuarta semana en frigoconservación, mientras que en CD, no mostró diferencias significativas con relación al control absoluto.

Algunos estudios realizados en cítricos muestran una relación entre la firmeza del fruto y la pérdida de peso del mismo, siendo la deshidratación, la responsable de la pérdida de turgencia del fruto y, por tanto, de la pérdida de firmeza. En las evaluaciones realizadas, al recubrimiento comestible, se puede apreciar que después de la semana 4, a 7°C, hasta la semana 8, el fruto aumentó su pérdida de peso; en este período; se presentó, además, una menor firmeza en los frutos, lo que pone de manifiesto un posible efecto de la deshidratación en la pérdida de firmeza de las naranjas.

Los resultados del recubrimiento FRCF muestran que es importante mejorar sus características de modo que permitan un mejor control de los parámetros de calidad. En otros estudios, se ha determinado que en recubrimientos con diferentes composiciones, se pueden controlar estos parámetros; por ejemplo, en recubrimientos compuestos a base de hidroxipropil metilcelulosa, lípidos [255] y a base de goma de garrofín [256], que reducen la pérdida de peso de mandarinas Fortune, también, formulaciones de recubrimientos a base de goma laca y distintas ceras (de abeja, carnauba o candelilla) resultaron efectivos reduciendo la pérdida de peso y de firmeza de naranjas Valencia, Navelina y Lanelate y mandarinas Fortune y Clemenules [257], [258]. También, se han aplicado recubrimientos de quitosan, que reducen estos parámetros, en mandarinas 'Fortune' [259], y recubrimientos con derivados de dextrina y ésteres de glicerina, que los disminuyen, en mandarinas Clemenules y Fortune.

6.3.2 Evaluación de la calidad interna de los frutos

6.3.2.1 Índice de madurez (IM)

En todos los casos experimentales el índice de madurez aumentó ligeramente durante el tiempo de almacenamiento respecto al IM inicial, esta diferencia se hizo mayor después

de ocho 8 semanas de frigoconservación y posterior comercialización directa, en la figura 30 se observan estos cambios.

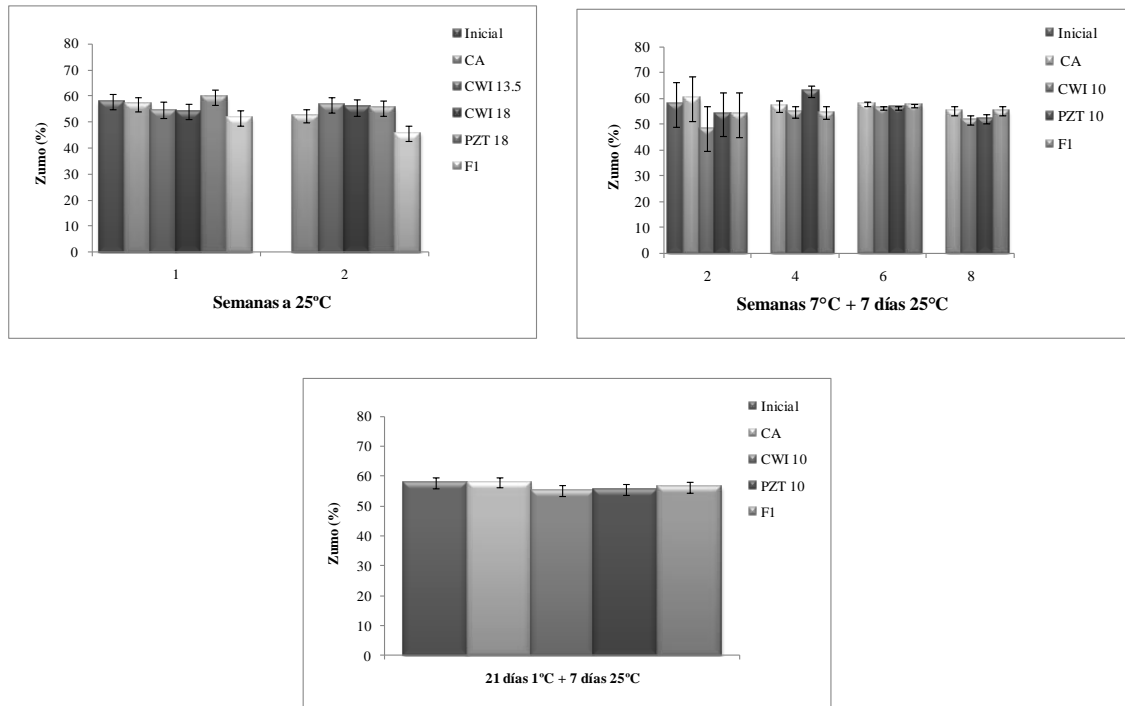
Al prolongar el almacenamiento, se observó una reducción de la acidez y un aumento del IM, manteniéndose el contenido en sólidos solubles. No se registraron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control absoluto, ni entre tratamientos. El recubrimiento FRCF tuvo un desempeño similar al de las demás ceras comerciales. Una disminución de la acidez, al prolongar el almacenamiento, puede traducirse en un aumento del I.M.

El consumo de azúcares y ácidos orgánicos, durante la respiración del fruto, la conversión de ácidos orgánicos en azúcares y la pérdida de agua por deshidratación, así como la hidrólisis de polisacáridos con la liberación de azúcares solubles, propia del metabolismo del fruto [260], dan como resultado, un balance negativo de ácidos orgánicos y una regulación del contenido en azúcares, que se traduce en una estabilización de los sólidos solubles totales.

6.3.2.2 Rendimiento en zumo (%)

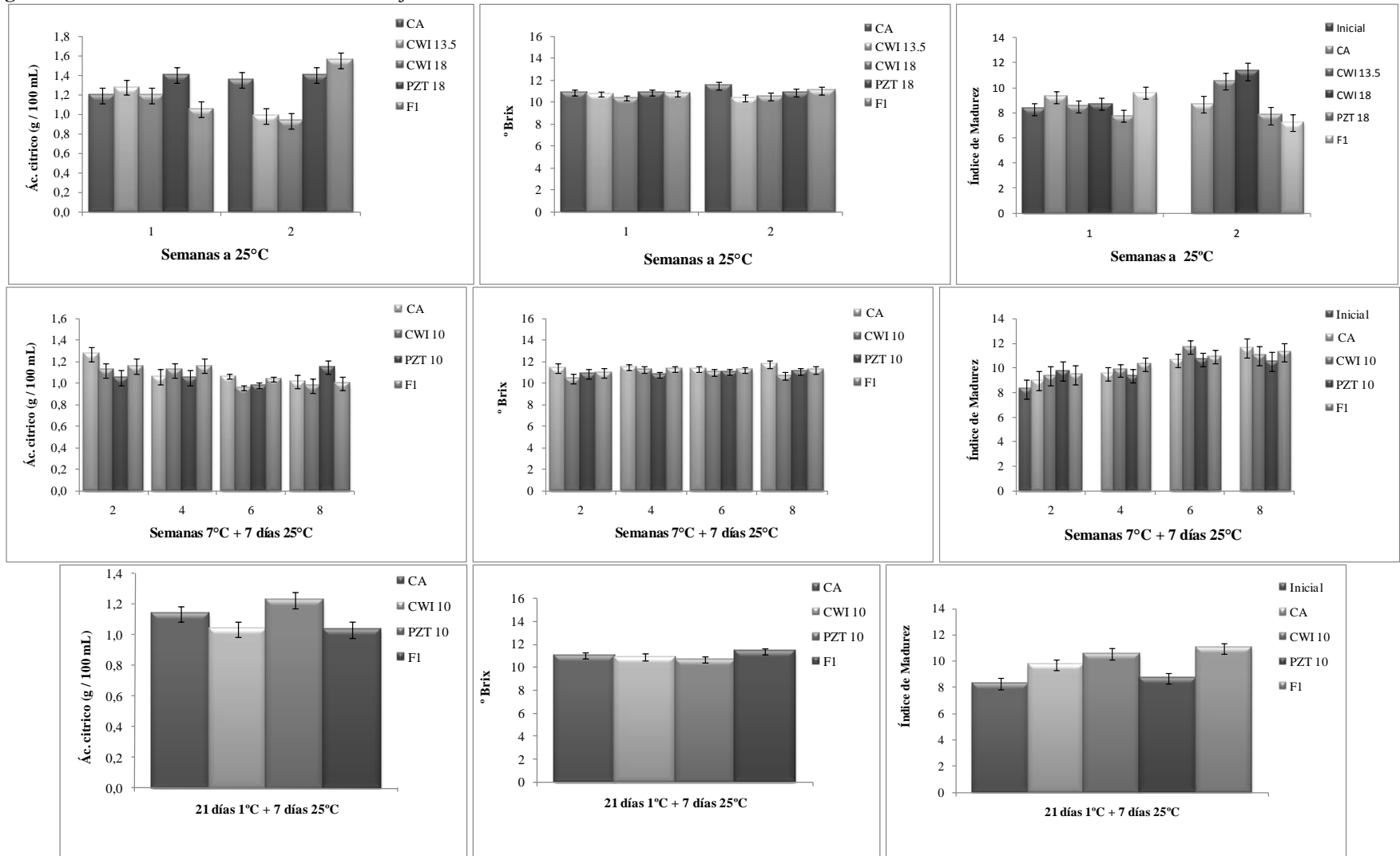
Los frutos cítricos son valorados por su contenido de zumo. El contenido del mismo, disminuye, con el avance de la maduración y del período de almacenamiento. El estado de maduración y la calidad en otros cítricos como la lima, el limón y el pomelo, se basan también, en la cantidad de zumo de los frutos, además del contenido de sólidos solubles. El rendimiento del zumo es un parámetro que está estrechamente relacionado con los parámetros de calidad, como son la pérdida de peso (PP) y la firmeza.

Figura 38. Rendimiento de zumo en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.



En los diferentes medios de conservación a los que fue sometida la naranja Valencia, no se observó un efecto significativo positivo del recubrimiento FRCF, en relación con el grupo control, durante las diferentes semanas, aunque, su comportamiento fue similar a los referentes comerciales.

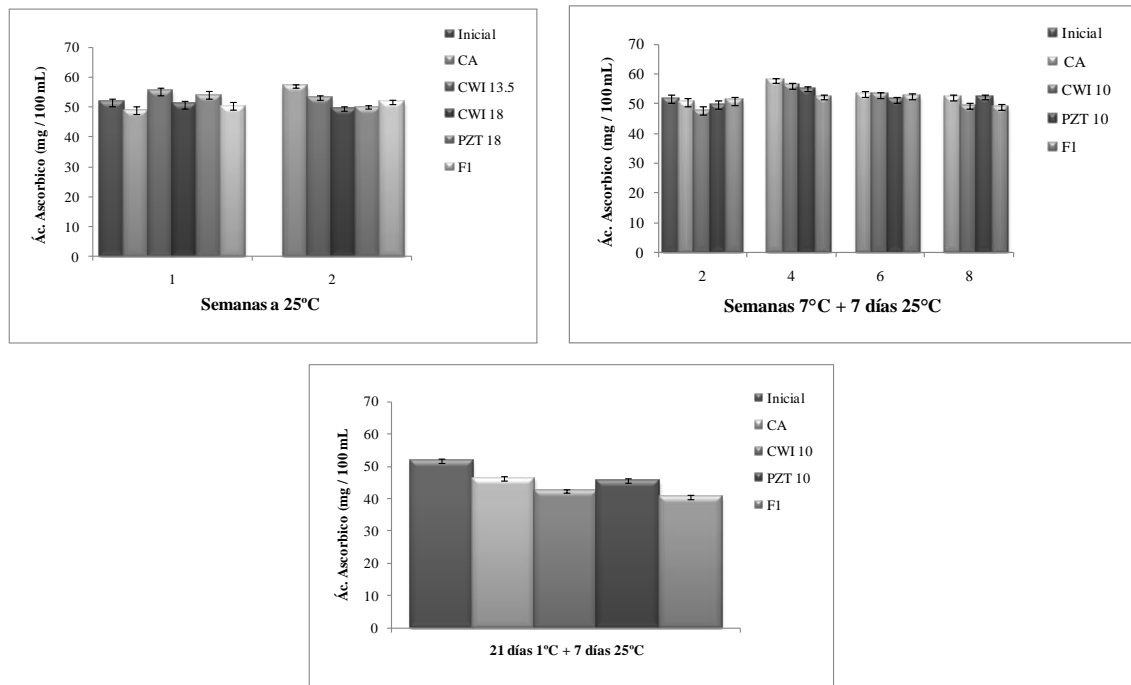
Figura 39. Índice de madurez de frutos de naranja Valencia recubiertos en simulación de condiciones de almacenamiento.



6.3.2.3 Contenido de vitamina C

El ácido ascórbico (L-ascórbico) o vitamina C es una γ -lactona, sintetizada por las plantas. Es un potente antioxidante natural, que se encuentra presente en grandes cantidades en los zumos cítricos, por lo que se considera un parámetro de calidad en los frutos cítricos.

Figura 40. Contenido de ácido ascórbico en frutos de naranja Valencia recubiertos en diferentes condiciones de almacenamiento.



Como se observa en la figura 31, el contenido en vitamina C no se vio significativamente afectado por el período de almacenamiento, excepto en el caso de la simulación de cuarentena, donde se observó una reducción significativa en este parámetro, siendo el contenido más bajo para el recubrimiento FRCF junto con la cera CWI, así, como a las 8 semanas en frigoconservación más período de comercialización. Así mismo, la cera PZT, mostró un mejor comportamiento frente a este parámetro para las demás condiciones de almacenamiento.

Otros recubrimientos compuestos a base de carboximetilcelulosa, aceite de soja y oleato sódico, han resultado efectivos manteniendo los niveles de sólidos solubles, la acidez y la

vitamina C, en mandarinas [261]. En albaricoques, se han aplicado recubrimientos a base de metilcelulosa, polietilenglicol, ácido esteárico y ácidos ascórbico o cítrico, que reducen la pérdida de peso y la de vitamina C [262].

6.3.3 Determinación de marcadores metabólicos de estrés relacionados con el uso de recubrimientos

Mediante metabolite profiling y análisis multivariado se detectaron diferentes metabolitos marcadores de procesos normales de senescencia en grupos control, y de impacto dado el uso de recubrimientos en naranja Valencia. Los marcadores de impacto metabólico estuvieron relacionados principalmente con el efecto que tuvieron los recubrimientos sobre los procesos respiratorio y de transpiración, dando como resultado, en algunos casos el inicio de procesos de anaerobiosis y deshidratación, dadas las condiciones de simulación experimental, algunos grupos de metabolitos presentaron mejor capacidad y sensibilidad para reportar marcadores asociados al inicio de procesos de estrés en los frutos.

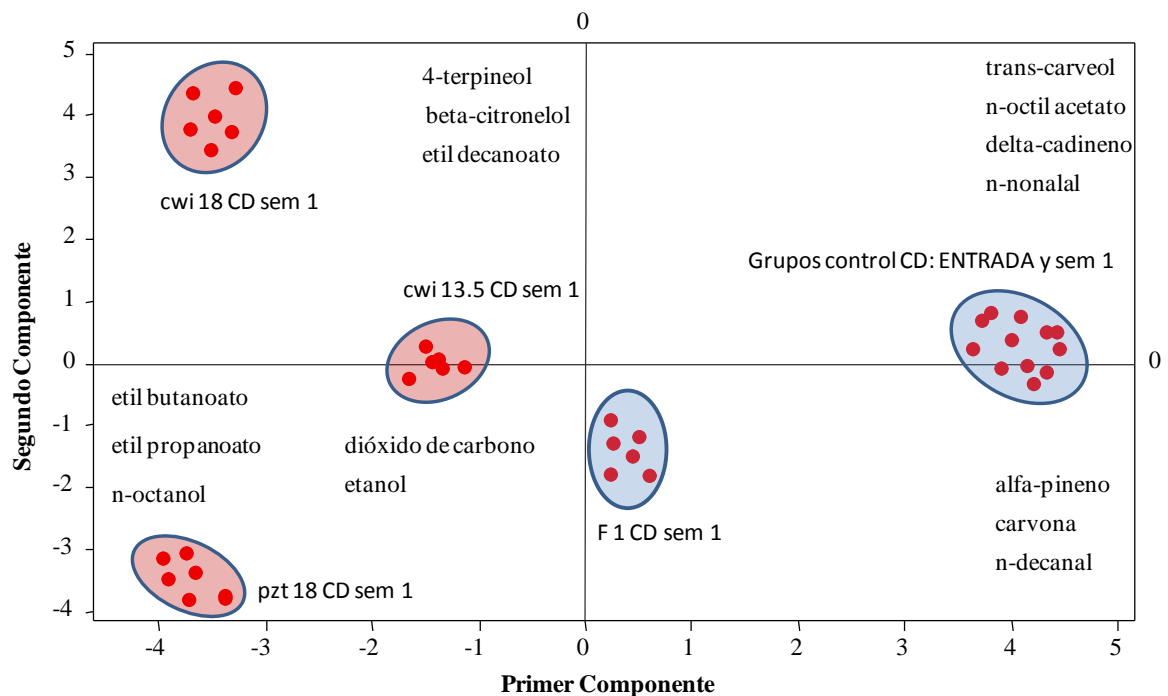
6.3.3.1 Marcadores volátiles

El análisis de fracción volátil de los zumos experimentales permitió la detección temprana (1 semana) de grupos de moléculas relacionadas con condiciones de anaerobiosis y por consiguiente la previsión de aparición de off-flavors y de pérdida de calidad organoléptica. Este grupo de compuestos se normalizó cromatográficamente con base en el factor de respuesta del ISTD, consiguiendo valores inferiores a 1 ppm para etanol y CO₂.

En la figura 41 se observa la formación de clusters de muestras que se alejan principalmente dada la relación cuantitativa inversa entre sustancias como trans-carveol, n-octil-acetato, delta-cadineno, n-nonanal (constituyentes normales de la fracción volátil del zumo) y dióxido de carbono y etanol (en cantidades superiores a los grupos control). Por

ello, la línea del segundo componente principal marcó la diferenciación de dos zonas con diferente status metabólico: una zona aerobia que contuvo el grupo de muestras control y FRCF (F1), y una zona de condiciones anaerobias con presencia de los grupos de muestras recubiertos PZT y CWI. Estas dos formulaciones comerciales formaron películas de carácter impermeable que afectaron en poco tiempo el cociente respiratorio, dando como resultado un aumento de los niveles de CO₂, etanol, productos oxigenados como 4-terpineol, beta-citronelol, n-octanol y ésteres etílicos de ácidos grasos: propanoico, butanoico y decanoico.

Figura 41. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales volátiles.

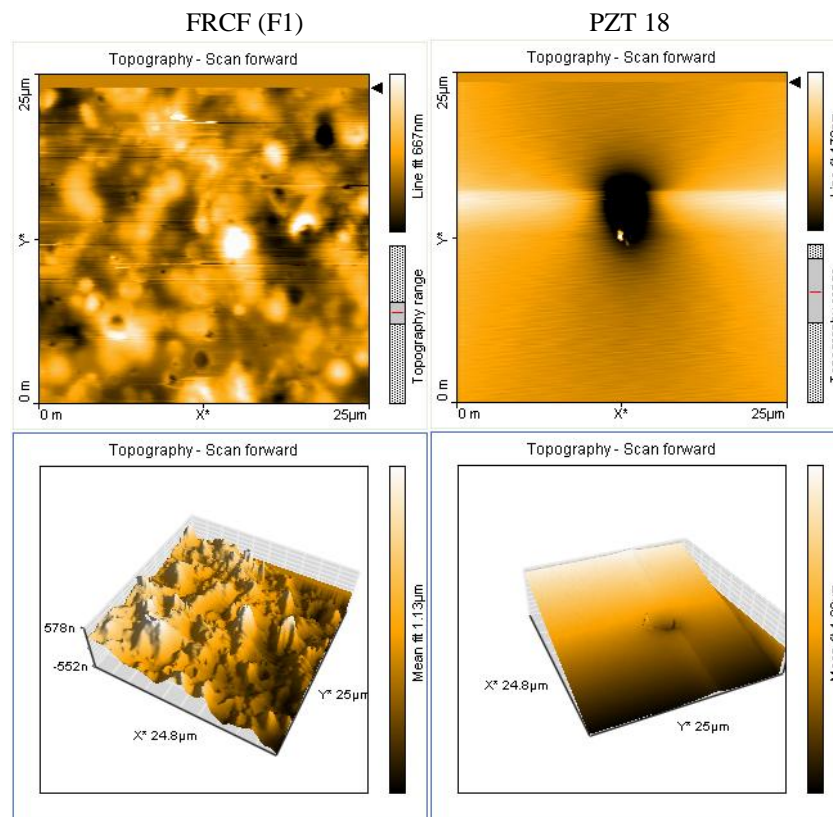


El recubrimiento PZT 18 presentó el mayor aumento de CO₂ disuelto en los zumos (93%) en contraste a F1 que no produjo cambios en esta sustancia respecto al grupo control de una semana, lo cual es comprensible dadas las características de la fórmula hidocoloidal y a su facilidad para la difusión de gases. En la figura 42 se aprecia el aspecto nanotopográfico de la superficie de la película formada por PZT, la cual presenta un aspecto plano, con menor

área de contacto con el exterior, gracias a su menor rugosidad y a un menor diámetro seccional.

Los marcadores permitieron identificar en forma temprana la evolución de procesos anaerobios que dieron explicación a la aparición de marcadores de cambio entre los grupos de muestras en posteriores simulaciones experimentales de frigoconservación y cuarentena, experimentos en los que dada la aplicación de bajas temperaturas, produjo la disminución en los valores de los marcadores en los respectivos experimentos, sin embargo se observó la diferenciación de clusters que se alejaron de la formulación FRCF y de los grupos control.

Figura 42. Aspecto de la topografía superficial del recubrimiento comestible FRCF y recubrimiento tipo cera PZT mediante AFM.



La identificación temprana de marcadores volátiles de anaerobiosis permitió la caracterización del efecto de los materiales ensayados sobre la fisiología de los frutos,

facilitando una adecuada calificación de los materiales, además de una mayor compresión de la expresión de otros grupos de sustancias y la producción temprana de sustancias relacionadas con off-Flavors, como es el caso del terpineol que se forma por degradación del limoneno, en este sentido la formulación FRCF presento el mejor desempeño en cuanto al impacto metabólico de la respiración en las condiciones experimentales.

6.3.3.2 Marcadores lipídicos

Como se vio en la sección 4, los perfiles de ácidos grasos constituyeron un grupo relativamente reducido de sustancias que permitieron explicar la variabilidad metabólica del proceso de maduración, dada la sensibilidad de este grupo de sustancias en las condiciones de análisis, fue posible utilizarlas en la búsqueda de marcadores de cambio dados los objetivos del experimento.

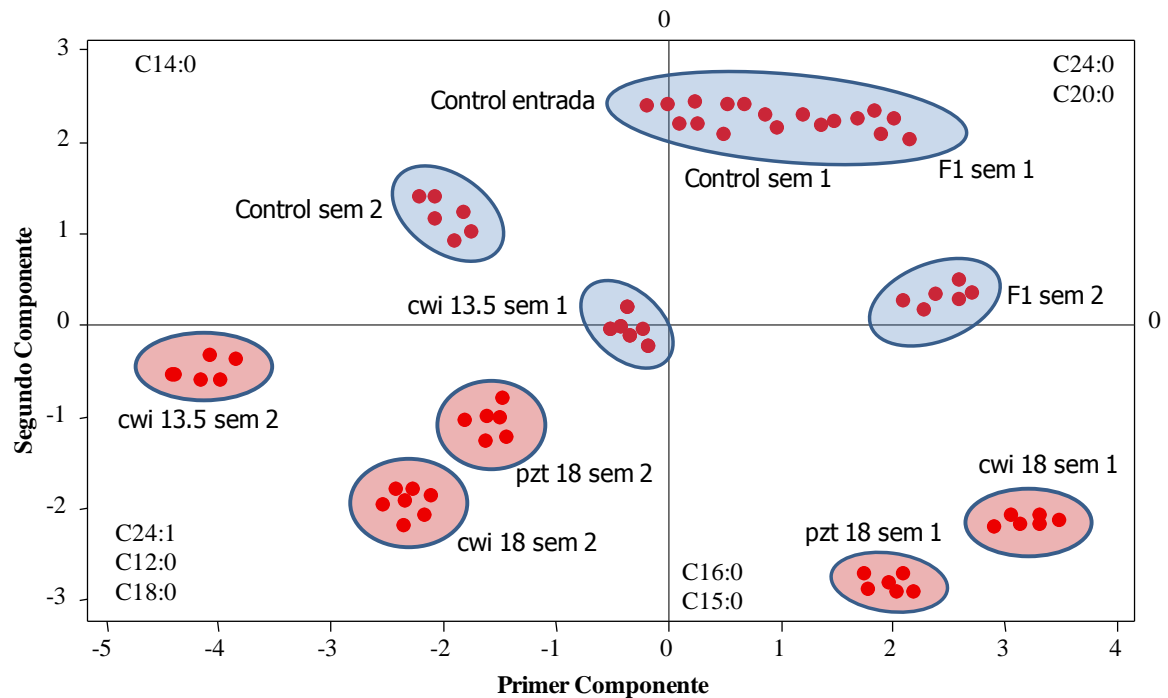
6.3.3.2.1 Comercialización directa CD

El grupo de sustancias lipídicas presentó resultados que muestran la evolución de cambios asociados a la senescencia temprana a temperatura ambiente para los grupos control, principalmente dado por el cociente Sat/Insat de los ácidos lignocérico (C24:0) y nervónico (C24:1) de 4.11 en la entrada y 3.64 y 1.37 en las semanas 1 y 2, respectivamente. El grupo control de la semana dos reportó adicionalmente el incremento en los niveles de C14:0. Como se observa en la figura 43, el primer componente principal define dos zonas de dos cuadrantes, en los que se ubican los cluster de muestras control, F1 y algunos puntos de CWI 13.5, presentando un comportamiento de poca alteración metabólica sobre los frutos.

Los dos cuadrantes restantes están ocupados por muestras de recubrimientos tipo cera de 18% de sólidos solubles, el panorama acumulado en la segunda semana del experimento mostró que estas muestras estuvieron relacionadas con un aumento en la biosíntesis de ácido nervónico a partir del respectivo C24:0, con valores del cociente C24:0/C24:1 de 0.26 y 0.27 para CWI y PZT, respectivamente. Además del aumento en las cantidades de los ácidos láurico y esteárico.

En comercialización directa la formulación FRCF presento un comportamiento metabólico similar al de los grupos control de perfiles de componentes lipídicos.

Figura 43. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales lipídicos, en simulación de comercialización directa.



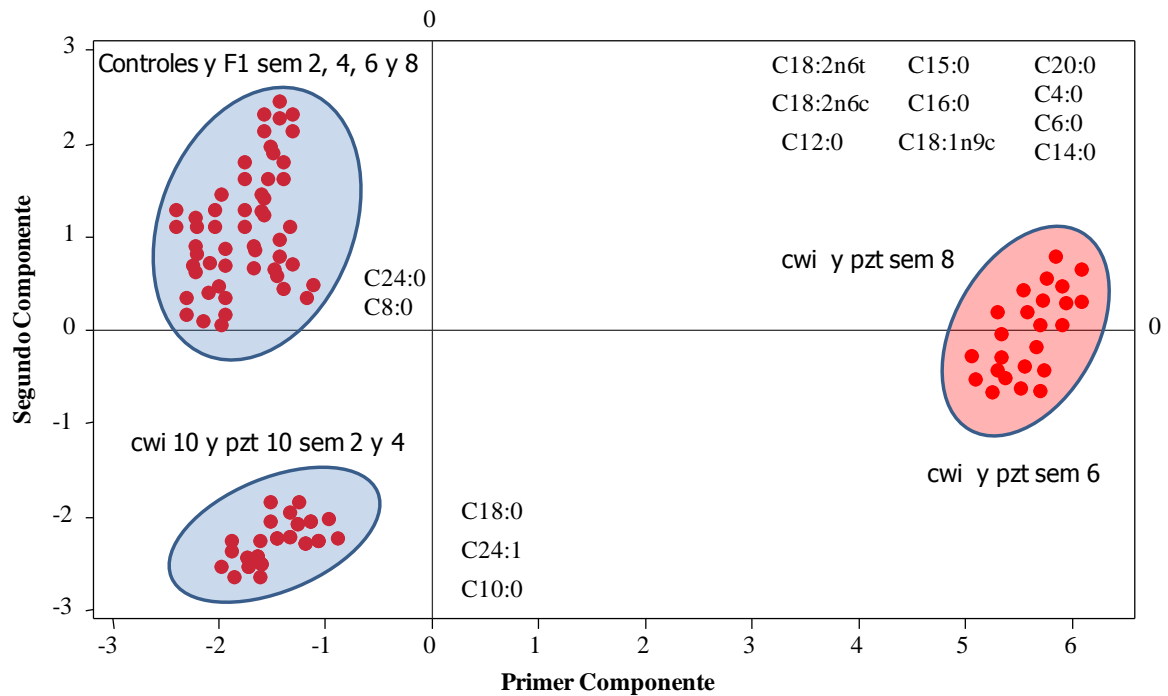
6.3.3.2.2 Frigoconservación y CD

La temperatura del experimento produjo la reducción en los valores de los marcadores de senescencia y de alteración observados en la simulación de comercialización directa, en este experimento se destaca la formación de tres clusters que reúnen todas las muestras después de 8 semanas de evolución. Sin embargo se observó adicionalmente, la aparición de algunos metabolitos lipídicos de menor peso molecular (C4:0 y C6:0) después de la sexta semana de almacenamiento.

Como se observa en la figura 44, se presentó una relación inversa entre los ácidos C24:0/C24:1 que se promovió por las formulaciones tipo cera, aspecto que se relacionó con la poca permeabilidad de este tipo de películas al oxígeno y a la acumulación de CO₂,

también, durante la ejecución del experimento se observó cómo, a partir de la semana 6 se dio el aumento en los niveles de los ácidos C4:0 y C6:0, los cuales pueden marcar la relación de mala calidad sensorial en los zumos recubiertos con materiales cerosos, dada la evolución de condiciones con bajo intercambio gaseoso durante el tiempo del experimento.

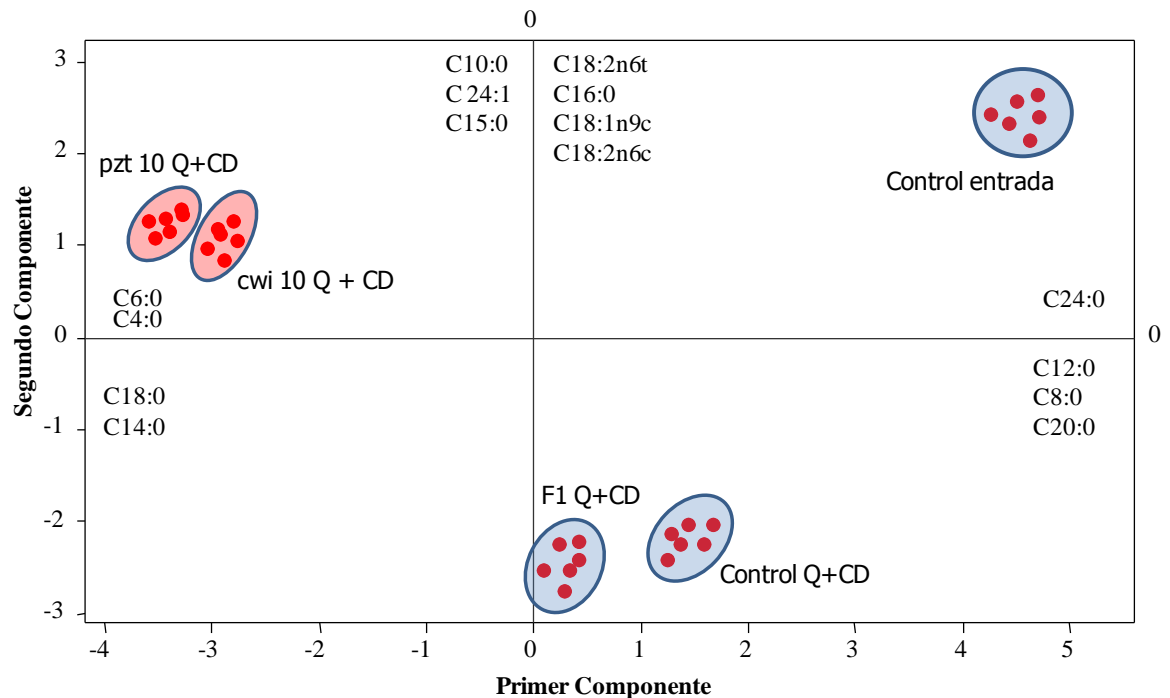
Figura 44. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales lipídicos. En simulación de frigoconservación y posterior comercialización directa.



6.3.3.2.3 Cuarentena y CD

La evolución del experimento produjo perfiles de metabolitos que identificaron los grupos control y a la formulación FRCF con marcadores de senescencia como C12:0, C8:0 y C20:0, produciendo un impacto muy leve del recubrimiento comestible sobre los frutos. En forma contraria, las formulas CWI y PZT presentaron mayores niveles de los ácidos C24:1, C6:0 y C4:0.

Figura 45. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales lipídicos. En simulación de cuarentena y posterior comercialización directa.



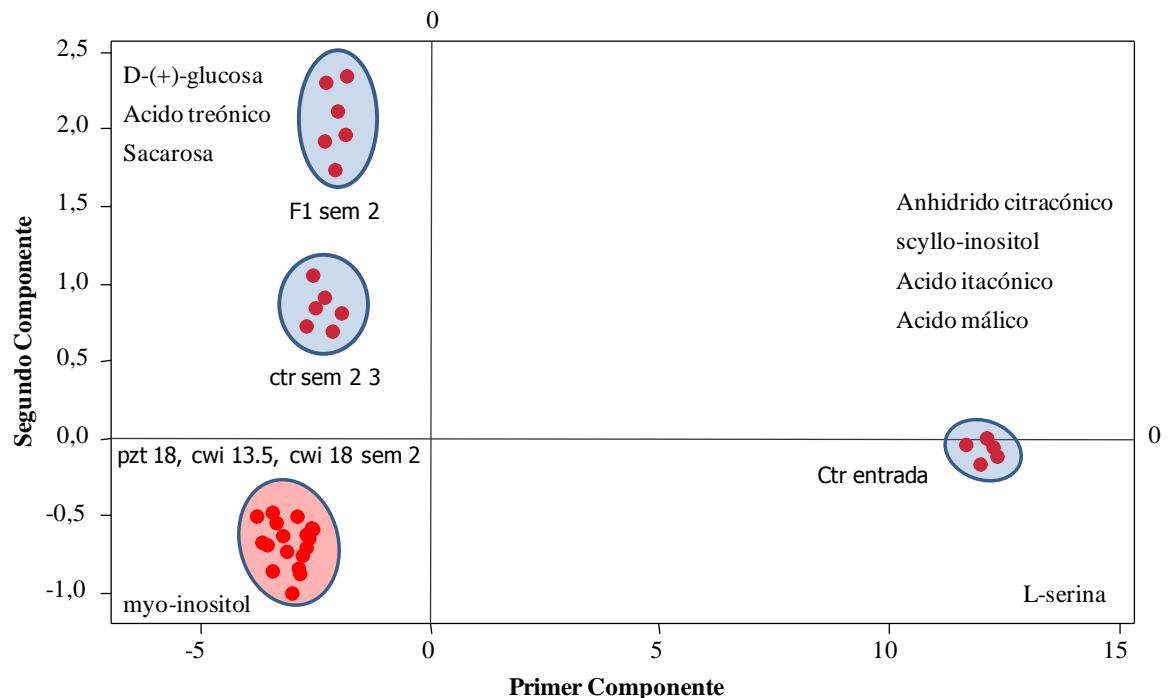
6.3.3.3 Marcadores polares TMS

La variabilidad acumulada en el desarrollo del experimento de simulación de comercialización directa, presentó marcadores de la evolución de senescencia en los grupos control. Estos marcadores explicaron en forma sensible la evolución de madures durante 14 días. Naturalmente. Se presentó una relación inversa entre el contenido del grupo de ácidos orgánicos y azúcares, representados principalmente por un aumento leve en los niveles de glucosa y sacarosa. La formulación FRCF se ubicó en el mismo cuadrante del grupo control y produjo adicionalmente en los frutos, un aumento leve, en los niveles de ácido treónico, lo que explica la leve disminución en los niveles de vitamina C para esta formulación. Ver figura 46.

En relación a las formulaciones tipo cera evaluadas a 13.5 y 18%, estas se agruparon en el mismo cuadrante, los hallazgos metabólicos presentaron un consumo importante del grupo

de los ácidos orgánicos y un aumento considerable en la producción de myo-inositol. Este metabolito se ha referenciado como marcador de estrés en vegetales, dado un aumento en la expresión constitutiva del gen *imt1* que codifica la mio-inositol O-metiltransferasa, como el caso de *Nicotiana tabacum* sometida a estrés osmótico y ambiental [263], [264], [265].

Figura 46. Dispersión de frutos de naranja Valencia recubiertos según componentes principales de SST. En simulación de comercialización directa.



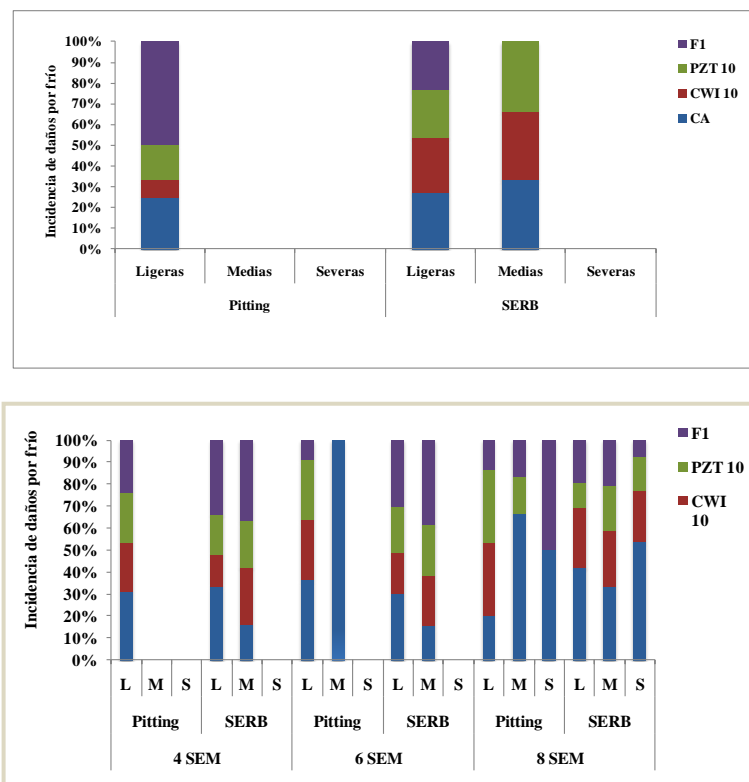
6.3.4 Desórdenes fisiológicos

Los cítricos, así como otros frutos tropicales y subtropicales, presentan una especial sensibilidad a las bajas temperaturas, que se manifiesta por distintas alteraciones y manchas en la piel, conocidas generalmente como lesión de frío, daño por frío o chilling injury (CI), que pueden implicar una alta pérdida de calidad comercial. Las distintas especies y variedades de cítricos presentan diferente susceptibilidad a los daños por frío. En general, las naranjas y mandarinas son menos susceptibles a los daños por frío, que las limas, limones y pomelos [254]. La manifestación de los síntomas de daños por frío se puede dar en la misma cámara de conservación, después de un cierto tiempo de permanencia en frío.

El riesgo de la aparición de síntomas es tanto mayor cuanto mayor sea el tiempo de permanencia en cámara y a menor temperatura, manifestándose totalmente cuando los frutos se transfirieren a temperatura ambiente. Las respuestas a los daños por frío son reversibles, para tiempos de exposición cortos, pero en caso contrario, los daños son irreversibles [266].

Los desórdenes fisiológicos, observados, que afectan la apariencia externa de los frutos cítricos, fueron el picado o ‘pitting’, que se manifiesta en la piel, con depresiones redondeadas, que se oscurecen a medida que avanza el deterioro, y la necrosis peripeduncular SERB, que se manifiesta en torno al pedúnculo, con depresiones que adquieren una coloración marrón. Se evaluó la incidencia de ambos desórdenes para cada tratamiento, expresándose el resultado como porcentaje de incidencia de daños por frío, con respecto al total de frutos observados con daños, para cada nivel de lesión, ver figura 47.

Figura 47. Porcentaje de incidencia de daños por frío en frutos de naranja Valencia recubierta durante simulación de condiciones de almacenamiento comercial.



Como se observa en la Figura 47, al prolongar el período de exposición a bajas temperaturas se obtiene un aumento de pitting y SERB, para frigoconservación y cuarentena respectivamente. Durante las semanas 4 y 6 en frigoconservación, se observan daños, ligeros y medios, mientras que a la semana 8 de almacenamiento, ya se empiezan a observar daños severos en grupo de frutos control. En esta salida los frutos presentaron mayor porcentaje de daños por frío, siendo la cera PZT 10% la que presentó menor incidencia de daños totales (pitting y SERB), la cera CWI 10% presentó más incidencia de pitting y en menor grado SERB.

Durante la simulación de cuarentena a EE.UU., los daños se manifestaron como ligeros y medios, los frutos con recubrimiento FRCF presentaron mayor porcentaje de daños por pitting y menor de SERB, en forma similar a la cera CWI 10%.

La necrosis peripeduncular o 'SERB', se produce por deshidratación de los tejidos aledaños al pedúnculo (Martínez-Jávega y Del Río, 1998). Por tanto, es previsible que una reducción de la deshidratación del fruto, tras la aplicación de recubrimientos, reduzca los daños por 'SERB'. Los causados por 'pitting', se atribuyen a las bajas temperaturas a las que puede exponerse el fruto, a lo largo de su desarrollo y/o durante su almacenamiento. Éstas, afectan a la permeabilidad de las membranas celulares, produciendo un colapso de las mismas y una pérdida de compartimentación celular [267]. Esta última, pone en contacto, las enzimas de oxidación con sus correspondientes sustratos, y a nivel de la piel, se manifiesta con el manchado típico de la lesión por 'pitting'. Es posible que la barrera a los gases CO₂ y O₂ creada por el recubrimiento, pudiera interferir en los procesos exudativos descritos.

Algunos autores atribuyen la reducción de daños por frío, en frutos recubiertos, a la modificación de la atmósfera interna del fruto, que éstos producen [268]. Otros autores han observado un efecto beneficioso de los recubrimientos, reduciendo la incidencia de desórdenes fisiológicos, en cítricos [254], [255].

6.4 Referencias Bibliográficas

247. Juran, J. M., 1993. Manual de Control de la Calidad. 4. Edición, Mc Graw Hill, Interamericana de España S.A, España. p. 13.
248. Harding, PL., Winston, J.R., Fisher, D.F. 1940. Seasonal changes in Florida oranges. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 73.
249. Crisosto, C. H., 1994. Stone Fruit Maturity Indices: A Descriptive Review. Postharvest News and Information. 5: 6. p. 65-68
250. Veraverbeke, E.A., 2003. Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris* Subs. *mitis* (Wallr.)) during storage. Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients. En: Postharvest Biology and Technology. 30. p. 75-88.
251. Jiménez-Cuesta, M., J., Cuquerella, and J.M., Martínez-Jávega., 1983. Teoría y práctica de la desverdización de los cítricos. Comunicación I.N.I.A, Hoja Técnica n46. p. 16–21.
252. Shellie, K.C. Ultra-low oxygen refrigerated storage of “Rio red” grapefruit: fungistatic activity and fruit quality. En: Postharvest Biology and Technology. 25. 2002. p. 73-85.
253. Hagenmaier, R.D., Baker, R.A., 1994. Wax microemulsions and emulsions as citrus coatings. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42. p. 899-902. Artés, F. 1987. Refrigeración y comercialización hortofrutícolas en la Región de Murcia. 2 ed. Murcia: CEBAS-CSIC. 1987. p. 150.
254. Pérez-Gago, M., Krochta, J., 2002. Drying temperature effect on water vapour permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49. p. 2308-2312.
255. Rojas, C., 2002. Desarrollo de nuevos recubrimientos comestibles y aplicación en cerezas, albaricoques y mandarinas. Tesis Doctoral. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
256. Perez-Gago, M. Rojas, C., Del Río, M. 2003. Effect of hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible composite coating on postharvest quality of “Fortune” Mandarins. Acta Horticulturae. 599. p. 583-587.
257. Gontard, R., Thibault R., Cuq, B., Guilbert, S., 1996. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44. p. 1064- 1069.
258. Monteverde, A., Salvador, A., Ben-abda, J., Martínez-javega, J.M., 2003. Efecto de la aplicación de recubrimientos de origen natural en la calidad de mandarinas y naranjas. En: Maduración y Post-Recolección de frutos y hortalizas. Eds. C. Merodio; I. Escribano. p. 203-208.
259. Barreiro, L. 2001. Physicochemical characterization of the postharvest senescence of winter melon ‘Tendral’. Fruits. 56. p. 51-58.
260. Togrul, H., Arslan, N., 2003. Carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose as hydrophilic polymer in coating mandarin. J. Food Eng. 62. p. 271-279.

261. Ayrancy, E., Tunc, S., 2004. The effect of edible coatings on water and vitamin C loss of apricots (*Armeniaca vulgaris* Lam.) and green peppers (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*. 87. 2004. p. 339–342.
262. Grierson, W. 1981. Physiological disorders of citrus fruits. En: *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 2. p. 764-767.
263. Vernon, D.M. y H.J. Bohnert. 1992. A novel methyltransferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* 11, 2077-2085.
264. Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14. p. 89-96.
265. Ishitani, M., 1996. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress, in *The Plant Journal*. Blackwell Science Ltd. 548. p. 537.
266. Chien YL., Wang, L., 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling injury stress. *Horticultural Science*. 17. p. 169-186.
267. Medeira, M.C., Maia, M.I., Vitor, R.F., 1999. The first stages of preharvest peel pittings' development in 'Encore' mandarin. A histological and ultrastructural study. *Ann Bot. London*. 83. 6. p. 667-673.
268. Wang, C.Y., 2000. Postharvest techniques for reduce low-temperature injury in chilling-sensitive commodities. En: *Improving Postharvest technologies of fruits, vegetables and ornamentals*. Murcia: F. Artés; M.I. Gil; M.A. Conesa., Int Inst. Refrig., Murcia. p. 467-472.

7. CONCLUSIONES GENERALES

Se realizó la extracción de pectina y aceites esenciales de residuos de la agroindustria cítrica; la caracterización de los productos permitió obtener pectina con rendimientos sobresalientes y con propiedades funcionales que le facultaron para formar películas de recubrimientos comestibles. Los aceites esenciales reportaron una importante actividad antifúngica respecto a fungicidas de poscosecha (Imazalil y Tiabendazol).

Los residuos disponibles en la industria local, se caracterizaron por presentar un aspecto macroscópico heterogéneo, su caracterización reportó diferencias significativas dado el funcionamiento de las máquinas que producen un impacto mecánico específico sobre los frutos y sus productos: zumos y residuos.

Se reportó por primera vez, el impacto tecnológico de las tecnologías de extracción de Zumos (Zumex y FMC) sobre la química de la fracción volátil, la calidad organoléptica y biológica de zumos de mandarina Clementina, encontrando diferencias significativas en descriptores de calidad olfativa, gustativa y respuestas somatosensoriales negativas para zumos de procedencia Zumex. Ver anexos 9 y 10.

Se obtuvo un prototipo de recubrimiento comestible hidrocoloidal (FRCF) con propiedades antifúngicas, gracias a la incorporación de aceite esencial de mandarina a una concentración del 1% en una matriz de pectina. El diseño de la formulación del recubrimiento permitió superar problemas críticos, como la retención de los componentes volátiles bioactivos en películas delgadas y aportar protección antifúngica contra hongos pudridores como *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.

Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de algunos componentes del aceite esencial y se obtuvieron los mejores resultados para Carvacrol, Timol y p-Cimeno en comparación con fungicidas de poscosecha. Los resultados mostraron que *Penicillium digitatum* posee mayor susceptibilidad a la composición química de los aceites esenciales de mandarina Clementina que *Penicillium italicum*.

La formulación obtenida se evaluó en cuanto a su capacidad antifúngica *in vivo* conjuntamente con formulaciones comerciales tipo cera, obteniendo resultados satisfactorios de protección para la formulación FRCF en condiciones de simulación de almacenamiento en comercialización directa a temperatura ambiente. Los experimentos de simulación de frigoconservación y cuarentena de exportación, realizados a 7° y 1°C no reportaron buena efectividad para las formulaciones de recubrimiento comestible y tipo cera.

Se desarrollaron metodologías mediante metabolite profiling para el estudio de perfiles de metabolitos primarios y secundarios mediante aproximación metabolómica. Las condiciones se establecieron mediante la inyección líquida de muestras derivatizadas y headspace para volátiles disueltos, aplicando principalmente un sistema GC/qEIMS. Se identificaron más de 400 metabolitos, con los que se establecieron librerías de target compound para la deconvolución automática de los cromatogramas TIC. Esta plataforma de análisis permitió en forma sensible, la identificación de marcadores involucrados en el proceso de maduración y de origen geográfico de frutos de mandarina Clementina dadas las condiciones eco-fisiológicas en las zonas de cultivo.

La formulación de recubrimiento comestible FRCF se evaluó en una línea comercial de tratamiento poscosecha de cítricos sobre naranja Valencia, en conjunto con dos fórmulas comerciales tipo cera, el estudio permitió la simulación de condiciones en almacenamiento de comercialización directa, frigoconservación y cuarentena de exportación. En cada simulación se evaluaron parámetros de calidad externa, interna y se establecieron marcadores de estrés abiótico dado el impacto de los materiales de recubrimiento en la fisiología vegetal. La formulación de recubrimiento comestible demostró tener capacidad para conservar los frutos en comercialización directa: no afectó la vida útil de los frutos, retardó la pérdida de peso y no produjo perturbaciones significativas del cociente respiratorio.

Mediante aproximación metabolómica se establecieron marcadores de estrés abiótico dado el uso de recubrimientos en los frutos. Se identificaron marcadores de anaerobiosis

principalmente en muestras de recubrimientos tipo cera. Se observó como el incremento en niveles de CO₂ y etanol están relacionados con el incremento de metabolitos volátiles: 4-terpineol, beta-citronelol, n-octanol, y ester de ácidos grasos: etil-propanoato, etil-butanoato y etil-decanoato; también se observó un aumento en la biosíntesis de ácido nervónico (C24:1) a partir del respectivo C24:0.

El uso de aproximación metabolómica para la evaluación del impacto fisiológico de recubrimientos en frutas cítricas ha sido hasta el momento un campo sin producción académica destacable, los factores de respuesta que poseen de los análisis y la cantidad de moléculas que se pueden integrar al estudio permite obtener evidencia potente y de muy alto peso para la calificación de materiales de recubrimientos.

8. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados mostraron que la formulación FRCF no ofrece un adecuado control a la transpiración; esta propiedad marca un aspecto fundamental del desempeño de un producto. Con el objeto de impermeabilizar gradualmente la película formada sobre la piel de los frutos, se podría optimizar en un estudio posterior, la incorporación de una cantidad mayor de aceite vegetal, en contraste con una disminución de la cantidad pectina, con lo que se esperaría una compensación sobre el aumento en la viscosidad producida por el aceite vegetal.

Los valores que presentaron los metabolitos se establecieron por estandarización interna, lo que puede alejar a la mayoría de las sustancias de una adecuada precisión. Además no se estableció si la aparición de marcadores de anaerobiosis posee relevancia organoléptica. Por ello, se requieren estudios de correlación entre las propiedades organolépticas (gustativas y olfativas) y los valores analíticos de los marcadores de estrés identificados.

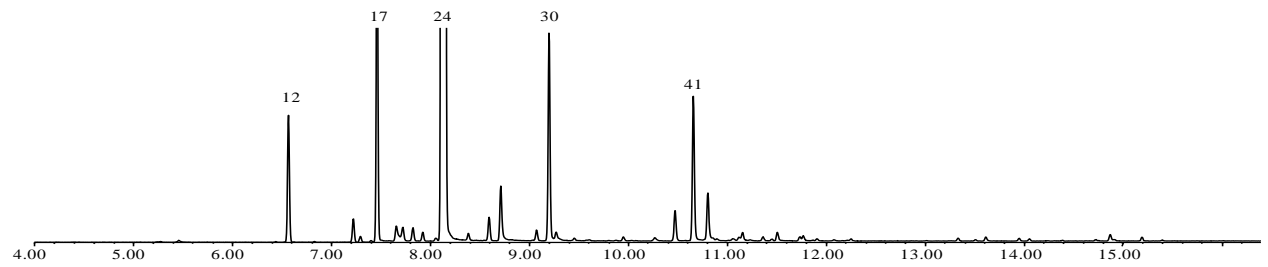
En relación al uso de la metabolómica en el estudio de recubrimientos, será recomendable aumentar el ámbito de su aplicabilidad para la búsqueda de marcadores relacionados con otros factores de calidad nutricional (nutrabólica) y funcional.

Anexo 1.

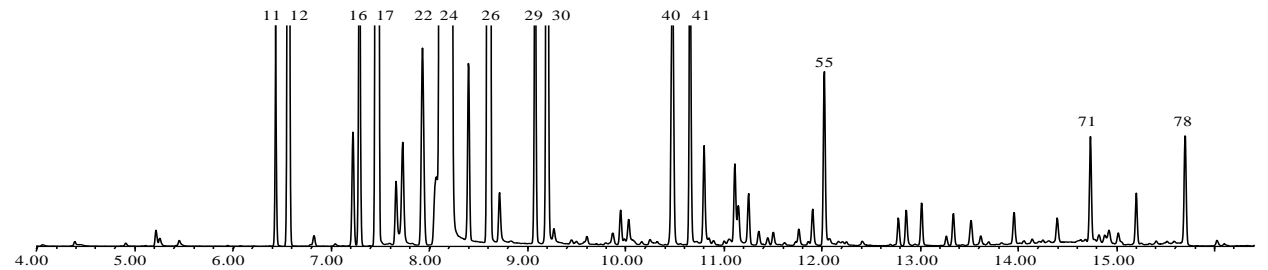
Perfiles cromatográficos de aceites esenciales hidrodestilados a partir de residuos de extracción de zumos, columna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25 μm , J&W Scientific, EE.UU.).

Fase móvil: Helio 1 ml/min, flujo constante
Horno: 40°C por 1 min.
40-200°C a 12°C/min
200-250°C a 12°C/min
250°C por 1 min

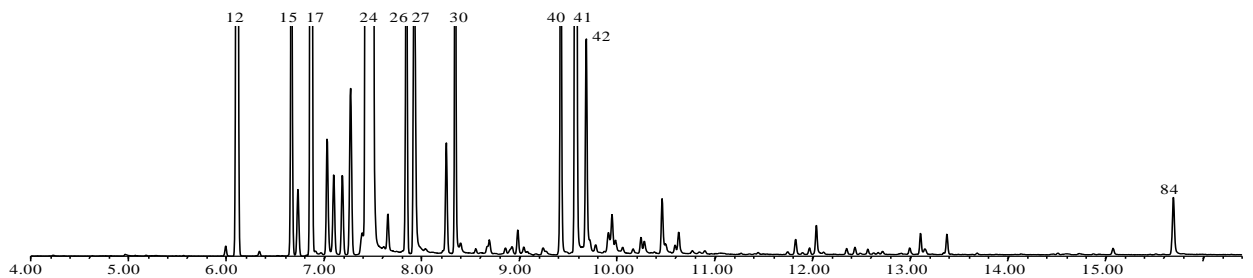
Inyector: split, 280°C
Detector: MSD, modo SCAN
Muestra: 1 μl (30% en cloroformo)



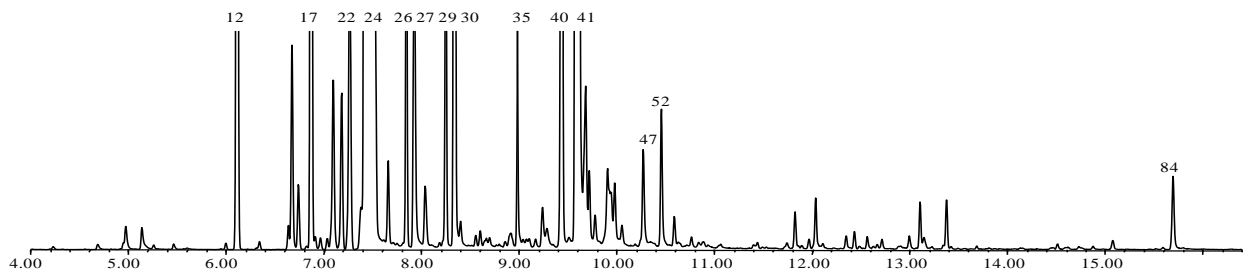
Naranja Valencia Zumex



Naranja Valencia FMC



m. Clementina ZUMEX



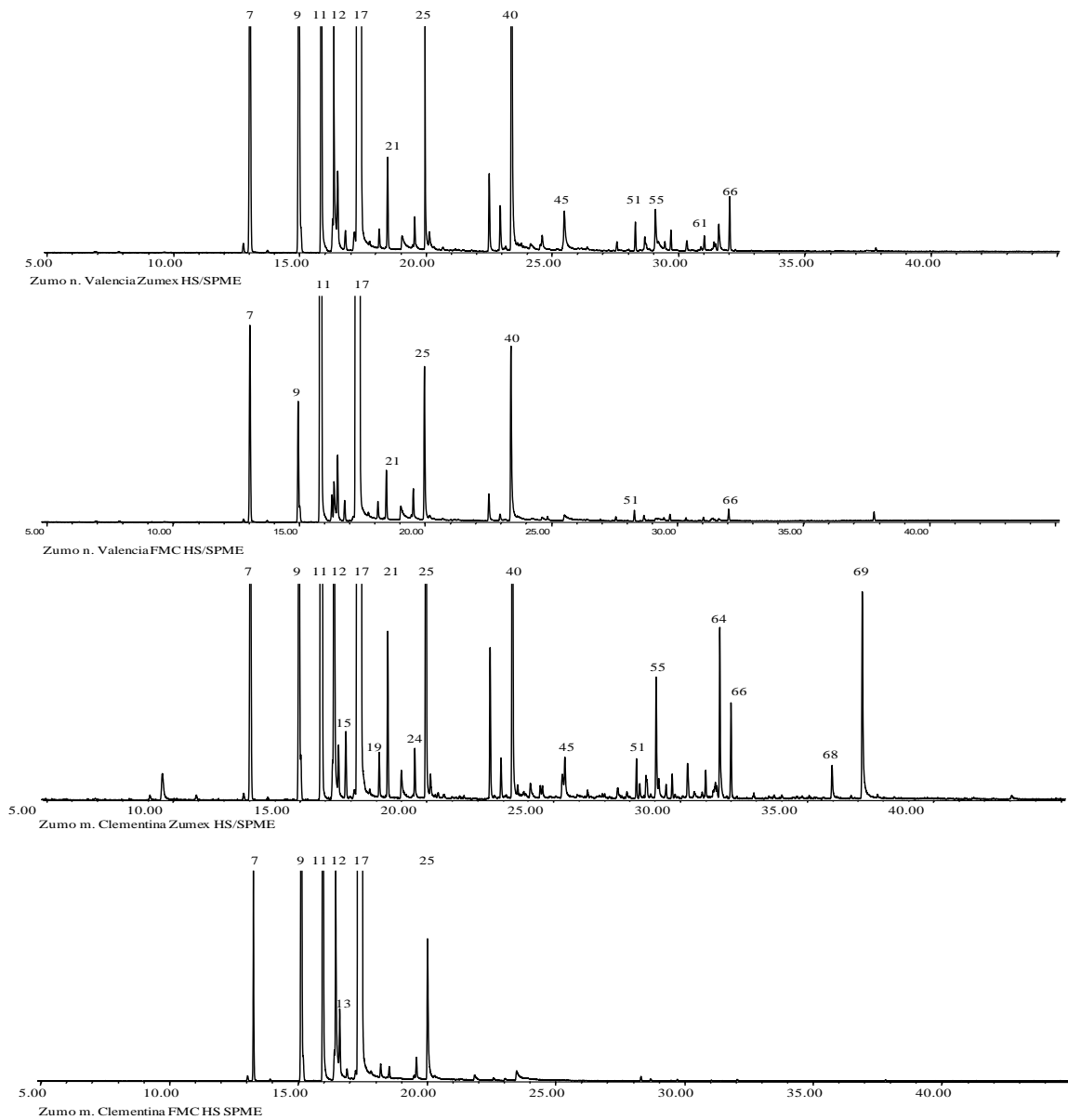
m. Clementina FMC

Anexo 2.

Perfiles cromatográficos de volátiles de zumos, N. Valencia y m. Clementina extraídos mediante microextracción en fase solida, columna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25 μm , J&W Scientific, EE.UU.).

Fase móvil: Helio 1 ml/min, flujo constante
Horno: 40°C por 1 min.
40-200°C a 12°C/min
200-250°C a 12°C/min
250°C por 1 min

Inyector: split, 280°C
Detector: MSD, modo SCAN
Muestra: 1 μl (30% en cloroformo)



Anexo 3.

Target compound para el análisis de perfiles de ácidos grasos en zumos de cítricos

P. ¹	Target compound	Designación	base m/z ²	CAS-No.	IRR ZB 5MSi
1	Acido butanoico, metilester (Butírico)	C4:0	74	623-42-7	728
2	Acido hexanoico, metilester (Caproico)	C6:0	74	106-70-7	927
3	Acido octanoico, metilester (Caprilico)	C8:0	74	111-11-5	1126
4	Acido decanoico, metilester (Caprico)	C10:0	74	110-42-9	1325
5	Acido undecanoico, metilester	C11:0	74	1731-86-8	1424
6	Acido dodecanoico, metilester (Laurico)	C12:0	74	111-82-0	1524
7	Acido tridecanoico, metilester	C13:0	74	1731-88-0	1624
8	Acido miristoleico, metilester	C14:1	55	56219-06-8	1712
9	Acido mirístico, metilester	C14:0	74	124-10-7	1724
10	Acido cis-10-pentadecenoico, metilester	C15:1	55	90176-52-6	1812
11	Pentadecanoic acid, methyl ester	C15:0	74	7132-64-1	1824
12	NN1 isómero	C16:1	55	-	1898.8
13	Acido palmitoleico, metilester	C16:1n7	55	1120-25-8	1903
14	Acido palmitico, metilester	C16:0	74	112-39-0	1922
15	Acido cis-10-heptadecenoico, metilester	C17:1	55	75190-82-8	2003
16	Acido heptadecanoico, metilester (Margárico)	C17:0	74	1731-92-6	2022
17	Acido γ -linolenico, metilester	C18:3n6	79	16326-32-2	2075
18	Acido linoleaidico, metilester	C18:2n6t	67	2566-97-4	2092
19	Acido cis-9 oleico, metilester	C18:1n9c	55	112-62-9	2098
20	Acido (9Z,12Z,15Z)-octadecatrienoico, metilester (α -Linolénico)	C18:3n3	79	301-00-8	2099
21	Acido linoleico, metilester	C18:2n6c	67	112-63-0	2101
22	Acido trans-9-elaidico, metilester	C18:1n9t	55	1937-62-8	2105
23	Acido estearico, metilester	C18:0	74	112-61-8	2122
24	Acido cis-5,8,11,14,17-heicosapentaenoico, metilester	C20:5n3	79	2734-47-6	2264
25	Acido cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico, metilester (Araquidónico)	C20:4n6	79	2566-89-4	2270
26	Acido cis-8,11,14-eicosatrienoico, metilester	C20:3n6	79	21061-10-9	2280.7
27	Acido cis-11,14-eicosadienoico, metilester	C20:2	67	2463-02 7	2295
28	Acido cis-11-eicosenoico, metilester	C20:1	55	2390-09 2	2299.6
29	Acido cis-11,14,17-eicosatrienoico,metilester	C20:3n3	79	55682-88-7	2300.9
30	Acido araquidico, metilester	C20:0	74	1120-28-1	2330
31	Acido heneicosanoico, metilester	C21:0	74	6064-90-0	2429
32	Acido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, metilester	C22:6n3	79	2566-90-7	2452.6
33	Acido cis-13,16-docosadienoico, metilester	C22:2	67	21012-47-3	2497.7
34	Acido cis-13-docosenoico, metilester (Erucico)	C22:1n9	55	1120-34-9	2502
35	Acido behenico, metilester	C22:0	74	929-77-1	2529
36	Acido tricosanoico, metilester	C23:0	74	2433-97-8	2630
37	Acido nervonico, metilester	C24:1	55	2733-88-2	2705.7
38	Acido lignocerico, metilester	C24:0	74	2424-49-1	2732.4

Anexo 4.

Diseño experimental factorial (2^4): 16 corridos experimentales x 1 repetición: 32 corridos, para la selección de formulación hidrocoloidal de componentes básicos.

Corrido	Bloque	Pectina (g)¹	Sorbitol (g)	Cera (g)	Aceite Esencial (1%)²	Respuesta
1	1	4,0	1,8	1,6	1,0	
2	1	2,0	0,9	0,8	-1,0	
3	1	2,0	1,8	1,6	-1,0	
4	1	2,0	1,8	0,8	-1,0	
5	1	4,0	1,8	0,8	-1,0	
6	1	4,0	0,9	1,6	-1,0	
7	1	4,0	0,9	0,8	-1,0	
8	1	4,0	0,9	1,6	1,0	
9	1	4,0	1,8	0,8	1,0	
10	1	4,0	1,8	1,6	-1,0	
11	1	2,0	0,9	1,6	-1,0	
12	1	4,0	0,9	0,8	1,0	
13	1	2,0	0,9	1,6	1,0	
14	1	2,0	0,9	0,8	1,0	
15	1	2,0	1,8	1,6	1,0	
16	1	2,0	1,8	0,8	1,0	
17	2	2,0	1,8	1,6	-1,0	
18	2	4,0	1,8	1,6	-1,0	
19	2	2,0	1,8	0,8	-1,0	
20	2	4,0	0,9	1,6	-1,0	
21	2	2,0	1,8	1,6	1,0	
22	2	2,0	1,8	0,8	1,0	
23	2	2,0	0,9	0,8	-1,0	
24	2	4,0	0,9	0,8	1,0	
25	2	2,0	0,9	0,8	1,0	
26	2	4,0	0,9	1,6	1,0	
27	2	2,0	0,9	1,6	1,0	
28	2	2,0	0,9	1,6	-1,0	
29	2	4,0	1,8	1,6	1,0	
30	2	4,0	0,9	0,8	-1,0	
31	2	4,0	1,8	0,8	1,0	
32	2	4,0	1,8	0,8	-1,0	

¹ Cantidades en gramos para preparar 100 gramos de formula.

² El peso del aceite esencial a utilizar depende de su densidad.

Tabla 1, anexo 4. Composición de mezcla de volátiles utilizado en el ensayo de formulación de partida y monitoreados en películas comestibles mediante GC/MSD.

Componente	Nombre	% FV ²
1	n-Octanal	11
2	Limoneno	11
3	trans-Ocimeno	11
4	gama-Terpineno	11
5	Terpinoleno	11
6	beta-Linalool	11
7	alfa-Terpineol	11
8	Carvacrol	11
9	Metil-N-metilantranilato	11

¹ Ion base para adquisición de señales y cuantificación SIM.

² Porcentaje de cada componente en la fracción volátil de referencia utilizada para el ensayo de formulación.

Condiciones de análisis en modo SIM de volátiles incorporados en las formulaciones.

Fase móvil: Helio 1 ml/min, flujo constante
 Horno: 40°C por 1 min.
 40-200°C a 12°C/min
 200-250°C a 12°C/min
 250°C por 1 min
 230°C

Inyector: splitless, 280°C
 Detector: MSD, modo SIM
 Muestra: 1 µl (total disuelto en metanol)

Adquisición de masas: Temperatura de la fuente:

Temperatura del cuádrupolo: 150°C

Ganancia: Gain factor 2

Grupos de iones: ver tabla 2, anexo 4.

Niveles de cuantificación de volátiles

Cada compuesto se adquirió cuantitativamente, para conocer su concentración se prepararon líneas de calibración con cuatro niveles de concentración para cada analito (0,5 ppm; 1 ppm; 3 ppm; 5 ppm), cada nivel cuantitativo se adquirió tres veces y a su vez cada línea de calibración se construyó mediante tres replicas. Se efectuaron pruebas de factores de respuesta para evaluar la linealidad, donde el máximo coeficiente de variación (%CV) fue de 1,96. Se aceptaron líneas de calibración un mínimo r: 99,953.

Tabla 2, anexo 4. Características de adquisición de grupos de iones en modo SIM.

Señal	IRR ¹	Nombre	Ion base ² ± 0,1 uma	Dwell time (msec)	Correlación r	Linealidad (CV < 5%)
1	999	n-Octanal	43	50	99,996	1,56
2	1029	Limoneno	68	50	99,999	1,47
3	1050	trans-Ocimeno	93	50	99,999	1,32
4	1060	gama-Terpineno	93	50	99,999	1,91
5	1090	Terpinoleno	93	50	99,983	1,39
6	1096	beta-Linalool	71	50	99,999	1,22
7	1100	ISTD C11	57	50	99,987	1,54
8	1188	alfa-Terpineol	59	50	99,994	1,96
9	1298	Carvacrol	135	50	99,978	1,09
10	1336	Metil-N-metilantranilato	105	50	99,953	1,88

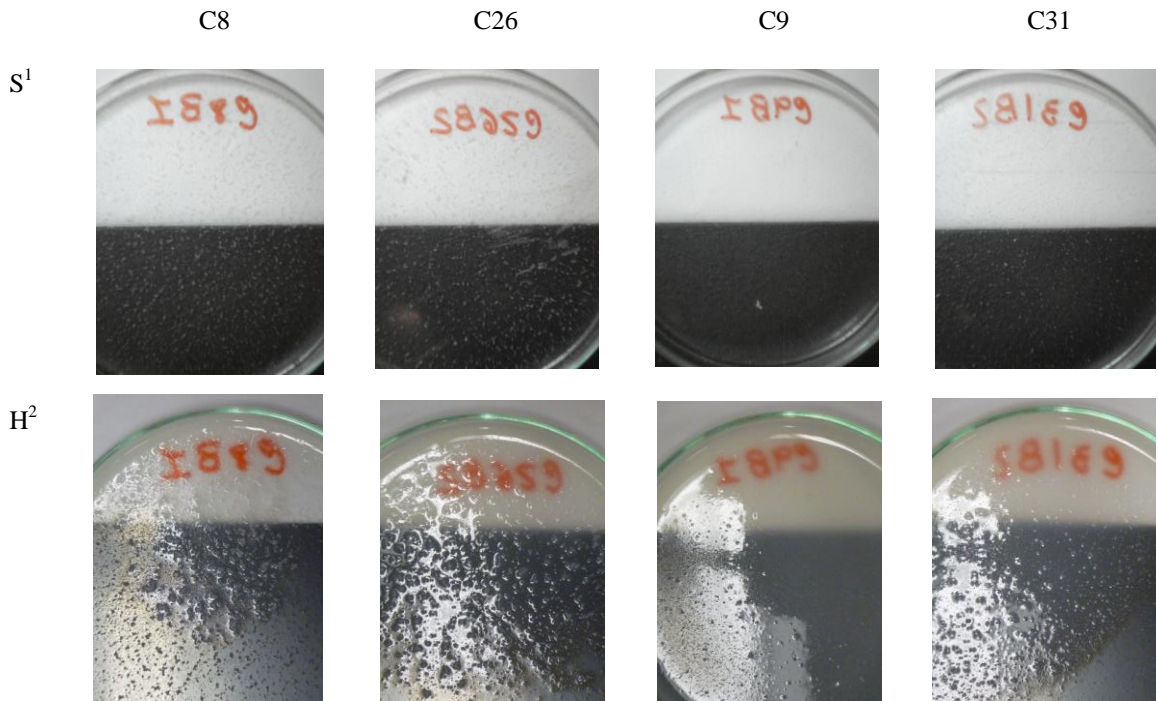
¹ Índice de retención relativa en columna HP5 MS (30 m, 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25 µm, J&W Scientific, EE.UU.).

² Ion base para cuantificación con rango de adquisición de masas de 0,1 unidades de masa (uma).

Anexo 5.

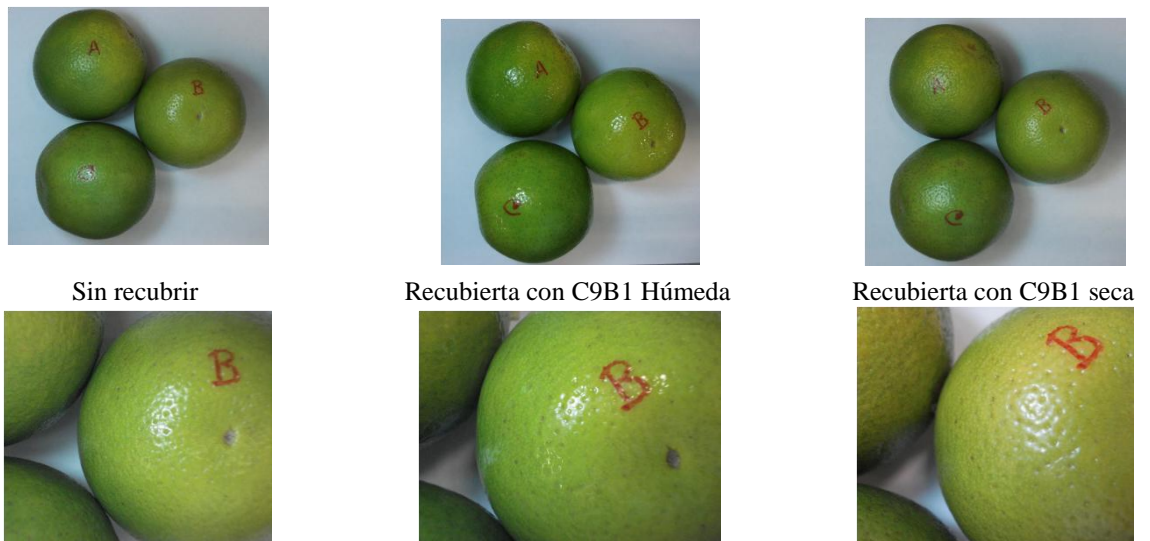
Fijación fotográfica del aspecto macroscópico de algunas formulaciones con componentes básicos, según diseño experimental anexo 4.

Figura 1, anexo 5. Aspecto macroscópico de corridos experimentales formadores de película.



¹ Formulación seca. ² Formulación húmeda.

Figura 2, anexo 5. Apariencia de frutos de naranja Valencia recubiertos con formulación corrido C9.



Anexo 6.

Tabla 1, anexo 6. Cuantificación de componentes volátiles de referencia en películas de recubrimiento secas, según plan experimental anexo 4.

Componentes	Contenido de componentes volátiles en la película seca ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)															
	Pares de replicas															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	C1	C29	C8	C26	C9	C31	C12	C24	C13	C27	C14	C25	C15	C21	C16	C22
n-Octanal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Limoneno	28,28	21,75	30,46	28,28	53,30	51,12	29,37	31,54	9,79	7,61	29,37	31,54	42,42	40,24	7,61	10,88
trans-Ocimeno	39,91	36,59	54,32	52,11	58,76	62,09	ND	ND	ND	ND	51,00	52,11	63,19	59,87	15,52	12,20
gama-Terpineno	11,81	17,18	37,57	42,94	41,87	42,94	33,28	31,13	9,66	10,74	47,24	46,16	56,90	55,82	12,88	16,10
Terpinoleno	11,01	9,91	31,93	30,83	39,64	41,84	8,81	6,61	4,40	5,51	37,44	36,34	47,35	44,05	44,05	41,84
beta-Linalool	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
alfa-Terpineol	ND	ND	ND	ND	51,71	54,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carvacrol	52,80	50,28	55,31	57,83	62,86	61,60	23,89	25,14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metil-N-metilantranilato	50,84	48,01	64,96	67,78	70,61	69,20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Anexo 7.

Tabla 1, anexo 7. Incorporación de goma tragacanto y aceites comestibles comerciales AO y AP.

Corrido	Pectina (g/100 mL)	Sorbitol (g)	Cera (g)	Aceite Esencial (1%)	Goma tragacanto	AO	Respuesta
1	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	2,0	
2	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	
3	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
4	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	1,0	
5	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
6	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	1,0	
7	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	2,0	
8	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	
Corrido	Pectina (g/100 mL)	Sorbitol (g)	Cera (g)	Aceite Esencial (1%)	Goma tragacanto	AP	Respuesta
9	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	2,0	
10	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	
11	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
12	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	1,0	
13	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
14	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	1,0	
15	4,0	1,8	0,8	1,0	2,0	2,0	
16	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	

Tabla 2 anexo 7. Plan experimental para el mejoramiento de la fluidez con los nuevos elementos en la formulación.

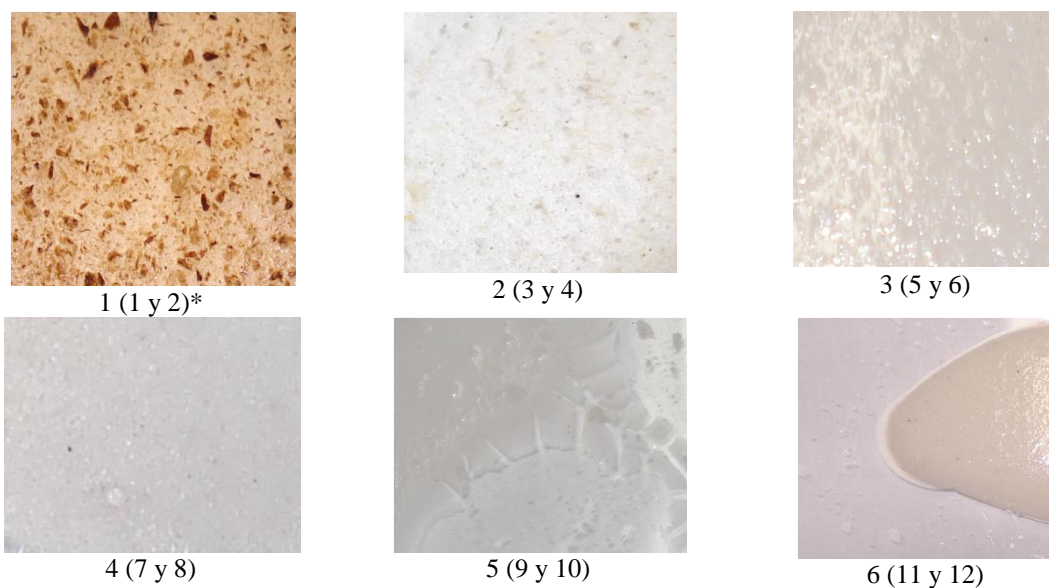
Corrido	Pectina (g/100 mL)	Sorbitol (g)	Cera (g)	Aceite esencial 1%	Goma tragacanto	AO	Respuesta
1	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
2	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
3	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	0,5	
4	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	0,5	
5	4,0	1,8	0,8	1,0	0,5	0,5	
6	4,0	1,8	0,8	1,0	0,5	0,5	
Corrido	Pectina (g/100 mL)	Sorbitol (g)	Cera (g)	Aceite esencial 1%	Goma tragacanto	AO	Respuesta
7	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	
8	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	
9	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
10	4,0	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
11	4,0	1,8	0,8	1,0	0,5	1,0	
12	4,0	1,8	0,8	1,0	0,5	1,0	

Anexo 8.

Tabla 1, anexo 8. Plan experimental para la incorporación de pectina cítrica y pectinas modificadas.

Corrido	Pectina (g/100 gr)	Sorbito l (g)	Cera (g)	Aceite Esencial (1%)	Goma tragacanto	AO	Respuesta
1	4,0 GISB I ¹	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
2	4,0 GISB I	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
3	4,0 GISB II ²	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
4	4,0 GISB II	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
5	4,0 Rapida USP ³	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
6	4,0 Rapida USP	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
7	4,0 Sigma ⁴	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
8	4,0 Sigma	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
9	4,0 Sigma ⁵	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
10	4,0 Sigma	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
11	4,0 Sigma ⁶	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	
12	4,0 Sigma	1,8	0,8	1,0	1,0	1,0	

Figura 1, anexo 8. Aspecto macroscópico de películas secas sobre vidrio



* 1 (1 y 2), pectina 1 (corridos 1 y 2).

¹ Extraída mediante metodología Capítulo 1, pH 1

² Extraída mediante metodología Capítulo 1, pH 4

³ Pectina rápida grado alimentos USP. Adquirida en Bellchem Medellín-Col.

⁴ Pectin from citrus fruits. Sigma P9135-Batch 079K0042

⁵ Pectin esterified, from citrus fruit. Sigma P9561-Batch 018K1650

⁶ Pectin, esterified potassium salt, from citrus fruit. Sigma P9436-Batch 069K0976

Figura 2, anexo 8. Detalles de defectos mayores en películas de recubrimientos, fotografías estereoscópicas.

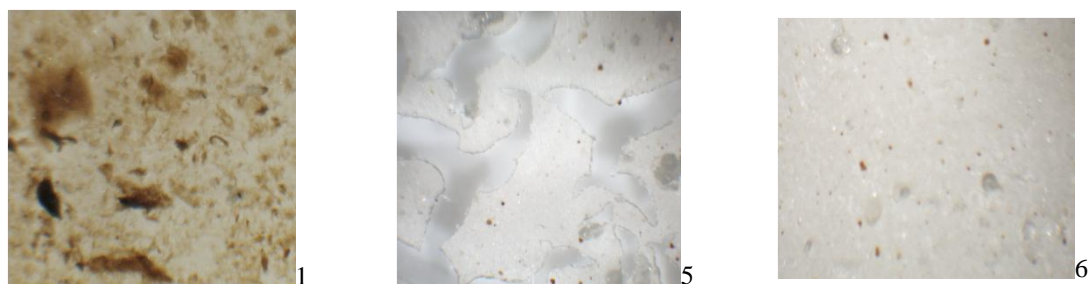


Figura 3, anexo 8. Aspecto de recubrimientos aplicados sobre frutos

