



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

“EFECTO DE CUBIERTAS COMESTIBLES CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO Y/O PROPÓLEO SOBRE LA CALIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRESAS (*Fragaria x ananassa*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A:
BIOL. MIRIAM DEL CARMEN MARTÍNEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA

CODIRECTORA
DRA. ZORMY NACARY CORREA PACHECO

COMITÉ TUTORAL
DRA. AZUCENA SALAZAR PIÑA
DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS

CUERNAVACA, MORELOS

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente quiero externar mi más profunda gratitud a la Dra. Margarita Ramos García por haberme dado la confianza para realizar este trabajo, por su paciencia, dedicación, motivación y aliento, ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda ya que sin usted no hubiera sido posible concluir esta investigación.

Agradezco infinitamente a la Dra. Zormy Nacary Correa Pacheco por todo el apoyo brindado durante el recorrido de la maestría, su dedicación incondicional en este trabajo y su capacidad de guiar mis ideas. Pero sobre todo, agradezco su calidez, consejos y valiosa amistad. Ha sido un aporte invaluable en mi desarrollo profesional y personal.

a la Dra. Silvia Bautista Baños por su apoyo desde el momento en que me dio la oportunidad de realizar este trabajo en el laboratorio de Tecnologías Postcosecha, por su confianza para llevarlo a cabo y proporcionarme las herramientas para concluir esta etapa, compartiendo sus grandes conocimientos.

A la Dra. Azucena Salazar Piña por tomarse el tiempo y la dedicación de fortalecer mi trabajo, por sus acertadas observaciones y sugerencias las cuales fueron de mucha ayuda para mi trabajo.

Especial agradecimiento a la Maestra María Luisa Corona Rangel, por instruirme y darme las bases para llevar a cabo este proyecto, gracias por toda la paciencia que tuvo conmigo, fue una pieza clave para esta investigación.

Al Dr. Jesús Hernández Romano por brindarme el acceso a su laboratorio, por su amabilidad y orientación en todo momento.

Al equipo de investigación y compañeros del laboratorio de Tecnologías Postcosecha, por hacer amena mi estancia y brindarme su apoyo siempre.

Al financiamiento otorgado por el programa PRODEP UAEMOR-PTC-403 para llevar a cabo este proyecto de tesis.

DEDICATORIAS

A Dios que siempre me diste la fuerza y paciencia necesaria para realizar esta meta. Porque por ti y para ti hago todo.

A mi esposo, que me brindó el apoyo desde el inicio de este proyecto, por tu gran paciencia y motivación que me diste en esos días que sentía que no podía más. Te amo.

A mis padres que sin su apoyo no hubiera sido posible llegar a donde estoy ahora, a ustedes les debo todo.

A mis hermanos que jamás dejan de apoyarme e impulsarme a dar lo mejor de mí. Por estar siempre conmigo en los momentos difíciles y en los más felices también.

Por último, a todos mis amigos que hacen que mi vida sea más divertida y que me hacen sentir que nunca estaré sola, los tengo a ellos.

RESUMEN

Los frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) son apreciados por su contenido de vitaminas, fibra y compuestos antioxidantes. Estos compuestos ayudan a la prevención y/o disminución de enfermedades crónico no transmisibles. Sin embargo, al poseer una epidermis delgada y elevada respiración son susceptibles al deterioro microbiológico, a la pérdida de componentes nutrimentales y a una corta vida de anaquel. Para reducir estos problemas, se ha propuesto el uso de cubiertas comestibles adicionadas con compuestos de origen natural como el quitosano (Q) y el propóleo (P), los cuales han demostrado ser antioxidantes y con amplia actividad antimicrobiana. Actualmente, la aplicación de la nanotecnología permite potenciar estos efectos al ser éstas más reactivas y eficientes. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar y evaluar el efecto de cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano (NPQ) y extracto de propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de la fresa durante el almacenamiento. Se evaluaron cinco formulaciones con NPQ y/o propóleo (Q, Q+NPQ, Q+NPQ+P10%, Q+NPQ+P20%, Q+NPQ+P30%) y un control (sin cubierta). Se recubrieron 100 fresas por tratamiento y fueron almacenadas durante ocho días a $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se evaluaron las variables de atributos de calidad (pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), color y presencia de microorganismos), capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides totales. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$). La cubierta de Q+NPQ+P10% mantuvo la calidad post-cosecha de la fresa por más tiempo ya que se observó una menor pérdida de peso, mayor firmeza y AT sin afectar las variables de color y SST. Las cubiertas adicionadas con extracto de propóleo (Q+NPQ+P10, 20 y 30%) presentaron los niveles de capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales más altos. Así mismo, estas tuvieron mayor inhibición a nivel *in vitro* contra bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*). Las cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o propóleo son una alternativa viable para la conservación post-cosecha de la fresa y mantener sus compuestos antioxidantes por más tiempo.

ABSTRACT

Strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) are appreciated for their vitamin content, fiber and antioxidant compounds. These compounds help prevent and/or reduce chronic non-communicable diseases. However, strawberries have a thin epidermis and high respiration rate. Therefore, they are susceptible to microbiological deterioration, loss of nutrient components and have a short shelf life. To reduce these problems, the use of edible coatings added with compounds of natural origin such as chitosan (Q) and propolis (P), which have been shown to be antioxidants and with extensive antimicrobial activity, is proposed. Nowadays, the application of nanotechnology makes possible to enhance these effects, because nanometric structures are more reactive and efficient. The objective of this research was to develop and evaluate the effect of edible coatings based on chitosan nanoparticles (NPQ) and propolis extract on the quality and antioxidant capacity of the strawberry during storage. Five formulations with NPQ and/or propolis (Q, Q+NPQ, Q+NPQ+P10%, Q+NPQ+P20%, Q+NPQ+P30%) and a control (no coating) were evaluated. Experimentally, 100 strawberries were coated per treatment and stored for eight days at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. The quality attributes (weight loss, firmness, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), color and presence of microorganisms), antioxidant capacity, phenolic compounds and total flavonoids were evaluated. The data of the results were analyzed using an ANOVA and Tukey mean comparison test ($p < 0.05$). The Q+NPQ+P10% coating maintained the post-harvest quality of the strawberry for longer with less weight loss, higher firmness and TA without affecting the color variables and TSS. The coatings added with propolis extract (Q+NPQ+P10, 20 and 30%) showed the highest levels of antioxidant capacity, phenols and total flavonoids. They also had higher inhibition *in vitro* against pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*). Edible coatings added with chitosan and/or propolis nanoparticles are a viable alternative for post-harvest conservation of the strawberry keeping its antioxidant compounds for longer.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	XI
SIMBOLOGÍAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Fresa	3
2.1.1 Calidad de la fresa	4
2.2 Capacidad antioxidante	8
2.2.1 Radicales libres.....	8
2.2.2. Estrés oxidativo.....	8
2.3 Problemática de la fresa.....	13
2.3.1 Conservación post-cosecha.....	13
2.3.2 Contaminación microbiana de la fresa	14
2.4 Cubiertas comestibles	15
2.4.1 Quitosano.....	16
2.4.2 Propóleo.....	18
2.5 Nanotecnología	21
2.5.1 Importancia de la nanotecnología	22
2.5.2 Actividad biológica de nanopartículas de quitosano	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 General	27
5.2 Específicos	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Material biológico	28

6.2 Extracción del propóleo.....	29
6.3 Caracterización de nanopartículas de quitosano y las cubiertas comestibles.	29
6.3.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano	29
6.3.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	31
6.3.3 Potencial Z y Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	31
6.3.4 Microscopia óptica	31
6.3.5 Elaboración de las cubiertas comestibles	32
6.3.6 Formulación de los tratamientos	33
6.4 Evaluación del efecto de cubiertas comestibles sobre los atributos de calidad de la fresa.	34
6.4.1 Aplicación de las cubiertas comestibles en las fresas.....	34
6.4.2 Evaluación de los atributos de calidad de la fresa	34
6.5 Evaluación del efecto de cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	40
6.5.1 Determinación de la capacidad antioxidante.....	40
6.5.2 Determinación de compuestos fenólicos.....	41
6.5.3 Determinación de flavonoides totales	41
6.6 Análisis estadístico.....	42
7. RESULTADOS	43
7.1 Caracterización de nanopartículas de quitosano.....	43
7.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	43
7.1.2 Potencial z y dispersión dinámica de luz (DLS)	45
7.1.3 Microscopia óptica	47
7.2 Evaluación de los atributos de calidad de la fresa.....	48
7.2.1 Pérdida de peso	48
7.2.2 Firmeza	49
7.2.3 Sólidos solubles totales (SST)	50
7.2.4 Acidez titulable (AT)	51
7.2.5 Color	52
7.2.6 Evaluación antibacteriana de las cubiertas comestibles	55

7.3 Evaluación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides totales de las fresas	59
7.3.1 Capacidad antioxidante (porcentaje de inhibición del DPPH)	59
7.3.2 Fenoles totales.....	60
7.3.3 Flavonoides totales	61
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIONES	72
10. ANEXOS.....	73
10.1 Caracterización del propóleo (Anexo 1).	73
11. REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Frutos de fresas provenientes de Coatlán del Río, Morelos.	28
Figura 2.	Síntesis de nanopartículas de quitosano por el método de nanoprecipitación.	30
Figura 3.	Desarrollo de las cubiertas comestibles.	32
Figura 4.	Aplicación de las cubiertas comestibles a las fresas.	34
Figura 5.	Mediciones de los atributos de calidad de las fresas con la cubierta comestible.	37
Figura 6.	Evaluación del efecto de los tratamientos mediante la metodología de las diluciones seriadas.	40
Figura 7.	Determinación del tamaño de NPQ en diferentes soluciones.	44
Figura 8.	Tamaño de distribución de partícula de nanopartículas de quitosano en diferentes soluciones.	46
Figura 9.	Corte histológico de fresas con cubiertas comestibles vistas en el microscopio óptico a una magnificación de 10x.	47
Figura 10.	Representación gráfica de la pérdida de peso diaria de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.	48
Figura 11.	Desarrollo de UFC de <i>E. coli in vitro</i> tratados con cubiertas comestibles.	56
Figura 12.	Desarrollo de UFC de <i>L. monocytogenes in vitro</i> tratados con cubierta comestible.	57
Figura 13.	Desarrollo de UFC de <i>S. enteritidis in vitro</i> tratados con cubierta comestible.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Aporte nutricional de la fresa.	6
Tabla 2.	Diferentes biomarcadores de estrés oxidativo asociados al consumo de fresas.	11
Tabla 3.	Componentes y formulación de los tratamientos evaluados.	33
Tabla 4.	Resultados del Potencial Z de las nanopartículas de quitosano en diferentes soluciones.	45
Tabla 5.	Valores de firmeza de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.	49
Tabla 6.	Contenido de °Brix de los frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.	50
Tabla 7.	Contenido de AT de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.	51
Tabla 8.	Valores de Luminosidad (L*) de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.	52
Tabla 9.	Valores de Cromaticidad (C*) de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.	53
Tabla 10.	Valores de ángulo de matiz (H°) de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de	54

	quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.	
Tabla 11.	Número de unidades formadoras de colonias de <i>E.coli</i> a dos diluciones diferentes (10^{-4} y 10^{-5}) presentes en los medios de cultivo adicionados con cubierta comestible después de 24 y 48 h.	55
Tabla 12.	Número de unidades formadoras de colonias de <i>L.monocytogenes</i> a dos diluciones diferentes (10^{-4} y 10^{-5}) presentes en los medios de cultivo adicionados con cubierta comestible después de 24 y 48 h	57
Tabla 13.	Número de unidades formadoras de colonias de <i>S.enteritidis</i> a dos diluciones diferentes (10^{-4} y 10^{-5}) presentes en los medios de cultivo adicionados con cubierta comestible después de 24 y 48 h.	58
Tabla 14.	Porcentaje de DPPH de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.	60
Tabla 15	Contenido de fenoles totales de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.	61
Tabla 16	Valores de flavonoides totales de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.	62

ABREVIATURAS

ECNT	Enfermedades crónico no transmisibles
ECV	Enfermedad cardiovascular
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
FAO	Food and Agriculture Organization
NOM	Norma Oficial Mexicana
ERO	Especies reactivas de oxígeno
AAC	Actividad antioxidante celular
CARO	Capacidad de absorción de radical oxígeno
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
DPPH	2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
SST	Sólidos solubles totales
AT	Acidez titulable
UFC	Unidades formadoras de colonias
CICATA	Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada
CNMM	Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías
IPN	Instituto Politécnico Nacional
UPEMOR	Universidad Politécnica del Estado de Morelos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
OMS	Organización Mundial de la Salud
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión (por sus siglas en inglés).
DLS	Dynamic Light Scattering (por sus siglas en inglés).
ANOVA	Análisis de la varianza
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
AC	Aceite esencial de canela
DE	Desviación estándar

EEP	Extracto etanólico de propóleo
NPQ	Nanopartículas de quitosano
NPs	Nanopartículas
P	Propóleo
Q	Quitosano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico

SIMBOLOGÍAS

m	Metros
cm	Centímetros
h	Horas
°C	Grados Celsius
°Brix	Grados Brix, cociente total de materia seca disuelta en un líquido
%	Porcentaje
mg	Miligramos
g	Gramos
ml	Mililitros
Abs	Absorbancia
min	Minutos
µg	Microgramos
N	Newtons
L*	Luminosidad
C*	Croma
Hue°	Ángulo de matiz
mPa	Megapascal
kV	Kilovoltio
mV	Milivoltios
µL	Microlitro
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Luz ultravioleta
\bar{x}	Media

1. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es uno de los frutos de mayor aceptación a nivel mundial, reconociéndose por sus características sensoriales y nutrimentales. Posee una variedad de compuestos esenciales para la salud humana, tales como micronutrientes, minerales, vitamina C, E, beta carotenos, folatos y compuestos fenólicos. Estos últimos, están vinculados con el alto nivel de capacidad antioxidante que se le atribuye a la fresa¹. Los compuestos bioactivos de la fresa, exhiben importantes actividades biológicas tanto en estudios *in vivo* como en *in vitro*, esto sugiere una posible relación entre los compuestos antioxidantes de la fresa y la prevención y/o disminución de enfermedades crónicas degenerativas ya que los compuestos antioxidantes actúan previniendo la generación excesiva de radicales libres, evitando así que se produzca el daño celular por efecto del estrés oxidativo^{2,3}.

La fresa es un fruto no climatérico, posee una epidermis muy delgada y frágil que lo hace ser muy susceptible al daño mecánico durante la cosecha, almacenamiento y procesamiento, ocasionando un deterioro en el color, la textura y el sabor. Además, La conservación de los compuestos funcionales de la fresa también se ve afectada por su vida de anaquel corta. Por otra parte, al ser de epidermis comestible, son las que presentan mayores posibilidades de convertirse en vehículos de microorganismos patógenos. En las últimas décadas se han incrementado los problemas de salud de los consumidores por la contaminación de bacterias enteropatógenas en este tipo de alimentos^{4,5}. Esta problemática ha estimulado la búsqueda de nuevos sistemas naturales de conservación, entre ellos, las cubiertas comestibles. El propósito del uso de estas cubiertas para frutas y hortalizas es retardar los cambios fisiológicos, extender la vida útil y evitar la pérdida de componentes importantes como los antioxidantes. Además, sirven como vehículos para incorporar aditivos específicos que refuerzan su funcionalidad tales como antioxidantes y antimicrobianos⁶.

Se han utilizado polisacáridos como el quitosano para formar cubiertas comestibles, esto se debe a la capacidad que presenta el quitosano para constituir una matriz estructural directamente sobre la superficie del fruto transparente y homogénea. Además, se ha evidenciado su efecto antibacteriano y antifúngico, se ha utilizado para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de los productos hortofrutícolas⁷. El propóleo es otra sustancia natural que ha sido empleada en los recubrimientos. Está constituido por una gran variedad de compuestos químicos como los fenólicos, flavonoides, etc. Aplicado a productos hortofrutícolas ha demostrado conservar los atributos de calidad y además servir como un vehículo de compuestos antioxidantes^{8,9}.

En la búsqueda de mejores funcionalidades de las cubiertas se ha estudiado el uso de materiales a escala nanométrica. Se han utilizado nanocompuestos en cubiertas poliméricas las cuales al enlazarse con la matriz ofrecen una mayor resistencia mecánica o una barrera para el intercambio de gases y compuestos volátiles¹⁰. En este sentido, al aplicar nanopartículas en cubiertas comestibles, se pretende mejorar la relación y sinergia con los compuestos debido a la mayor interacción área superficie y como consecuencia mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera. Así mismo, potenciar los efectos sobre las características deseadas en el fruto como la capacidad antioxidante y atributos de calidad.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar el efecto de cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o extracto de propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de la fresa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fresa

La fresa pertenece a la familia de las Rosáceae, al género *Fragaria*, y especie *F. ananassa*, su nombre procede del latín “fragans” que significa fragante, es una de las frutas de mayor aceptación mundial con múltiples usos industriales como mermeladas, purés, concentrados, helados, bases para yogurt, etc. Es una fruta apreciada por sus excelentes propiedades organolépticas, pero extremadamente perecedera, debido a su textura suave, alta sensibilidad al ablandamiento y susceptibilidad a microorganismos¹¹. La planta de fresa es de tipo herbáceo y perenne. El sistema radicular es fasciculado, se compone de raíces y raicillas. En condiciones óptimas pueden alcanzar los 2 a 3 m, aunque lo normal es que no sobrepasen los 40 cm, encontrándose la mayor parte (90%) en los primeros 25 cm. La fresa es en realidad un falso fruto, formado por el engrosamiento del receptáculo floral en el que están insertos los verdaderos frutos llamados aquenios, integrados en el receptáculo que es la parte carnosa comestible. Es nativa de regiones templadas alrededor del mundo incluyendo partes de Norteamérica. La planta es termoperiódica y fotoperiódica, es decir que su crecimiento depende de las condiciones de luz y temperatura. Es un cultivo que se adapta a muchos tipos de climas, pero la temperatura óptima para fructificación adecuada está entre los 15 y 20 °C. La influencia del suelo, su estructura física y contenido químico en cuanto a nutrientes son las bases para un buen desarrollo. Requieren suelos ricos en materia orgánica, bien aireados, drenados, pero con cierta capacidad de retención de agua¹².

Las fresas generalmente se cosechan manualmente debido a su sensibilidad y vulnerabilidad al daño mecánico. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-062-SCFI-2002, la fresa debe cosecharse con un 75 % de madurez o $\frac{3}{4}$ de sazón para lograr la máxima calidad en términos de apariencia visual (frescura, color, ablandamiento y desordenes fisiológicos), textura (firmeza y jugosidad), el sabor y valor nutricional (vitaminas, minerales, fibra dietética y fitonutrientes). conforme la fresa madura en la planta, el peso, el % de sólidos solubles, ácido ascórbico y pectinas solubles en agua

aumentan; mientras que, la acidez, fenoles totales y actividad de polifenoloxidasas disminuyen¹³.

Es un fruto altamente perecedero con cortos periodos de maduración y senescencia, lo cual hace que su comercialización sea un desafío. Fisiológicamente se caracteriza como un fruto no climatérico, con ausencia o muy limitada producción de etileno postcosecha, pero con un importante número de compuestos volátiles identificados, que junto a su condición de altamente perecedera, le hace evolucionar rápidamente con importantes pérdidas por la contaminación microbiana, razón por la que la cadena del frío, incluyendo la pre refrigeración, es de vital importancia. Su tasa de respiración es alta, aproximadamente 15 mg/ kg / h a 0°C y aumenta de 4 a 5 veces cuando la temperatura se eleva a 10°C. Se puede reducir la tasa al mantener las fresas a bajas concentraciones de O₂ y atmósferas altas de CO₂. Bajos niveles de O₂ en el ambiente pueden inducir procesos de fermentación en las frutas ocasionando la producción de malos olores, sabores y el deterioro del producto^{14,13}.

2.1.1 Calidad de la fresa

La calidad es la percepción del conjunto de atributos de un producto, los cuales son evaluados constantemente en forma subjetiva y objetiva por el consumidor. Los atributos de un producto como el tamaño, color, forma apropiada son otros de los criterios de calidad más importantes. El sabor y la textura son también factores de calidad de los productos hortofrutícolas, la firmeza está relacionada con la resistencia al estrés mecánico durante el transporte, además, un color y olor característico es deseable ya que indica madurez y refleja calidad de consumo¹⁴. En el óptimo manejo y cuidado de los atributos de frutas y hortalizas, radica la calidad y en ella la aceptación o el rechazo de las mismas. Una de las normas de calidad que debe cumplir el fruto de fresa para el consumo en fresco en México, es la norma NMX-FF-062-SCFI-2002, la cual menciona las especificaciones mínimas de calidad que deben cumplir los frutos¹⁵.

2.1.1.1 Contenido de sólidos solubles (SST)

Los azúcares son uno de los principales componentes solubles en los frutos blandos los cuales proveen energía para la mayor parte de las reacciones metabólicas. Dentro del total de sólidos solubles existen otros compuestos además de los azúcares; tales como ácidos orgánicos, sin embargo, éstos constituyen el 85% del total de sólidos solubles. Es por eso que frecuentemente se considera a los °Brix como equivalentes de los sólidos solubles. Los azúcares que se encuentran principalmente en el fruto de fresa son sacarosa, glucosa y fructuosa, que en conjunto representan el 99% del total de los azúcares de las frutas maduras. Asimismo, se encuentran la ribosa, arabinosa, xilosa, manosa y galactosa. Las fresas son aceptables con un contenido de sólidos solubles mínimo de 7 °Brix¹⁶.

2.1.1.2 Acidez titulable (AT)

El ácido cítrico es el ácido orgánico principal contenido en el fruto de fresa y el ácido ascórbico es la forma predominante de la vitamina C. La concentración de éste ácido varía entre genotipos y es relativamente más alto en frutos maduros. Se aceptan las fresas con una AT de 0.8 % como valor máximo¹⁶.

2.1.2.3 Color

El color de las fresas es equivalente al contenido de antocianinas en la epidermis y en la corteza, la colorimetría es el único de los métodos fisicoquímicos que no requiere la destrucción de la muestra. Para realizar la medición se utiliza un aparato calibrado denominado colorímetro. En el caso de variedades rojas se realizan mediciones de color tanto en las zonas más coloreadas como en las menos coloreadas. La función del colorímetro es describir la epidermis de los frutos¹⁷.

2.1.2.4 Firmeza

La textura de las frutas cambia debido a la hidrólisis de los almidones y de las pectinas, por la reducción de su contenido de fibra y por los procesos de degradación de las paredes celulares. Las frutas se tornan blandas y más susceptibles de ser dañadas durante el manejo post-cosecha debido al manejo o mal manejo que se les da. La pérdida de agua es una de las causas principales de deterioro, da como resultado no solamente pérdida cuantitativa directa, si no también pérdidas en la apariencia (marchitamiento y deshidratación) y la calidad en la textura (ablandamiento, flacidez, pérdida de una textura crujiente y jugosidad), así como su valor nutricional¹⁶.

2.1.2.5 Calidad nutricional de la fresa

Las propiedades nutricionales encontradas en las fresas, la hacen ser un fruto de excelencia para el consumidor. Dentro de su composición química destaca la presencia de Vitamina C, taninos, flavonoides, antocianinas y ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico), también tiene un importante contenido de vitaminas: A, B6; sustancias minerales; zinc, sodio, calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio; grasas y azúcares, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Aporte nutricional de la fresa

Nutriente	Por cada 100g de fruta
Agua	90.95g
Proteínas	0.67g
Lípidos	0.3g
Fibra	2 g
Azúcares	4.89 g
Calcio	16mg

Magnesio	13 mg
Fósforo	24 mg
Potasio	153 mg
Vitamina C	58.8 mg
Vitamina E	0.29 mg
Beta Caroteno	7 µg
Luteína Y Zeaxantina	26 µg

Fuente: Adaptado de Giampieri *et al.* (2014)¹.

Las fresas son frutas que aportan pocas calorías y cuyo componente más abundante, después del agua, son los hidratos de carbono (fructosa, glucosa y xilitol). Destaca su aporte de fibra, que mejora el tránsito intestinal. En lo que se refiere a otros nutrientes y compuestos orgánicos, las fresas son muy buena fuente de vitamina C y ácido cítrico, ácido salicílico, ácido málico, ácido oxálico y potasio, algunos de estos compuestos actúan como antiinflamatorios y anticoagulantes. En menor proporción, contienen vitamina E, que interviene en la estabilidad de las células sanguíneas y en la fertilidad. La vitamina C tiene acción antioxidante, interviene en la formación de colágeno, huesos, dientes y glóbulos rojos, favorece la absorción del hierro de los alimentos y resistencia a las infecciones, al igual que la vitamina E y los flavonoides (antocianos) que son pigmentos vegetales que le confieren a estas frutas su color característico. Por otra parte, vitaminas como el ácido fólico, intervienen en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis material genético y la formación anticuerpos del sistema inmunológico. Mientras que el potasio es necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso, para la actividad muscular normal e interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. En estudios preliminares con animales se indica que las dietas ricas en fresas también pueden tener el potencial para proporcionar ácido salicílico y elálgico y minerales como el K, P, Ca, Na y Fe; además, de pigmentos y aceites esenciales. Estos compuestos presentes en la fresa tienen un poder antioxidante potente y ayudan a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, mejoran la función endotelial

vascular y disminuyen la trombosis. Se ha demostrado en varios sistemas experimentales (Tabla 2) la actividad anticancerígena de los extractos de fresas, así como su bloqueo de iniciación de la carcinogénesis y los beneficios para el envejecimiento cerebral^{18,1,13}.

La fresa ha sido un fruto muy estudiado para conocer su capacidad antioxidante y varios estudios han demostrado en general que posee un alto nivel de éstos, lo cual se relaciona con la prevención y/o disminución de enfermedades crónico degenerativas ya que los compuestos antioxidantes actúan previniendo la generación excesiva de radicales libres³.

2.2 Capacidad antioxidante

2.2.1 Radicales libres

Un radical libre es una molécula que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, De hecho, un radical libre puede afectar un millón de moléculas durante la reacción en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de los llamados especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species)^{19,20}.

Los radicales libres se liberan durante el metabolismo humano, y también se producen por contaminantes ambientales, (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Se pueden relacionar con el consumo o uso de tóxicos como el alcohol, tabaco y drogas o debido a una alimentación no adecuada, exposición a fertilizantes o pesticidas. Se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psíquico²¹.

2.2.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un término asociado a las células que se ven afectadas por un radical libre, así en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y

endógeno). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Sin embargo, cuando se rompe este equilibrio, se asocia con un déficit en el sistema antioxidante o a la proliferación descontrolada de los radicales libres. Existen dos vías fundamentales para proteger al organismo de los radicales libres; enzimáticos y no enzimáticos (endógenos y exógenos) y su interacción puede ser intracelular o extracelular. La vía endógena requiere apoyo externo y por ello se recomiendan los antioxidantes exógenos, los cuales se van a adquirir principalmente de la dieta diaria³. Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo²².

2.2.3 Los antioxidantes y su papel en la salud humana

Los antioxidantes son moléculas que pueden prevenir el daño oxidativo, las cuales son capaces de donar electrones para estabilizar a los radicales libres y neutralizar sus efectos dañinos, puede retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser; lípido, proteína, ADN o cualquier otro tipo de molécula. Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno (sintetizados por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas como los adquiridos en la dieta). Un antioxidante dietético, es decir un antioxidante exógeno, es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos¹⁹. Dentro de los antioxidantes exógenos se incluyen la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides, compuestos fenólicos, entre otros. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario²³.

La capacidad antioxidante que presentan las frutas, en especial los frutos rojos como las fresas, es el punto de interés ante la prevención y el control de ciertas enfermedades. La composición química de las mismas contiene: flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, catequinas, isocatequinas, vitaminas C, E y β -carotenos, que están

directamente relacionadas con el control y disminución de radicales libres a nivel celular, los cuales son los principales protagonistas que participan en el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos²⁴.

Los antioxidantes obtenidos a través de la dieta pueden actuar de dos formas: primero, previniendo la generación excesiva de radicales libres, evitando así que se produzca el daño celular por efecto del estrés oxidativo. Y segundo, después de que se ha producido el daño, los antioxidantes pueden controlar los niveles de radicales libres evitando que el daño continúe avanzando e incluso algunos síntomas de estas enfermedades pueden disminuir³. Por otra parte, Rodríguez *et al.* (2015)²³ señalan que la longevidad parece aumentar en concordancia con los niveles de antioxidantes en la dieta y con una reducción calórica; lo que puede propiciar una menor degradación de las mitocondrias, del metabolismo celular y del consumo de oxígeno.

En el caso de la diabetes los posibles mecanismos de los antioxidantes se relacionan con la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, en particular la glucosa, de la cual también se modula su liberación por el hígado. Podrían también estimular la secreción de insulina en el páncreas y activar los receptores de la misma y de alguna manera activar la recaptura de glucosa en los tejidos blanco para la hormona. Además, diversos autores han demostrado con base en investigaciones que los antioxidantes juegan un papel importante en la prevención y/o tratamiento de la diabetes, dichos estudios han concluido que bajos niveles de antioxidantes en el plasma sanguíneo están implicados en un mayor riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. Muchas complicaciones de la diabetes que conducen a la mortalidad del paciente, se han relacionado con el estrés oxidativo, lo que sugiere que se considere significativamente a los antioxidantes como candidatos para el tratamiento de dicha enfermedad^{25,26}.

Debido al aumento de obesidad y sus factores de riesgo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer (WFCR, por sus siglas

en inglés) y el Instituto Americano de Investigación del Cáncer (AICR, por sus siglas en inglés), entre otros, han señalado que existe evidencia de que el consumo de al menos cinco porciones de frutas y verduras todos los días, disminuye el riesgo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), ya que los estudios epidemiológicos han llevado a establecer una estrecha asociación entre la incidencia de enfermedades tales como cáncer de próstata, de mama, de colon, enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes tipo 2 con la carencia de cierto tipo de frutas y vegetales en la dieta²⁷.

La fruta de fresa ahora se considera un alimento funcional que ofrece múltiples beneficios de los cuales se han demostrado efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antihiperlipidémicos, antihipertensivos y/o antiproliferativos. Estos mecanismos de acción están relacionados con la modificación de la etiología de las ECNT, gracias al contenido de vitaminas y compuestos fenólicos que poseen¹⁸. En otro estudio, Wolfe *et al.* (2008)²⁸ compararon la actividad antioxidante celular (AAC) y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (CARO) de las 25 frutas más consumidas en los Estados Unidos, y demostraron que la fresa, junto con la manzana son las frutas con la mayor contribución de ACC.

Si bien los estudios *in vitro* han aportado información importante para conocer los efectos antioxidantes de las fresas, estos son llevados a cabo en condiciones experimentales controladas, que no se comparan con la situación “*in vivo*”¹. Debido a esto último, se han llevado a cabo estudios asociados al consumo de fresas para comprobar su potencial antioxidante y efectos de su consumo en diferentes biomarcadores de estrés oxidativo tanto en modelos animales como en humanos (Tabla 2)²⁴.

Tabla 2. Diferentes biomarcadores de estrés oxidativo asociado al consumo de fresas.

ESTUDIO DE DIFERENTES BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO					
Estudio / población	Presentación	Dosis	Tiempo	Resultado	Referencia

Plasma humano, mujeres con síndrome metabólico	25 g de polvo de fresa liofilizado	2 tazas de bebida de fresa por día	4 semanas	Inhibición de la peroxidación lipídica (actividad antioxidante)	Basu <i>et al.</i> (2009) ²⁹
Plasma humano, sujetos hiperlipidémicos	Fresas frescas	454 g al día	4 semanas	Inhibición de la peroxidación lipídica (actividad antioxidante)	Jenkins <i>et al.</i> (2008) ³⁰
Gástrico de ratas	Extracto de fresa crudo	40 mg/día/Kg de peso corporal	10 días	Inhibición de la peroxidación lipídica (actividad antioxidante)	Álvarez-Suarez <i>et al.</i> (2011) ³¹
Plasma humano, sujetos con diabetes tipo 2	50 g de fresa liofilizada	2 tazas de fresa liofilizada	6 semanas	Inhibición de la peroxidación lipídica (actividad antioxidante)	Moazen <i>et al.</i> (2013) ³²
Plasma y tejido hepático de rata	Fresas frescas	25 g al día	2 meses	Inhibición de la peroxidación lipídica (actividad antioxidante)	Giampieri <i>et al.</i> (2016) ³³
Plasma, adultos con adiposidad abdominal y lípidos séricos elevados	Fresas liofilizadas	25 - 50 g al día	12 semanas	Inhibición de la peroxidación lipídica (actividad antioxidante)	Basu y cols., 2014 ^{a 34}
Gástrico de ratas	Extracto de fresa crudo	40 mg/día/Kg de peso corporal	10 días	Aumento de actividad de enzimas antioxidantes (actividad antioxidante)	Álvarez-Suarez y cols., 2011 ³¹
Plasma y tejido hepático de rata	Fresas frescas	25 g al día	2 meses	Aumento de actividad de enzimas antioxidantes (actividad antioxidante)	Giampieri y cols., 2016 ³³

Plasma humano, sujetos con diabetes tipo 2	50 g de fresa liofilizada	2 tazas de fresa liofilizada	6 semanas	Aumento del estado antioxidante total (actividad antioxidante)	Moazen y cols., 2013 ³²
Plasma humano, sujetos sanos	Fresas frescas	consumo libre de fresas diariamente	2 semanas	Aumento del estado antioxidante total (actividad antioxidante)	Tulipani y cols., 2014 ³⁵

Fuente: Olas (2018)²⁴.

2.3 Problemática de la fresa

2.3.1 Conservación post-cosecha

Aunque es un fruto muy apreciado por su alto valor nutricional tiene la desventaja de ser altamente perecedero con cortos periodos de maduración y rápida senescencia, lo cual hace que su comercialización sea un desafío³⁶.

La vida útil de la fresa es de 2 a 3 días después de la cosecha y de 4 a 5 días almacenadas en refrigeración. Este fruto posee una epidermis muy delgada y frágil que lo hace ser muy susceptible al daño mecánico durante la cosecha y almacenamiento, Además, la actividad de enzimas como la polifenol oxidasa y peroxidasa provoca la degradación de las antocianinas y otros polifenoles que lleva a la decoloración y, por lo tanto, un aumento en el oscurecimiento de la superficie de la fruta¹⁶.

Los frutos al ser recolectados quedan separados de su fuente natural de nutrientes, pero sus tejidos continúan respirando, sus azúcares siguen activos y otros componentes sufren importantes modificaciones. Generalmente, la velocidad de deterioro es proporcional a la velocidad a la que ocurre su respiración. Siendo los productos más perecederos aquellos que tienen una velocidad de respiración más rápida³⁷. Para la fresa

su tasa de respiración es alta (aproximadamente 15 mg/ kg / h a 0°C y aumenta de 4 a 5 veces cuando la temperatura se eleva a 10°C. Se puede reducir la tasa al mantener las fresas a bajas concentraciones de O₂ y atmosferas altas de CO₂³⁸.

2.3.2 Contaminación microbiana de la fresa

Las frutas de epidermis comestible como la fresa son las que presentan mayores posibilidades de convertirse en vehículos de microorganismos patógenos. En las últimas décadas, el aumento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) asociadas al consumo de alimentos frescos, entre ellos las frutas, ha conducido a las autoridades sanitarias a considerar estas patologías como un problema de salud pública. Se han incrementado los problemas de salud de los consumidores por la contaminación de bacterias enteropatógenas en este tipo de alimentos. Dentro de los principales microorganismos patógenos humanos involucrados en estos brotes están bacterias como *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. siendo esta última el agente causal de la mayoría de los brotes. Las fresas se encuentran expuestas a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha. En la pre-cosecha la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire, y las personas que cuidan las tierras de cultivo. En la post-cosecha destacan la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos. Estos, son elementos que influyen en la contaminación de la fruta^{39,5,4}.

En vista de que la microflora de las frutas de epidermis comestible varía ampliamente y refleja tanto las condiciones de cultivo como las condiciones sanitarias durante el procesamiento y comercialización, es necesaria la evaluación de la calidad microbiológica de estos productos, a fin de asegurar la inocuidad de los mismos⁵.

Ante esta problemática se hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para reducir el deterioro microbiológico y la pérdida de atributos de la calidad de la fresa. En la búsqueda de nuevos sistemas naturales de conservación, una alternativa viable son las cubiertas comestibles.

2.4 Cubiertas comestibles

Durante la conservación, manipulación y distribución de la fresa, la composición química se modifica con el tiempo y provoca un descenso del valor nutritivo y calidad global. Al ser tejidos vivos, son susceptibles después de la cosecha a cambios fisiológicos y posteriormente bioquímicos. Para limitar estos cambios es indispensable controlar los procesos respiratorios y enzimáticos, así como los daños mecánicos, responsables de lesiones en tejidos y, como consecuencia de ello, pérdida de turgencia. Hoy en día se han desarrollado nuevas técnicas de almacenamiento, entre ellas, las cubiertas comestibles, éstas hacen posible prolongar la vida útil y mantener sus atributos de calidad por más tiempo^{37,40}.

Una cubierta o recubrimiento comestible es un material de envoltura delgado el cual es utilizado en la industria de alimentos y que puede ser consumido como parte del mismo, debido a que son de origen natural; como los polímeros biodegradables, compuestos no tóxicos y que ayudan a incrementar la calidad de los alimentos durante su conservación⁴¹. Estas cubiertas, pueden elaborarse con ingredientes básicos adecuados al producto para brindarle la protección de barrera que sea necesaria, además ingredientes activos pueden ser incorporados en estas cubiertas (compuestos antimicrobianos y antioxidantes), para ser consumidos en los alimentos, potenciando la seguridad y calidad nutricional de productos hortofrutícolas^{6,42}.

Los principales ingredientes utilizados en su elaboración son proteínas (gluten de trigo, maíz, colágeno, queratina, proteína aislada de soya, caseína, proteína de maní y proteína

de suero), a base de lípidos (ceras de abejas, candelilla y carnauba; aceites, resinas, monoglicéridos, diglicéridos y los ácidos grasos tales como el ácido esteárico, palmítico, láurico y oleico), otros compuestos empleados son los polisacáridos (derivados de celulosa hidrolizada, almidón, alginatos, pectinas, goma arábiga, quitosano, entre otros), todos estos, ya sea utilizarlos solos o en combinación⁴¹.

2.4.1 Quitosano

El quitosano es un polímero natural derivado de la desacetilación de la quitina [poli - β -(1-4)-N-acetil-D- glucosamina] y es el componente principal del exoesqueleto de los crustáceos. Se describe como un polisacárido catiónico de bajo, medio o alto peso molecular. Al tener grupos amino (-NH₂) en su estructura química, cuenta con propiedades únicas e ideales que le confieren buenas características para ser utilizado en diferentes sistemas agrícolas; incluyendo la conservación de alimentos mediante el desarrollo de recubrimientos y películas comestibles biodegradables⁴³.

Se ha evidenciado su efecto antibacteriano y antifúngico a nivel *in vitro*, así como aplicado directamente a productos hortofrutícolas. Los recubrimientos a base de quitosano presentan buenas propiedades mecánicas y permeabilidades selectivas al CO₂ y O₂, por lo tanto, se utiliza para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de frutas frescas⁷.

Muchos frutos, incluyendo la ciruela mexicana, el aguacate, la papaya y la pitaya, se han beneficiado con el uso del quitosano aplicado como recubrimiento. Se ha observado en diversos estudios que disminuye el porcentaje de pérdida de peso, retrasa cambios en el color, y en la acidez titulable durante el almacenamiento, además mejora la calidad de la textura en estas frutas congeladas^{44,43}.

Ventura-Aguilar *et al.* (2018)⁴⁵ evaluaron un recubrimiento de quitosano en combinación con aceite esencial de canela aplicado en fresas almacenadas a 5 y 20° C. Los resultados indicaron que la pérdida de peso se redujo 15 veces y la firmeza fue 33% mayor en los frutos tratados con el recubrimiento de quitosano a comparación del control. Los autores

concluyeron que esta tecnología fue efectiva para preservar la calidad de la fresa hasta por 17 días a 5 °C.

En frutos de plátano, se reporta el uso de quitosano combinado con ácido giberélico, mostrando una reducción de la pérdida de peso, firmeza, acidez, sólidos solubles totales y contenido de ácido ascórbico, prolongando la vida útil de la fruta sin modificar la coloración de esta⁴⁶.

En otro estudio, Bello-Lara *et al.* (2016)⁴⁷ demostraron que el mango 'Ataulfo' almacenado a 10 °C tratado con 1 % de quitosano en combinación con 1 % de almidón, o 1 % de pectina, tuvo mejor vida útil en términos de mayor contenido de SST (16.96°Brix) y menor pérdida de firmeza (3.34 kgf·cm⁻²) en comparación con los frutos control (2.26 kgf·cm⁻² y 15.8 °Brix, respectivamente).

Además de ayudar a conservar la calidad y prolongar la vida de anaquel de los productos hortofrutícolas, se ha evidenciado la actividad antioxidante del quitosano aplicado como recubrimiento⁴⁸. Hong *et al.* (2012)⁴⁹ refieren que el tratamiento con quitosano al 2% en frutos de guayaba almacenada a 11 °C durante 12 días, puede inducir un aumento significativo en la firmeza del fruto hasta de 14% comparado con el control. También se observó un aumento en las actividades de la superóxido dismutasa y catalasa (13.53 U g⁻¹ min⁻¹) comparada con el control (11 U g⁻¹ min⁻¹) e inhibió la producción del radical libre superóxido.

Diversos estudios han demostrado el aumento de la actividad antioxidante y reducción en la pérdida de componentes nutrimentales en frutas tratadas con quitosano. Petriccione *et al.* (2015)⁵⁰ aplicaron una cubierta de quitosano al 2% y ésta retrasó cambios en el contenido de ácido ascórbico (60 mg CCE/ 100 g FW) de tres cultivares de fresa almacenada a 2°C durante 14 días en comparación con el control (48 mg CCE/ 100 g FW). En otro estudio, Gol *et al.* (2015)⁵¹ aplicaron quitosano (0.5%) a la fruta de carambola como recubrimiento, este retrasó significativamente la reducción de vitamina C (24.42 mg/g), pérdida de peso (9.9%), SST (7°Brix) y AT (2%) en comparación con la fruta sin tratamiento durante un tiempo de almacenamiento de 8 días. Wang y Gao

(2013)³⁶ reportan que el quitosano al 1% también retrasó la disminución del ácido ascórbico y el porcentaje de decaimiento (15.7%) en las fresas almacenadas durante 9 días a 5 °C comparadas con las fresas no recubiertas (95.2%).

Baldoni *et al.* (2016)⁵² demostraron que, al aplicar un recubrimiento en higos, formulado con 1% de quitosano + cera de abeja 0.5% y aceites esenciales de canela 0.025% o limón 1%, los SST fueron ligeramente mayores (16%), al igual que la actividad antioxidante (68%) en los frutos con las cubiertas, además presentaron un menor crecimiento de bacterias mesófilas aeróbicas y hongos fitopatógenos a comparación de los frutos no tratados.

López *et al.* (2012)⁵³ evaluaron el efecto de recubrimientos comestibles de quitosano (1 y 2%) con y sin la adición de aceite esencial de canela (0.03, 0.07 y 0.1%) sobre los cambios en aceptabilidad, fenoles totales, capacidad antioxidante y población microbiana en fresas. Los resultados demostraron que los recubrimientos con quitosano más almidón con aceite esencial de canela fueron efectivos para prolongar la vida útil de la fresa hasta por 15 días a 5 °C comparado con el control que presentó 8 días de vida de anaquel, siendo el recubrimiento de quitosano (1%) más aceite esencial de canela (0.1%), el más efectivo para mantener el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante, así como retrasar el desarrollo microbiano.

El quitosano es una sustancia que puede combinarse con otros compuestos hidrófobos como aceites, ceras o resinas, que también han demostrado poseer características deseables para los productos frescos y así mejorar sus propiedades de barrera, antimicrobianas y nutricionales ^{54,41}.

2.4.2 Propóleo

El propóleo es una sustancia de origen natural que se elabora por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas, la cual está constituida por una gran variedad de compuestos, en general , por 30% de cera, 50% de resinas y bálsamo vegetal, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5%

polen y otras sustancias como flavonoides (flavonas, flavonoles y flavononas) y compuestos fenólicos^{8,55,56}. Los flavonoides, ácidos aromáticos y compuestos fenólicos son los componentes activos más importantes del propóleo y parecen ser los principales componentes responsables de las actividades biológicas de este compuesto. Además, al propóleo se le atribuyen diferentes propiedades biológicas, tales como: antitumorales, antiprotozoarias, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, antibacteriales y antifúngicas⁵⁷.

Dado que el propóleo es una buena fuente de polifenoles con múltiples actividades biológicas y potenciales terapéuticos, tiene un alto potencial para ser utilizado como un aditivo natural con propiedades funcionales que se puede incorporar en cubiertas o recubrimientos para la conservación y protección de los alimentos para dar un valor agregado además de inhibir ciertos microorganismos^{58,59,56}.

Se han realizado investigaciones para conocer las propiedades del propóleo como cubierta comestible y se ha demostrado que en general, posee buenas propiedades, sobre todo en combinación con polisacáridos. En un estudio, Siripatrawan y Vitchayakitti (2016)⁵⁹ caracterizaron cubiertas de quitosano con la incorporación de extracto etanólico de propóleo (EEP) para su uso potencial en el envasado de alimentos, ellos encontraron que el contenido fenólico total y 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) en películas de quitosano, aumentaban al agregar e incrementar la proporción de propóleo, además se determinó que componentes de ésta sustancia tales como la rutina, quercetina y naringenina fueron los principales compuestos fenólicos del propóleo por lo que, a su vez, fueron los principales contribuyentes a la actividad antioxidante. Por otro lado, observaron que al agregar el extracto de propóleo a la cubierta con quitosano, las propiedades mecánicas se ven mejoradas, siendo que actúa como un agente plastificante aumentando la elasticidad, la elongación y reduciendo la resistencia a la tracción de las películas.

Los extractos de propóleo pueden ser aplicados a varios tipos de alimentos, incluyendo a frutas frescas. Los recubrimientos con EEP han demostrado reducir la pérdida de peso y la firmeza de varias frutas y verduras. Además, el propóleo se considera una sustancia prometedora para reducir la incidencia del decaimiento y reducción del valor nutricional durante el período de almacenamiento de estos productos⁶¹. Esto último se ha demostrado en diversos estudios.

Thomas *et al.* (2016)⁶² incorporaron recubrimientos de EEP en dos concentraciones (33 y 66%) combinado con almidón de yuca al 3% a una temperatura de 4°C durante 16 días en fresas. Los resultados mostraron que el recubrimiento con 66% de propóleo promovió un mayor contenido de vitamina C (71.95 mg 100 g⁻¹) que las frutas sometidas a los otros tratamientos, incluyendo el control (46.58 mg 100 g⁻¹). Además de que hubo una tendencia al aumento del contenido fenólico (332.72 mg EAG g⁻¹) durante el almacenamiento en las frutas evaluadas con el EEP.

Passos *et al.* (2016a)⁶³ evaluaron los efectos de un recubrimiento EEP (70% alcohol, extracto hidroalcohólico de propóleo al 2.5%, extracto hidroalcohólico de propóleo al 5%) en peras durante 25 días. Se evaluó las características fisicoquímicas y atributos de calidad del fruto a temperatura ambiente. Se observó que los recubrimientos con propóleo redujeron el porcentaje de pérdida de peso (20.26%) y hubo diferencias significativas positivas en las variables SST (9.16%), AT (0.52%) y pH (4.33) al final del almacenamiento comparadas con los frutos control (9.75%, 10.80 °Brix, 0.90% y 3.88, respectivamente). En otro trabajo, Passos *et al.* (2016b)⁶⁴ evaluaron los efectos de los recubrimientos de EEP al 2.5% (p/v) sobre los atributos de calidad de los plátanos almacenados a temperatura ambiente durante 12 días. Los plátanos recubiertos con EEP presentaron menores pérdidas de peso fresco (24.88%) en comparación con los plátanos del tratamiento control (30.50%).

Barrera *et al.* (2015)⁶⁵ evaluaron el efecto de dos recubrimientos, control (quitosano, 1%) y tratamiento (quitosano 1% + EEP 5%), sobre las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de frutos de papaya. Los frutos recubiertos con el tratamiento mostraron un índice de deterioro y un diámetro de la infección del hongo *Colletotrichum*

gloeosporioides inferior (18.2% de inhibición) al de las papayas control (<3% de inhibición) extendiéndose en dos días la aparición de daños. Adicionalmente, el tratamiento no afectó significativamente las propiedades fisicoquímicas de la papaya, en comparación con el control.

Si bien los compuestos como el quitosano y propóleo han demostrado ser efectivos para los objetivos planteados, actualmente han surgido propuestas de alternativas para potencializar el efecto sobre las características que necesitamos, entre estas se encuentra la nanotecnología.

2.5 Nanotecnología

El concepto de nanotecnología fue propuesto por primera vez en 1959 por el físico Richard Feynman quien exploró la posibilidad de manipular la materia en la escala de átomos y moléculas. Sin embargo, este concepto fue usado hasta 1974 por Norio Taniguchi, un investigador de la Universidad de Tokyo. La nanotecnología se refiere a la habilidad de fabricar, caracterizar y manipular materiales a nanoescala cuyos tamaños van desde 1 a 100 nanómetros (nm). Es integrada por varias disciplinas, incluyendo física, química, biotecnología e ingeniería^{66,67}.

El material, cuando se presenta en nanoescala, tiene propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes de aquellas en gran tamaño; también por su gran área superficial relativa a la masa, las nanopartículas son altamente reactivas. Al combinar materiales de nanoestructura con otros polímeros se forman nanocompuestos que exhiben características fisicoquímicas únicas, tales como solubilidad, toxicidad, fuerza, magnetismo, difusividad, óptica, color, y termodinámica^{68,69}.

El auge de la nanotecnología radica básicamente en hacer productos de materia prima más eficientes, multifuncionales y ahorradores. Dentro del mercado global de la nanotecnología, los aspectos relacionados con el procesamiento de superficies y películas delgadas juegan un rol predominante creciente sobre nanopartículas y nanocompuestos⁶⁶.

2.5.1 Importancia de la nanotecnología

La nanotecnología empieza a presentarse en cada aspecto de nuestras vidas ya que está creciendo en varios sectores, incluyendo la agricultura, medicina, ropa, cosméticos, alimentos, y la salud pública debido a su capacidad única para incrementar la solubilidad, biodisponibilidad y proteger componentes bioactivos mientras se procesan y almacenan⁷⁰.

En la industria farmacéutica, la nanotecnología se ha empleado en los suplementos nutricionales en sistemas de encapsulación que transportan, protegen y distribuyen componentes funcionales de los alimentos a un sitio de destino específico y lo hacen de manera eficiente⁷¹.

Dentro del sector alimenticio la nanotecnología tiene grandes ventajas en la conservación de alimentos, se utilizan polímeros a nanoescala para mejorar las propiedades de barrera y mecánicas, resistencia al calor y la biodegradabilidad de envases inteligentes, empaques activos y cubiertas comestibles. Los envases biodegradables de nanocompuestos son de gran potencial para el medio ambiente. El embalaje inteligente permite a los consumidores elegir los productos correctos que tienen buena vida útil y también indican la naturaleza y otras características de los productos que se consumen. Además, se pretende mejorar el valor nutraceútico de los alimentos, incorporando aditivos nutricionales sin alterar sus atributos físicos y sensoriales. Por lo que se han desarrollado una serie de diferentes nanopartículas que, de acuerdo con las investigaciones, prometen brindar mayor seguridad, aumentar el valor nutritivo y la vida útil de los alimentos^{72,73,66}.

En otras aplicaciones, nanodispositivos o nanosensores en combinación con polímeros se utilizan para monitorear patógenos de alimentos y productos químicos durante procesos de almacenamiento y tránsito en envases inteligentes. Además, estos dispositivos también pueden rastrear la historia del tiempo, la temperatura, y fecha de

caducidad. Varios informes recientes indicaron que los nanosensores son capaces de detectar toxinas y patógenos de los alimentos en el embalaje⁷⁴.

La contaminación microbiana ha dado lugar a infecciones patógenas y mala nutrición asociada a los alimentos, por lo que la utilización de nanomateriales con actividad antimicrobiana ha demostrado tener buenos efectos contra múltiples organismos infecciosos resistentes a los medicamentos, en lugar de actuar en un proceso bioquímico en particular como lo hacen los antibióticos convencionales. Probablemente las nanopartículas interrumpan múltiples procesos en las células microbianas de una manera menos específica^{75,70}. Dentro de los compuestos utilizados en nanoescala que poseen propiedades antimicrobianas se incluyen: Óxido de plata (Ag_2O), dióxido de titanio (TiO_2), óxido de magnesio (MgO), cobre y óxido de cobre (CuO), óxido de zinc (ZnO), selenuro de cadmio / telurio, nanotubos de carbono y quitosano (Tan y cols., 2013). Su actividad antibacteriana va a depender de factores como superficie, tamaño, forma, internalización de partículas y funcionalización química. Su mecanismo de acción se basa en la adhesión a la superficie celular causando una ruptura de la membrana y daño al ADN⁷⁷.

2.5.2 Actividad biológica de nanopartículas de quitosano

Un componente que ha sido usado para la síntesis de nanopartículas es el quitosano. Se ha reportado que las nanopartículas de quitosano (NPQ) debido a su bajo peso molecular y pequeño tamaño pueden contribuir a potenciar el efecto antioxidante de este polímero, ya que actúan sobre los radicales libres impidiendo las donaciones de hidrógeno por parte de los iones metálicos quelados. La no toxicidad y la biocompatibilidad de las NPQ, las convierten en un excelente material de recubrimiento de frutas y verduras, aplicadas en revestimientos, tienen la capacidad de controlar la descomposición y prolongar la vida de anaquel de diversas frutas como fresas, papaya pepino, zanahoria, manzana, cítricos, kiwi, melocotón, pera, fresa y cereza dulce. Además, pueden incorporarse a recubrimientos comestibles y actuar como agentes nutraceúticos y antimicrobianos⁷⁸.

Se han utilizado nanocompuestos de quitosano en recubrimientos, los cuales al enlazarse con la matriz ofrecen una mayor resistencia mecánica o una barrera para el intercambio de gases, una disminución a la permeabilidad del vapor de agua y una menor pérdida de compuestos volátiles (Kerch, 2015). La aplicación de la nanotecnología sobre polímeros comestibles puede abrir nuevas posibilidades para mejorar no solo las propiedades de recubrimientos sino también el costo eficiencia de los mismos⁷⁹.

Ortiz-Duarte *et al.* (2019)⁸⁰ utilizaron nanocompuestos de quitosano y plata (Ag) en recubrimientos para prolongar la vida útil poscosecha del melón fresco recién cortado, la fruta recubierta redujo la respiración y la producción de etileno en comparación con las de sin recubrimiento. La calidad, azúcares, ácidos orgánicos y contenidos de vitamina C no fueron afectados por la incorporación de quitosano y plata, hubo menor degradación de la textura y firmeza (591 N) después de 13 días a 5°C comparado el grupo control (220.7 N).

Correa-Pacheco *et al.* (2017)⁸¹ evaluaron el efecto de cubiertas comestibles a adicionadas con NPQ y Nanopartículas de quitosano-aceite esencial de tomillo (NPQ-AET) sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* y la calidad de la fruta Aguacate Hass. Las concentraciones de AET al 3 y 5% tuvieron un efecto fungicida. El recubrimiento con la formulación de 55% de NPQ-AET redujo notablemente la incidencia de *C. gloeosporioides* sobre aguacate cv. Hass hasta en un 60%. Al final del almacenamiento (8 días), las NPQ-AET mantuvieron mayor firmeza (30.2 N) en comparación con los frutos no tratados (18.6 N). Estas cubiertas, no afectaron los atributos de calidad del aguacate.

Por otra parte, se ha demostrado que las NPQ tienen un amplio espectro de actividad y un efecto significativo en el control de hongos fitopatógenos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas^{82,83}.

Madureira *et al.* (2015)⁸⁴ desarrollaron nanopartículas de quitosano con bajo y alto peso molecular. Los estudios antimicrobianos probaron que tiene altos valores de inhibición para todas las bacterias probadas (60-90%) (*Bacillus cereus*, *E. coli*, *Listeria innocua*, *S.*

aureus, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica*) con ligeras diferencias entre ellas, siendo ligeramente mejores las producidas con alto peso molecular.

La actividad antibacteriana del quitosano tal vez se debe al daño en la membrana celular que ha sido evidenciada por lisis de la célula a través de microscopía electrónica de transmisión. En este sentido, el modo de acción de las nanopartículas de carboximetil quitosano cuaternizado contra *E. coli* fue investigado por Wen *et al.* (2015)⁸⁵ demostrando que las nanopartículas dañaban la pared celular, mostrando rupturas notables o poros en la superficie de la célula.

Sin embargo, a pesar de la evidencia científica de la interacción de las NPQ con microorganismos y en la aplicación de recubrimientos comestibles, existe poca información acerca de la sinergia que estas nanopartículas puedan tener en combinación con extracto de propóleo para conservar la calidad poscosecha y capacidad antioxidante de productos hortofrutícolas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las evidencias científicas demuestran que las fresas además de nutrientes pueden contener agentes bioactivos que le confieren su gran capacidad antioxidante y son capaces de prevenir diversas enfermedades y/o reforzar el sistema inmunológico. A medida que las ECNT adquieren mayor relevancia, se observa en los consumidores una creciente tendencia a elegir los alimentos que se asocian con su salud y bienestar, día a día exigen que los alimentos frescos estén exentos de sustancias de síntesis química, y buscan aquellos enriquecidos con sustancias de origen natural que proporcionen beneficios para su salud, que mantengan las características nutritivas y sensoriales de los productos adquiridos. La fresa a pesar de ser un fruto muy apreciado por su alto valor nutricional, tiene la desventaja de ser muy perecedero, además presenta mayores posibilidades de convertirse en vehículo de bacterias patógenas, esto hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para reducir la pérdida sus compuestos, de sus atributos de calidad y el deterioro microbiológico. Una alternativa viable a este problema es la utilización de las cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y extracto de propóleo, compuestos de origen natural que han demostrado tener propiedades que ayudan a conservar y preservar la calidad de algunas frutas y hortalizas durante su almacenamiento, además, de poseer propiedades antimicrobianas importantes. En la búsqueda de mejores funcionalidades se ha estudiado el uso de bionanocompuestos. En este sentido, al aplicar nanopartículas en cubiertas comestibles, se pretende mejorar la relación y sinergia con los compuestos debido a la mayor interacción área superficie y potenciar los efectos sobre las características deseadas en el fruto como la capacidad antioxidante y atributos de calidad.

4. HIPÓTESIS

Las cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o extracto de propóleo conservarán la calidad y capacidad antioxidante de frutos de fresa.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Desarrollar y evaluar el efecto de cubiertas a base de nanopartículas de quitosano y/o extracto de propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de la fresa durante el almacenamiento.

5.2 Específicos

- Elaborar y caracterizar las cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o extracto de propóleo mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, Microscopía óptica, Dispersión Dinámica de Luz, y Potencial Z.
- Evaluar el efecto de cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o extracto de propóleo sobre los atributos de calidad de la fresa mediante las variables pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable, color y presencia de microorganismos patógenos.
- Determinar el efecto de cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o extracto de propóleo sobre los compuestos fenólicos, flavonoides y la capacidad antioxidante de las fresas tratadas con estas cubiertas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Las fresas se adquirieron de huertos comerciales del municipio de Coatlán del Río, del estado de Morelos (Figura 1). Para el estudio, se seleccionaron las fresas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-062-SCFI-2002, con un 75% de madurez o $\frac{3}{4}$ de sazón, descartando visualmente los frutos con daños físicos, con formas irregulares y presencia de microorganismos.

Se utilizó quitosano comercial marca Sigma Aldrich® (Quitosano de baja densidad, 89.34% grado de des acetilación, con peso molecular de 89.306 g-Mol).

El propóleo en greña fue donado por el Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4. Cuautitlán Izcalli, Estado de México.



Figura 1. Frutos de fresas provenientes de Coatlán del Río, Morelos.

6.2 Extracción del propóleo

La extracción del propóleo en greña fue realizada por el laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, Estado de México bajo la asesoría del Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez y se realizó de acuerdo con los procedimientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 (Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento).

El extracto que se obtuvo a partir del propóleo en greña, fue utilizado para la elaboración de los extractos etanólicos de propóleo en tres concentraciones (10, 20 y 30%). Para esto, se pesaron muestras de 1, 2 y 3 g del extracto blando del propóleo en una balanza (OHAUS CS200, Japón), las muestras se colocaron en vasos de precipitado, a los cuales se les adicionó 10 ml de alcohol etílico. Posteriormente, las muestras se dejaron durante 3 h en una parrilla de calentamiento bajo agitación magnética constante para la disolución del extracto blando en la solución etanólica. Las muestras se colocaron en frascos ámbar de 15 ml y se guardaron en refrigeración.

Posteriormente, el propóleo fue caracterizado en laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. Las especificaciones químicas se presentan en el anexo 1.

6.3 Caracterización de nanopartículas de quitosano y las cubiertas comestibles.

6.3.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano

Para obtener las nanopartículas de quitosano (NPQ) se usó el método de nanoprecipitación empleado por Sotelo-Boyás *et al.* (2017)⁸⁶ (Figura 2). Primero se preparó una solución de quitosano al 0.05 y 0.01% (p/v) para obtener NPQ al 0.05 y 0.01%, para lo cual 0.05 y 0.01 g de quitosano comercial se disolvieron en agua destilada

y ácido acético (Fermont[®]) 1% (v / v). Se dejó en agitación constante durante 24 h y se ajustó el pH a 5.6 con una solución de NaOH 1N.

Se prepararon 40 ml de una solución etanólica (alcohol etílico 94.9-96°, Hycl[®]) a la cual se le adicionó 10 μ L de tween 20 (Meyer[®]) y se dejó en agitación durante 1h. Posteriormente, 2.5 ml de la solución de quitosano al 0.05% se agregó a la solución etanólica previamente preparada por medio de una bomba peristáltica (Masterflex C/L Dual-Channel Pump) bajo agitación magnética constante. Una vez formadas las nanopartículas, las soluciones obtenidas se colocaron en un rotavapor (Rotavapor Buchi R-300, BM 500 Water Bath, Yamato CF 300) a 40 °C con una velocidad de 50 rpm y posteriormente se almacenó en refrigeración (4 °C).

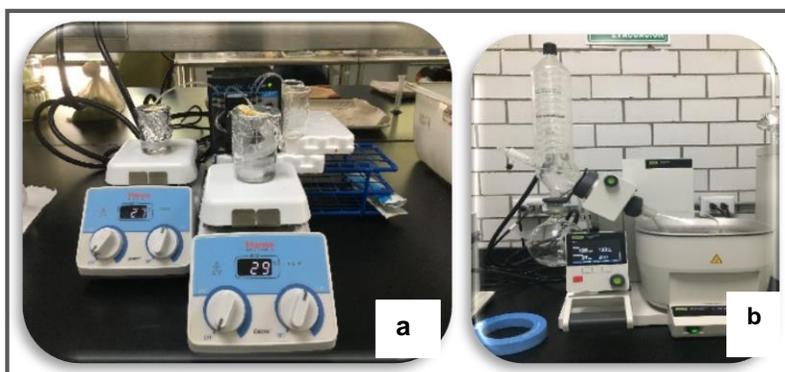


Figura 2. Síntesis de nanopartículas de quitosano por el método de nanoprecipitación: a) síntesis de NPQ, b) concentración de NPQ en el rotavapor.

Las nanopartículas recién formadas se utilizaron para la elaboración de las cubiertas comestibles y la caracterización morfológica y fisicoquímica que incluyó: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), Microscopía óptica, Potencial Z y Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés).

6.3.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La caracterización por TEM se realizó en el Laboratorio de Microscopia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Se determinó el tamaño de las nanopartículas de quitosano sin solución (NPQ), nanopartículas de quitosano en una solución de quitosano al 0.01% (NPQ 01) y por último nanopartículas de quitosano al 0.05% adicionadas en extracto de propóleo al 5% (NPQ P). Para esto, se tomaron 2µL de cada una de las muestras y se colocaron en una rejilla porta muestra (lado oscuro de la rejilla) para TEM Lacey-Carbon y se dejó secar a temperatura ambiente. Se observó en un Microscopio de Transmisión Electrónica (JEOL-JEM 2100, CNMM-IPN), con un voltaje de operación de 80 kV. El tamaño de las nanopartículas promedio se calculó a partir de las imágenes del TEM utilizando el programa de imágenes IMAGEJ.

6.3.3 Potencial Z y Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

El estudio del Potencial Z y la DLS se llevó a cabo en CICATA Legaria del Instituto Politécnico Nacional. Las muestras analizadas fueron las siguientes: NPQ, NPQ 01, NPQ 05 Y NPQ P. Para esto, Se colocaron 3 ml de cada muestra, en una celda de cuarzo para su análisis. Se utilizó un Zetasizer Nano - ZS90 (Instrumentos Malvern) y se analizaron los resultados en el programa Zetasizer versión 7.12.

6.3.4 Microscopia óptica

Para la caracterización de las cubiertas comestibles por microscopia óptica, se utilizaron frutos de fresa las cuales se recubrieron con los seis tratamientos evaluados, incluyendo al control (Tabla 3). Los frutos se dejaron secar a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) durante 90 min. Posteriormente, se realizó un corte histológico longitudinal delgado (500 µm), con ayuda de un bisturí, el corte se colocó en un portaobjetos para su observación

en el microscopio (Nikon Eclipse Ci, Japón) a una magnificación de 10x. Las fotografías se tomaron con una cámara digital (Nikon, Japón). Se midió el grosor de la cubierta con ayuda del programa de IMAGEJ.

6.3.5 Elaboración de las cubiertas comestibles

Para la preparación de las cubiertas comestibles nanoestructuradas se siguió la metodología empleada por Correa-Pacheco *et al.* (2017)⁸¹. En un vaso de precipitado se colocó quitosano comercial al 1% previamente preparado y se adicionó el glicerol en agitación constante aproximadamente durante 5 min. Posteriormente, a la mezcla se le adicionó el propóleo por goteo con ayuda de una bomba peristáltica, a la vez que se calentaba a una temperatura de 40 °C en una parrilla de calentamiento y con agitación fuerte y constante. Después de adicionar el propóleo, la emulsión se agitó por 10 min más. Se apagó el calentamiento y las nanopartículas se adicionaron lentamente a la emulsión, agitando constantemente durante 5 min. Posteriormente, la emulsión se homogeneizó a 10,000 rpm durante 1 min en un homogeneizador. La emulsión se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente (Figura 3).



Figura 3. Desarrollo de las cubiertas comestibles: a) adición de los compuestos utilizados, b) cubiertas de quitosano y propóleo en agitación constante, c) homogenización de la cubierta comestible.

6.3.6 Formulación de los tratamientos

Se tuvo un total de seis tratamientos incluyendo el control que fueron las fresas sin cubierta. Se evaluó el propóleo a tres concentraciones diferentes (10, 20 y 30%) y nanopartículas de quitosano al 33% (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes y formulación de los tratamientos evaluados.

Componentes	Formulaciones (ml)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Quitosano (1%)	99.7	66.7	66.1	66.1	66.1	C
Glicerol	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	O
Nanopartículas de quitosano		33	33	33	33	N
Extracto de propóleo (10%)			0.6			T
Extracto de propóleo (20%)				0.6		R
Extracto de propóleo (30%)					0.6	O
						L

6.4 Evaluación del efecto de cubiertas comestibles sobre los atributos de calidad de la fresa.

6.4.1 Aplicación de las cubiertas comestibles en las fresas

Las fresas se lavaron con agua corriente para quitar el exceso de tierra y/o basura que pudieran llevar y posteriormente se dejaron secar. Se sumergieron 100 fresas durante 30 s aproximadamente en cada formulación evaluada (Tabla 3), se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en contenedores PET en refrigeración a 4 ± 1 °C durante 8 días y se evaluaron las variables correspondientes (Figura 4).

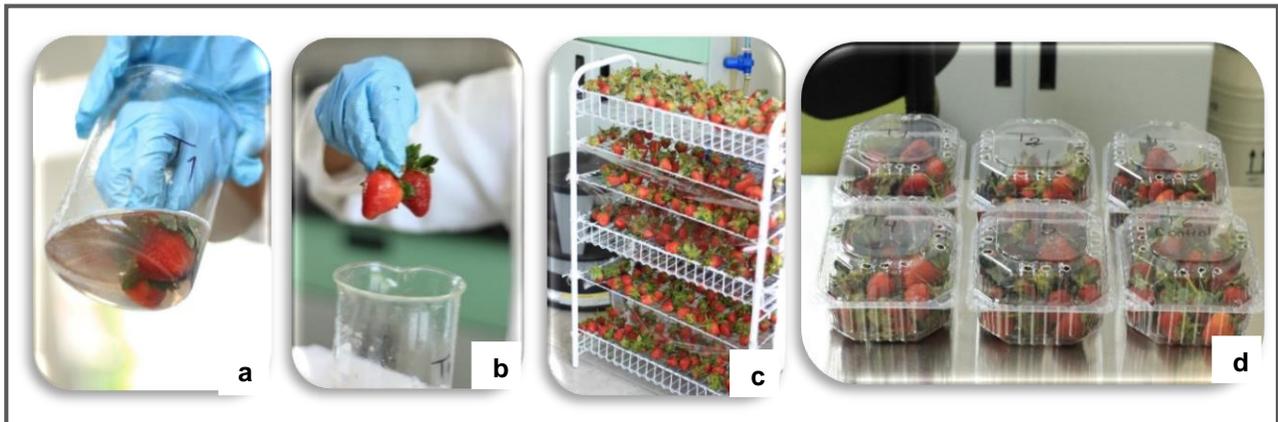


Figura 4. Aplicación de las cubiertas comestibles a las fresas: a) inmersión del fruto en el tratamiento, b) fresas con la cubierta comestible, c) secado de las fresas, d) almacenamiento de las fresas en contenedores PET.

6.4.2 Evaluación de los atributos de calidad de la fresa

Las variables asociadas con los atributos de calidad fueron: pérdida de peso, firmeza, color, SST, AT y presencia de microorganismos patógenos. Estas se evaluaron durante 8 días, excepto presencia de microorganismos patógenos (Figura 5).

6.4.2.1 Pérdida de peso

La pérdida de peso se determinó por gravimetría con ayuda de una balanza (OHAUS CS200, Japón) mediante la diferencia entre el peso inicial y el final de cada unidad experimental. Se pesaron los mismos 15 frutos de cada tratamiento todos los días hasta el término del experimento. El resultado se expresó en porcentaje, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%Pérdida\ de\ peso = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

Donde P_i = peso inicial y P_f = peso final.

6.4.2.2 Firmeza

La firmeza se determinó utilizando un penetrómetro análogo (GY-3, KANDPI, Japón) y se empleó una punta cilíndrica de 8 mm de diámetro, penetrando con este la zona media de la fresa, en ambas caras del fruto. Se midieron 15 frutos por cada tratamiento. Se evaluó al inicio y al final del experimento. Los valores se reportaron como la fuerza requerida para atravesar la membrana del fruto en unidades de Newton (N).

6.4.2.3 Sólidos solubles totales (SST)

Para determinar los SST, se utilizaron 15 frutos por cada tratamiento y se evaluaron cada tercer día. De los frutos, se extrajo una gota del jugo y con la ayuda de un refractómetro (Atago N-1E, Japón) se obtuvieron los resultados, los cuales se expresaron en °Brix.

6.4.2.4 Acidez titulable (AT)

La determinación de AT se realizó con base en la metodología reportada por la A.O.A.C (1990)⁸⁷ y se evaluó cada tercer día. Esta consistió en pesar 20 g de muestra, se

adicionaron 100 ml de agua destilada y se homogeneizó la mezcla. Posteriormente, se recuperó una alícuota de 5mL de la solución y se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N, utilizando como indicador 2 gotas de fenolftaleína en solución alcohólica al 1%. Los resultados se reportaron como porcentaje de AT y se expresaron como ácido cítrico, de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\%AT = \frac{(GB)(PA)(100)}{(A)(M)} \times 100$$

Donde GB= Gasto de NaOH consumido; PA=Peso de ácido presente en mayor %; A= Alícuota tomada; M= Muestra utilizada.

6.4.2.5 Color

Para la determinación del color se realizó una medición diaria en ambas caras y en la zona media de cada fresa utilizando un colorímetro (Konica Minolta, Baking Meter BC-10, Japón), obteniendo las coordenadas de color L*, que es el indicador de la luminosidad, a* (cromaticidad (-) verde a (+) rojo) y b* (cromaticidad (-) azul a (+) amarillo), con las cuales se calcularon las diferencias de color ΔE , de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde L, a y b= Las diferencias entre los parámetros de color de los frutos recubiertos y de los frutos control.

Se toma como referencia el día 1 (inicio del almacenamiento). Se midieron los mismos 15 frutos de cada tratamiento durante 8 días.

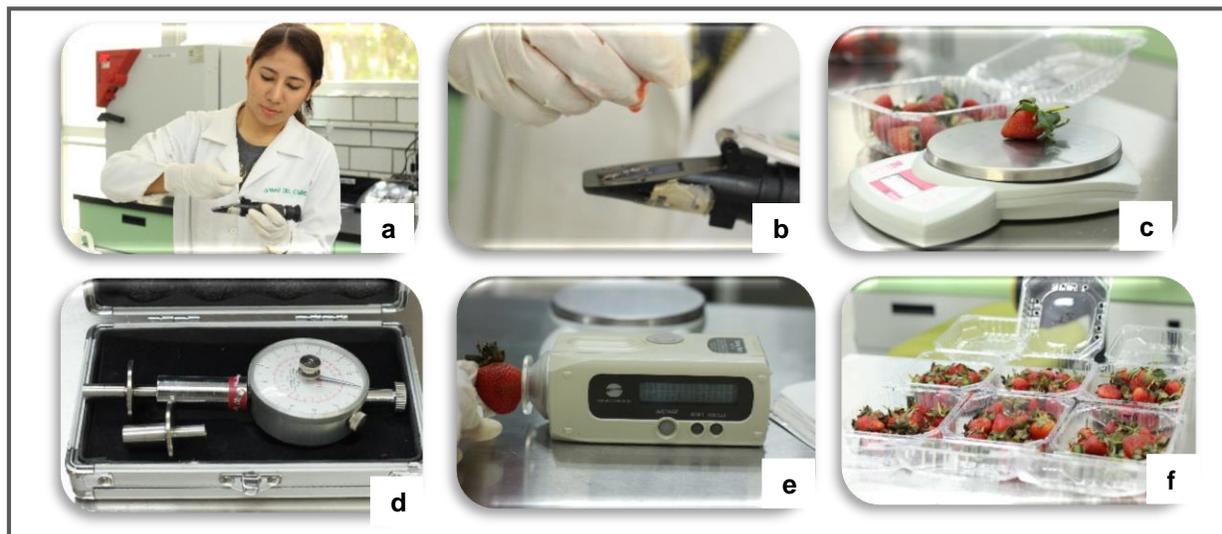


Figura 5. Mediciones de los atributos de calidad de las fresas con la cubierta comestible: a) SST, b) refractómetro con muestra del fruto, c) pérdida de peso, d) firmeza, e) color, f) almacenamiento.

6.4.2.6 Presencia de microorganismos patógenos

Para el análisis de presencia de microorganismos como requisito de atributo de calidad de la fresa, se evaluó la efectividad antimicrobiana de las cubiertas comestibles a nivel *in vitro*. Para esto, se utilizó la metodología de las diluciones seriadas (Figura 6) para las siguientes bacterias: *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

El experimento se realizó en la Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR) bajo la asesoría del Dr. Jesús Hernández Romano, jefe del Laboratorio de Microbiología.

6.4.2.6.1 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar y caldo nutritivo como medio de cultivo. Se utilizaron cajas Petri de plástico estériles (20 cajas por tratamiento). Se pesaron en dos charolas de plástico 4.6 g de agar nutritivo en cada una, el agar se vertió en dos matraces de Erlenmeyer con 200 ml de

agua destilada cada uno. Para el medio de caldo nutritivo, se pesaron 0.48 g de este mismo y se vertió en un matraz de Erlenmeyer con 60 ml de agua destilada. Todo se colocó en agitación durante 15 min para disolver el medio. Posteriormente, se colocaron en la autoclave para la esterilización durante 30 min. Al finalizar el proceso de esterilización, el agar se vertió en las 20 cajas y el caldo nutritivo en 20 tubos de ensayo, esto último dentro de una campana de flujo laminar. Los medios se guardaron a temperatura ambiente.

6.4.2.6.2 Aplicación del recubrimiento en el medio de cultivo

Se tuvo un total de seis tratamientos incluyendo el control (Tabla 3). Los recubrimientos se aplicaron a las cajas con agar nutritivo un día antes de la siembra de la bacteria, esto se realizó con ayuda de una micropipeta, donde a cada caja se le aplicó 0.5 ml de recubrimiento distribuido uniformemente por todo el medio. Las cajas se dejaron abiertas dentro de la campana de flujo para que el recubrimiento secase por completo. Una vez secas, se rotularon y guardaron en la incubadora (BIOBASE BJPX-H48II, China) a 37 °C durante 24 h.

6.4.2.6.3 Preparación del inóculo y la suspensión bacteriana

Se tomaron 50 µl de la cepa bacteriana inactiva y se colocó en dos tubos de ensayo con caldo nutritivo (25 µl en cada tubo). Esto se realizó un día antes de realizar las diluciones seriadas para que la bacteria tuviera un crecimiento “overnight”. Los tubos se dejaron en la incubadora a 37 °C durante 12 h.

A partir del cultivo de bacteria con crecimiento “overnight”, se preparó una suspensión bacteriana el día de la siembra, esta se ajustó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 0.100 ± 0.001 a 600 nm. Esta suspensión se utilizó para realizar las diluciones seriadas.

6.4.2.6.4 Evaluación de cubiertas comestibles con quitosano y/o extracto de propóleo sobre el desarrollo de bacterias patógenas.

Se estandarizó la metodología de las diluciones seriadas para determinar las diluciones empleadas. De siete diluciones decimales de una cepa bacteriana, se seleccionaron aquellas en las que el número de unidades formadoras de colonias (UFC) no fueran mayor a 300 UFC. Las diluciones empleadas fueron 10^{-4} y 10^{-5} .

Se evaluaron seis tratamientos (Tabla 3) y se realizó un control que correspondían a las cajas con medio de cultivo sin cubierta comestible. Se incluyó un control negativo (cajas con caldo nutritivo como diluyente). De todo lo anterior descrito se realizaron 4 series.

Las diluciones seriadas se realizaron a partir de la suspensión bacteriana que se ajustó previamente, se prepararon 5 diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y se hicieron 4 series independientes de estas diluciones. Se colocaron 135 μ l de medio limpio en 5 microtubos de 1.5 ml estériles. Al primer microtubo (10^{-1}) se le colocaron 15 μ l de la suspensión bacteriana ajustada a 0.100 Abs, se mezcló perfectamente y se cambió la punta de la micropipeta y se tomaron 15 μ l del primer microtubo y se adicionó al segundo microtubo (10^{-2}) y así sucesivamente. Preparadas las diluciones de las 4 series, a partir de la dilución 10^{-4} se tomaron 100 μ l y se colocaron sobre una caja Petri previamente preparada con agar nutritivo. Se dispersó el líquido con ayuda de aproximadamente 10 perlas de vidrio estériles, se dejó abierta la caja hasta que se evaporó el exceso de líquido. Se prosiguió a realizar la siguiente dilución 10^{-5} y se siguió el mismo procedimiento. Una vez secas las cajas, las perlas se colocaron en un recipiente con cloro al 0.5% y las cajas se pusieron a incubar a 37 °C debidamente etiquetadas con fecha, dilución y número de serie. Se hizo lectura de las cajas a las 24 y 48 h de incubación haciendo un conteo de las colonias bacterianas. Se reportó en unidades formadoras de colonias (UFC).

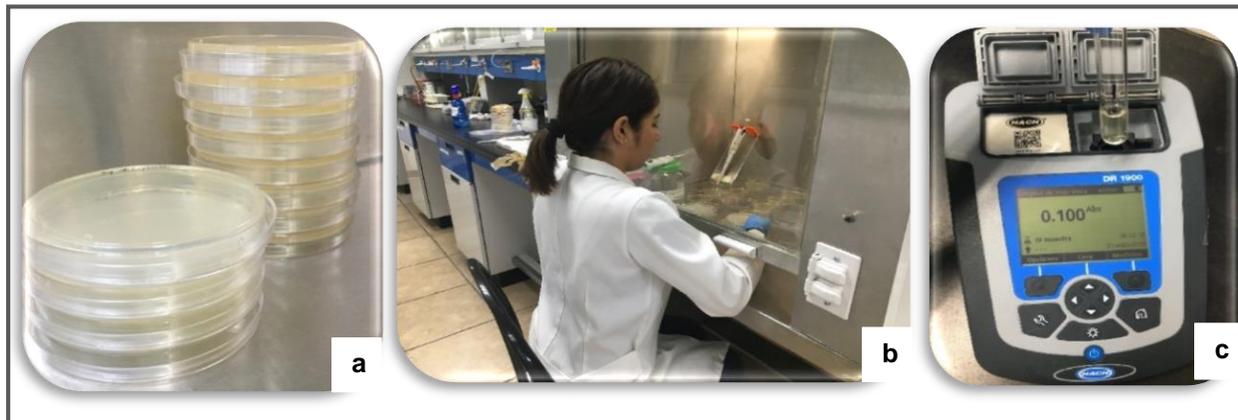


Figura 6. Evaluación del efecto de los tratamientos mediante la metodología de las diluciones seriadas: a) cajas Petri con la cubierta comestible, b) inoculación de la bacteria en la campana de flujo laminar, b) ajuste de absorbancia de la suspensión bacteriana a 0.100 Abs.

6.5 Evaluación del efecto de cubiertas comestibles adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides totales.

6.5.1 Determinación de la capacidad antioxidante

Se evaluó cada tercer día y se determinó siguiendo la metodología empleada por Ventura-Aguilar *et al.* (2018)⁴⁵. Previamente se preparó la solución stock de 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH), el cual se utiliza generalmente como un reactivo para evaluar la actividad de eliminación de los radicales libres de los antioxidantes. Se pesó 0.01g de DPPH y se aforó a 25 ml con metanol, de esta solución, se tomó 1.3 ml y se aforó a 10 ml con metanol para preparar la solución diaria. Posteriormente, se pesaron 0.5 g de muestra, se agregaron 5 ml de metanol y se maceró con un mortero en cerámica. La solución resultante se transfirió a cuatro tubos Eppendorf de 1.5 ml, los cuales se centrifugaron (modelo Prism High Speed Microcentrifuge, Labnet International, U.S.A), durante 10 min a 8000 rpm. De cada muestra, se tomaron los sobrenadantes de los

cuales se tomaron 250 µl de la muestra y se agregaron a 750 µl de DPPH, mientras que, para la prueba en blanco, a 250 µl de metanol se les agregó 750 µl de DPPH. Se dejó en incubación por 30 min en la oscuridad. Al final, el porcentaje de reducción de DPPH, se determinó espectrofotométricamente (517nm) con un espectrofotómetro 10S UV-VIS (Thermo scientific Genesys,China) calibrado con metanol con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción de DPPH} = \frac{\text{Abs}_0 - \text{Abs}_m}{\text{Abs}_0} \times 100$$

Abs₀

Donde Abs₀= absorbancia del blanco y Abs_m= absorbancia muestra

6.5.2 Determinación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se evaluó cada tercer día y se analizó con el método colorimétrico de Folin- Ciocalteau según lo descrito por Singleton y Rossi (1965)⁸⁸. De 150 µl de la muestra, se mezclaron con 3.85 ml de agua destilada, 250 µl de fenol de Folin Ciocalteau y 750 µl de NaCO₃. Se dejó reaccionar durante 2 h en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm con un espectrofotómetro 10S UV-VIS (Thermo scientific Genesys,China) y la concentración de los compuestos fenólicos totales de las muestras se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico.

6.5.3 Determinación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se siguió la metodología de Chougui *et al.* (2013)⁸⁹. Donde 2 g de fresa de cada tratamiento se maceraron con 5 ml de una solución de metanol al 80%. El macerado se llevó a una centrifuga a 8000 rpm durante 12 min Posteriormente, se utilizaron 1.5 ml de sobrenadante que reaccionaron con 1.5 ml de AlCl₃ y después de 30 min se leyó la absorbancia de la muestra a 430 nm con un espectrofotómetro (Thermo scientific Genesys,China). El contenido de flavonoides se

cuantificó utilizando una curva estándar de quercetina (20-110 μg quercetina) y se evaluó cada tercer día.

6.6 Análisis estadístico

Se realizó un experimento completamente aleatorizado. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico InfoStat versión estudiantil 2018.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de nanopartículas de quitosano

7.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En el TEM, las imágenes muestran que las nanopartículas de quitosano en todas las muestras evaluadas se mostraron esféricas y distribuidas uniformemente en la mayoría de los campos observados. En las NPQ se observó un tamaño promedio de 36.4 ± 5.8 nm, mientras que en las NPQ 01 fue de 28.85 ± 3.4 nm y las NPQ P un tamaño de 31.6 ± 7.9 (Figura 7).

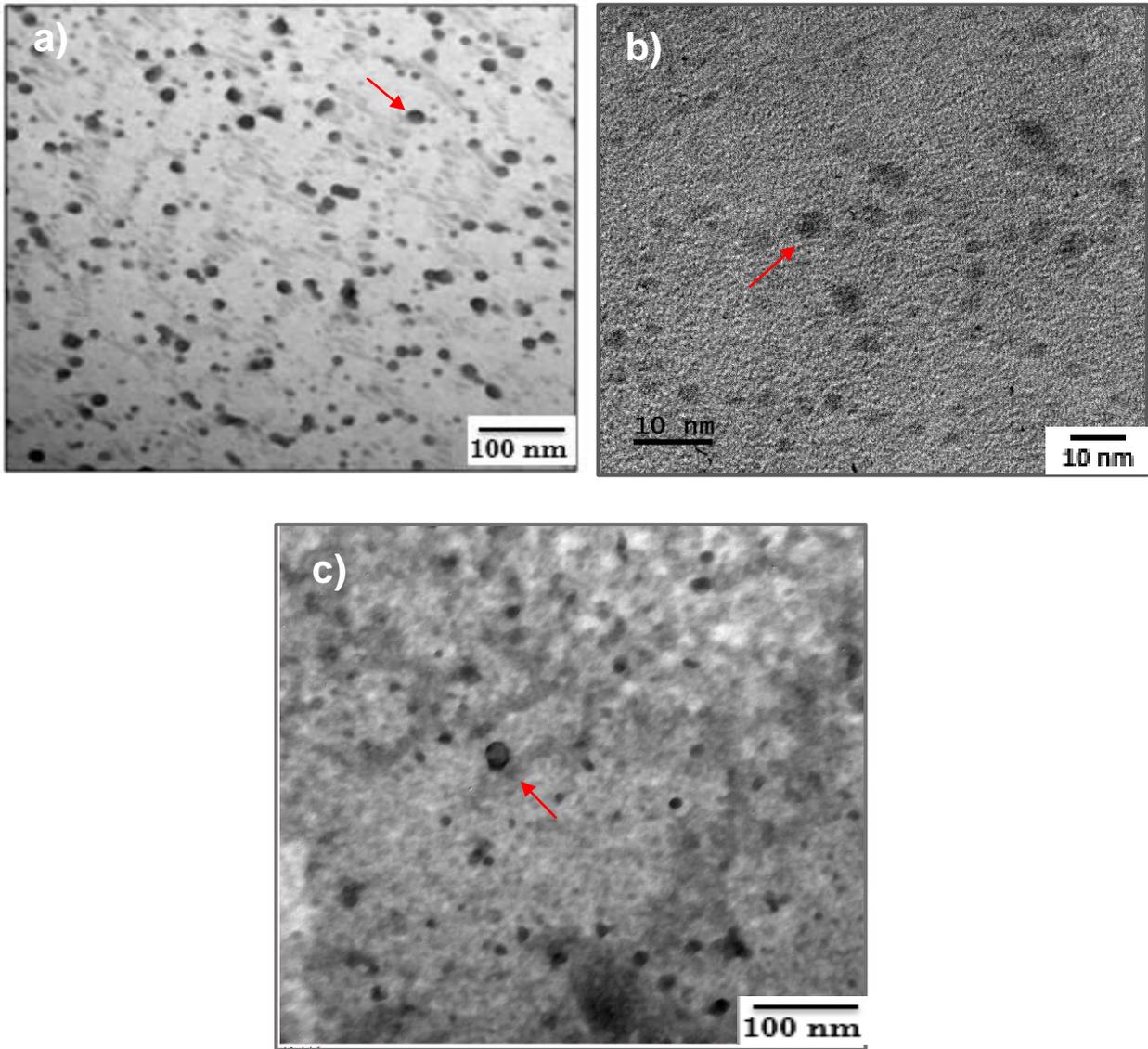


Figura 7. Determinación del tamaño de NPQ en diferentes soluciones: a) NPQ (nanopartículas de quitosano sin solución), b) NPQ 01 (nanopartículas de quitosano en solución de quitosano al 0.01%), c) NPQ P (nanopartículas de quitosano en solución de propóleo al 10%).

7.1.2 Potencial z y dispersión dinámica de luz (DLS)

Las nanopartículas que presentaron un potencial Z mayor fueron las NPQ P (127 ± 20.81), seguido de las NPQ 05 (67.50 ± 12.66), ambas muestras fueron diferentes estadísticamente de los demás tratamientos evaluados, mientras que las NPQ y NPQ 01 no mostraron diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con las otras muestras analizadas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del Potencial Z de las nanopartículas de quitosano en diferentes soluciones.

Muestra	Potencial Z (mV)
NPQ	20.7 ± 2.1 ^{a*}
NPQ 01	12.53 ± 1.68 ^a
NPQ 05	67.50 ± 12.66 ^b
NPQ P	127 ± 20.81 ^c

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). NPQ (nanopartículas de quitosano sin solución), NPQ 01 (nanopartículas de quitosano en solución de quitosano al 0.01%), NPQ 05 (nanopartículas de quitosano en solución de quitosano al 0.05%), NPQ P (nanopartículas de quitosano en solución de propóleo al 10%).

Con relación a la determinación por DLS, se observa para las NPQ una distribución unimodal con un rango entre 50 y 500 nm con un pico máximo de 16.48 ± 4.3 nm, las NPQ 01 presentaron un tamaño máximo de 330.20 ± 38.55 nm con un rango entre 40-120 nm y 120-1000 nm y distribución bimodal, las NPQ 05 muestra una distribución unimodal entre 110-800 nm con un tamaño de 291.63 ± 6.31 nm y finalmente las NPQ P fueron las que presentaron un mayor tamaño 536.53 ± 91.29 nm con una distribución bimodal entre un rango de 7-12 nm y 300-600 nm (Figura 8).

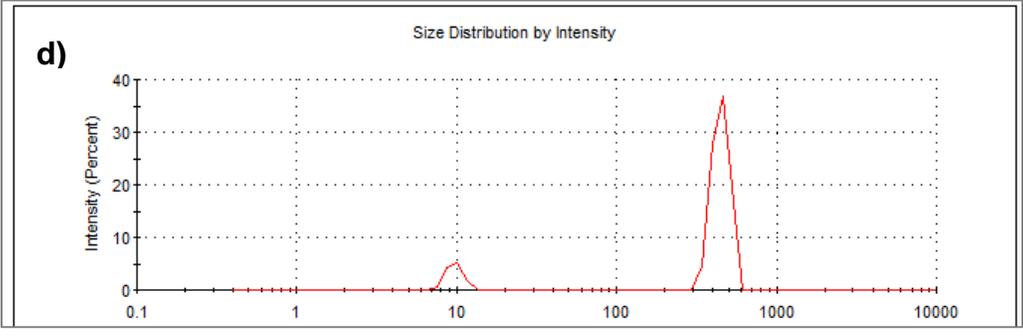
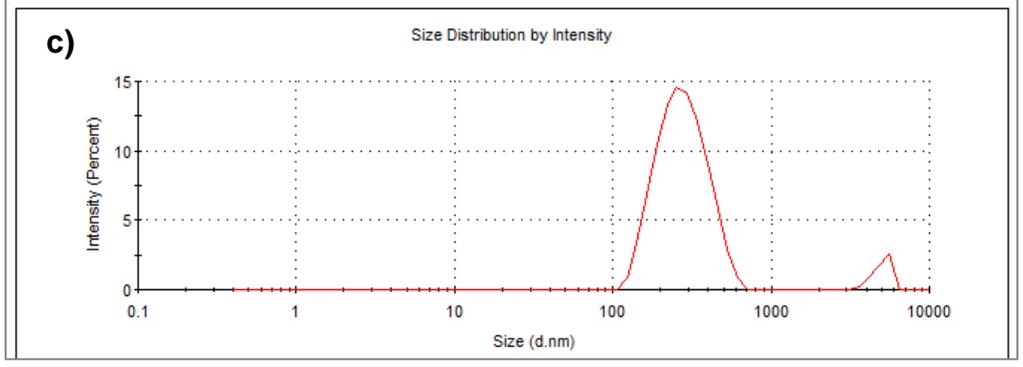
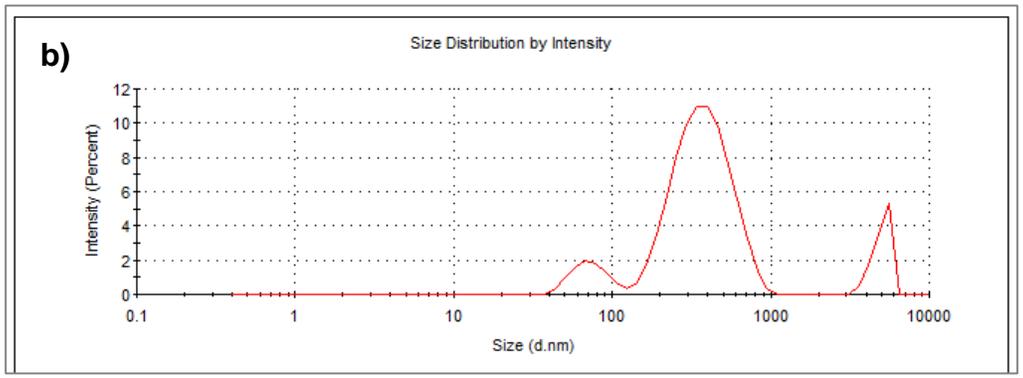
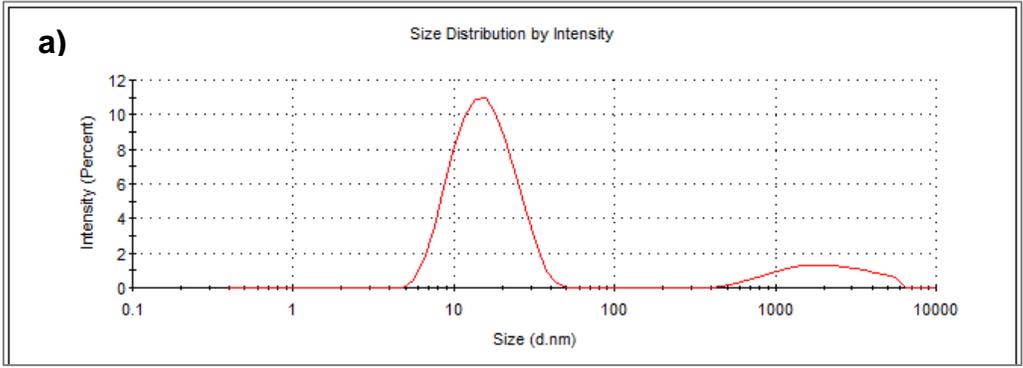


Figura 8. Tamaño de distribución de partícula de nanopartículas de quitosano en diferentes soluciones: a) NPQ (nanopartículas de quitosano sin solución), b) NPQ 01(nanopartículas de quitosano en solución de quitosano al 0.01%), C) NPQ 05 (nanopartículas de quitosano en solución de quitosano al 0.05%), d) NPQ P (nanopartículas de quitosano en solución de propóleo al 10%).

7.1.3 Microscopia óptica

El espesor de las cubiertas comestibles de Q y Q+NPQ fue de 155.99 ± 13.91 y 220.52 ± 20.56 μm , respectivamente, mientras que, las cubiertas que contenían propóleo presentaron espesores de 256.41 ± 41.71 μm en Q+NPQ+NPQP10%, la cubierta Q+NPQ+NPQP20% se observó con un espesor de 243.60 ± 90.64 μm y la cubierta con la concentración de propóleo más alta (Q+NPQ+NPQP30%), fue la que presentó un mayor espesor (309.83 ± 45.33 μm) (Figura 9).

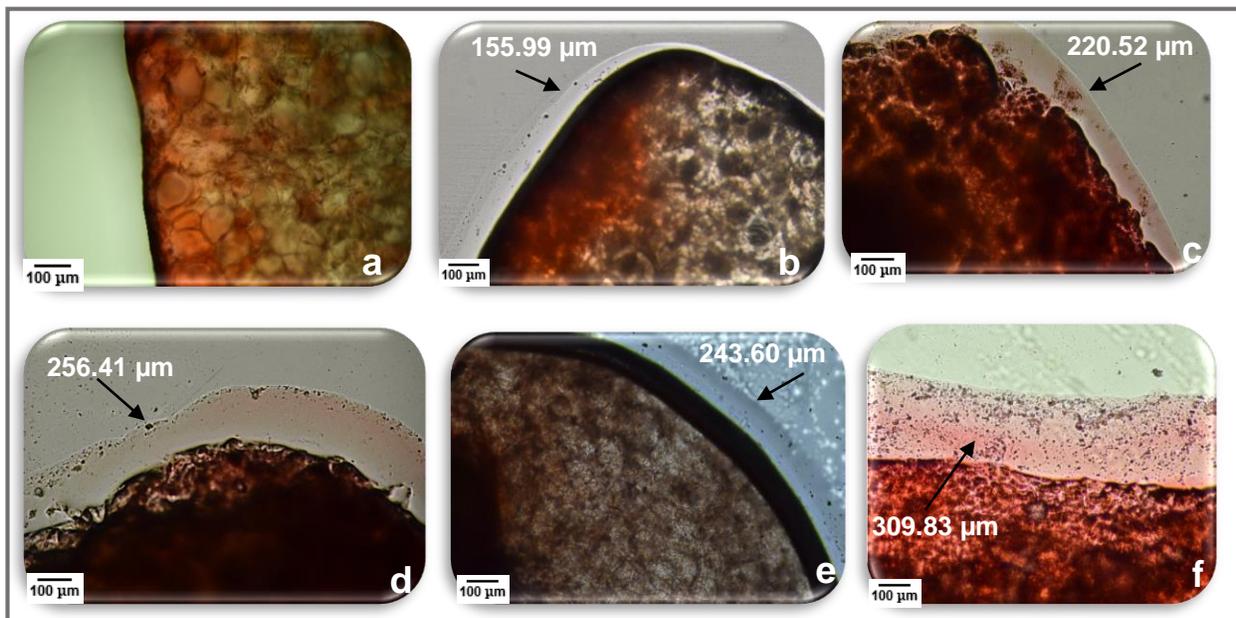


Figura 9. Corte histológico de fresas con cubiertas comestibles vistas en el microscopio óptico a una magnificación de 10x: a) control (fresa no tratada); b) Q (quitosano); c) Q+NPQ (quitosano + nanopartículas de quitosano); d) Q+NPQ+ P10% (quitosano + nanopartículas de quitosano+ propóleo 10%); e) Q+NPQ+ P20% (quitosano +

nanopartículas de quitosano+ propóleo 20%); f) Q+NPQ+ P30% (quitosano + nanopartículas de quitosano+ propóleo 30%).

7.2 Evaluación de los atributos de calidad de la fresa

7.2.1 Pérdida de peso

Las fresas que mostraron una menor pérdida de peso al final del almacenamiento fueron las recubiertas con Q+NPQ+P10% y Q+NPQ (9.77 y 10.27%, respectivamente) seguido de las cubiertas Q+NPQ+P30% y Q+NPQ+P20% (10.9 y 11.01%, respectivamente) las cuales fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) al control (14.93%) (Figura 10).

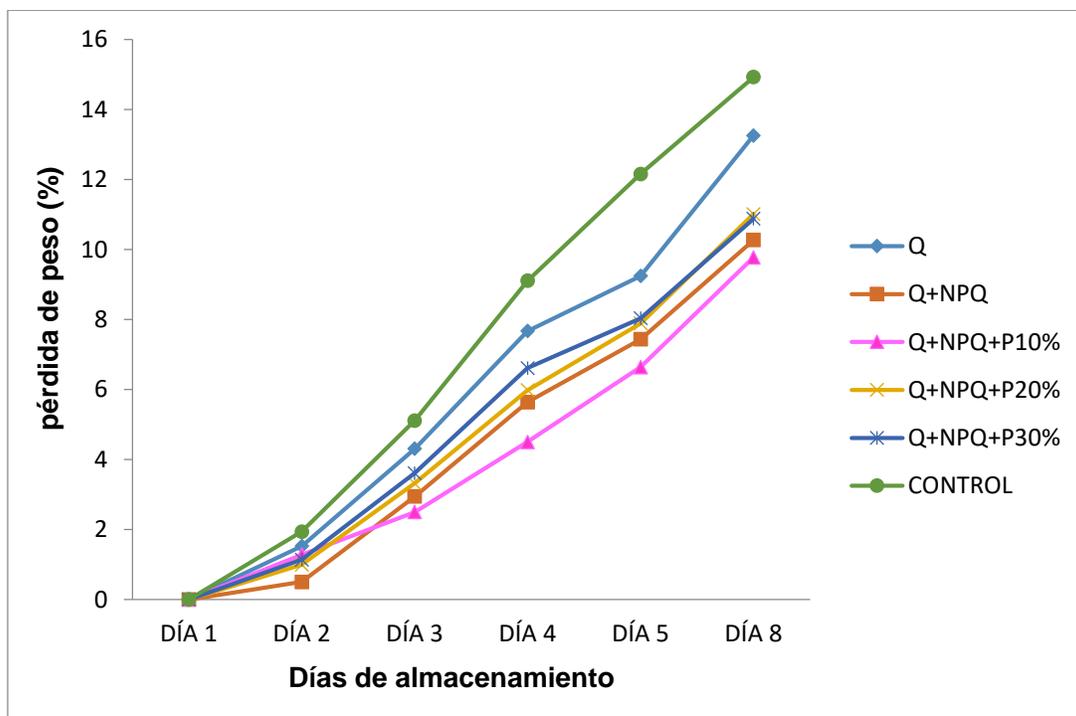


Figura 10. Representación gráfica de la pérdida de peso diaria de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.

7.2.2 Firmeza

Con respecto a la variable firmeza en la evaluación inicial, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados, sin embargo, al término del almacenamiento los frutos que fueron cubiertos con el tratamiento Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P10% mostraron una mayor firmeza estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (4.96 N y 4.87 N, respectivamente) comparado con el control (3.83 N), sin embargo, fueron estadísticamente similares al resto de las cubiertas evaluadas (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de firmeza de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	FIRMEZA (N)	
	Días de almacenamiento	
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	5.45 ± 0.97 ^{a*}	4.82 ± 1.04 ^{ab}
Q + NPQ	5.43 ± 1.00 ^a	4.50 ± 0.94 ^{ab}
Q + NPQ + P10%	5.15 ± 1.05 ^a	4.87 ± 0.67 ^b
Q + NPQ + P20%	5.19 ± 0.93 ^a	4.96 ± 1.26 ^b
Q + NPQ + P30%	5.24 ± 1.28 ^a	4.75 ± 1.02 ^{ab}
CONTROL	5.31 ± 0.91 ^a	3.83 ± 0.75 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

7.2.3 Sólidos solubles totales (SST)

Con respecto a los SST, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 6).

Tabla 6. Contenido de °Brix de los frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	° BRIX		
	Días de almacenamiento		
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	6.72 ± 0.81 ^{a*}	6.85 ± 0.84 ^a	6.79 ± 0.65 ^a
Q + NPQ	6.68 ± 0.64 ^a	6.83 ± 0.72 ^a	6.87 ± 0.74 ^a
Q + NPQ + P10%	6.67 ± 0.77 ^a	6.77 ± 0.68 ^a	6.83 ± 1.02 ^a
Q + NPQ + P20%	6.61 ± 0.70 ^a	6.67 ± 0.82 ^a	6.71 ± 1.13 ^a
Q + NPQ + P30%	6.93 ± 0.88 ^a	6.80 ± 0.68 ^a	6.78 ± 1.01 ^a
CONTROL	6.82 ± 0.82 ^a	7.05 ± 1.21 ^a	6.71 ± 0.76 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

7.2.4 Acidez titulable (AT)

Con respecto a los valores de AT, en el primer día las fresas recubiertas con la cubierta Q+NPQ fueron las que mostraron mayor porcentaje de AT (0.72%) siendo diferente estadísticamente ($p<0.05$) del control (64%). Durante el día tres no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en el último día de almacenamiento los frutos recubiertos con el tratamiento Q+NPQ+P10% mostraron mayor porcentaje de AT (0.65%) comparado con el control (0.57%), siendo diferente estadísticamente ($p<0.05$) (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido de AT de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	ACIDEZ TITULABLE (%)			
	Días de almacenamiento			
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	0.69 ± 0.02 ^{ab*}	0.64 ± 0.00 ^a	0.62 ± 0.03 ^{ab}	0.60 ± 0.03 ^{ab}
Q + NPQ	0.72 ± 0.04 ^b	0.67 ± 0.06 ^a	0.67 ± 0.00 ^b	0.58 ± 0.00 ^{ab}
Q + NPQ + P10%	0.70 ± 0.04 ^{ab}	0.68 ± 0.02 ^a	0.67 ± 0.00 ^b	0.65 ± 0.02 ^b
Q + NPQ + P20%	0.65 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.02 ^a	0.64 ± 0.00 ^{ab}	0.59 ± 0.02 ^{ab}
Q + NPQ + P30%	0.65 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.02 ^a	0.63 ± 0.05 ^{ab}	0.59 ± 0.05 ^{ab}
CONTROL	0.64 ± 0.00 ^a	0.62 ± 0.03 ^a	0.59 ± 0.02 ^a	0.57 ± 0.02 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

7.2.5 Color

Se observó que al tercer día de almacenamiento los frutos con la cubierta Q+NPQ+ P 20% mostraron una menor luminosidad (32.21) estadísticamente significativa ($p>0.05$) comparados con el control (35.45). No se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos durante el resto del almacenamiento (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de Luminosidad (L^*) de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento

Tratamiento	LUMINOSIDAD (L^*)					
	Días de almacenamiento					
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	2 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	4 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	34.09 \pm 2.46 ^{a*}	33.14 \pm 3.19 ^a	33.90 \pm 1.88 ^{ab}	30.29 \pm 2.20 ^a	31.56 \pm 1.87 ^a	30.98 \pm 2.28 ^a
Q+ NPQ	32.95 \pm 2.04 ^a	33.28 \pm 2.84 ^a	32.89 \pm 3.12 ^{ab}	31.55 \pm 2.30 ^a	32.51 \pm 2.49 ^a	31.54 \pm 2.41 ^a
Q+NPQ+P10%	34.84 \pm 2.42 ^a	32.19 \pm 2.19 ^a	33.15 \pm 2.33 ^{ab}	32.24 \pm 1.48 ^a	31.32 \pm 2.08 ^a	31.77 \pm 1.53 ^a
Q+NPQ+P20%	33.48 \pm 3.74 ^a	31.65 \pm 3.63 ^a	32.21 \pm 2.88 ^a	30.90 \pm 2.49 ^a	30.18 \pm 2.83 ^a	30.64 \pm 2.54 ^a
Q+NPQ+P30%	32.49 \pm 4.43 ^a	31.50 \pm 3.26 ^a	32.98 \pm 2.29 ^{ab}	31.92 \pm 2.99 ^a	30.95 \pm 1.91 ^a	31.17 \pm 2.27 ^a
CONTROL	33.73 \pm 1.83 ^a	34.42 \pm 3.41 ^a	35.45 \pm 3.12 ^b	32.00 \pm 2.86 ^a	32.56 \pm 2.60 ^a	32.32 \pm 2.62 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

La cromaticidad (C^*) se mostró variable durante los días de almacenamiento, al día uno los valores más altos los presentó la cubierta Q+NPQ+P20% (33.67) comparada con el control (29.71), sin embargo, al término del almacenamiento, fue esta cubierta la que presentó los valores más bajos de cromaticidad (22.86), siendo estadísticamente diferente ($p>0.05$) del control que presentó los valores más altos (28.00). En el resto de los tratamientos, no hubo diferencias significativas comparados con el control (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de Cromaticidad (C*) de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.

CROMATICIDAD (C*)						
Tratamiento	Días de almacenamiento					
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	2 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	4 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	27.97 ± 3.33 ^a	30.31 ± 4.30 ^a	26.05 ± 2.46 ^{abc}	29.77 ± 3.27 ^b	27.37 ± 2.70 ^{ab}	26.87 ± 2.84 ^b
Q+NPQ	30.38 ± 3.34 ^{abc}	31.36 ± 3.79 ^a	27.47 ± 3.21 ^{bc}	28.16 ± 2.70 ^{ab}	27.05 ± 2.93 ^{ab}	27.31 ± 2.27 ^b
Q+NPQ+P10%	32.62 ± 4.90 ^{bc}	30.54 ± 3.50 ^a	26.04 ± 2.22 ^{abc}	28.90 ± 4.36 ^{ab}	27.85 ± 2.54 ^{ab}	27.35 ± 3.21 ^b
Q+NPQ+P20%	33.67 ± 3.19 ^c	28.61 ± 4.44 ^a	23.77 ± 3.13 ^a	27.19 ± 4.40 ^{ab}	25.85 ± 3.96 ^a	22.86 ± 3.84 ^a
Q+NPQ+30%	31.65 ± 3.25 ^{abc}	29.99 ± 3.91 ^a	24.95 ± 3.02 ^{ab}	26.07 ± 2.08 ^a	26.57 ± 2.57 ^{ab}	25.65 ± 2.64 ^{ab}
CONTROL	29.71 ± 2.96 ^{ab}	30.38 ± 3.24 ^a	28.86 ± 2.92 ^c	30.01 ± 2.31 ^{ab}	29.07 ± 2.04 ^b	28.00 ± 2.81 ^b

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

En la variable de ángulo de matiz, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en los tratamientos evaluados (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de ángulo de matiz (H°) de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y /o extracto de propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	ÁNGULO DE MATIZ (H°)					
	Días de almacenamiento					
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	2 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	4 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	25.50 ± 4.19 ^a	25.05 ± 5.00 ^a	20.67 ± 4.10 ^a	24.72 ± 5.47 ^a	21.55 ± 4.05 ^a	22.87 ± 3.94 ^a
Q+NPQ	25.16 ± 6.40 ^a	24.09 ± 4.25 ^a	21.71 ± 3.89 ^a	23.85 ± 3.97 ^a	21.07 ± 3.82 ^a	22.72 ± 3.85 ^a
Q+NPQ+P10%	27.27 ± 9.15 ^a	23.13 ± 3.77 ^a	20.80 ± 3.78 ^a	23.13 ± 3.51 ^a	21.55 ± 2.49 ^a	22.64 ± 2.96 ^a
Q+NPQ+P20%	28.78 ± 5.78 ^a	24.35 ± 3.60 ^a	20.75 ± 2.96 ^a	24.48 ± 7.47 ^a	21.85 ± 3.53 ^a	22.51 ± 3.18 ^a
Q+NPQ+P30%	26.71 ± 4.86 ^a	24.65 ± 6.66 ^a	21.27 ± 4.26 ^a	22.74 ± 5.33 ^a	22.41 ± 3.83 ^a	21.97 ± 3.96 ^a
CONTROL	25.07 ± 5.95 ^a	25.34 ± 5.40 ^a	23.73 ± 4.20 ^a	23.95 ± 4.41 ^a	23.05 ± 4.13 ^a	23.87 ± 5.06 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

7.2.6 Evaluación antibacteriana de las cubiertas comestibles

7.2.6.1 *Escherichia coli*

Todos los tratamientos probados contra el crecimiento de *E. coli* en la dilución 10^{-4} fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) respecto al control, sin embargo, en los tratamientos con propóleo (Q+NPQ+P10% y Q+NPQ+P30%) se observó el menor crecimiento de UFC después de 48 h (5.67 y 7.33 UFC, respectivamente) (Figura 11). En la dilución 10^{-5} se presentó el mismo caso, donde los tratamientos con propóleo (Q+NPQ+P10%, Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P30%) hubo menor crecimiento de UFC (de 1 a 3 UFC) frente al control (30 UFC) (Tabla 11).

Tabla 11. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* a dos diluciones diferentes (10^{-4} y 10^{-5}) presentes en los medios de cultivo adicionados con cubierta comestible después de 24 y 48 h.

<i>Escherichia coli</i> (UFC)				
Tratamientos	Dilución 10^{-4}		Dilución 10^{-5}	
	24 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	48 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	24 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	48 h. ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	28.67 \pm 17.50 ^{a*}	33 \pm 22.07 ^a	1.33 \pm 0.58 ^a	2 \pm 1.73 ^a
Q+NPQ	122 \pm 14.53 ^b	122 \pm 14.53 ^b	11.67 \pm 3.21 ^b	11.67 \pm 3.21 ^b
Q+NPQ+P10%	0 \pm 0 ^a	5.67 \pm 6.43 ^a	0 \pm 0 ^a	1.33 \pm 1.15 ^a
Q+NPQ+P20%	21.33 \pm 6.43 ^a	24 \pm 7.21 ^a	0 \pm 0 ^a	1.0 \pm 1 ^a
Q+NPQ+P30%	2.67 \pm 2.31 ^a	7.33 \pm 2.31 ^a	0 \pm 0 ^a	3.67 \pm 4.04 ^a
CONTROL	211.7 \pm 34.12 ^c	217.33 \pm 37.43 ^c	26.33 \pm 4.04 ^c	30 \pm 0 ^c

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (cajas de medio de cultivo con bacteria sin la cubierta comestible).

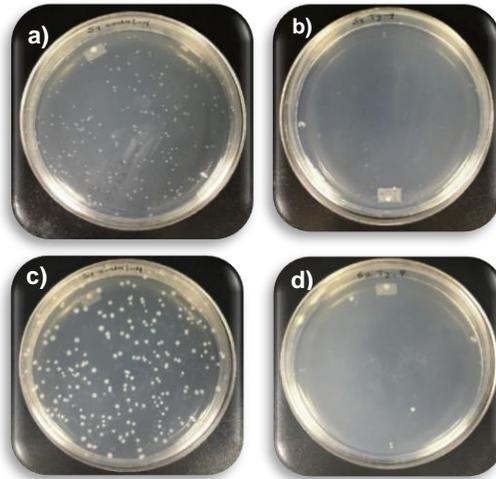


Figura 11. Desarrollo de UFC de *E. coli in vitro* tratados con cubiertas comestibles: a) control a las 24 h dilución 10^{-4} , b) Q+NPQ+P10% a las 24 h dilución 10^{-4} , c) control a las 48 h dilución 10^{-4} , d) Q+NPQ+P10% a las 48 h dilución 10^{-4} .

7.2.6.2 *Listeria monocytogenes*

Para el caso de *L. monocytogenes* se observó que en la dilución 10^{-4} los tratamientos que redujeron significativamente el crecimiento de UFC fueron los tratamientos Q, Q+NPQ+P10%, Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P30% con un crecimiento de 0 a 1 UFC respecto al control (286 UFC) a las 24 h (Figura 12). El tratamiento adicionado con Q logró detener el crecimiento de UFC en la dilución 10^{-4} debido a que no se incrementaron las colonias después de 48 h. En la dilución 10^{-5} los tratamientos con mayor concentración de propóleo (Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P30%) inhibieron por completo el crecimiento de *L. monocytogenes* con 0 UFC después de 24 y 48 h (Tabla 12).

Tabla 12. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. monocytogenes* a dos diluciones diferentes (10^{-4} y 10^{-5}) presentes en los medios de cultivo adicionados con cubierta comestible después de 24 y 48 h.

<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC)				
Tratamientos	Dilución 10^{-4}		Dilución 10^{-5}	
	24 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	48 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	24 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	48 h. ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	$1 \pm 0^{a*}$	1 ± 0^a	0 ± 0^a	3 ± 2.65^a
Q + NPQ	30 ± 7.81^b	108.67 ± 49.12^b	32.33 ± 0.58^b	12.33 ± 1.15^a
Q + NPQ + P10%	0 ± 0^a	43.33 ± 21.59^a	0 ± 0^a	7.67 ± 7.23^a
Q + NPQ + P20%	0 ± 0^A	21 ± 15.39^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Q + NPQ + P30%	0 ± 0^a	22.67 ± 9.24^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
CONTROL	286.67 ± 11.93^c	300 ± 8^c	46 ± 19.29^b	51.33 ± 25.32^b

*Medias con letra iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (Quitosa), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (Propóleo en diferentes concentraciones). Control (Cajas de medio de cultivo con bacteria sin la cubierta comestible).

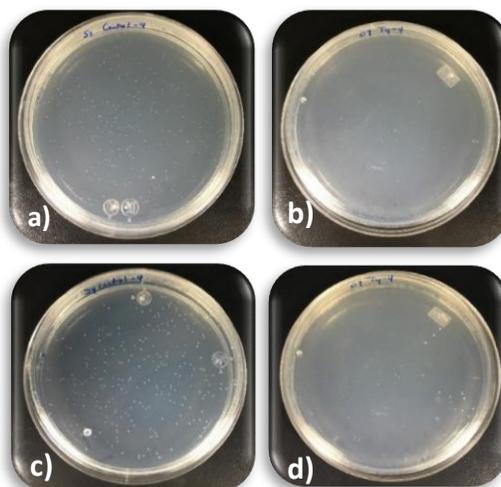


Figura 12. Desarrollo de UFC de *L. monocytogenes* *in vitro* tratados con cubierta comestible: a) control a las 24 h dilución 10^{-4} , b) Q+NPQ+P20% a las 24 h dilución 10^{-4} , c) control a las 48 h dilución 10^{-4} , d) Q+NPQ+P20% a las 48 h dilución 10^{-4} .

7.2.6.3 *Salmonella enteritidis*

Para el caso de *S. enteritidis* en la dilución 10^{-4} todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente respecto al control, sin embargo, fueron los tratamientos Q+NPQ+P10% y Q+NPQ+P30% que después de 48 h mostraron menor crecimiento de UFC (13.33 y 13.67, respectivamente) a diferencia del control que a las 48 h mostró un crecimiento de 297 UFC (Figura 13). En la dilución 10^{-5} el tratamiento Q+NPQ+P20% seguido del tratamiento Q+NPQ+P30% presentaron un número bajo de UFC (1.67 y 2.33, respectivamente) siendo estadísticamente diferente al control (40.33 UFC). El tratamiento que logró inhibir el crecimiento de *S. enteritidis* fue el Q+NPQ+P10% ya que después de 24 y 48 horas tuvo 0 UFC para una dilución de 10^{-5} (Tabla 13).

Tabla 13. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. enteritidis* a dos diluciones diferentes (10^{-4} y 10^{-5}) presentes en los medios de cultivo adicionados con cubierta comestible después de 24 y 48 h.

Tratamientos	<i>Salmonella enteritidis</i> (UFC)			
	Dilución 10^{-4}		Dilución 10^{-5}	
	24 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	48 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	24 h. ($\bar{x} \pm D.E$)	48 h. ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	0 ± 0 ^{a*}	29.67 ± 1.53 ^a	0 ± 0 ^a	2.33 ± 0.58 ^a
Q + NPQ	188.67 ± 10.21 ^c	190.33 ± 11.72 ^b	18.33 ± 1.15 ^c	22 ± 2.65 ^b
Q + NPQ + P10%	11.33 ± 4.04 ^a	13.33 ± 5.69 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Q + NPQ + P20%	38.33 ± 13.58 ^b	38.33 ± 13.58 ^a	1.33 ± 1.53 ^b	1.67 ± 2.08 ^a
Q + NPQ + P30%	13.33 ± 10.12 ^a	13.67 ± 9.87 ^a	2.33 ± 1.53 ^a	2.33 ± 1.53 ^a
CONTROL	297 ± 5.20 ^d	297 ± 5.20 ^c	38.67 ± 6.11 ^c	40.33 ± 7.23 ^c

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (cajas de medio de cultivo con bacteria sin la cubierta comestible).

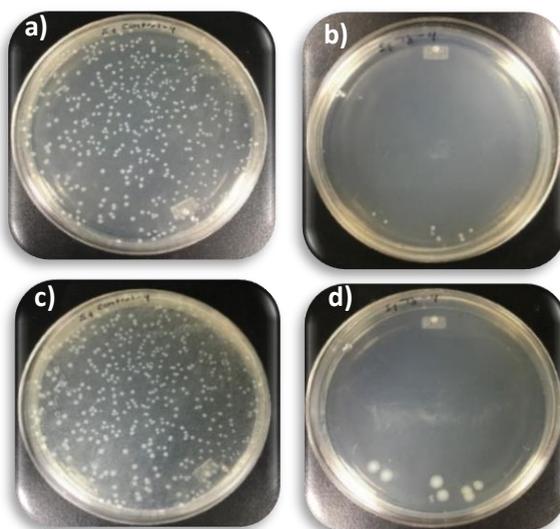


Figura 13. Desarrollo de UFC de *S. enteritidis in vitro* tratados con cubierta comestible: a) control a las 24 h dilución 10^{-4} , b) Q+NPQ+P10% a las 24 h dilución 10^{-4} , c) control a las 48 h dilución 10^{-4} , d) Q+NPQ+P10% a las 48 h.

7.3 Evaluación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides totales de las fresas

7.3.1 Capacidad antioxidante (porcentaje de inhibición del DPPH)

La capacidad antioxidante que presentaron las fresas fue muy variable durante los ocho días de almacenamiento. El primer día, las fresas tratadas con Q+NPQ y Q+NPQ+P20%, fueron las que mostraron un mayor porcentaje de inhibición del DPPH (87.57% y 87.39% respectivamente) siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) de los demás tratamientos y el control (75.69%). Al tercer día de evaluación las fresas recubiertas con Q+NPQ+P30% (90.27%) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control (69.59%), sin embargo, no fue diferente de las demás cubiertas evaluadas. Durante el día cinco, todas las fresas recubiertas fueron diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) al control ya que este presentó valores bajos (57.33%) comparado con los demás tratamientos los cuales mostraron valores que oscilaron de 72 a 79.88%. Para el último día de evaluación, las fresas con los tratamientos Q,

Q+NPQ+P10% y Q+NPQ+P30% (83.68, 87 y 92.45%, respectivamente) fueron las que presentaron los valores más altos de porcentaje de inhibición del DPPH con respecto al control (69.03%) (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de DPPH de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	DPPH (%)			
	Días de almacenamiento			
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	86.03 \pm 3.63 ^{ab*}	73.91 \pm 6.52 ^a	79.88 \pm 1.66 ^c	83.68 \pm 2.31 ^{bc}
Q + NPQ	87.57 \pm 1.93 ^b	78.13 \pm 7.00 ^{ab}	72.64 \pm 0.88 ^b	78.24 \pm 3.09 ^b
Q + NPQ + P10%	79.05 \pm 2.13 ^{ab}	82.56 \pm 1.12 ^{ab}	73.98 \pm 2.42 ^{bc}	87.00 \pm 1.54 ^{bc}
Q + NPQ + P20%	87.39 \pm 5.86 ^b	80.84 \pm 8.31 ^{ab}	72.66 \pm 4.38 ^b	83.50 \pm 0.51 ^b
Q + NPQ + P30%	82.31 \pm 5.80 ^{ab}	90.23 \pm 0.37 ^b	73.70 \pm 0.94 ^b	92.45 \pm 6.61 ^c
CONTROL	75.69 \pm 0.27 ^a	69.59 \pm 1.97 ^a	57.33 \pm 0.40 ^a	69.03 \pm 0.62 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

7.3.2 Fenoles totales

Las fresas recubiertas con los tratamientos que contienen propóleo Q+NPQ+P30%, Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P10% (69.98, 67.15 y 66.46 mg EAG g⁻¹ de fresa, respectivamente) fueron las que tuvieron mayor contenido fenólico al día uno comparado con el control (48.08 mg EAG g⁻¹ de fresa), siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Al tercer día el tratamiento Q+NPQ+P20% (45.49 mg EAG g⁻¹ de fresa) fue el que mantuvo su nivel de compuestos fenólicos totales más alto. Durante los siguientes días (día cinco y ocho), las fresas con mayor contenido de compuestos fenólicos totales fueron

las recubiertas con Q+NPQ+P10%, ya que al término de la evaluación mostraron un contenido de 28.49 mg EAG g⁻¹ de fresa respecto al control (18.13 mg EAG g⁻¹ de fresa) (Tabla 15).

Tabla 15. Contenido de fenoles totales de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	FENOLES TOTALES (mg EAG g ⁻¹ de fresa)			
	Días de almacenamiento			
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	55.07 ± 4.58 ^{ab*}	41.69 ± 1.54 ^{bc}	31.18 ± 4.59 ^{ab}	26.23 ± 3.52 ^{ab}
Q + NPQ	57.80 ± 4.73 ^{bc}	38.49 ± 2.10 ^b	33.27 ± 5.74 ^{ab}	24.19 ± 5.80 ^{ab}
Q + NPQ + P10%	66.46 ± 2.46 ^{cd}	39.10 ± 1.95 ^b	34.75 ± 2.32 ^b	28.49 ± 1.20 ^b
Q + NPQ + P20%	67.15 ± 2.65 ^d	45.49 ± 0.56 ^c	31.83 ± 3.22 ^{ab}	25.53 ± 2.63 ^{ab}
Q + NPQ + P30%	69.98 ± 2.02 ^d	40.12 ± 0.77 ^b	30.67 ± 4.54 ^{ab}	24.47 ± 1.35 ^{ab}
CONTROL	48.08 ± 0.66 ^a	24.4 ± 2.05 ^a	22.85 ± 4.01 ^a	18.13 ± 2.92 ^a

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

7.3.3 Flavonoides totales

El comportamiento del contenido de flavonoides fue variable, ya que el primer día todos los tratamientos evaluados fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$). Sin embargo, durante los ocho días de almacenamiento, las fresas cubiertas con el tratamiento Q+NPQ+P20% fueron las que tuvieron un mayor contenido de flavonoides totales, estas mostraron un contenido de 554.61 µg quercetina g⁻¹ de fresa al último día de evaluación, por lo que fue diferente estadísticamente ($p < 0.05$) del control (508.05 µg

quercetina g⁻¹ de fresa) y los demás tratamientos evaluados. El último día de almacenamiento el que presentó menor contenido de flavonoides fue el tratamiento Q+NPQ seguido del Tratamiento Q (402 y 409.12 µg quercetina g⁻¹ de fresa, respectivamente) (Tabla 16).

Tabla 16. Valores de flavonoides totales de frutos de fresa tratados con cubiertas comestibles a base de nanopartículas de quitosano y/o propóleo durante ocho días de almacenamiento.

Tratamiento	FLAVONOIDES TOTALES (µg quercetina g ⁻¹ de fresa)			
	Días de almacenamiento			
	1 ($\bar{x} \pm D.E$)	3 ($\bar{x} \pm D.E$)	5 ($\bar{x} \pm D.E$)	8 ($\bar{x} \pm D.E$)
Q	667.12 ± 5.82 ^{b*}	750.53 ± 11.64 ^d	515.81 ± 9.70 ^b	409.12 ± 20.25 ^a
Q + NPQ	698.16 ± 8.46 ^c	620.56 ± 6.72 ^b	522.92 ± 11.69 ^b	402.65 ± 4.04 ^a
Q + NPQ + P10%	853.70 ± 4.48 ^e	667.12 ± 10.08 ^c	546.85 ± 17.46 ^b	505.46 ± 11.69 ^b
Q + NPQ + P20%	954.22 ± 8.89 ^f	974.91 ± 15.80 ^e	645.13 ± 9.96 ^c	554.61 ± 3.36 ^c
Q + NPQ + P30%	758.94 ± 5.60 ^d	647.07 ± 15.07 ^{bc}	400.71 ± 16.27 ^a	498.35 ± 3.88 ^b
CONTROL	588.23 ± 4.47 ^a	459.55 ± 1.94 ^a	524.22 ± 11.20 ^b	508.05 ± 13.99 ^b

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.05$). Q (quitosano), NPQ (nanopartículas de quitosano), P10, 20 y 30% (propóleo en diferentes concentraciones), control (frutos de fresa sin la cubierta comestible).

8. DISCUSIÓN

Las nanopartículas caracterizadas por TEM, presentaron forma esférica y se encontraron distribuidas de manera uniforme. Con respecto al tamaño, las NPQ mostraron valores de 36.4 nm, lo cual difiere de lo reportado por Sotelo-Boyás *et al.* (2017)⁸⁶ y Correa-Pacheco *et al.* (2017)⁸¹ donde las nanopartículas de quitosano preparadas por el método de nanoprecipitación mostraron valores de 4.7 y 4.5 nm, respectivamente. Sin embargo, Woranuch y Yoksan (2013)⁹⁰ reportaron tamaños de nanopartículas de quitosano preparadas por gelación iónica que oscilaron entre 80 y 100 nm. Cabe mencionar que los cambios en el tamaño de las nanopartículas pueden verse influidos por la naturaleza y la concentración del polímero en la fase orgánica, la polaridad del disolvente, la naturaleza y la concentración de los surfactantes en la fase acuosa⁹¹.

Con respecto al potencial Z, las NPQ mostraron una carga positiva de 20.7 mV lo cuál coincide con Sotelo-Boyás *et al.* (2017)⁸⁶ donde obtuvieron valores positivos de 20.2 mV para nanopartículas de quitosano. Conforme se incrementó la concentración de quitosano, el valor del potencial Z aumentó, ya que el tratamiento NPQ 05 presentó un valor de +67.50 mV. El mismo efecto observaron Ong *et al.* (2017)⁹² donde caracterizaron nanopartículas de quitosano y propóleo y a medida que aumentaron la concentración de quitosano, el potencial Z se incrementó de +45.2 mV a +60 mV. De acuerdo con Mujtaba (2019)⁹³ esto se debe a que el quitosano contiene grupos amino ($-NH_3^+$) en forma protonada que le confieren una carga positiva. Por otra parte, Ranjan *et al.* (2010)⁹⁴ menciona que nanopartículas con valores de potencial Z mayores a +30 mV o menores -30 mV presentan alto grado de estabilidad lo cual se observó en el tratamiento NPQ 05. En relación a la muestra NPQ P, se observó un potencial Z más alto comparado con el resto de las muestras, presentando un valor de +127 mV. Amalina *et al.* (2019)⁹⁵ observaron un efecto similar, en donde el incremento del potencial Z de extracto de propóleo cargado de quitosomas se asoció con la interacción de las propiedades catiónicas del quitosano y el grupo de cabezas polares de los compuestos del propóleo aumentando así la carga de la partícula. Si bien la carga de las nanopartículas se

comporta diferente de acuerdo con el medio en la que está suspendida, los valores siguen siendo óptimos de acuerdo con lo que reporta Bhattacharjee *et al.* (2016)⁹⁶ donde menciona que mientras las partículas tengan una potencial Z alto ya sea negativo o positivo se repelerán entre si lo que conducirá a una mayor estabilidad que en una carga neutra, evitando la tendencia a la aglomeración debido a las fuerzas de repulsión eléctrica. En la determinación de la distribución del tamaño de partícula por DLS, las nanopartículas en la solución de quitosano en concentraciones de 0.01 y 0.05 % mostraron valores más altos (330.20 y 291.63 nm, respectivamente) que los tamaños obtenidos en las micrografías del TEM, sin embargo, Correa-Pacheco *et al.* (2017)⁸¹ mencionan que el tamaño y distribución de la partícula depende del método de preparación para las mediciones. En ambas técnicas (TEM y DLS) existen diferencias de preparación de las muestras, por tanto, son factores que pueden afectar los resultados de la medición^{97,98}.

Las cubiertas que contenían propóleo (Q+NPQ+P10, 20 y 30%) presentaron los mayores espesores, estos oscilaron de 256.41 a 309.83 μm . En otros estudios, Sipahi *et al.* (2013)⁹⁹ y Mantilla *et al.* (2013)¹⁰⁰ mostraron resultados similares al medir el espesor de una cubierta a base de alginato de sodio y pectina sobre melón y piña, respectivamente, los espesores iban desde 180 a 412 μm dependiendo de la concentración de alginato empleada. En este ensayo la concentración de quitosano y propóleo empleada fue variable en cada formulación por lo que explicaría la variación de espesores en las cubiertas. De acuerdo con Embuscado *et al.* (2004)¹⁰¹ el espesor de una cubierta no debe exceder los 300 μm porque crea una fermentación interna que destruye a la fruta en un tiempo más corto que la fruta sin cubierta.

Las fresas que mostraron una menor pérdida de peso al final del almacenamiento fueron las recubiertas con Q+NPQ+P10% y Q+NPQ (9.77 y 10.27 %, respectivamente), los resultados coinciden con otros estudios en fresas, por ejemplo, Gol *et al.* (2013)¹⁰² reportaron un menor porcentaje de pérdida de peso (4.08%) en las fresas recubiertas con 1% de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y quitosano al 1% respecto al control (14.34%)

después de ocho días de almacenamiento. Por otra parte, Trejo-Márquez *et al.* (2007)¹⁰³ formularon un recubrimiento a base de gelatina que fue aplicado en fresa. Los autores observaron una reducción del 50% en la pérdida de peso de las fresas tratadas. Esto pudo deberse a los efectos de las cubiertas, que sirven como barrera semipermeable entre el oxígeno, el dióxido de carbono y la humedad, lo que reduce la respiración, la pérdida de agua y las reacciones de oxidación¹⁰⁴.

Todas las fresas recubiertas mostraron un efecto positivo en la firmeza al término del almacenamiento, sin embargo, fueron los tratamientos Q+NPQ+P10% y Q+NPQ+P20% que tuvieron una mayor firmeza (4.87 y 4.96 N, respectivamente). Los resultados coinciden con Restrepo *et al.* (2010)¹⁰⁵ donde reportan una mayor firmeza en fresas con una cubierta de gel mucilaginoso de penca de sábila y cera de carnaúba y resaltan que la disminución de firmeza en fresas que no están recubiertas se encuentra relacionada con el aumento en el % de pérdida de humedad. Por otro lado, Pilon *et al.* (2014)¹⁰⁶ reportaron resultados diferentes. Ellos aplicaron una cubierta de nanopartículas de quitosano obtenidas de dos concentraciones de solución de ácido cítrico acuosa a manzanas recién cortadas y no se observaron diferencias significativas entre las manzanas tratadas y el control. Sin embargo, el efecto positivo en el porcentaje de pérdida de peso y la textura de las fresas en esta investigación, pudo deberse a la combinación del propóleo con el quitosano. Sobre este tema, Siripatrawan y Vitchayakitti (2016)⁶⁰ estudiaron el efecto de la incorporación de propóleo en propiedades funcionales de películas de quitosano. Dentro de las propiedades estudiadas, determinaron que la adición de propóleo redujo la permeabilidad de vapor de agua en las películas, debido a que los compuestos polifenólicos del propóleo pueden ser capaces de encajar en la matriz de quitosano y establecer interacciones tales como la unión hidrógeno o covalente con grupos reactivos de quitosano, estas interacciones entre la red de quitosano y compuestos polifenólicos limitan la disponibilidad de grupos de hidrógeno para formar la unión hidrófila con agua, lo que lleva a una disminución en la afinidad de las películas de quitosano hacia el agua y menor permeabilidad de vapor de agua de las cubiertas. En otro estudio, Bodini *et al.* (2013)¹⁰⁷ determinaron que la incorporación de EEP llevó a una

reducción significativa en la permeabilidad de vapor de agua en relación con la película de control (0 g/100 g de gelatina), ellos argumentan que la alta concentración de EEP puede alterar la interacción entre el vapor de agua y la matriz de polímero, debido posiblemente, a la reducción de higroscopicidad de las películas como una función de la concentración aumentada de compuestos hidrófobos en la matriz de proteína de propóleos.

Con relación al color de las fresas, los datos de luminosidad y ángulo de matiz no presentaron diferencias al final del almacenamiento. Trejo *et al.* (2007)¹⁰³ reportaron que la aplicación de un recubrimiento comestible utilizando 1 y 2 % de gelatina no afectó la luminosidad de las fresas almacenadas en refrigeración durante 10 días. Se presentó el mismo comportamiento en el estudio de Del Valle *et al.* (2005)¹⁰⁸ los cuales aplicaron un recubrimiento a base de mucílago de cactus y glicerol en fresa almacenada por 10 días a 5 °C y 75% H.R. Se observó que el recubrimiento comestible no presentó modificaciones en los parámetros de color. En esta investigación se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los valores de cromaticidad de la cubierta Q+NPQ+P20%, la cual presentó una disminución respecto al control. El factor de cromaticidad representa el cambio del color rojo a verde, es un método para distinguir la madurez de la fruta, al disminuir los valores positivos se tiene una disminución en la tonalidad de color rojo¹⁶. Según Kader (2011)¹⁰⁹, estos cambios en el color de la piel y pulpa de la fruta, luego de su maduración, se originan por la disminución de constituyentes químicos como clorofilas, antocianinas, carotenos, xantofilas y flavonoides. Restrepo, Cortés y Rojano (2009)¹¹⁰ señalaron que esta disminución puede deberse a la actividad respiratoria y enzimática que causa la pérdida de calidad por pardeamiento oxidativo. El color en la fresa es un atributo muy importante para la aceptación del producto por el consumidor, las cubiertas comestibles aplicadas en este estudio, no modificaron de manera significativa el color original de las fresas.

Con respecto a los SST, los obtenidos coinciden con Pastor *et al.* (2010)¹¹¹ los cuales aplicaron un recubrimiento comestible de HPMC y extracto de propóleo en uvas y no encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Los autores

mencionan que esto se debió probablemente a la variabilidad natural de las muestras, que no permitió la observación de las posibles pequeñas diferencias inducidas por los diferentes recubrimientos. Barrera *et al.* (2012)¹¹² también reportaron que no hubo diferencias en el contenido de SST en frutos de papaya tratados con una cubierta formulada con extracto de propóleo. Por otro lado, con relación a la acidez titulable, todas las fresas tratadas con la cubierta mostraron valores más altos comparados con el control en el último día de almacenamiento. Este efecto se atribuye posiblemente a las cubiertas comestibles, ya que ralentizan la frecuencia respiratoria de las fresas y retrasan la utilización de los ácidos orgánicos en la reacción enzimática. Cabe mencionar que la fresa al ser un fruto no climatérico, su intensidad respiratoria y producción de etileno no exhiben un notable aumento durante su maduración y no presentan cambios marcados en su calidad interna después de la cosecha¹¹³.

En lo que respecta a la efectividad antibacteriana, las cubiertas que contenían en su formulación Q+NPQ+ P10, 20 y/o 30% ejercieron el mayor efecto para retardar o inhibir el crecimiento de UFC de las bacterias evaluadas (*E. coli*, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*) ya que mostraron crecimientos de 0 a 13 UFC comparado con los controles (217 a 297 UFC) en la dilución 10^{-4} después de 48 h. Son pocos los estudios que demuestren la actividad antimicrobiana de la combinación de las nanopartículas de quitosano con el extracto de propóleo, sin embargo, Torlak y Sert (2013)¹¹⁴ reportaron que la actividad antimicrobiana de recubrimientos a base de quitosano mejoró cuando se adicionó el extracto de propóleo. Al aplicar los recubrimientos con quitosano (2%), el crecimiento de la bacteria fue de 3 log CFU, mientras que al combinarlo con propóleo a una concentración del 10%, fue de 1 log CFU.

La actividad del propóleo en contra de los microorganismos se relaciona con el efecto sinérgico de los flavonoides más que a la acción de cada uno de sus compuestos por separado; como la galangina y la pinocembrina. La acción de estos compuestos puede desorganizar el citoplasma, pared y membrana celular de los microorganismos e inhibir su síntesis de proteínas, además, podría estar actuando sobre la inhibición de la replicación de ADN¹¹⁵. En la literatura se ha reportado que el quitosano posee un amplio

espectro de actividad antimicrobiana, lo cual justifica que, en esta investigación, la cubierta de quitosano solo haya retardado el crecimiento de UFC, siendo uno de los tratamientos que mejor funcionó para detener el crecimiento de *L. monocytogenes* después de 48 h (1 UFC) en una dilución 10^{-4} . Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kim *et al.* (2011)¹¹⁶ donde evaluaron el efecto antimicrobiano de membranas de quitosano hechas a partir de dispersiones de quitosano con diferentes viscosidades (40, 100 y 200 mPa). La actividad antimicrobiana de las membranas fue evaluada contra *L. monocytogenes* (Gram positiva), *E. coli* (Gram negativa) y *S. typhimurium* (Gram negativa). Los autores reportaron que *L. monocytogenes* (Gram positiva) fue más susceptible a las membranas de quitosano que las Gram negativas. En otro estudio, Perdonés *et al.* (2014)¹¹⁷ estudiaron un quitosano de bajo peso molecular al 1% (p/p) junto con aceite de colza o pescado para medir el efecto antimicrobiano de una película. Para ello utilizaron *L. monocytogenes* CIP 82110, en un alimento modelo y las películas mostraron un efecto bacteriostático, incluso bactericida durante el almacenamiento.

Una de las principales razones para que el quitosano posea actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3 el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares⁴³. En bacterias Gram positivas el efecto antimicrobiano del quitosano puede ser debido a la densidad de carga positiva. Las bacterias Gram positivas tienen en sus estructuras externas diversos polímeros con carga negativa tales como el ácido lipoteicoico y pectidoglicanos los cuales pueden interactuar con el quitosano a través de los grupos $-NH_3^+$. Además, el quitosano tiene propiedad quelante, lo que permite que este biopolímero se pueda ligar selectivamente a metales presentes en las estructuras externas de los microorganismos, inhibiendo así la producción de toxinas. También se ha reportado que el quitosano puede inhibir enzimas debido a la interacción quitosano-ADN que altera la síntesis de ARN mensajero^{118,119}.

En el presente estudio, la combinación de las NPQ con extracto de propóleo tuvieron un efecto positivo para retardar y/o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Nuestros resultados coinciden con Madureira *et al.* (2015)⁸⁴ donde demostraron que las NPQ tienen propiedades inhibitorias contra diversas bacterias, incluyendo gram negativas y positivas. Ellos probaron NPQ con bajo y alto peso molecular, los resultados antimicrobianos mostraron que estas tienen altos valores de inhibición para todas las bacterias probadas (60-90%) (*B. cereus*, *E. coli*, *L. innocua*, *S. aureus*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica*.). Los autores mencionan que esto se debe posiblemente al aumento en la densidad de carga positiva, haciendo que los grupos $-NH_3^+$ y las cargas positivas de las nanopartículas compitan por los mismos grupos de cargas negativas presentes en los microorganismos⁷⁸.

Con respecto a la determinación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides totales, al final del almacenamiento, las fresas tratadas con las cubiertas Q, Q+NPQ+P10% y Q+NPQ+P20% presentaron los valores más altos de la capacidad antioxidante. En relación a los fenoles totales, la cubierta de Q+NPQ+P10% (28.49 mg EAG g⁻¹ de fresa) mostró mayor contenido de fenoles totales al final del almacenamiento. Con respecto a los flavonoides la cubierta Q+NPQ+P20% fue la que mantuvo la mayor cantidad del compuesto (554.61 µg quercetina g⁻¹ de fresa) comparado con el resto de los tratamientos evaluados. Es notable que los tratamientos adicionados con nanopartículas de quitosano y propóleo fueron los que presentaron mayores niveles de concentración en las variables antes mencionadas, aun así, el quitosano aplicado individualmente mostró efectos positivos en la capacidad antioxidante. Respecto a esto, se ha demostrado el efecto antioxidante del quitosano en diversos estudios¹²⁰. Las cubiertas con quitosano, prolongan la vida útil post cosecha, y además pueden retener mayor actividad antioxidante en fresas después de un periodo prolongado³⁶. La cubierta de quitosano forma una barrera semipermeable que permite el intercambio restringido de gases y compuestos volátiles¹²¹. Esto concuerda con lo reportado por Wang y Gao (2013)³⁶ donde demostraron que la capacidad de secuestrar radicales libres en fresas recubiertas con quitosano fue superior a las fresas no recubiertas al final de nueve días

de almacenamiento a 5°C. Por otra parte, López *et al.* (2012)⁵³ evaluaron una cubierta de quitosano (Q) y aceite esencial de canela (AC) en la conservación de la calidad de las fresas, incluyendo capacidad antioxidante y fenoles, observaron que la cubierta de Q1% + AC 0.03% fue la más efectiva para mantener el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante hasta por 15 días a 5°C.

En el caso de las cubiertas adicionadas con nanopartículas de quitosano y propóleo se observó que con estas, el fruto presentó mayor capacidad antioxidante, fenoles totales y flavonoides respecto al control. Sin embargo, nuestros resultados difieren con lo reportado por Thomas *et al.* (2016)⁶² donde utilizaron EEP comercial incorporándolo en cubiertas comestibles de almidón de yuca en una concentración de 33 y 66 % respecto del almidón total aplicadas a fresas y concluyeron que las concentraciones usadas no fueron suficientes para mantener o incrementar la capacidad antioxidante de las fresas durante 16 días de almacenamiento. Nuestros resultados coinciden con Zahid *et al.* (2013)¹²² quienes lograron retrasar la maduración en pitayas y aumentar la biosíntesis de componentes nutricionales como los antioxidantes y flavonoides totales con la aplicación de EEP al 0.5%. Estos resultados se le atribuyen posiblemente al propóleo, por su alta actividad biológica, en la que se incluye la actividad antioxidante por su alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides^{62,56}.

De acuerdo con la literatura y lo observado en esta investigación, el quitosano y el propóleo han demostrado ser efectivos aplicados individualmente para mantener e incrementar la capacidad antioxidante, sin embargo, se observó un efecto sinérgico entre las nanopartículas de quitosano y el propóleo ya que fueron en estas cubiertas donde se presentaron mayores concentraciones de % de inhibición del DPPH, contenido de fenoles y flavonoides totales. Existe poca información sobre el efecto de nanopartículas de quitosano combinado con extracto de propóleo en la actividad antioxidante de cubiertas comestibles aplicadas a frutos, sin embargo, algunos estudios han demostrado el sinergismo de las nanopartículas con otros compuestos en cubiertas comestibles, por ejemplo, Yang *et al.* (2016a)¹²³ probaron que utilizando nanopartículas de lignina como nanorrellenos en películas basadas en poli ácido láctico, estas fueron altamente eficaces

en actividad antioxidativa y en combinación con nanocristales de celulosa se generó un efecto sinérgico positivo en la respuesta antioxidativa de las películas. En otro trabajo Yang *et al.* (2016b)¹²⁴ observaron actividad antioxidante con la adición de nanopartículas de lignina a películas basadas en alcohol polivinílico/quitosano, donde la respuesta antioxidativa se atribuyó a la sinergia entre la lignina y el quitosano. La efectividad de los nanopartículas se atribuye a que, al enlazarse con una matriz polimérica, existe un reforzamiento en las cadenas estructurales dando como resultado mejoras en las propiedades mecánicas, una mayor resistencia como barrera para la disminución de la permeabilidad, el intercambio de gases y compuestos volátiles¹⁰. El sinergismo entre el quitosano y las nanopartículas podría explicarse por la capacidad que tiene el quitosano de eliminar iones quelados y radicales libres evitando la donación de hidrogeno, dando como resultado su actividad antioxidante. Las nanopartículas por su tamaño pequeño y bajo peso molecular aportan cambios significativos en las propiedades funcionales debido al aumento del área superficial en relación con el volumen, por lo que son más activas biológicamente mejorando la biodisponibilidad de los ingredientes activos y de liberación controlada, contribuyendo a la actividad antioxidante del quitosano^{120, 44}.

En esta investigación, las cubiertas comestibles ejercieron efectos positivos en los atributos de calidad y capacidad antioxidante de los frutos de fresa. Además, demostraron retardar y/o inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas.

9. CONCLUSIONES

-Las nanopartículas de quitosano se mostraron esféricas y distribuidas uniformemente, presentaron tamaños que oscilaron de 28.85 a 36.4 nm. Además, presentaron un alto potencial Z en un rango de 12.53 a 67.50 mV y mostraron espesores que oscilaron entre 155.9 a 309.83 μm .

- En general, las cubiertas adicionadas con nanopartículas de quitosano y/o propóleo, no afectaron los atributos de calidad de los frutos de fresa. La cubierta comestible a base de Q+NPQ+P10% mostró una menor pérdida de peso, mayor firmeza y acidez titulable sin afectar las variables de color y SST. Las cubiertas Q+NPQ+P10% y Q+NPQ+P30% tuvieron mayor inhibición sobre *E. coli* y *S. enteritidis*, mientras que las cubiertas con Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P30% ejercieron mayor efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*.

-Las tres cubiertas comestibles adicionadas con extracto de propóleo (Q+NPQ+P10%, Q+NPQ+P20% y Q+NPQ+P30%) presentaron los niveles de capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales más altos, logrando conservar estos compuestos por más tiempo en frutos de fresa.

10. ANEXOS

10.1 Caracterización del propóleo (Anexo 1).

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN UNIDAD DE INVESTIGACION MULTIDISCIPLINARIA LABORATORIO SERVICIO DE ANALISIS DE PROPÓLEO	
	Reporte de resultados	SAP-OCT-0001

Identificación: SAP-OCT-001	Fecha: 11 de Octubre
Tipo de muestra: greña en bruto	Cliente: Miriam Martínez González
Lugar de origen: Cuautitlán. Edo. México	Cantidad de muestra en el lote: 111.2g

Especificaciones físicas

Características	Resultado	Parámetros
Color	Verdoso	Amarillo, pardo, verdoso, marrón, rojizo y otros similares, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso	Característico de este producto: resinoso o balsámico, dependiendo de su origen botánico.
Sabor	Balsámico	Variable, de suave, balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.
Consistencia (a temperatura ambiente)	Rígido	Maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.
Método: Visual		

Especificaciones químicas

Características	Resultado	Parámetros	Metodología
Flavonoides	Presencia	Presencia	Visual
Fenoles totales	Presencia	Presencia	Visual
Índice de oxidación	Mayor a 22 segundos	Máximo 22 segundos	Visual
Actividad antioxidante	88.14 µg/mL	> 100 µg/mL	Espectrofotometría
Compuestos fenólicos	37.05%	Expresados como equivalentes de ácido gálico: mínimo 5% (m/m)	Espectrofotometría
Flavonoides	22.05%	Expresados como equivalentes de quercetina: mínimo 0.5% (m/m)	Espectrofotometría

Especificaciones microbiológicas

Microorganismo	No. de cepa	Halo de inhibición (mm)
<i>Escherichia coli</i>	8739	0 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	8-1005	10 mm
<i>Candida albicans</i>	14065	0mm

La vigencia de estos resultados es por un periodo de un año a partir de la fecha de emisión y válido para la cantidad indicada del lote.


 MC Betsabe Rodríguez Pérez
 Responsable técnico del laboratorio


 Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez
 Responsable General del laboratorio

11. REFERENCIAS

1. Giampieri F., Álvarez-Suarez J.M., Battino M. Strawberry and Human Health: Effects Beyond Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(18): 3867-3876.
2. Afrin S., Gasparrini M., Forbes-Hernández T.Y., Reboledo-Rodríguez P., Mezzetti B., Varela-López A. et al. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J Agric Food Chem.* 2016; 64(22): 4435–4449.
3. Coronado M., Vega-y-León S., Gutiérrez R., Vázquez M., Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev chil nutr.* 2015; 42(2): 206-212.
4. Rodríguez-Torrens H., Barreto-Argilagos G., Sedrés-Cabrera M., Bertot-Valdés J., Martínez-Sáez S., Guevara-Viera G. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET.* 2015; 16(8): 1-27.
5. Gil De-Salim A.M., Yosainix A.G. Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expandidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *RSVM.* 2010; 30: 24-28.
6. Ramos-García M., Bautista-Baños S., Barrera-Necha L. L., Bosquez-Molina E., Alia Tejacal I., y Estrada-Carrillo M. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortifrutícolas. *Rev Mex Fitopatol.* 2010; 28(1): 44-57.
7. Bautista-Baños S., Romanazi G. and Joiménez-Aparicio. Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. 1st Edition. Academic Press. E.U.A. 384pp; 2016.
8. Mouhoubi-Tafinine Z.; Ouchemoukh S.; Tamendjari A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Ind Crops Prod.* 2016; 82:85-90.
9. Zabaïoun, Fouachea A., Troussona A., Barona S., Zellaguid A., Lahouelc M., et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids.* 2017; 207: 214–222.

10. Sekhon B. S. Food nanotechnology an overview. *Nanotechnol Sci Appl*. 2010; 3: 1-15.
11. Galetto C. D., Verdini A. R., Zorrilla S. E., y Rubiolo, C. A. Freezing of strawberries by immersion in CaCl₂ solutions. *Food Chem*. 2010; (123): 243- 248.
12. SAGARPA. (2010). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx>. Consultada: el 18 de noviembre del 2017.
13. Gunduz K., Simmonds M.S.J., Preedy V.R. editors. Strawberry: Phytochemical Composition of Strawberry (*Fragaria x ananassa*): Academic Press. 733-752; 2015.
14. FAO. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Capítulo 5. Calidad en frutas y hortalizas. 2012; Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/Y4893S/y4893s08.htm>. Consultada: 25 de septiembre del 2018.
15. SAGARPA. (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>. Consultada: 8 de marzo del 2018.
16. Ruiz M., Ávila J., & Ruales J. Recubrimiento comestible bioactivo para aplicarlo en la frutilla (*Fragaria vesca*) como proceso de postcosecha. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*. 2016; 17(2): 276-287.
17. Ruelas-Chacón X., Reyes-Vega M.L., Valdivia-Urdiales B., Contreras-Esquivel J.C., Montañez-Sáenz J.C., Aguilera-Carbó A.F. *et al*. Conservación de Frutas y Hortalizas Frescas y Mínimamente Procesadas con Recubrimientos Comestibles. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2013; 5(9).
18. Basu A., Nguyen A., Betts N.M., Timothy J. Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014b; 54(6): 790-806.

19. Corrales L.E., & Muñoz M.M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*. 2012; 10(18): 135-250.
20. Shahidi F., & Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Funct Foods*. 2015; 18: 820–897.
21. Llancari A., Matos, A. Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. En: Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. 2011; Perú, Lima, 2-4.
22. Sánchez-Valle V., Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur*. 2013; 20(3).
23. Rodríguez-Graña T., Peña-González M., Gómez-Trujillo N., Santisteban-Lozano Y., Hernández-Tamayo M. Estrés oxidativo: genética, dieta y desarrollo de enfermedades. *CCM*. 2015; 19(4): 690-705.
24. Olas B. Berry Phenolic Antioxidants – Implications for Human Health?. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 78.
25. Reyes A., Galicia M., Carrillo M. Antioxidantes: la magia de lo natural. *Rev Tlatemoani*. 2011; 8: 1-16.
26. González-Jiménez F.E., Hernández-Espinosa N., Cooper-Bribiesca B.L., Núñez-Bretón L.C., Reyes-Reyes M. Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 2015; 18(1): 16-21.
27. Mayor-Oxilia R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev Inst Med Trop*. 2010; 5(2): 23-29.
28. Wolfe K.L., Kang X., He X., Dong M., Zhang Q., Liu R.H. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2008; 56: 8418–8426.

29. Basu A., Wilkinson M., Penugonda K., Simmons B., Betts N. M., and Lyons, T. J. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J.* 2009; 8: 1–7.
30. Jenkins D. J., Nguyen T. H., Kendall C. W., Faulkner D. A., Bashyam B., Kim I. J., *et al.* The effect of strawberries in a cholesterol-lowering dietary portfolio. *Met Clin Exp.* 2008; 57: 1636–1644.
31. Álvarez-Suarez J. M., Dekanski D., Ristic S., Radonjic, N. V., Petronijevic N. D., Giampieri F., *et al.* Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PLoS One.* 2011; 6: e25878.
32. Moazen S., Amani R., Homoyouni R. A., Shahbazian H., Ahmadi K., & Taha Jaliali, M. Effects of freeze-dried strawberry supplementation on metabolic biomarkers of atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind controlled trial. *Ann. Nutr Metab.* 2013; 63: 256–264.
33. Giampieri F., Alvarez-Suarez J. M., Gasparri M., Forbes-Hernandez T. Y., Afrin S., Bompadre S., *et al.* Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food Chem Toxicol.* 2016; 94: 128–137.
34. Basu, A., Betts, N. M., Nguyen, A., Newman, E. D., Fu, D., and Lyons, T. J. Freeze-dried strawberries lower serum cholesterol and lipid peroxidation in adults with abdominal adiposity and elevated serum lipids. *J Nutr.* 2014a; 144: 830–837.
35. Tulipani S., Armeni T., Giampieri F., Alvarez-Suarez J. M., Gonzalez-Paramas A. M., Santos-Buelga C., *et al.* Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. *Food Chem.* 2014; 156: 87–93.

36. Wang S. Y., Gao H. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria ananassa Duch.*). *LWT - Food Science and Technology*. 2013; 52(2): 71-79.
37. Ghidelli C & Pérez-Gago M.B. Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018; 58(4): 662-679.
38. Landanilla M.S. Fruit morphology, anatomy and physiology. Capítulo 2-7. Citrus fruit. Biology, Technonolgy, and Evaluation. First edition. Academic Press. India; 2008.
39. Delbeke S, Hessel C, Verguldt E, De Beleyer A, Castro I, Uyttendaele M. Microbiological analysis of strawberries for the presence of Salmonella spp. and VTEC in primary production, processing and trade in Belgium. Proceedings of the 18th conference on food microbiology. Belgian Society for Food Microbiology (BSFM). 2013; 112–112.
40. Romo-Zamarrón K.F., Pérez-Cabrera L.E., Ramírez-Carrillo R.E. quitosanos de *Cherax quadricarinatus* utilizados como recubrimientos comestibles sobre frutos de fresas mínimamente procesadas. *Ciencia y Tecnol Agropec*. 2014; 2(1): 36-43.
41. Fernández D.V., Bautista-Baños S., Ocampo-Ramírez A., García-Pereira A., Falcón Rodríguez A. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2015; 24(3): 52-57.
42. Dhall R.K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013; 53(5): 435-450.
43. Bautista-Baños S., Ventura-Aguilar R.I., Correa-Pacheco Z., Corona-Rangel M.L. Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest. *Rev Chapingo Ser Hortic*. 2017; 23(2): 103-121.
44. Kerch G. The Potential of Chitosan and Its Derivatives in Prevention and Treatment of Age-Related Diseases. *Marine Drugs*. 2015; 13(4): 2158–2182.

45. Ventura-Aguilar R. I., Bautista-Baños S., Flores-García G., & Zavaleta-Avejar L. Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chem.* 2018; 262: 142–149.
46. Gol N.B. y Ramana R. T. V. Banana fruit ripening as influenced by edible coatings. *International Journal of Fruit Science.* 2011; 11: 119–135.
47. Bello-Lara J.E., Balois-Morales R., Juárez-López P., Alia-Tejacal I., Peña-Valdivia C.B., Jiménez-Zurita J.O. *et al.* Coatings based on starch and pectin from 'Pear' banana (*Musa ABB*), and chitosan applied to postharvest 'Ataulfo' mango fruit. *Rev Chapingo Ser Hort.* 2016; 22(3): 209-218.
48. Schreiber S. B., Bozell J. J., Hayes D. G., & Zivanovic, S. Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocoll.* 2013; 33(2): 207–214.
49. Hong K., Xie J., Zhang L., Sun D., Gong D. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava L.*) fruit during cold storage. *Sci Hortic.* 2012; 144: 172-178.
50. Petriccione M., Mastrobuoni F., Pasquariello M.S., Zampella L., Nobis E., Capriolo G. *et al.* Effect of chitosan coating on the postharvest quality and antioxidant enzyme system response of strawberry fruit during cold storage. *Foods.* 2015; 4(4): 501-523.
51. Gol N.B., Chaudhari M.L., Rao T.V.R. Effect of edible coatings on quality and shelf life of carambola (*Averrhoa carambola L.*) fruit during storage. *J Food Sci. Technol.* 2015; 52: 78-91.
52. Baldoni D., Ventura-Aguilar R.I., Hernández-López M., Corona-Rangel M.L., Barrera-Necha L.L., Correa-Pacheco Z., Bautista-Baños S. Calidad postcosecha de higos 'black mission' tratados con cubiertas naturales. *Rev Iber Tecnología Postcosecha.* 2016; 17(2): 267-275.

53. López-Mata M., Ruiz-Cruz, S., Navarro-Preciado C., Ornelas-Paz J., Estrada-Alvarado M., Gassos-Ortega L., Rodrigo-García J. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. *Revista de ciencias biológicas y de la salud*. 2012; 14 (1): 33-43.
54. Atarés L., Bonilla J., Chiralt A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *J Food Eng.* 2010; 100(4): 678-687.
55. Sforcin J.M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*. 2016; 30(6): 894-905.
56. Anjum S.I., Ullah A., Khan K.A., Attaullah M., Khan H., Ali H. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*. 2018; 08-013.
57. Rebaza R., Amaya L., Gutiérrez A., Haro R., Tumbajulca M., Valera F., Vargas Y., Barraza-Jauregui G., León-Vargas J.M., Sánchez-González J.A. Aplicación del propóleo en envasado activo. *Agroind Sci*. 2016; 6(2).
58. Wilson M.B., Brinkman D., Spivak M., Gardner G., Cohen J.D. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascopheara apis*. *J Invertebr Pathol*. 2014; 144: 44-50.
59. Araujo G.P., Souza S.J., Silva M.V., Yamashita F., Gonçalves O.H., Leimann F.V., Shirai M.A.. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *Int J Food Sci Technol*. 2015; 50(9): 2080-2087.
60. Siripatrawan U. & Vitchayakitti W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocoll*. 2016; 61: 695-702.

61. Pobiega K., Kraśniewska K., & Gniewosz M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends Food Sci Technol.* 2019; 83: 53–62.
62. Thomas A., Nassur R.C., Boas Vilas AC *et al.* Cassava starch edible coating incorporated with propolis on bioactive compounds in strawberries. *Ciênc. agrotec.* 2016; 40(1): 87-96.
63. Passos F.R., Queiroz-Mendes F., Crivelari-da-Cunha M., Crivelari-da-Cunha M & De-Carvalho A.M.X. Propolis extract coated in “Pera” orange fruits: An alternative to cold storage. *Revista Brasileira de Fruticultura.* 2016; 11(23): 2043-2049.
64. Passos F.R., Mendes F.Q., Cunha M.C., Pigozzi M.T., Carvalho A.M.X. Propolis Extract in postharvest conservation banana prata. *Revista Brasileira de Fruticultura.* 2016; 38(2): 931.
65. Barrera E, Gil, Restrepo J, Mosquera A, Kelly, Durango D. A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya L. cv. Hawaiiiana*). *Rev Fac Nac Agron Medellin.* 2015; 68(2): 7667-7678.
66. Bajpai V. K., Kamle M., Shukla S., Mahato D. K., Chandra P., Hwang S. K., Han Y.-K. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *J Food Drug Anal.* 2018; 26: 1201-1214
67. Zhang H., Chen S. Nanoparticle-based methods for food safety evaluation. *Evaluation Technologies for Food Quality.* 2019; 817–835.
68. Gupta A., Eral H.B., Hatton T.A., Doyle P.S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter.* 2016; 12(28): 26-41.
69. Singh T., Shukla S., Kumar P., Wahla V., Bajpai V.K., Rather I.A. Application of nanotechnology in food Science: perception and overview. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1501.

70. Pathkoti K., Manubolu M., Hwang H.M. Nanostructures: current uses and future applications in food science. *J Food Drug Anal.* 2017; 25(2): 245-253.
71. Patel A., Patra F., Shah N., Khedkar C. editors. Impact of Nanoscience in the Food Industry Handbook of Food Bioengineering. Academic press; 2018.
72. Chellaram C., Murugaboopathi G., John A. A., Sivakumar R., Ganesan S., Krithika S., & Priya G. Significance of Nanotechnology in Food Industry. *APCBEE Procedia.* 2014; 8: 109–113.
73. Wesley S.J., Raja P., Sunder-Raj A.A., Tiroutchelvamae D. Review on nanotechnology applications in food packaging and safety. *Int J Eng Res.* 2014; 3: 645-651.
74. Li Z, Sheng C. Nanosensors for food safety. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14:905-912.
75. Bata-Vidács I.A., Nóra B., Judit F., Szekacs J. Nanotechnology and microbial food safety. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Eds. A. Méndez-Vilas; 2013.
76. Tan H., Ma R., Lin C., Liu Z., Tang T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *Int J Mol. Sci.* 2013; 14: 1854–1869.
77. He X., & Hwang H.M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *J Food Drug Anal.* 2016; 24(4): 671–681.
78. Divya K., Smitha V., & Jisha M. S. Antifungal, antioxidant and cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and its use as an edible coating on vegetables. *Int J Biol Macromol.* 2018; 114: 572–577.
79. Zambrano-Zaragoza M.L., E Mercado-Silva E., Gutiérrez-Cortez E., Castaño-Tostado E., Quintanar-Guerrero D. *LWT-Food Science and Technology.* 2011; 44(6): 1362-1368.

80. Ortiz-Duarte G., Pérez-Cabrera L. E., Artés-Hernández F., & Martínez-Hernández G. B. Ag-chitosan nanocomposites in edible coatings affect the quality of fresh-cut melon. *Postharvest Biol Technol.* 2019; 147: 174–184.
81. Correa-Pacheco Z. N., Bautista S., Valle M. Á., & Hernández, M. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides*. Growth in vitro and on cv Hass avocado and fruit quality. *J Phytopathol.* 2017; 165(5): 297-305.
82. Martínez- Camacho A., Cortez-Rocha M.,Castillo-Ortega M, Burgos-Hernandéz A., Ezquerro- Brauer J.M. Plascencia-Jatomea. Antimicrobial activity of chitosan nanofibers obtained by electrospinning. Review. *Polym Int.* 2011; 60: 1663-1669.
83. Cota- Arriola O., M. Cortez- Rocha A. Burgos-Hernández J. Ezquerro-Brauer and M. Plascencia-Jatomea. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agricultura. Review. *J Sci Food Agric.* 2013; 93: 1525-1536.
84. Madureir, A., A. Pereira P. Castro and M. Pintado. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. *J Food Eng.* 2015; 167: 210-216.
85. Wen Y., F. Yao F., Sun Z., Tan L., Tian L. Antibacterial action mode of quaternized carboxymethyl chitosan/poly (amidoamine) dendrimer core- Shell nanoparticles against *Escherichia coli* correlated with molecular chain conformation. *Mater Sci Eng C.* 2015; 48: 220-227.
86. Sotelo M. E., Correa Z. N., Bautista S., & Corona M. L. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology.* 2017; 77: 15-20.
87. AOAC (1990). Official Methods of Analysis of AOAC International. Washington D.C
88. Singleton V. L., & Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult.* 1965; 16(1): 44-58.

89. Chougui N., Tamendjari A., Hamidj W., Hallal S., Barras A. & Richard T., Larbat R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficusindica* seeds. *Food Chem.* 2013; 139(1–4): 796–803.
90. Woranuch S., & Yoksan R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydr Polym.* 2013; 96(2): 495–502.
91. Scaffazick S.R., Guterres S.S., Lucca-Freitas L., Pohlmann A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova.* 2003; 26: 726–737.
92. Ong T.H., Chitra E., Ramamurthy S., Siddalingam R.P., Yuen K.H., Ambu S.P., *et al.* Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *PLoS ONE.* 2017; 12(3): e0174888.
93. Mujtaba M., Morsi R. E., Kerch G., Elsabee M. Z., Kaya M., Labidi J., & Khawar K. M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *Int J Biol Macromol.* 2019; 121: 889-904.
94. Ranjan Sinha V., Srivastava S., Goel H., y Jindal V. Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S)- Trends and implications in drug targeting. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Science.* 2010; 1: 212-238.
95. Amalina N. R., Ali N., Hamzah S. Indo-Malayan Stingless Bees' Propolis Extract-Loaded Chitosomes: Characterization and Storage Stability Evaluation. *IJRTE.* 2019; 7(6).
96. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016; 235: 337–351.
97. Goycoolea M., Valle-Gallego A., Stefani R., Menchicchi B., David L., Rochas C., Santander-Ortega M., Alonso M. Chitosan-based nanocapsules: physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation. *Colloid Polym Sci.* 2012; 290: 1423–1434.

98. Luque-Alcaraz A., Cortez-Rocha M., Velazquez-Contreras C., Acosta-Silva A., Santacruz-Ortega H., Burgos-Hernandez A., Argcuelles-Monal W., Plascencia-Jatomea M. Enhanced Antifungal Effect of Chitosan/Pepper Tree (*Schinus molle*) Essential Oil Bionanocomposites on the Viability of *Aspergillus parasiticus* Spores. *J Nanomater.* 2016;1–10.
99. Sipahi R. E., Castell-Perez M. E., Moreira R. G., Gomes C., & Castillo A. Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). *LWT - Food Science and Technology.* 2013; 51(1): 9–15.
100. Mantilla, N., Castell-Perez, M. E., Gomes, C., & Moreira, R. G. Multilayered antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *LWT - Food Science and Technology.* 2013; 51(1): 37–43.
101. Embuscado M. y Huber K. *Edible Films and Coatings for Food Applications*, 1^o. edición, Springer, London; 2004.
102. Gol N.B., Patel, P. R., Rao T. V. R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biol Technol.* 2013; 85(1): 185-195.
103. Trejo M., Ramos K. y Pérez C. Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de gelatina sobre la calidad de fresa (*Fragaria vesca* L.) almacenada en refrigeración. En V congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones. (pp. 230 - 239). Murcia, España: *Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha (AITEP)*. 2007; pp. 236-237.
104. Maqbool M., Ali A., Alderson P.G., Zahid N., Siddiqui Y. Effect of a noveledible composite coating based on gum arabic and chitosan on biochemical and physiological responses of banana fruit during cold storage. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 5474–5482.

105. Restrepo J. y Aristizabal T. Conservación de fresa (*Fragaria x ananassa Duch cv. Camarosa*) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso, de penca sábila (*Aloe barbadensis Miller*) y cera de carnauba. *Revista de la Universidad de Química Farmacéutica*. 2010; 17(3): 252 - 263.
106. Pilon L., Spricigo P. C., Miranda M., de Moura M. R., Assis O. B. G., Mattoso L. H. C., & Ferreira, M. D. Chitosan nanoparticle coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. *Int J Food Sci Technol*. 2014; 50(2): 440–448.
107. Bodini R. Sobral, P., Favaro-Trindade C., Carvalho R., Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*. 2013; 51(1): 104-110.
108. Del-Valle V., Hernández-Munoz P., Guarda A., & Galloto, M. J. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry shelf-life. *Food Chem*. 2005; 91(4): 751–756.
109. Kader A. Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas, 3era. edición, Peer Reviewed, California, United States of America; 2011.
110. Restrepo A., & Cortés M., & Rojano B. Determinación de la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa Duch.*) Fortificada con vitamina E. *Dyna*. 2009; 76(159): 163-175.
111. Pastor C., Sánchez-González L., Cháfer M., Chiralt A., González-Martínez C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydr Polym*. 2010; 82(4): 1174–1183.
112. Barrera E., Gil M., García C., Durango D., Gil J. Empleo de un recubrimiento formulado con propóleos para el manejo poscosecha de frutos de papaya (*Carica papaya L. cv. Hawaiana*). *Rev Fac Nal Agr Medellín*. 2012; 65(1): 6497-6506.

113. Landanilla M.S. Fruit morphology, anatomy and physiology. Capítulo 2-7. Citrus fruit. Biology, Technonolgy, and Evaluation. First edition. Academic Press. India; 2008.
114. Torlak E., & Sert D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *Int J Biol Macromol.* 2013; 60: 52-55.
115. Talero C. A. Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp 68; 2014.
116. Kim K.W., Min B.J., Kim Y.T., Kimmel R.M., Cooksey K., Park S.I. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology.* 2011; 44: 565-569.
117. Perdones A., Sánchez-González L., Arab-Tehrany E., Vargas M. and Chiralt A. Efecto de la adición de aceite de colza o de pescado en las propiedades físico-químicas y antimicrobianas de películas comestibles de quitosano. En Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9. Vol 3. (pp. 460-465). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España: Editorial Universitat Politècnica de València; 2014.
118. Hafdani F.N., Sadeghinia N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. *World Academy of Science and Technology.* 2011; 50: 252-256.
119. Ayala-Valencia G. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria.* 2015; 2: 32-38.
120. Radhakrishnan Y., Gopal G., Lakshmanan C.C., Nandakumar K.S. Chitosan Nanoparticles for Generating Novel Systems for Better Applications: A Review. *J Mol Genet Med.* 2015; S4: 005.
121. Khalifa I., Barakat H., El-Mansy H. A., & Soliman S. A. Enhancing the keeping quality of fresh strawberry using chitosan-incorporated olive processing wastes. *Food Biosci.* 2016; 13: 69–75.

122. Zahid N. Efficacy of ethanolic extract of propolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage. *Postharvest Biol Technol.* 2013; 79(1): 69- 72.
123. Yang W., Fortunati E., Dominici F., Giovanale G., Mazzaglia A., Balestra G.M., Kenny J.M. and Puglia D. Effect of cellulose and lignin on disintegration, antimicrobial and antioxidant properties of PLA active films. *Int J Biol Macromol.* 2016a; 89: 360-368.
124. Yang W., Owczarek J.S., Fortunati E., Kozanecki M., Mazzaglia A., Balestra G.M., Kenny J.M., Torre L., & Puglia D. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. *Ind Crops Prod.* 2016b; 94: 800-811.



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Miriam del Carmen Martínez González, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010408, y que lleva por título "Efecto de cubiertas comestibles con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de fresas (*Fragaria x ananassa*)" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dra. Margarita de Lorena Ramos García.
Sinodal.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 12 días del mes de agosto de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Miriam del Carmen Martínez González, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010408, y que lleva por título "Efecto de cubiertas comestibles con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de fresas (*Fragaria x ananassa*)" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- i. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. Zormy Nacary Correa Pacheco,
Sinodal,

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 12 días del mes de agosto de 2019.



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Miriam del Carmen Martínez González, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010408, y que lleva por título "Efecto de cubiertas comestibles con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de fresas (*Fragaria x ananassa*)" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

1. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez.
Sinodal.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 12 días del mes de agosto de 2019.



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Miriam del Carmen Martínez González, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010408, y que lleva por título "Efecto de cubiertas comestibles con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de fresas (*Fragaria x ananassa*)" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dra. Azucena Salazar Piña.
Sinodal.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 12 días del mes de agosto de 2019.



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voño Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. Miriam del Carmen Martínez González, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010408, y que lleva por título "Efecto de cubiertas comestibles con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de fresas (*Fragaria x ananassa*)" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dra. Ivette Barrera Molina.
Sinodal.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 12 días del mes de agosto de 2019.