



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

CONSERVACIÓN DE PIEZAS DE FRUTAS MEDIANTE RECUBRIMIENTOS ALIMENTARIOS

Alumno/a: Carrasco Brocal, Carmen

Tutor/a: Prof. Dña. Rosario Lucas López
Dpto: Ciencias de la Salud

Julio, 2019

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Frutas.....	8
1.1.1 Microbiota inicial	8
1.1.2 Tratamiento primario	9
1.1.3 Microorganismos patógenos	10
1.1.4 Control.....	12
1.2. Recubrimientos en los alimentos	13
1.2.1 Diferencias entre recubrimientos comestibles (RC) y películas comestibles (PC).....	16
1.2.2 Características deseables en un recubrimiento comestible.....	18
1.3 Principales recubrimientos comestibles en frutas	18
1.3.1 Polisacáridos	19
1.3.2 Proteínas	22
1.3.3 Lípidos.....	23
1.3.4 Recubrimientos a base de almidones modificados y proteína.....	23
1.3.5 Recubrimientos comestibles a base de proteína de suero de leche	23
1.4 Propiedades de los recubrimientos	24
1.5 Formación de recubrimientos.....	25
1.6 Métodos para aplicar los recubrimientos en el fruto.....	26
1.7 Ventajas de los recubrimientos en frutas	26
1.8 Problemas asociados con recubrimientos comestibles.....	27
1.9 Necesidades futuras en recubrimientos comestibles para frutas y verduras ..	29
1.9.1. Mejora de las propiedades de barrera a la humedad de los recubrimientos hidrófilos	29
1.9.2 Mejora de la adherencia y durabilidad del recubrimiento	30
1.9.3 Desarrollo continuo de recubrimientos compuestos o microemulsión	30
1.9.4 Calidad sensorial de los recubrimientos comestibles	31
1.9.5 Ampliación de la operación de recubrimiento en un entorno industrial	31

1.10 Futuras tendencias.....	32
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Material de laboratorio necesario	34
3.2 Medios de cultivo utilizados	35
3.2.1 Preparación de los medios de cultivo	36
3.2.2 Preparación de la solución salina	37
3.2.3 Preparación de alimento, quitosan y EDTA.....	38
3.3 Siembra del alimento	42
3.4 Recuento y cálculo de las UFC/g	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Efectos de los recubrimientos ensayados sobre el melón	44
4.1.1. Resultados obtenidos en el Día 0.....	44
4.1.2. Resultados obtenidos en el Día 2.....	45
4.1.3. Resultados obtenidos en el Día 5.....	46
4.1.4. Resultados obtenidos en el Día 7	47
4.2. Efectos de los recubrimientos sobre la naranja	49
4.2.1. Resultados obtenidos en el Día 0.....	49
4.2.2. Resultados obtenidos en el Día 2.....	50
4.2.3. Resultados obtenidos en el Día 5.....	51
4.2.4. Resultados obtenidos en el Día 7	52
5. DISCUSIÓN.....	55
6. CONCLUSIONES	58
7. BIBLIOGRAFÍA.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Beneficios potenciales del uso de recubrimientos comestibles (lin y zhao, 2007)	15
Figura 2: Formación de recubrimientos comestibles por inmersión del producto (valencia- chamorro et al., 2011)	17
Figura 3: Formación de películas comestibles (valencia- chamorro et al., 2011)	17
Figura 4: Principales materiales utilizados en recubrimientos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (barbosa-cánovas y olivas, 2009)	19
Figura 5: Parte del material utilizado	35
Figura 6: Medios de cultivo PALCAM, TSA y NACL	37
Figura 7: Diluciones con solución salina en eppendorfs	38
Figura 8: Aplicación de los recubrimientos	40
Figura 9: Secado en campana	40
Figura 10: Inoculación de listeria	41
Figura 11: Trozos de frutas envasados	41
Figura 12: Siembra en placa	42
Figura 13: Lectura de resultados en muestras de melón el día cero	45
Figura 14: Resultados palcam día 5	52
Figura 15: Resultados día 7	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplos de hongos habituales que alteran la fruta (hall y scott, 1977; splittstoesser,1987; ryall y pentzer,1982; snowdon,1991)	9
Tabla 2: Composición del medio tsa.....	36
Tabla 3: Composición del medio palcam.....	36
Tabla 4: Abreviaturas bolsas melón	39
Tabla 5: Abreviaturas bolsas naranja	39
Tabla 6: Recuentos en ufc/g en las muestras de melón a tiempo 0	44
Tabla 7: Recuentos en ufc/g en muestras de melón al segundo día de incubación .	45
Tabla 8: Recuentos en ufc/g en muestras de melón en el quinto día de incubación	46
Tabla 9: Recuentos en ufc/g en muestras de melón al séptimo día de incubación ..	47
Tabla 10: Recuentos en ufc/g en las muestras de naranja a tiempo 0	49
Tabla 11: Recuentos en ufc/g en muestras de naranja en el segundo día de incubación	50
Tabla 12: Recuentos en ufc/g en muestras de naranja en el quinto día de incubación	51
Tabla 13: Recuentos en ufc/g en muestras de naranja en el último día de incubación	52

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Efecto de los recubrimientos sobre las muestras de melón	48
Gráfica 2: Efecto de los recubrimientos sobre las muestras de melón inoculadas con <i>L.innocua</i>	49
Gráfica 3: Efectos recubrimientos naranja control	54
Gráfica 4: Efectos recubrimientos naranja inoculada	54

Resumen

La producción de frutas frescas se está convirtiendo cada vez más en una tarea importante ya que los consumidores son más conscientes de la importancia de los hábitos alimenticios saludables y tienen menos tiempo para la preparación de alimentos. Los recubrimientos comestibles se han utilizado como una barrera para minimizar la pérdida de agua y retrasar la senescencia natural de las frutas recubiertas a través de la permeabilidad selectiva a los gases.

Este trabajo fin de máster tiene como objetivo general estudiar la conservación de dos piezas de frutas, melón y naranja, mediante dos tipos de recubrimientos alimentarios (quitosa y quitosa+EDTA).

Palabras clave: frutas, recubrimientos comestibles, biopolímeros, *Listeria innocua*,

Abstract

The production of fresh-cut fruits is increasingly becoming an important task as consumers are more aware of the importance of healthy eating habits, and have less time for food preparation. Edible coatings have been used as a barrier to minimize water loss and delay the natural senescence of coated fruits through selective permeability to gases.

This Final Master's Project has as its general objective the maintenance of two pieces of fruit, melon and orange, by means of two types of food coatings (chitosan and chitosan+EDTA).

Keywords: fruits, edible coatings, biopolymers, *Listeria innocua*

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, existe una tendencia mundial hacia un consumo mayor de frutas y hortalizas, originado principalmente por una creciente preocupación por una dieta más equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites y con una mayor participación de la fibra dietaria, vitaminas y minerales. Esto se basa, en parte, en las menores necesidades calóricas de la vida moderna, caracterizadas por un mayor confort y sedentarismo. Sin embargo, la tendencia es cada vez consumir productos más frescos y sanos, y lo más parecido a su forma original. Esto es debido a que se ha asociado el consumo de conservantes químicos con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas, como son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO_2), entre otros. Esto genera la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento. Para satisfacer estas demandas, las nuevas tecnologías de procesamiento están bajo investigación y desarrollo. Los avances en las tecnologías de procesamiento de frutas incorporan los fundamentos en el procesamiento de alimentos, así como los avances logrados en los últimos años para mejorar la calidad del producto final (de-Azevedo, 2012). Entre ellas podemos encontrar:

- Ozono, ultrasonido, irradiación, campo eléctrico pulsado, fritura al vacío y procesamiento a alta presión
- Procesamiento ultravioleta y membrana.
- Maceración enzimática, concentración por congelación y refrigeración.
- El efecto del procesamiento sobre las características sensoriales y el valor nutricional.
- Nuevas tendencias en envasado en atmósfera modificada.
- El uso de jugos de frutas como vehículo para los microorganismos probióticos.
- Oligosacáridos prebióticos como alternativa a los productos lácteos.

1.1 Frutas

Los frutos se pueden definir como “las partes de la planta que producen semillas”. En esta definición se incluye los frutos verdaderos, como son los cítricos, los frutos falsos, como son las manzanas y las peras, y los frutos compuestos como las bayas. Esta definición incluye tomates, aceitunas y cucúrbitas como los pepinos y los melones.

La gran mayoría de las frutas son ricas en ácidos orgánicos, por lo que tienen un pH bajo. En los cítricos y en las bayas, el ácido principal es el ácido cítrico, en las frutas de pipas y en las bayas el ácido málico, y en las uvas los ácidos tartárico y málico.

Las frutas tienen un gran valor nutritivo, como fuente principal de vitamina C. Algunas de ellas, proporcionan niveles útiles de calcio, potasio y magnesio, y contienen niveles importantes de vitamina A, tiamina y niacina.

Debido al pH ácido de las frutas, la mayoría de ellas son más sensibles al daño por hongos que por bacterias. Para ser estables desde el punto de vista microbiológico, la mayoría de los productos a base de frutas solo necesitan pasteurización.

Las frutas se pueden tratar mediante enlatado, congelación o deshidratación.

1.1.1 Microbiota inicial

La microbiota inicial de las frutas frescas proviene del campo, y del equipo de recolección y transporte. Los orígenes de esta microbiota incluyen la tierra, los insectos, el aire y los exudados de las frutas. La tierra es el origen de ascosporas fúngicas termorresistentes, especialmente de las especies de *Byssoschlamys*. Los insectos transportan una diversidad de microorganismos, y en concreto son responsables de la inoculación de los higos con levaduras y a veces *Aspergillus flavus*. Los exudados de las frutas proveen nutrientes para las levaduras, especialmente levaduras pigmentadas de *Basidiomycetes* como las especies de *Rhodotorula*. Algunos patógenos fúngicos de la fruta, que incluyen a *Lasiodiplodia theobromae*, pueden hallarse presentes sistémicamente en los árboles e invadir el fruto en desarrollo a través de los pedúnculos. En general, las bacterias sólo se encuentran en escasas cantidades.

1.1.2 Tratamiento primario

En general, las operaciones de recolección, limpieza, selección, envasado y primer almacenaje de la fruta tienen poca influencia sobre la microbiota inicial de la fruta. Algunos microorganismos se eliminan mediante operaciones de limpieza seca o húmeda. Las técnicas destinadas a reducir la carga y la infección fúngica incluyen el encerado y la inmersión en un baño de agua templada (40-50°C) que puede contener fungicidas. Después de la inmersión en el baño, se puede envolver la fruta individualmente en papel impregnado con fungicidas o se pueden envasar en bandejas que garantizan la separación de la fruta entre sí. Estos tratamientos primarios pueden retardar de modo eficaz la alteración pero también pueden dañar la fruta y por tanto acelerar la infección y la alteración de esas piezas.

Alteración

Parece ser que en la fruta, los mecanismos de defensa son sumamente eficaces contra casi todos los hongos. Solo pocos géneros y especies son capaces de invadir un determinado tipo de fruta y provocar pérdidas graves. Algunos hongos son patógenos especializados en atacar solamente uno o dos tipos de fruta; otros tienen una capacidad más general para invadir el tejido del fruto. (Tabla 1)

Tabla 1: Ejemplos de hongos habituales que alteran la fruta (Dy Scott, 1977; Splittstoesser, 1987; Ryall y Pentzer, 1982; Snowdon, 1991)

Fruta	Hongo	Alteración
Cítricas: Naranja , limones	<i>Penicilium digitatum</i> <i>Alternaria citri</i> <i>Penicilium ulalense</i>	Podredumbre verde Podredumbre negra del extremo del pedúnculo Moho de barbas
Frutas de pipa: manzana, peras	<i>Penicilium expansum</i> <i>Penicilium solitum</i>	Podredumbre azul Podredumbre azul
Frutas de hueso: melocotones, cerezas,...	<i>Alternaria sp.</i> <i>Monilinia fructicola</i>	Manchas de negras a pardas Podredumbre parda
Plátanos	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>Nigrospora oryzae</i>	Podredumbre de la almohadilla

		Podredumbre atomizadora
Melones	<i>Colletotrichum lagenarium</i> <i>Alternaria alternata</i>	Antracnosis Podredumbre negra
Uvas	<i>Botytris cinerea</i>	Podredumbre gris
Tomates	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Alternaria alternata</i>	Podredumbre acuosa Podredumbre negra

1.1.3 Microorganismos patógenos

Los microorganismos representan dos problemas importantes. Para las industrias hortofrutícolas: el deterioro o reducción de la vida útil y problemas de salud humana debido a la presencia y / o crecimiento de microbios, patógenos que dan lugar a casos o brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Doyle, 1990).

Bacterias

Normalmente, las bacterias patógenas no están asociadas con la fruta, sin embargo; es posible que existan patógenos debidos a la contaminación fecal. Los tiempos de supervivencia de los patógenos entéricos, tanto en las frutas como en los zumos y en los concentrados, dependen del pH y de la temperatura. Los tiempos de supervivencia son más cortos a temperatura ambiente (20-30°C) que en refrigeración (5-10°C) aunque hay excepciones. En las frutas con acidez elevada, los tiempos de supervivencia generalmente son más cortos que en las frutas de media a baja acidez. En las frutas con una acidez muy elevada, los tiempos de supervivencia suelen ser muy cortos, es decir, de unos pocos días. Sin embargo, en frutas como los melones, con una acidez menor, la supervivencia de patógenos entéricos se puede prolongar o puede haber crecimiento. Es muy probable que exista crecimiento en la superficie de corte de la fruta.

Algunos brotes de salmonelosis se han relacionado con tomates crudos, con sandías cortadas previamente, con tomates frescos, con zumo de manzana no fermentado y con zumo de naranja.

También se han atribuido brotes de infección por *E. coli* O157 en productos de frutas, incluso en el zumo de manzana fermentado. La supervivencia de esta bacteria en condiciones ácidas depende del ácido orgánico y de la temperatura,

siendo la supervivencia a 4°C mayor que a 10°C, mientras que a 10°C los ácidos cítricos, málico y mandélico se inactivan más rápidamente que los ácidos acético, láctico o tartárico.

Por otro lado, *Listeria monocytogenes* es de especial preocupación porque puede crecer a temperaturas de refrigeración, persiste como un contaminante ambiental en el entorno de procesamiento y tiene la capacidad de causar enfermedades mortales asociadas con brotes (Fain, 1996).

Virus

Los virus entéricos pueden estar presentes en la fruta como resultado de contaminación fecal humana antes o después de la recolección. Una de las mayores preocupaciones son el virus Norwalk y los virus gastroentéricos parecidos y el virus de la hepatitis A. Los operarios que preparan las frutas para el consumo son una fuente importante de contaminación, pero también puede ser fuentes de contaminación el personal que se encuentran en otros puntos de la producción y tratamiento o el agua contaminada. Sin embargo, si bien ha habido pocos estudios acerca de la supervivencia de los virus de la hepatitis A o de los virus al Norwalk, las influencias principales sobre las bacterias patógenas citadas anteriormente también determinan el tiempo de supervivencia de los virus entéricos. Algunas sustancias existentes en las frutas causan la inactivación reversible de los virus.

Micotoxinas

Los dos principales problemas de las micotoxinas que se dan en la fruta fresca son la formación de patulina por *Pen. expansum* en las manzanas, y de aflatoxinas por *Asp. Flavus* en los higos. La podredumbre de las manzanas son evidentes y es de esperar que los consumidores las eliminen antes de que la fruta se consuma fresca. Por tanto, la patulina es más un problema en la fabricación de zumos.

Las aflatoxinas proceden de los higos contaminados en la producción de vino de higos. La degradación de las aflatoxinas se suele producir a una velocidad constante, con una vida media estimada de 115 días.

1.1.4 Control

Bacterias y virus

Un plan de HACCP construido correctamente debe tener en cuenta la posibilidad de que la fruta pueda vehicular bacterias patógenas y virus patógenos. Las frutas y los productos de frutas se consumen con frecuencia crudos sin haber sido expuestos a un tratamiento que pueda haber eliminado los patógenos de modo fiable.

Cuando el caso es éste, es esencial que las medidas para evitar la contaminación de la fruta con patógenos de origen fecal sean verificadas en todos los puntos de la cadena de cultivo, tratamiento, almacenaje, distribución y preparación. Estas medidas incluyen evitar las prácticas agrícolas peligrosas, como por ejemplo el uso no apropiado de algunos abonos orgánicos o la recolección de las manzanas caídas del árbol que pueden haber estado expuestas a las heces de los animales. Se debe poner en práctica el saneamiento adecuado durante la recogida, envasado y la clasificación. El lavado de la fruta en agua consigue una pequeña reducción de la carga microbiana si se realiza correctamente. La adición de cloro al agua de lavado o la inmersión en soluciones de cloro puede reducir de modo importante la concentración de patógenos en la superficie de la fruta, y por esta razón, puede reducir los peligros para el consumo.

El control de la podredumbre agria (*Geotrichum*) requiere el control de los insectos que perforan la fruta, la reducción del daño mecánico y la selección de la fruta agrietada.

La antracnosis de los melones se debe controlar mediante higiene rigurosa de todos los restos del cultivo y limpieza de los envases. La inoculación de las plantas jóvenes con el hongo reducirá la gravedad de la enfermedad. Las aspersiones de fungicida pueden ser valiosas. El uso de cultivares resistentes puede reducir o prevenir la podredumbre por *Cladosporium*.

Las podredumbres por *Fusarium* son difíciles de controlar, exigiendo a veces la desinfección de la tierra, el acondicionamiento de la semilla, fungicidas sistémicos, y la inspección cuidadosa en el establecimiento de envasado.

1.2. Recubrimientos en los alimentos

Aunque parezca que el uso de recubrimientos comestibles que se utilizan en alimentos es completamente nuevo, hace mucho tiempo que se aplica. Durante los siglos XII y XIII se practicaba en China la inmersión en cera de limones y naranjas para retrasar la pérdida de agua. Aunque los chinos no se dieron cuenta de todo su potencial e informaron que las frutas recubiertas con cera se podían almacenar por más tiempo que las frutas no enceradas. En la década de 1930, las ceras de parafina fundidas en caliente se comercializaron como recubrimientos comestibles para frutas frescas como manzanas y peras. Más tarde, el recubrimiento de grasa en los productos alimenticios, específicamente llamado "larding" estuvo de moda en Inglaterra. La "envoltura de salchichas" que se usa con mucha frecuencia en la actualidad no es más que un material derivado de una fuente de proteínas (gelatina). Por lo general, se emplea un espesor de película 2,5 mm y el recubrimiento se realiza mediante varios métodos. Nisperos-Carriedo et al. (1990) y Baldwin et al. (1995) observaron que los aceites, las ceras o la celulosa tenían efectos similares al prevenir el deterioro y al retener la calidad de las frutas y verduras recién recogidas. Se han realizado varios intentos para desarrollar otros materiales que podrían usarse para recubrir, producir y modificar la composición interna del gas de frutas / verduras para el almacenamiento a corto plazo.

En 1982, Lowings y Cutts publicaron un material de recubrimiento comestible que no es fitotóxico, insípido, inodoro y eficaz para aumentar la vida útil de las frutas y verduras. Este material de recubrimiento es una mezcla de ésteres de ácidos grasos de sacarosa (SFAE), carboximetilcelulosa sódica y mono- y di-glicéridos. SFAE fue desarrollado originalmente como un emulsionante. Sin embargo, el recubrimiento de SFAE en las frutas retrasa la maduración de las frutas. Las mezclas de SFAE han estado disponibles comercialmente desde 1980 para recubrir frutas y verduras con los nombres comerciales "TAL Pro-long" y "Semper fresh" (Banks, 1984; Smith y Stow, 1984; Chu, 1986; Santerre et al., 1989; Lau y Meheriuk, 1994; Park et al., 1996). Park et al. (1994) informaron que la aplicación del recubrimiento de zeína en la superficie del tomate retrasó el cambio de color, la pérdida de peso y mantuvo la firmeza durante el almacenamiento.

Un recubrimiento alimentario se puede definir como una matriz continua delgada, que será usada posteriormente en forma de recubrimiento del alimento o bien, estará ubicada entre los componentes del mismo. El uso de estos en frutas frescas y mínimamente procesadas como cítricos, manzanas y pepinos procesados ha sido utilizado para mantener la calidad y prolongar su vida útil. (Lin y Zhao, 2007).

En un tejido vivo, las reacciones que conllevan al deterioro y a la deshidratación continúan su curso después de la cosecha, las frutas y verduras continúan respirando incluso después de la cosecha y consumen todo el oxígeno del producto, que no se reemplaza tan rápido como el recubrimiento comestible y produce dióxido de carbono, que se acumula dentro del producto porque no puede escapar tan fácilmente a través del recubrimiento. Finalmente, la fruta y la verdura cambiarán a una respiración anaeróbica parcial que requiere menos oxígeno (1-3%) (Park et al., 1994; Guilbert et al., 1996; McHugh y Senesi, 2000). Con menos oxígeno, se interrumpe la producción de etileno (que acelera el proceso de maduración) y se minimiza la pérdida fisiológica de agua. Así, los frutos y las verduras permanecen firmes, frescas y nutritivas durante un período más largo y su vida útil casi se duplica. La barrera natural en frutas y verduras, y el tipo y la cantidad de recubrimiento influirán en la medida en que la atmósfera interna (oxígeno y dióxido de carbono) se modifican y el nivel de reducción de pérdida de peso.

Las investigaciones relacionadas con estos recubrimientos están orientadas fundamentalmente a las propiedades de barrera que pueden proporcionar. En frutas, los recubrimientos comestibles (Figura 1) crean una atmósfera modificada en el interior, reduciendo la velocidad de transpiración y retrasando el proceso de senescencia (Eum et al., 2009), debido a que generan una barrera semipermeable a gases como el oxígeno, el dióxido de carbono y el vapor de agua. Esto hace que se retrase el deterioro de la fruta a causa de la deshidratación, mejora las propiedades mecánicas, ayuda a mantener la integridad estructural del alimento y a retener los compuestos volátiles.

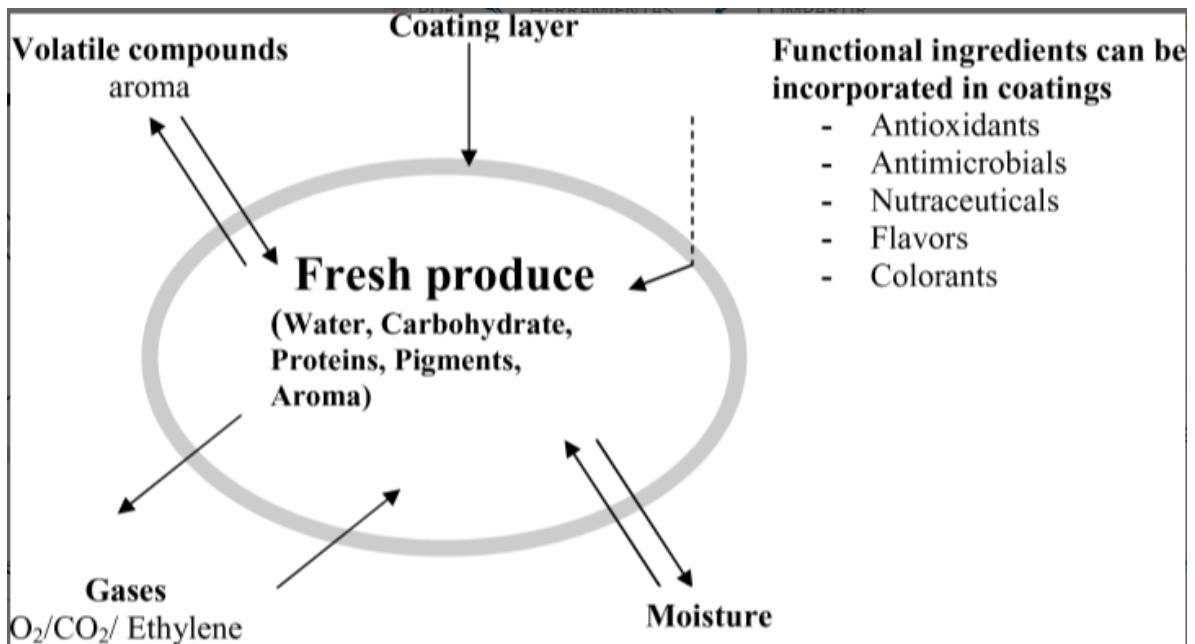


Figura 1: Beneficios potenciales del uso de recubrimientos comestibles (Lin y Zhao, 2007)

El uso en frutas se basa en algunas características como son el costo, la disponibilidad, atributos funcionales, propiedades mecánicas (flexibilidad y tensión), propiedades ópticas (brillo y opacidad), su efecto frente al flujo de gases, resistencia estructural al agua y a microorganismos, así como a su aceptabilidad sensorial. Estas características son influenciadas por algunas medidas como son el tipo de material estructural, masa molecular, distribución de cargas, condiciones bajo las cuales se preforman los recubrimientos (tipo de solvente, pH, concentración de componentes y temperatura, y el tipo y concentración de los aditivos (plastificantes, agentes entrecruzantes, antioxidantes o emulgentes).

Los materiales más utilizados en la formulación de recubrimientos y películas comestibles son polisacáridos y proteínas, se ha descrito que el uso de estos biopolímeros ha contribuido a proveer al alimento en cuestión de una barrera selectiva contra gases como el O_2 y el CO_2 , pero una pobre barrera contra la humedad, lo cual contribuye al rápido deterioro del alimento, debido a eso, se ha formulado el uso de estos biopolímeros con agentes hidrofóbicos que proporcionen a la película formada una menor permeabilidad al vapor de agua sin dejar de lado las características sensoriales que dictarán la preferencia del consumidor así como el costo de producción por el uso de materias primas que sean accesibles.

En vista de esto, ceras y aceites pueden utilizarse en la formulación, además, por sus características intrínsecas de disponibilidad y bajo costo, el almidón puede ser utilizado como material matriz en la formulación. Las modificaciones químicas en las moléculas de almidón pueden contribuir al cambio en las propiedades de barrera del recubrimiento o película comestible. La mezcla de almidón con proteína puede proporcionar a la película de estabilidad mecánica necesaria para mantener la integridad de los alimentos y una barrera contra la humedad. Entre las propiedades más importantes evaluadas en las películas comestibles son las propiedades de barrera a gases como el oxígeno y el dióxido de carbono y al vapor de agua, el porcentaje de materia soluble que orienta las aplicaciones de la película y parámetros de apariencia, especialmente cuando las películas o recubrimientos están diseñadas para utilizarse sobre el alimento.

Los recubrimientos comestibles, pueden optimizar las propiedades sensoriales de los alimentos y pueden ser adaptados para evitar el deterioro de alimentos como son las pizzas, empanadas y dulces, producido por la humedad. (Bourtoom, 2008).

Para la elección del material de un recubrimiento comestible, hay que tener en cuenta el fruto ya que su éxito va a estar basado en las propiedades de barrera a la humedad, el oxígeno y el dióxido de carbono. (Lin y Zhao, 2007).

1.2.1 Diferencias entre recubrimientos comestibles (RC) y películas comestibles (PC)

Un recubrimiento comestible se define como el revestimiento de un producto vegetal con una o varias capas finas de material polimérico natural y comestible, mientras que la película comestible es también una capa (o varias) fina de material polimérico comestible pero que es primero preformada y después colocada sobre el alimento o entre componentes del mismo. Por tanto, la principal diferencia entre RC y PC, es que los RC son aplicados en forma líquida por inmersión o pulverización formándose la película sobre el alimento (Figura 2), mientras que las PC (Figura 3) son primero preformadas como láminas sólidas y después colocadas ya formadas sobre el alimento (Figura) (Valencia-Chamorro et al., 2011).



Figura 2: Formación de recubrimientos comestibles por inmersión del producto (Valencia-Chamorro et al., 2011)

El uso de RC y PC se considera una tecnología razonada con el medio ambiente por varios aspectos fundamentales. Por un lado, disminuye la utilización del envasado tradicional con films plásticos. Además, los RC y PC son biopolímeros naturales y biodegradables, es decir, que pueden ser obtenidos a partir de recursos naturales o extraídos a partir de los subproductos de las industrias agroalimentarias. También, los RC y las PC pueden ser envases activos cuando se incorpora en su matriz polimérica aditivos naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.



Figura 3: Formación de películas comestibles (Valencia- Chamorro et al., 2011)

Los RC y las PC pueden ser utilizados como un vehículo para incrementar las propiedades nutricionales y saludables del vegetal mínimamente procesado por la incorporación de compuestos bioactivos. Para mantener su carácter de película o recubrimiento comestible natural, estos aditivos deben de ser también aditivos

naturales aprobados para su uso alimentario por la legislación de cada país (Silva-Weiss et al., 2003).

1.2.2 Características deseables en un recubrimiento comestible

- No estar compuesto de tóxicos o alérgenos.
- Proveer al alimento de estabilidad estructural y prevenir de daños mecánicos durante su transporte, manipulación y distribución.
- Mantener el contenido adecuado de humedad por lo que su composición debe diseñarse para controlar en ambos sentidos la migración del agua del alimento protegido.
- Ser semipermeable de modo que mantenga un equilibrio de los gases implicados en la respiración y como consecuencia de este efecto retardar la senescencia.
- Proporcionar una cobertura uniforme al alimento para lo cual debe contar con una buena adherencia a su superficie.
- Estabilizar el aroma, sabor y valor nutritivo previniendo la pérdida o absorción de componentes que afecten esos parámetros sin afectar las características organolépticas que influyan negativamente en la aceptación del consumidor; proporcionar protección contra el deterioro.
- Servir como soporte para aditivos deseables en el producto como antioxidantes y nutrientes y que la tecnología y materia prima involucrada en la producción de estos recubrimientos sea accesible y viable económicamente

1.3 Principales recubrimientos comestibles en frutas

Los dos grandes grupos de materiales (Figura 4) que se suelen utilizar en frutas frescas cortadas son los polisacáridos y las proteínas.

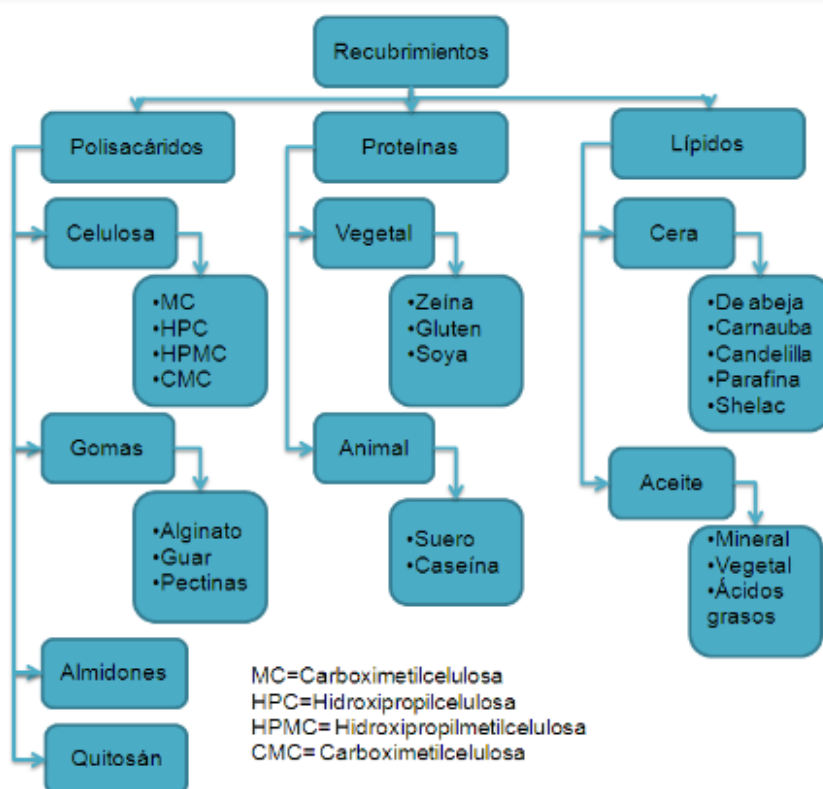


Figura 4: Principales materiales utilizados en recubrimientos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009)

1.3.1 Polisacáridos

Estas biomoléculas son muy utilizadas en la fabricación de recubrimientos comestibles ya que crean una barrera contra los gases, como son el oxígeno y el dióxido de carbono. Sin embargo, dada su naturaleza hidrofílica son barreras poco eficientes contra la humedad y por tanto, tiene un valor alto en permeabilidad al vapor de agua (PVA) si se comparan con películas plásticas comerciales. Los polisacáridos utilizados en frutas y hortalizas frescas son el almidón y sus derivados, los derivados de celulosa como la metilcelulosa y la hidroxipropilmetilcelulosa, alginatos, carragenina, quitosano, pectina y sus derivados, extractos de algas marinas y varias gomas, que han sido utilizados también en frutas y hortalizas frescas (Vargas et al., 2008; Bourtoom, 2008; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

Las variaciones a nivel molecular de los polisacáridos, como el peso molecular, grado de ramificación, conformación en el espacio, cargas eléctricas e hidrofobicidad

alterarán las propiedades fisicoquímicas y rendimiento del recubrimiento (Vargas et al., 2008).

✓ Quitosano

El quitosano es uno de los polisacáridos más utilizados, el mismo se obtiene del exoesqueleto de crustáceos, alas de algunos insectos, pareces celulares de hongos, algas y otros, mediante la desacetilación parcial de la quitina (Kucukgulmez et al., 2011), ofrece un amplio potencial que puede ser aplicado a la industria alimentaria debido a sus propiedades fisicoquímicas particulares, tales como biodegradabilidad y biocompatibilidad con los tejidos humanos. Este compuesto de origen biológico se ha convertido en los últimos años en el preferido debido a su capacidad para formar RC y PC, por no ser tóxico, su abundancia en la naturaleza y a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas que lo hacen ser de vital interés para la preservación de muchos alimentos (Aider, 2010).

En la industria de frutas y hortalizas se ha encontrado que tiene la capacidad de retardar el crecimiento de algunos microorganismos que son mortales en la etapa de pos cosecha. Aunque la actividad antimicrobiana del quitosano ha sido comprobada contra diferentes tipos de microorganismos, varios estudios han demostrado que ésta es mayor contra bacterias que contra hongos (Ziani et al., 2009).

Se ha confirmado que la capacidad fungicida del quitosano está correlacionada en gran medida con su concentración, encontrando a su vez que medios suplementados con altas concentraciones de quitosano son capaces de inhibir el crecimiento de micelios, en patógenos tales como *Alternaria alternate*, *Bipolaris oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, entre otros (Bautista- Baños et al., 2006; Badawy y Rabea, 2011).

Mediante la evaluación del efecto del moho gris (*Botrytis cinérea*), sobre tejidos de frutos de pimiento en presencia de quitosano, se pudo determinar que el hongo sufrió daño celular en las hifas invasoras y se redujo la producción de poligalacturonasa, lo cual justificaría la conservación de la firmeza de los tejidos (El Ghaouth et al., 1992). También la composición de recubrimientos comestibles a base de goma arábica (GA) a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20% w/v), quitosano 95% desacetilado (0,5, 1,0 y 1,5% w/v) y películas compuestas de goma

arábiga + quitosano (GA + CH) han sido aplicadas sobre frutos frescos de banano, con el objetivo de determinar su potencial en el control de *Colletotrichum musae*, hongo causante de la antracnosis en el fruto, que afecta la calidad poscosecha y se desarrolla con mayor facilidad durante el transporte y almacenamiento de la fruta (Maqbool et al., 2010). El CH es una sustancia que permite ser utilizada de conjunto con otros compuestos como es el caso de su mezcla con almidones, proteínas y lípidos, donde han demostrado poseer las características deseables para los productos frescos: buenas propiedades de barrera, insípidos y transparentes (Atarés et al., 2010), tal es el caso de su combinación con carboximetilcelulosa para aumentar la vida de almacenamiento de uva, encontrando que la combinación de estos compuestos disminuyen la tasa respiratoria de esta fruta y aumentan la resistencia mecánica a los daños (Sánchez-González et al., 2011).

Además es capaz de actuar en combinación con aceites esenciales de diferentes orígenes, estos son ampliamente conocidos por conferirle al producto atributos sensoriales y poseer características como capacidad antioxidante y antimicrobiana, con importantes perspectivas para el control de crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes como es el caso del aceite de bergamota, canela, vainilla, rosas, cítricos como el limón, mandarina y naranja, entre otros (Rico et al., 2012).

✓ Alginatos y Carragenanos

También se pueden usar alginatos y carragenanos para preparar recubrimientos comestibles. Los alginatos son las sales del ácido algínico, que es un copolímero lineal de monómeros de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico. El formato de revestimiento de alginato se basa en la capacidad de los alginatos para reaccionar con cationes di-valentes y trivalentes, como calcio, ferrum o magnesio, que se agregan como agentes gelificantes (Cha y Chinnan, 2004). La carragenina es una mezcla compleja de al menos cinco polímeros de galactosa solubles en agua diferentes designados como carragenina λ , κ , ι , μ y ν . La gelificación de ι y κ carragenina se produce en presencia de monovalentes o cationes divalentes. La formación de película de carragenina incluye este mecanismo de gelificación durante el secado moderado, lo que lleva a una red tridimensional formada por dobles hélices de polisacárido ya una película sólida después de la evaporación del solvente (Karbowski et al., 2007).

✓ Pectina

La pectina es un polisacárido aniónico complejo compuesto por residuos de ácido D-galacturónico β -1, 4-enlazados, en donde los carboxilos del ácido urónico son totalmente (HMP, metoxi pectina alta) o parcialmente (LMP, metoxi pectina baja) metil esterificado. La pectina de alto metoxi forma películas excelentes. Las mezclas plastificadas de pectina cítrica y almidón con alto contenido de amilasa proporcionan películas fuertes y flexibles, que son térmicamente estables hasta 180°C. La pectina también es miscible con poli (alcohol vinílico) en todas las proporciones. Los usos comerciales potenciales de tales películas son las bolsas solubles en agua para detergentes e insecticidas, bolsas y bolsas desechables, y sistemas y dispositivos de administración médica. Estas películas son soluciones fundidas por secado al aire a temperatura ambiente. Las espumas plásticas basadas en almidón formadas por la mezcla de almidón con ácido poliláctico se utilizan como materiales de relleno sueltos para proteger contra golpes y vibraciones durante el transporte (Fang y Hanna, 2000). Existen en el mercado películas laminadas de pectina y quitosán junto con glicerol o ácido láctico como plastificante (Fishman et al., 1994).

1.3.2 Proteínas

Debido a su capacidad para formar enlaces intermoleculares entrecruzados y a las propiedades de estas interacciones, las proteínas pueden formar recubrimientos. A igual que los recubrimientos con polisacáridos, los recubrimientos hechos con proteínas presentan propiedades de barrera contra gases, pero al igual que los anteriores son pobres barreras con el agua.

Las proteínas que se han utilizado en el recubrimiento de frutas y hortalizas son la zeína, el gluten y proteína de soja, gluten de trigo, la proteína de suero de leche y la caseína e incluso la proteína de semilla de algodón (Cisneros-Zevallos y Krochta, 2003a; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

El peso molecular, las características eléctricas, flexibilidad y estabilidad térmica y la conformación espacial, son propiedades de las proteínas que repercutirán en última instancia en la capacidad de una proteína determinada para formar un recubrimiento y conferirle características específicas (Vargas et al., 2008).

1.3.3 Lípidos

La función principal del uso de lípidos en recubrimientos comestibles es la barrera que ofrece frente a la humedad y esto es debido a su baja polaridad. Su uso siempre está asociado a un polímero que proporcione resistencia mecánica al recubrimiento.

Para productos frescos, se suelen utilizar lípidos neutros, ácidos grasos, ceras y resinas.

Las propiedades finales de estos recubrimientos añadidos con lípidos van a depender de las características de estos componentes, así como su estado físico, su grado de saturación y longitud de la cadena. (Lin y Zhao, 2007; Bourtoom, 2008; Vargas et al., 2008; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

1.3.4 Recubrimientos a base de almidones modificados y proteína

Investigaciones recientes se han enfocado en el uso de mezclas de biopolímeros, como proteínas y almidones, con el objetivo de mejorar las características de estos recubrimientos, ya que se combinan sus propiedades para adaptarlas a las necesidades de cada producto en específico.

Como consecuencia de los arreglos en los puentes disulfuro de una proteína, se obtienen películas con buenas propiedades estructurales, por otro lado, las películas a base de almidones tienen ventajas en el control de intercambio de gases. Cada uno de estos biopolímeros se ha utilizado en formulación en combinación de cera y lípidos, no obstante, pueden crearse recubrimientos con mezclas que disminuyan por ejemplo la permeabilidad al vapor de agua, conociendo los comportamientos de ambos materiales (Jagannath et al., 2003; Wang, 2007).

1.3.5 Recubrimientos comestibles a base de proteína de suero de leche

El suero de leche es el líquido que resulta de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Su composición varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso del que procede. Las proteínas del suero de leche son la β -lactoglobulina seguida de la α -lactoalbúmina, la seroalbúmina bovina y varias inmunoglobulinas. Las proteínas del suero son

solubles en agua y sufren desnaturalización cuando se exponen a altas temperaturas.

En general, las propiedades de las películas a base de proteínas de suero de leche pueden verse afectadas por los tipos de ingredientes utilizado para formular la solución filmogénica, entre los que se incluyen plastificantes, agentes antimicrobianos y lípidos, también por las condiciones de secado de la película pues con aceleración en el secado se han reportado valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua con respecto a las películas con un secado lento (Regalado et al., 2006; Lin y Zhao, 2007).

1.4 Propiedades de los recubrimientos

Las propiedades dependerán del tipo de material que se utilice en la formulación de la solución para fabricar el recubrimiento, del tipo de plastificante, de las condiciones de formación, del espesor y de la velocidad de evaporación del disolvente.

Generalmente, su efectividad depende generalmente de la permeabilidad al vapor de agua y a los gases así como a sus propiedades mecánicas adecuadas.

El mecanismo por el cual los recubrimientos conservan la calidad en frutas es debido a que generan una barrera física a los gases, produciendo una atmósfera modificada ya que reducen la disponibilidad de O_2 e incrementan la concentración de CO_2 (Avena-Bustillos et al., 1997).

La permeabilidad de una barrera se calcula a partir de una combinación de la Ley de Fick para la difusión, y la Ley de Henry para la solubilidad. La permeabilidad al vapor de agua es una medida de la facilidad con la que el vapor de agua puede penetrar en un material.

El espesor de los recubrimientos comestibles es un parámetro importante, debido a que afecta directamente las propiedades biológicas y la vida útil de la fruta cubierta. La eficacia de recubrimiento depende principalmente del control de la difusión de los componentes del revestimiento, la cual se ve afectada por el espesor de la película. La mayoría de los recubrimientos comestibles son de naturaleza hidrofílica, encontrándose una relación con la permeabilidad al vapor de agua y el espesor de las películas. A medida que el espesor del recubrimiento aumenta, se incrementa la

resistencia a la transferencia de masa a través de ella, en consecuencia, la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la película se incrementa.

1.5 Formación de recubrimientos

1º Etapa

Disolución del material (biopolímeros) correctamente en algún disolvente como agua, alcohol, soluciones de ácido diluido o mezclas de disolventes; el material debe estar dispersado. Algunas veces, es necesario ajustar el pH o calentar de la suspensión que contiene el biopolímero para disolver la macromolécula.

2º Etapa

Se adiciona una sustancia con propiedades plastificantes. Esta sustancia proporcionará al recubrimiento un buen comportamiento mecánico en términos de flexibilidad y resistencia a la rotura, reduciendo la fragilidad. El plastificante que más se utiliza es el glicerol debido a su mayor estabilidad y compatibilidad con las cadenas biopoliméricas hidrófilas en comparación con el sorbitol, polietilenglicol y azúcares. El plastificante se asocia fisicoquímicamente con la estructura del biopolímero reduciendo la cohesión e interfiriendo con la asociación de las cadenas poliméricas facilitando su deslizamiento por lo que aumenta la flexibilidad del recubrimiento. Una vez dispersados los biopolímeros y adicionado el plastificante, es posible añadir otras sustancias como antimicrobianos, antioxidantes a la solución formadora de película, con el objetivo de proporcionar alguna propiedad funcional deseada.

3º Etapa

En esta etapa se elimina el exceso de disolvente, por lo cual se debe realizar un proceso de secado controlado. La velocidad de secado y las condiciones ambientales determinarán el espesor final y las características estructurales del recubrimiento.

1.6 Métodos para aplicar los recubrimientos en el fruto

Cuando tenemos frutas con superficies irregulares, el método más adecuado es el de inmersión, debido a que se requiere un recubrimiento uniforme. La fruta debe ser lavada y secada previamente, luego se sumerge en la formulación del recubrimiento directamente, después se deja drenar el material que sobra y se procede al secado, este método es muy aplicado en recubrimientos comestibles con cera en frutas enteras, ya que se garantiza un impregnado completo para formar una película membranosa delgada sobre la superficie. En frutas con superficies lisas y uniformes, el método más utilizado es el de aspersión, debido a que se obtienen recubrimientos más delgados y uniformes que los obtenidos por inmersión. La solución se aplica presurizada, mediante la regulación de la presión, para conseguir diferentes tamaños de gota. La aplicación del recubrimiento se realiza con aspersores de alta presión que permiten emplear menos material de recubrimiento. Otros métodos son la aplicación mecánica o manual con brochas.

1.7 Ventajas de los recubrimientos en frutas

Ventajas en la utilización de estos recubrimientos incluyen:

- Prolongan la degradación de pigmentos debido a la ausencia de CO₂, y por tanto el desarrollo de colores indeseables.
- Crean una atmósfera modificada entre la película y la superficie de la misma.
- Los recubrimientos forman una barrera en la superficie del fruto, modificando la composición gaseosa interna, lo cual disminuye la tasa de respiración y por tanto, prolonga la vida pos cosecha del producto.
- Son biodegradables, lo que reduce el impacto al medio ambiente.
- Los biopolímeros utilizados en las formulaciones pueden llevar diferentes aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes aromatizantes y nutraceúticos.
- Proporcionan a la fruta mayor estabilidad durante el transporte y almacenamiento.
- Pueden ser consumidos con la fruta ya que se fabrican utilizando materiales considerados GRAS (Alimentos Generalmente Reconocido como Seguros).

-Controlan el desarrollo microbiano, cambios fisiológicos y físicoquímicos extendiendo la vida útil del fruto entero o con un mínimo de procesamiento.

1.8 Problemas asociados con recubrimientos comestibles

A pesar de que algunos recubrimientos comestibles se han aplicado con éxito a frutas y verduras frescas, otras aplicaciones han afectado negativamente a la calidad. La modificación de la atmósfera interna mediante el uso de recubrimientos comestibles puede aumentar los trastornos asociados con un alto nivel de dióxido de carbono o una baja concentración de oxígeno (Ben-Yehoshua, 1969).

Implicaciones sensoriales

El recubrimiento grueso en la superficie de frutas y verduras se convierte en una barrera indeseable entre la atmósfera externa e interna y restringe el intercambio de gases respiratorios (CO_2 y O_2) (Cisneros-Zevallos y Krochta, 2003). Esto puede resultar en la respiración anaeróbica, que produce mucho más dióxido de carbono, acetaldehído y etanol. El acetaldehído y el etanol dan como resultado una fermentación y dan un sabor desagradable al producto, lo cual es perjudicial para la calidad percibida (Miller et al., 1983; Howard y Dewi, 1995). Por lo tanto, es necesario ajustar el grosor de la capa de cera según la variedad y las temperaturas de almacenamiento y comercialización.

-La modificación de la atmósfera interna del fruto, la cual puede incrementar desórdenes asociados con una alta concentración de dióxido de carbono o una baja de oxígeno, afectando parámetros sensoriales en la fruta.

-Además pueden inducir indirectamente cambios en el sabor de la fruta como consecuencia al retraso en la maduración.

Cuestiones de seguridad alimentaria

De acuerdo con la Directiva Europea (ED, 1995, 1998) y las regulaciones de EE. UU. (FDA, 2006), los recubrimientos comestibles pueden clasificarse como productos alimenticios, ingredientes alimentarios, aditivos alimentarios, sustancias en contacto con alimentos o materiales de envasado de alimentos. Para mantener la visibilidad, todos los componentes formadores de película, así como cualquier aditivo

funcional en los materiales formadores de película, deben ser de calidad alimentaria, no tóxicos, y todas las instalaciones de proceso deben cumplir con altos estándares de higiene (Guilbert y Gontard, 1995; Guilbert et al., 1996; Han, 2002; Nussinovitch, 2003).

En la regulación de la mayoría de los países, las sustancias químicas agregadas como antimicrobianos se consideran aditivos alimentarios si el propósito principal de las sustancias es la extensión de la vida útil. Sin embargo, cada país tiene sus propias regulaciones que definen una lista de aditivos aprobados (ED, 1995; USDA, 2006). Por ejemplo, de acuerdo con las regulaciones de los EE.UU., los ácidos orgánicos, como el acético, el láctico, el cítrico, el málico, el propiónico, el tartárico y sus sales, son GRAS para usos diversos y de uso general (Doores, 1993). Por otro lado, muchas OE se utilizan ampliamente en las industrias de alimentos, salud y cuidado personal, y también se clasifican como sustancias GRAS o están permitidas como aditivos alimentarios. En Europa, los ingredientes que pueden incorporarse en las formulaciones de recubrimientos comestibles incluyen goma arábica y karaya, pectinas, laca, cera de abejas, cera de candelilla y cera de carnauba.

Esta Directiva se modificó en 1998 mediante la introducción de nuevos ingredientes, como lecitina, polisorbatos, ácidos grasos y sales de ácidos grasos. Por otro lado, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) menciona otros aditivos utilizados como componentes de recubrimientos protectores aplicados a frutas y verduras frescas como la morfolina, la polidextrosa, el monoestearato de sorbitán, los ésteres de ácidos grasos de sacarosa, la manteca de cacao y el aceite de ricino (FDA, 2006). Los vegetarianos y otras personas que evitan los productos animales pueden preocuparse de que las frutas y verduras contengan ceras de origen animal, como el ácido oleico. Algunas personas temen que el recubrimiento y las películas comestibles atrapen los pesticidas, lo que hace que la fruta o la verdura no sea segura para comer. Si los consumidores desean evitar las frutas y verduras con recubrimiento comestible, las regulaciones de la FDA que entraron en vigencia en 1994 pueden ayudarles a identificar los productos adecuados para ellos. Estas regulaciones requieren que los empacadores o tiendas de comestibles proporcionen información sobre la presencia de ceras en las frutas y verduras frescas. La información dirá que el producto está (a) recubierto con cera a base de animales de calidad alimentaria o (b) recubierto con vegetales de calidad

alimentaria, petróleo, cera o resina a base de cera de abeja y / o laca para mantener la frescura. La FDA también les permitirá etiquetar la declaración "Sin recubrimiento de cera o resina" en frutas y verduras frescas que no contengan ningún recubrimiento.

1.9 Necesidades futuras en recubrimientos comestibles para frutas y verduras

A pesar de los beneficios significativos del uso de recubrimientos comestibles para prolongar la vida útil y mejorar la calidad y la seguridad microbiana de las frutas y verduras frescas y mínimamente procesadas, las aplicaciones comerciales en una amplia gama de frutas y verduras aún son muy limitadas. Esto puede estar limitado por varios factores, entre los que se incluyen una comprensión y disponibilidad limitadas de los materiales de recubrimiento apropiados, una propiedad de barrera contra la humedad deficiente, una adherencia superficial débil de algunos materiales de recubrimiento, una posible alergia de los materiales de recubrimiento basados en proteínas, una calidad sensorial no deseada de algunos materiales de recubrimiento y la viabilidad de la ampliación a un entorno industrial.

1.9.1. Mejora de las propiedades de barrera a la humedad de los recubrimientos hidrófilos

La hidrofiliidad de algunos materiales de recubrimiento comestibles no proporciona una barrera suficiente contra la humedad para recubrir frutas y verduras, especialmente para productos frescos, donde hay una superficie húmeda. Se requieren esfuerzos para desarrollar nuevos materiales de recubrimiento y / o formulaciones de recubrimiento que posean una alta propiedad de barrera contra la humedad y adherencia a la superficie, y para comprender la funcionalidad e interacciones entre los diferentes componentes de la fórmula de recubrimiento comestible. Los estudios para mejorar la funcionalidad de los materiales de revestimiento existentes también son importantes. La incorporación de ingredientes hidrófobos, como los lípidos y los ácidos grasos, para mejorar la barrera contra la humedad mientras se mantienen las funciones deseables de resistencia al vapor, gas o soluto y propiedades sensoriales es fundamental en futuras investigaciones.

1.9.2 Mejora de la adherencia y durabilidad del recubrimiento

La adherencia y la durabilidad del recubrimiento son importantes para mantener la calidad de los alimentos durante el almacenamiento. Para recibir verdaderamente el beneficio de los recubrimientos comestibles en frutas y verduras en aplicaciones comerciales, el recubrimiento debe adherirse a la superficie del alimento durante el procesamiento, almacenamiento y transporte. La humectabilidad de la superficie es esencial para una buena adherencia del recubrimiento. Un líquido humedecería perfectamente el sólido cuando la tensión superficial de un sólido sea mayor o igual a la del líquido, lo que se puede lograr mediante la adición de un surfactante apropiado en las soluciones de recubrimiento. La adhesión de los recubrimientos en las superficies de los alimentos con diferentes características necesita ser estudiada y mejorada. Esto suele ser importante para algunas frutas y verduras frescas y recién cortadas donde ya existe una capa cerosa hidrofóbica natural o una superficie húmeda y de alta humedad, respectivamente. En la aplicación de recubrimiento de hoy, la inmersión es un método común para aplicar recubrimientos. Este método cuando se usa agua que contiene detergente, sin embargo, puede lavar la capa cerosa natural de la superficie de algunas frutas y verduras, degradando así la funcionalidad de los recubrimientos. Además, puede diluir la solución de recubrimiento y dar como resultado residuos (desperdicios) significativos de los materiales de recubrimiento. Por lo tanto, el desarrollo de otras técnicas de aplicación de recubrimiento como la pulverización o goteo es necesario para aumentar la eficiencia y durabilidad del recubrimiento.

1.9.3 Desarrollo continuo de recubrimientos compuestos o microemulsión

Los recubrimientos compuestos son prometedores para mejorar las propiedades de barrera contra la humedad de los materiales de recubrimiento hidrófilos y mejorar la adherencia y durabilidad del recubrimiento. La investigación sobre la identificación de las combinaciones de materiales más compatibles, el tamaño de las partículas lipídicas y la estabilidad del sistema de emulsión debe investigarse continuamente para satisfacer las necesidades específicas de recubrir frutas y verduras frescas y mínimamente procesadas.

1.9.4 Calidad sensorial de los recubrimientos comestibles

La calidad sensorial es esencial para determinar el éxito de los recubrimientos comestibles, ya que afecta la aceptación del consumidor y el potencial de mercado de los productos recubiertos. El impacto del sabor exógeno por los materiales de recubrimiento, el aspecto superficial poco atractivo de los recubrimientos y otros factores pueden afectar la aceptación por parte del consumidor de los productos recubiertos. Por lo tanto, es importante investigar la calidad sensorial de los materiales de recubrimiento y los productos recubiertos, incluidos el aspecto, el color, el aroma, el sabor y la textura. Desafortunadamente, tales estudios son muy escasos y se necesitan más trabajos.

1.9.5 Ampliación de la operación de recubrimiento en un entorno industrial

Las frutas y verduras son productos frágiles con alto contenido de agua, por lo que generalmente presentan 2 desafíos para las aplicaciones de recubrimiento a escala en un entorno industrial:

- Proteger las frutas y hortalizas del daño físico durante la aplicación del recubrimiento mientras proporciona la adherencia y durabilidad necesarias para el recubrimiento.
- Evitar la pérdida de humedad y la deshidratación de la superficie durante el secado después de la aplicación del recubrimiento.

Los sistemas de revestimiento de cubeta y revestimiento de lecho fluidizado requieren volteo intenso, mientras que la aplicación de inmersión puede lavar la capa protectora natural en la superficie de algunas frutas y verduras. Buscar sistemas de aplicación de recubrimiento más factibles que proporcionen una distribución uniforme de la solución de recubrimiento en la superficie de frutas y verduras y un secado eficiente es necesario en las operaciones de recubrimiento a escala a escala de fábrica.

1.10 Futuras tendencias

Se está desarrollando una nueva generación de recubrimientos comestibles, cuyo objetivo es incorporar y / o controlar la liberación de compuestos activos utilizando soluciones nanotecnológicas como la nanoencapsulación y los sistemas multicapa. Hoy en día, las nanotecnologías se utilizan para mejorar los aspectos nutricionales de los alimentos mediante aditivos y nutrientes a nanoescala y los sistemas de distribución en nanoescala para compuestos bioactivos (Bouwmeester et al., 2007). La micro y nanoencapsulación de compuestos activos con recubrimientos comestibles puede ayudar a controlar su liberación en condiciones específicas (López-Rubio et al., 2006), protegiéndolos de la humedad, el calor u otras condiciones extremas y mejorando su estabilidad y viabilidad (Jiménez et al., 2004). El alginato es el material más utilizado para la encapsulación, pero también se pueden usar materiales de otras fuentes. Las enzimas, los aceites probióticos, prebióticos, marinos (ácidos grasos omega-3) se encuentran entre las sustancias funcionales más adecuadas para encapsularse. Por otro lado, el uso de sistemas multicapa de capa-capa (LbL) de nanolaminato, en los que las superficies cargadas están recubiertas con películas interfaciales que consisten en capas de nano múltiples ofrecen perspectivas prometedoras (Decher, 2003; Weiss et al., 2006).

La preparación de estructuras multicapa consiste en una inmersión consecutiva del sustrato en dos o más soluciones de recubrimiento que contienen especies con carga opuesta (Guzey y McClements, 2006). El recubrimiento de los alimentos con nanolaminatos implica sumergirlos en una serie de soluciones que contienen sustancias que serán absorbidas por la superficie de los alimentos o rociar sustancias sobre la superficie de los alimentos (McClements et al., 2005). Estos recubrimientos de nanolaminato podrían elaborarse completamente a partir de ingredientes de grado alimenticio (proteínas, polisacáridos, lípidos) y podrían incluir varios agentes funcionales como antimicrobianos, agentes antibrowning, antioxidantes, enzimas, saborizantes y colorantes (Weiss et al., 2006).

2. OBJETIVOS

La fruta es un alimento indispensable para una dieta equilibrada. Su característica nutricional viene dada por su gran aporte de fibra y vitaminas. Son un grupo de alimentos con una gran variedad de especies, con características propias respecto al color y sabor, y también con distintas formas de preparación, lo que hace que tengan una gran aceptación en la población en general. Los consumidores demandan productos más duraderos y que garanticen su salud, y una de las técnicas para aumentar la vida y evitar la contaminación de la frutas son los recubrimientos alimentarios

Este trabajo fin de máster tiene como objetivo general estudiar la conservación de piezas de frutas mediante recubrimientos alimentarios. Los objetivos propuestos son:

1. Estudiar la conservación de piezas melón mediante dos tipos de recubrimientos comestibles
2. Estudiar el efecto de los recubrimientos en las muestras de melón inoculadas con *L. innocua*
3. Estudiar la conservación de gajos de naranja mediante dos tipos de recubrimientos comestibles
4. Estudiar el efecto de los recubrimientos en los gajos de naranja inoculados con *L. innocua*
5. Comparar la efectividad de los recubrimientos utilizados a base de quitosan o quitosan + EDTA

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se ha realizado con dos piezas de frutas diferentes, melón y naranja. Una vez empezado el estudio, las frutas se reparten en diferentes bolsas que permanecerán en cámara fría a 4°C para hacer un recuento de bacterias a tiempo 0h, 2 días, 5 días y 7 días en medios TSA y PALCAM.

3.1 Material de laboratorio necesario

Se han utilizado los siguientes materiales (Figura 5):

- Bolsas de plástico para introducir el alimento
- Eppendorf
- Asa de siembra
- Guantes
- Mechero Bunsen
- Alcohol
- Agua destilada
- Alcohol 96°C
- Solución salina
- Quitosano al 2%
- Ácido acético al 1%
- EDTA
- Pinzas
- Tubos TSB inoculados con *Listeria innocua*
- Placas Tryptic soy Agar (TSA)
- Placas BD PALCAM Listeria Agar (PALCAM)
- Piezas de fruta troceada
- Puntas estériles para micropipetas
- Micropipetas de 200 µl y 1000 µl
- Estufa de cultivo a 37°C
- Cámara fría a 4° C
- Autoclave
- Campana de gases

- Agitador
- Matraces de diferentes tamaños
- Balanza
- Baño de agua a 55° C
- Gradillas

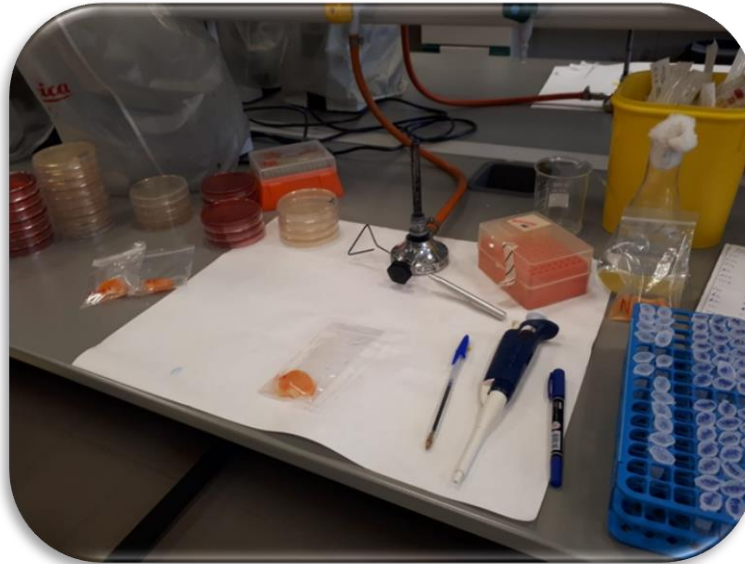


Figura 5: Parte del material utilizado

3.2 Medios de cultivo utilizados

En el experimento se han utilizado principalmente dos medios de cultivo:

Tryptic soy Agar (TSA)

El medio TSA es un medio de cultivo de uso general en el que pueden crecer tanto microorganismos exigentes como no exigentes, aquí se incluyen bacterias aerobias y no anaerobias. Este medio es recomendado para la detección y el recuento de una gran variedad de microorganismos. En el pueden crecer microorganismos como *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Salmonella* y algunos microorganismos más precisos como *Listeria*, *Neisseria*, *Brucella*, etc.

Su composición en gramos por litro se muestra en la siguiente tabla (Tabla 2)

Tabla 2: Composición del medio TSA

Fórmula en g/l	
Pancreatic Digest of casein	15,00
Papaic Digest of Soya Bean	5,00
Cloruro de sodio	5,00
Agar	15,00
pH	7.3±0.2
Temperatura	25°C

Listeria PALCAM, Base de Agar (Medio Deshidratado)

Es un medio para el aislamiento selectivo, cultivo y diferenciación de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en alimentos.

Su composición en gramos por litro se muestra en la tabla 3

Tabla 3: Composición del medio PALCAM

Fórmula en g/l	
Columbia, Base de Agar	39,00
Extracto de levadura	3,00
Glucosa	0,5
Esculina	0,8
Amonio Hierro(III) Citrato	0,5
Manita	10,00
Rojo de Fenol	0,08
Litio Cloruro	15,00
pH	7,2±0,2

3.2.1 Preparación de los medios de cultivo

Se han preparado varios matraces de PALCAM de 500 ml como medio selectivo, debido a que el número de muestras ha sido muy grande debido a las distintas diluciones en placa. Para el TSA, medio general, el número de matraces de 400ml ha sido mayor debido al ya que el número de diluciones en placas.

Para preparar cada medio (Figura 6) se ha utilizado un medio deshidratado comercial, en este medio indica los gr/l que se necesitan y la cantidad de agar que contiene. Por tanto, para la preparación del medio PALCAM en un matraz de 500 ml se ha utilizado 34,5 gr y para la preparación de TSA, 16 gr para cada matraz de 400 ml. El medio PALCAM además necesita la incorporación de un suplemento una vez que el medio está autoclavado y atemperado. (Figura 6)



Figura 6: Medios de cultivo PALCAM, TSA y NaCl

3.2.2 Preparación de la solución salina

Se han preparado matraces de 250 ml de solución salina al 0,9%, para ello se ha utilizado agua destilada y 2,25 gr de NaCl.

Esta solución salina se utiliza para distintos fines. Por un lado, se utilizará para rellenar cada bolsa de nuestro alimento con 20 ml de solución; por otro lado se usará para hacer las diferentes diluciones en eppendorfs (Figura 7) que necesitamos para la siembra en placa

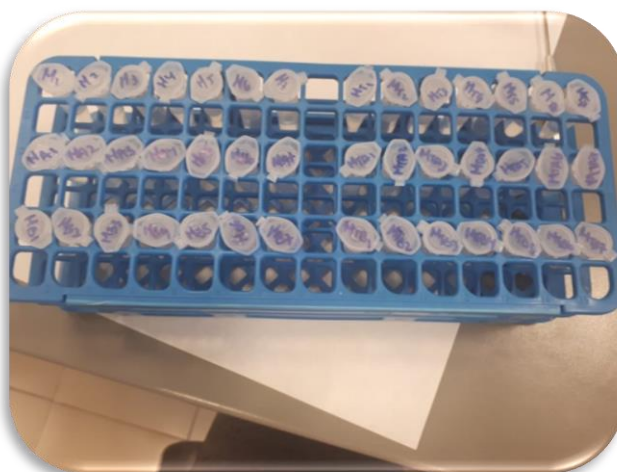


Figura 7: Diluciones con solución salina en eppendorfs

3.2.3 Preparación de alimento, quitosano y EDTA

Para realizar el experimento hemos utilizado dos alimentos, naranja y melón, en el caso del melón se ha cortado en pequeños trozos y en el caso de la naranja hemos utilizado sus gajos. Se han utilizado dos tipos de tratamiento A y B, quitosano y quitosano + EDTA, respectivamente.

Para la preparación del primer recubrimiento, quitosano al 2% (p/v) en una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v), hemos utilizado 200 ml de agua destilada, 2 ml de ácido acético y 4 gr de quitosano. Posteriormente, la mezcla se homogenizó durante 20 min haciendo uso de un agitador magnético a 15 rpm.

Para el segundo recubrimiento, quitosano + EDTA, hemos usado 100 ml de la preparación anterior, es decir, quitosano al 2% y le hemos añadido 584 μ l de EDTA.

Se prepararon 24 bolsas de plástico para cada alimento, ya que cada día de recuento se utilizarán 6 bolsas de cada fruta. Estas bolsas irán rotuladas según el tipo de tratamiento que lleve y si están inoculadas o no con listeria.

Para el entendimiento de la división de las bolsas, se expone gráficamente en las siguientes tablas: (Tablas 4 y 5)

Tabla 4: Abreviaturas bolsas melón

Melón (M)			
Día 0	Día 2	Día 5	Día 7
M0	M2	M5	M7
MA0	MA2	MA5	MA7
MB0	MB2	MB5	MB7
MT0	MT2	MT5	MT7
MTA0	MTA2	MTA5	MTA7
MTB0	MTB2	MTB5	MTB7

Tabla 5: Abreviaturas bolsas naranja

Naranja (N)			
Día 0	Día 2	Día 5	Día 7
N0	N2	N5	N7
NA0	NA2	NA5	NA7
NB0	NB2	NB5	NB7
NT0	NT2	NT5	NT7
NTA0	NTA2	NTA5	NTA7
NTB0	NTB2	NTB5	NTB7

Para el ensayo las piezas de frutas, han sido repartidas en diferentes placas según el tratamiento.

Distinguimos dos grupos:

El **primer grupo**, donde los trozos de fruta iban sin listeria, han sido distribuidos en 3 tipos de placas:

- Trozos de fruta sin ningún tipo de recubrimiento ni tratamiento
- Trozos de fruta, con el recubrimiento A
- Trozos de fruta, con el recubrimiento B

Para los recubrimientos los trozos se sumergen (Figura 8) en sus respectivos tratamientos (quitosan y quitosan+EDTA) y se depositan en las placas para ponerlos en la campana extractora y así proceder a su secado durante 30 min. (Figura 9)

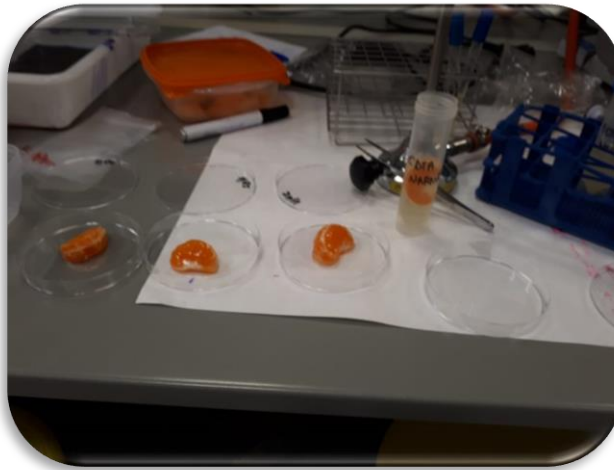


Figura 8: Aplicación de los recubrimientos

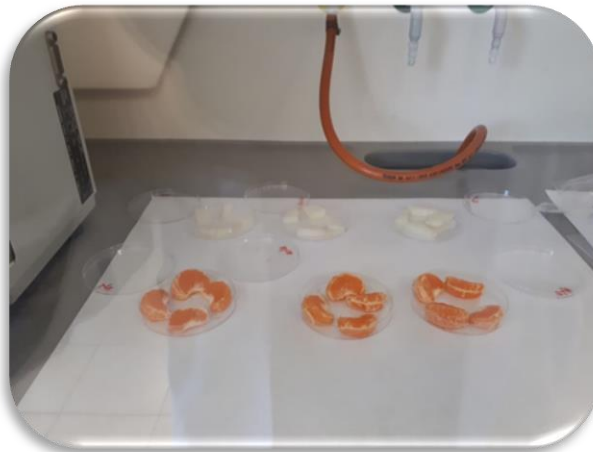


Figura 9: Secado en campana

Una vez sacadas de la campana, los trozos de fruta fueron depositados en bolsas de plástico y llevados a la cámara fría.

En el **segundo grupo**, los trozos de fruta se inocularon con 100 μ l de *Listeria innocua* (Figura 10) y se llevaron a secar 30 min a la campana. Una vez terminado este tiempo, se procedió a:

- Introducir el trozo de fruta con listeria en la bolsa de plástico y llevarlo a la cámara fría.

- Otro grupo de trozos de fruta con listeria se sumergieron en el tratamiento A y fueron llevados a la campana extractora 30 min para su secado.
- El último grupo, se introdujo en el tratamiento B y fue igualmente llevado a la campana extractora para su posterior secado.

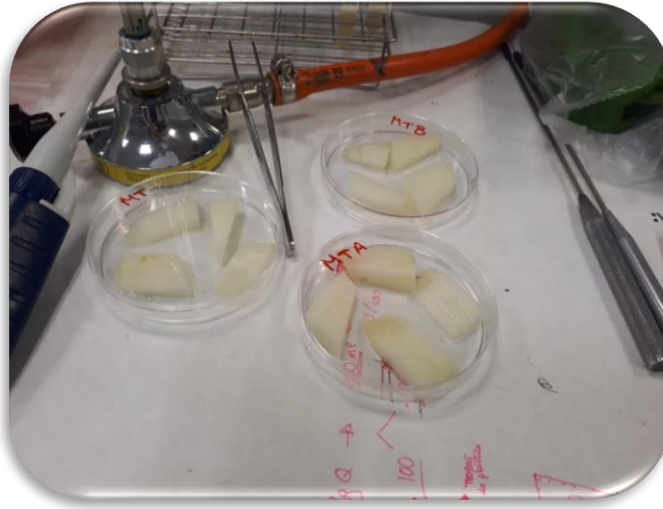


Figura 10: Inoculación de *Listeria*

Una vez sacados de la campana, se introdujeron en bolsas de plástico (Figura 11) y fueron llevados a la cámara fría junto a las demás bolsas.

Este procedimiento se realiza igual tanto para el melón como para la naranja.



Figura 11: Trozos de frutas envasados

3.3 Siembra del alimento

Los recuentos mediante siembras en placa se realizaron en los días 0, 2, 5 y 7. Se tendrá en cuenta los resultados de los días anteriores para ver el número de diluciones a realizar.

Para ello, cogeremos las bolsas donde están introducidas las frutas y le añadiremos 20 ml de solución salina. Seguidamente, serán masajeadas para homogeneizar la muestra. De aquí se extraen 100 μ l que depositaremos, en condiciones de esterilidad, sobre los medios de las placas o en caso de tener que realizar diluciones en los correspondientes eppendorfs para su posterior depositado en placa. Una vez realizado esto, se procede a extender de manera circular, con el asa de siembra, la muestra para que quede uniformemente repartida (Figura 12).

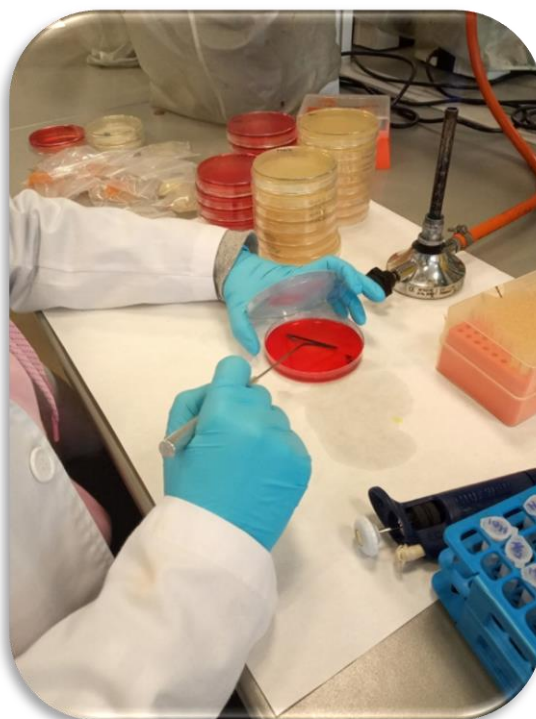


Figura 12: Siembra en placa

Por último, las placas se guardarán en la estufa a 37°C para su posterior recuento. El ensayo se realiza por duplicado tanto en el medio TSA como en el medio PALCAM

3.4 Recuento y cálculo de las UFC/g

A las 24h se realiza el recuento de las placas en los días especificados anteriormente para ver el crecimiento bacteriano. Para este recuento, se utilizarán las diluciones de las placas que contengan entre 20-200 colonias.

La fórmula utilizada será:

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{10^{-(n^{\circ} \text{ dilución})}} \times 10 \times 10$$

Dónde:

Nº colonias: recuento específico de la placa

Nº de dilución: indica el número de placa

En el medio TSA se hará un recuento de todos los microorganismos que crezcan y en el medio PALCAM se hará lectura de las colonias de color negro correspondientes a listerias.

4. RESULTADOS

4.1 Efectos de los recubrimientos ensayados sobre el melón

Los ensayos se realizaron con las muestras de melón troceadas a igual tamaño, solas e inoculadas con *Listeria innocua*. Una vez inoculadas con la bacteria y aplicados los recubrimientos e incubadas las muestras a 4°C, se realizaron los ensayos para obtener los recuentos en unidades formadoras de colonias por gramo de alimento (UFC/g) a los tiempos 0, 2, 5 y 7 días.

4.1.1. Resultados obtenidos en el Día 0

En la siguiente tabla (tabla 6) se pueden observar las UFC obtenidas en los ensayos de las muestras de melón sin inocular, tratadas con *L. innocua* y recubiertas con los dos tipos de recubrimientos utilizados en el ensayo.

Tabla 6: Recuentos en UFC/g en las muestras de melón a tiempo 0

	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
T=0h	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
MELÓN	4×10^5	0	$1,6 \times 10^4$	0	$1,7 \times 10^4$	0
MELÓN + <i>Listeria</i>	$4,7 \times 10^8$	3×10^7	2×10^6	2×10^6	$7,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$

En el tiempo cero, en las muestras control (muestras sin recubrimiento), se observó un crecimiento en el medio TSA, medio general para el crecimiento de microorganismos, en torno a las 5 unidades logarítmicas, mientras que no se detectó ninguna bacteria en el medio PALCAM, medio selectivo para detección de listerias.

Cuando las muestras fueron tratadas con el tratamiento A (elaborado sólo con quitosan), los recuentos bajaron una unidad logarítmica en el medio TSA, de 5 a 4, y tampoco se detectó crecimiento en el medio PALCAM. Con el tratamiento B (elaborado con quitosan + EDTA), ocurrió exactamente lo mismo.

Al inocular la muestra de melón con la bacteria control *L. innocua*, en el medio TSA, el número de colonias aumentó hasta 10^8 UFC, y en PALCAM, se detectaron hasta 10^7 UFC.

Cuando los trozos de melón fueron recubiertos con el tratamiento A, el número de bacterias formadoras de colonias disminuyó 2 unidades logarítmicas, de 10^8 a 10^6 en el medio general TSA mientras que en PALCAM se observó una disminución de sólo una unidad logarítmica. En el caso de las muestras recubiertas con el tratamiento B, se observó una reducción de dos unidades logarítmicas en los dos medios de cultivo ensayados. (Figura 13).

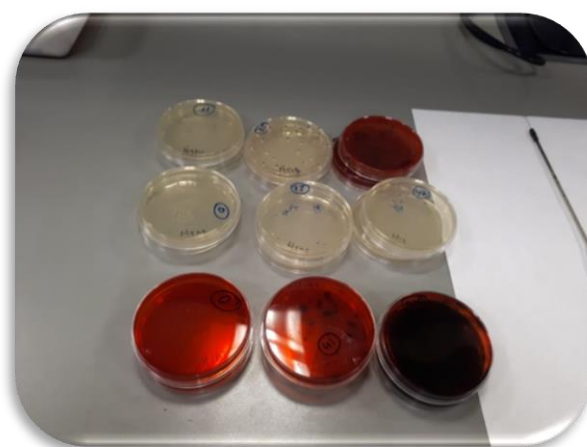


Figura 13: Lectura de resultados en muestras de melón el día cero

4.1.2. Resultados obtenidos en el Día 2

En la siguiente tabla (tabla 7) podemos observar los resultados obtenidos en el segundo día de incubación.

Tabla 7: Recuentos en UFC/g en muestras de melón al segundo día de incubación

T=2d	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
MELÓN	$3,1 \times 10^7$	0	$1,5 \times 10^6$	0	$1,5 \times 10^6$	0
MELÓN + LISTERIA	3×10^9	$1,31 \times 10^9$	$1,52 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	3×10^8	$1,7 \times 10^6$

Los recuentos del segundo día, en el medio TSA, llegaron a $3,1 \times 10^7$ UFC, mientras que en el medio PALCAM no se detectó ninguna bacteria.

En las muestras inoculadas con *L. innocua*, se detectó un aumento con respecto al día cero, en TSA pasó de 10^8 UFC a 10^9 UFC, mientras que en PALCAM subió dos unidades logarítmicas.

En las muestras no tratadas y recubiertas con el tratamiento A, en el medio TSA el número de bacterias formadoras de colonias bajo de 10^7 a 10^6 , tampoco se detectó bacterias en PALCAM. El tratamiento B actuó de la misma manera disminuyendo en una unidad logarítmica las UFC.

En las muestras inoculadas con *L. innocua* y recubiertas con el tratamiento A, las UFC pasaron de 10^9 a 10^8 en el medio TSA, mientras que en PALCAM disminuyeron dos unidades logarítmicas. El tratamiento B actuó de forma parecida en TSA ya que disminuyeron las UFC de la misma manera mientras que en el medio PALCAM, el recuento disminuyó hasta 3 unidades logarítmicas.

4.1.3. Resultados obtenidos en el Día 5

En la tabla 8 se muestran los resultados de los recuentos obtenidos al quinto día de incubación.

Tabla 8: Recuentos en UFC/g en muestras de melón en el quinto día de incubación

T=5d	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
MELÓN	$3,02 \times 10^{10}$	0	$1,65 \times 10^{10}$	0	$9,3 \times 10^9$	0
MELÓN + LISTERIA	$1,6 \times 10^{11}$	$1,24 \times 10^{10}$	$3,42 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^9$	$2,96 \times 10^{10}$	$1,19 \times 10^9$

Los recuentos en el día 5 en la muestra control fueron en el medio TSA de $3,02 \times 10^{10}$, mientras que en PALCAM no se detectó ninguna bacteria.

En las muestras de melón recubiertas con el tratamiento A, en el medio TSA se mantuvieron los recuentos igual que en el control, por lo tanto este recubrimiento no disminuyó las UFC en el día 5, y en PALCAM no hubo crecimiento bacteriano. Con el tratamiento B, las UFC disminuyeron una unidad logarítmica en TSA y tampoco hubo crecimiento en el medio PALCAM. Podemos decir que el recubrimiento B fue algo más efectivo que el A.

En las muestras de melón inoculadas con la bacteria control *L. innocua*, en TSA el número de bacterias formadoras de colonias fue de $1,6 \times 10^{11}$ y en PALCAM $1,24 \times 10^{10}$.

En la fruta con recubrimiento, las UFC disminuyeron de la misma manera tanto con el tratamiento A, como con el tratamiento B. En TSA, bajó una unidad logarítmica y en PALCAM, dos. Por tanto, los dos tratamientos en este caso han actuado igual.

4.1.4. Resultados obtenidos en el Día 7

En la siguiente tabla (tabla 9) podemos ver los resultados obtenidos en el último día de incubación, a los 7 días de ensayo.

Tabla 9: Recuentos en UFC/g en muestras de melón al séptimo día de incubación

T=7d	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
MELÓN	$1,6 \times 10^{10}$	0	2×10^9	0	$4,9 \times 10^9$	0
MELÓN + LISTERIA	$1,8 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	5×10^9	3×10^{10}	$1,5 \times 10^9$

El último día de ensayo, los recuentos en la muestra control de melón se mantienen como el resto de los días en torno a 10^{10} UFC, mientras que en el medio PALCAM seguimos teniendo crecimiento cero.

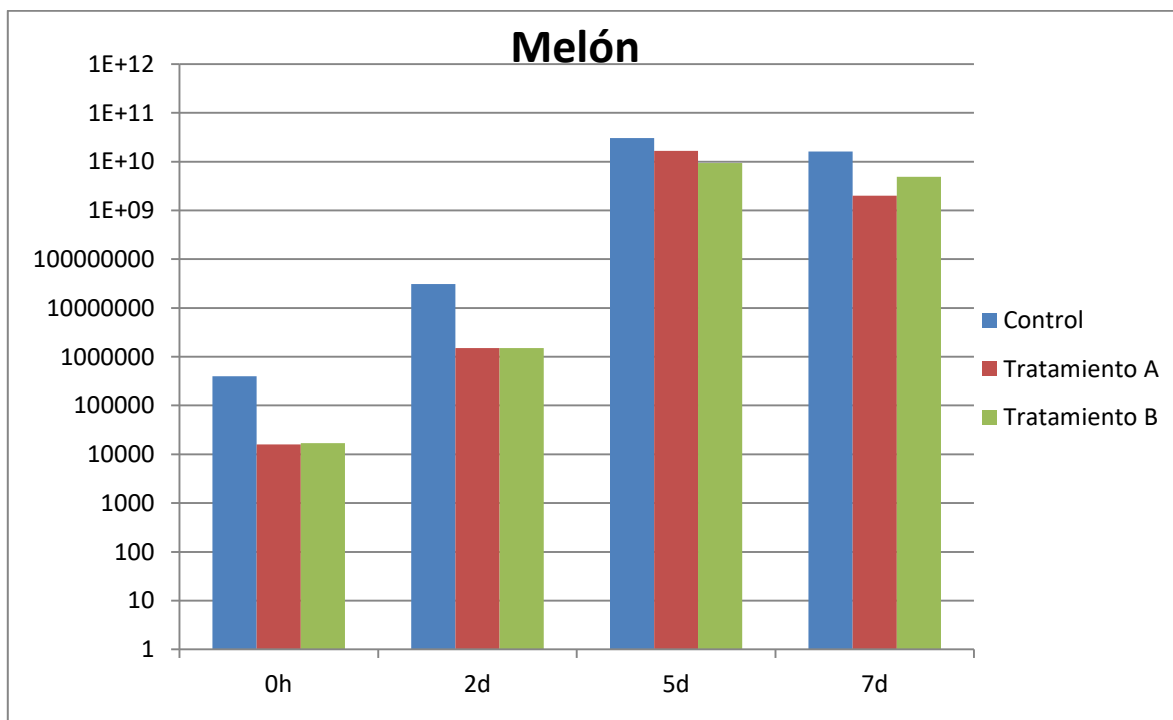
Tanto con el tratamiento A como con el tratamiento B, las UFC han disminuido una unidad logarítmica de 10^{10} a 10^9 .

En las muestras control de melón inoculadas con *L. innocua*, en TSA también seguimos obteniendo unas 11 unidades logarítmicas mientras que en PALCAM tenemos 10 UFC.

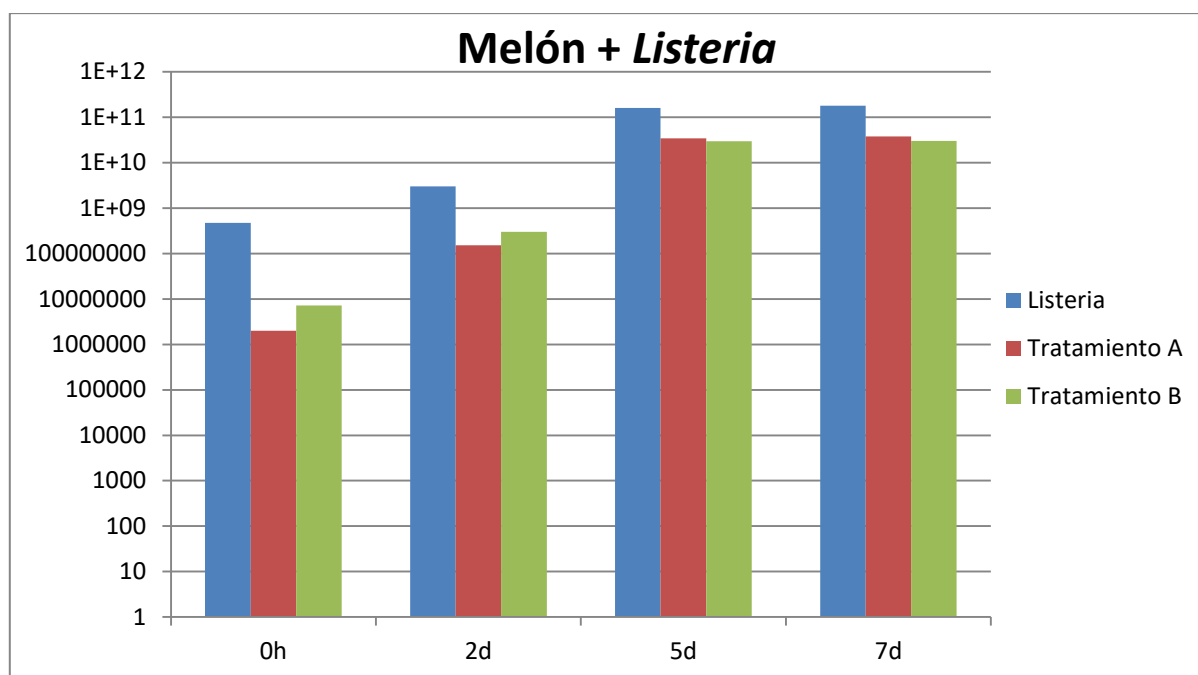
Tanto con el recubrimiento A como con el recubrimiento B, los recuentos en el medio TSA, disminuyen una unidad logarítmica y en el medio PALCAM igual. Por tanto, los dos tratamientos actúan igual.

Si representamos los resultados en TSA obtenidos gráficamente, en las gráficas 1 y 2, podemos ver que en las muestras control y tratadas el crecimiento bacteriano es

progresivo hasta el día 5 y se mantiene a los 7 días de incubación. Respecto a las muestras recubiertas, tanto con tratamiento A como el tratamiento B, los recubrimientos son algo efectivos, ya que ambos reducen las unidades formadoras de colonias. Los dos actúan de manera similar, tan sólo se aprecia una mayor efectividad en el tratamiento B al quinto día de incubación.



Gráfica 1: Efecto de los recubrimientos sobre las muestras de melón



Gráfica 2: Efecto de los recubrimientos sobre las muestras de melón inoculadas con *L.innocua*

4.2. Efectos de los recubrimientos sobre la naranja

Las muestras de naranjas cortadas en gajos se inocularon con la bacteria control *L. innocua* y se recubrieron con los dos tipos de tratamientos para realizar los ensayos a lo largo de una semana almacenadas a 4°C.

4.2.1. Resultados obtenidos en el Día 0

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en el tiempo de inicio del ensayo.

Tabla 10: Recuentos en UFC/g en las muestras de naranja a tiempo 0

	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
T=0h	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
NARANJA	3x10 ³	0	1x10 ²	0	5x10 ³	0
NARANJA + LISTERIA	1,5x10 ⁸	2,3x10 ⁶	1,1x10 ⁵	2,68x10 ⁵	3,5x10 ⁶	2,32x10 ⁵

En el tiempo cero, en las muestras de naranja en el medio TSA se obtuvo un recuento en torno a 3 unidades logarítmicas, mientras que no se detectó presencia de listerias en el medio PALCAM.

Cuando las muestras fueron recubiertas con un tratamiento A, los recuentos bajaron una unidad logarítmica, de 3 a 2, y tampoco se detectó bacteria alguna en PALCAM. Con el tratamiento B, las UFC se mantuvieron igual.

Al inocular los gajos de de naranja con la bacteria control *L. innocua*, en TSA, el número de colonias aumentó hasta 10^8 y en PALCAM, aumentó hasta 10^6 UFC.

Cuando lo tratamos con el tratamiento A, el número de bacterias formadoras de colonias disminuyó 3 unidades logarítmicas, de 10^8 a 10^5 , en PALCAM disminuyó una unidad logarítmica. Lo mismo ocurrió con el tratamiento B, por tanto los dos tratamientos en el día cero actuaron de forma similar.

4.2.2. Resultados obtenidos en el Día 2

Los resultados obtenidos el segundo día de ensayo se pueden ver en la tabla 11:

Tabla 11: Recuentos en UFC/g en muestras de naranja en el día 2 de incubación

	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
T=2d	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
NARANJA	$5,4 \times 10^3$	0	2×10^2	0	$1,2 \times 10^4$	0
NARANJA + LISTERIA	$1,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$	6×10^5	6×10^5	$1,7 \times 10^5$

En el día dos, en las muestras de naranja sin recubrir, en el medio TSA se observaron $5,4 \times 10^3$ unidades formadoras de colonias, mientras que no se detectó ninguna listeria en el medio PALCAM.

Cuando las naranjas fueron recubiertas con el tratamiento A, los recuentos bajaron una unidad logarítmica, de 3 a 2, y tampoco se detectó crecimiento en PALCAM. Con el tratamiento B, sin embargo aumentó una unidad logarítmica. Por tanto, el tratamiento A fue más eficaz.

En la muestra de naranja con la bacteria control, *L. innocua*, en TSA, el número de colonias aumentó hasta 10^7 y en PALCAM, de detectaron hasta 10^6 UFC.

Al recubrir la fruta, con el tratamiento A, el número de bacterias formadoras de colonias disminuyó 2 unidades logarítmicas, de 10^7 a 10^5 , en PALCAM disminuyó una unidad logarítmica. Lo mismo ocurrió con el tratamiento B, por tanto los dos tratamientos en el día dos actuaron de la misma manera.

4.2.3. Resultados obtenidos en el Día 5

En la siguiente tabla (tabla 12) podemos ver los resultados obtenidos en el recuento del día 5

Tabla 12: Recuentos en UFC/g en muestras de naranja en el quinto día de incubación

	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
T=5d	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
NARANJA	$1,8 \times 10^7$	0	1×10^3	0	$1,1 \times 10^5$	0
NARANJA + LISTERIA	$1,22 \times 10^9$	$2,85 \times 10^7$	$2,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	5×10^6	$1,3 \times 10^5$

El recuento en las muestras de naranja sin tratar ni recubiertas fue creciendo hasta $1,8 \times 10^7$ UFC, y cómo en el resto de los ensayos no se detectaron listerias.

Cuando las naranjas iban recubiertas, en el caso del tratamiento o recubrimiento A, los recuentos bajaron 4 unidades logarítmicas, de 7 a 3, y con el recubrimiento B bajaron dos unidades logarítmicas.

En la muestra de naranja con la bacteria control, en TSA, el número de colonias aumentó hasta 10^9 y en PALCAM, aumentó hasta 10^7 UFC.

Al tratar la fruta con el recubrimiento A, el número de bacterias formadoras de colonias disminuyó 3 unidades logarítmicas, de 10^9 a 10^6 , en PALCAM disminuyó dos unidades logarítmicas. Lo mismo ocurrió con el tratamiento B, por tanto los dos tratamientos en el día dos actuaron de la misma manera (Figura 14)

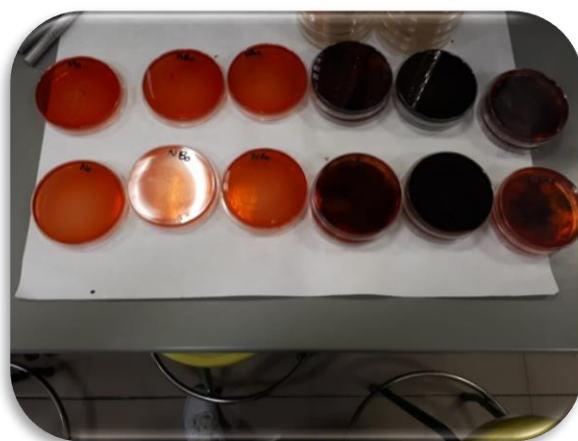


Figura 14: Resultados en medio PALCAM el día 5

4.2.4. Resultados obtenidos en el Día 7

Los recuentos obtenidos el último día de ensayo se muestran en la tabla 13:

Tabla 13: Recuentos en UFC/g en muestras de naranja en el último día de incubación

	CONTROL		Tratamiento A		Tratamiento B	
T=7d	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM	TSA	PALCAM
NARANJA	$1,05 \times 10^8$	0	$1,3 \times 10^3$	0	$2,57 \times 10^5$	0
NARANJA + LISTERIA	3×10^9	3×10^8	8×10^6	9×10^3	3×10^6	$2,08 \times 10^5$

En el día 7, los recuentos en las muestras de naranja ascendieron en el medio TSA hasta 8 unidades logarítmicas, mientras que no se detectó crecimiento en el medio PALCAM.

Al ser recubiertas con el tratamiento A, los recuentos bajaron 5 unidades logarítmicas, de 10^8 a 10^3 , sin detectarse listerias. Con el tratamiento B, sin embargo bajó el recuento en sólo tres unidades logarítmicas.

En la muestra de naranja con la bacteria control, en TSA, el número de colonias aumentó hasta 10^9 y en PALCAM, aumentó hasta 10^8 UFC.

Al recubrir los gajos con el tratamiento A, el número de bacterias formadoras de colonias disminuyó 3 unidades logarítmicas, de 10^9 a 10^6 y en PALCAM disminuyó

cinco unidades logarítmicas. En el tratamiento B, en TSA ocurrió lo mismo que en el tratamiento A, bajó el número de colonias 3 unidades logarítmicas pero en el medio PALCAM para detección de listerias, sólo disminuyó en 3UFC (Figura 15).

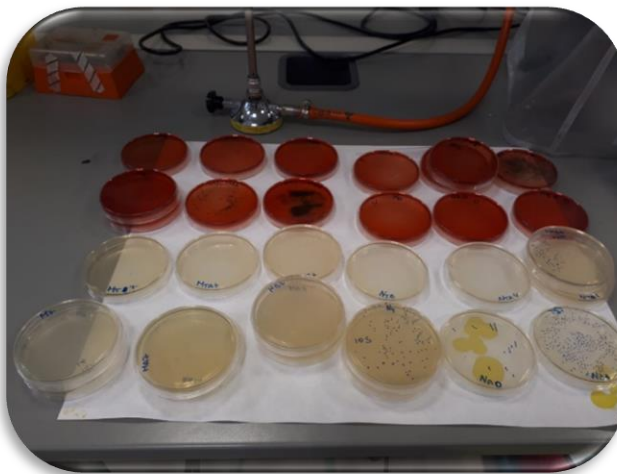
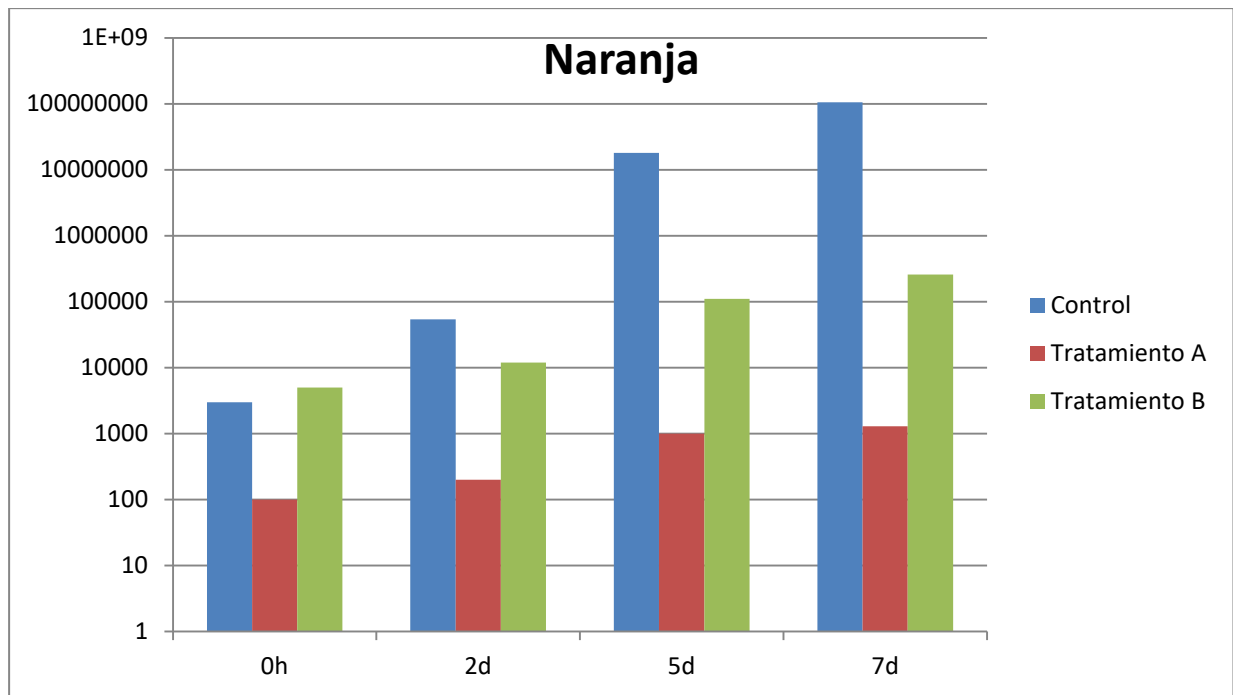
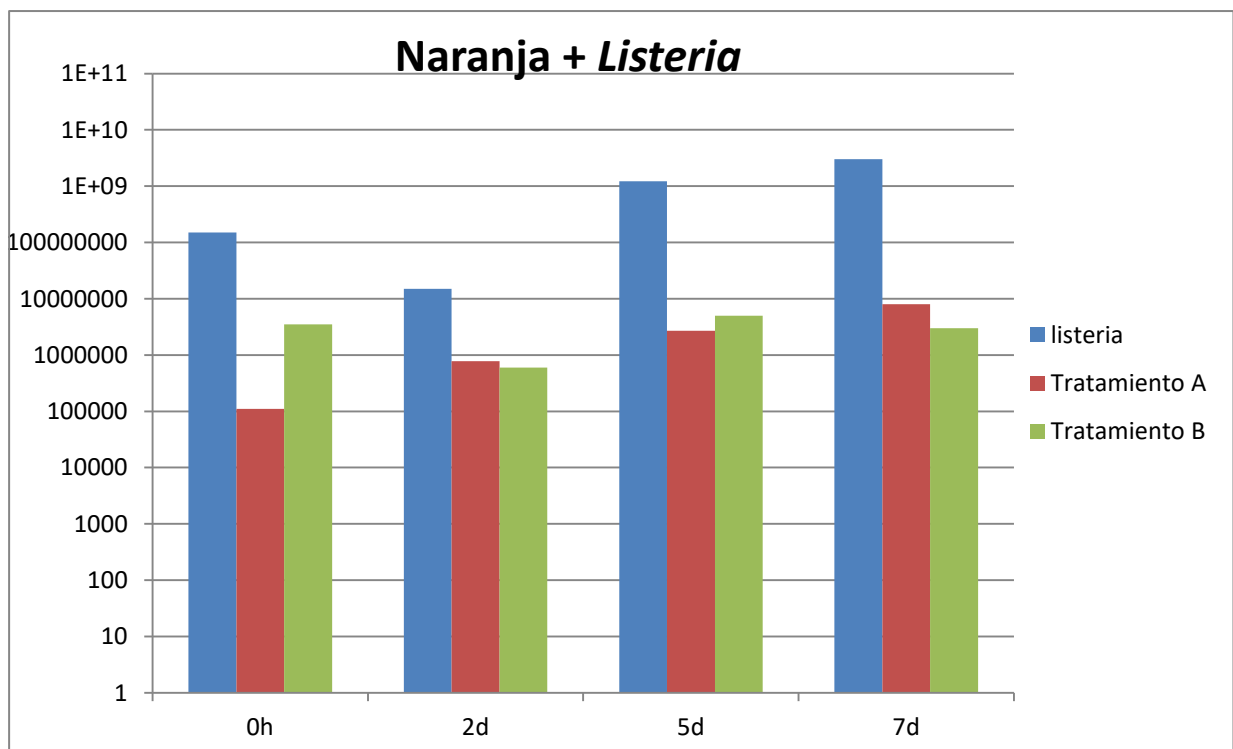


Figura 15: Resultados obtenidos el día 7

Si representamos gráficamente los resultados de todo el ensayo (gráficas 3 y 4) podemos decir que en las muestras de naranja, los dos tratamientos, A y B, son efectivos ya que bajan los recuentos. Sin embargo, el tratamiento A parece ser más efectivo que el tratamiento B, ya que disminuye más unidades logarítmicas.



Gráfica 3: efectos recubrimientos naranja control



Gráfica 4: efectos recubrimientos naranja inoculada

5. DISCUSIÓN

Los datos científicos relacionados con *L. monocytogenes* en frutas crudas son extremadamente limitados. En enero de 1997, y en 1999 Brackett, se describieron dos estudios sobre la viabilidad de la listeria en suero y zumo de naranja. La cáscara de la fruta es una protección contra los microorganismos; una vez que se rompe esta barrera (rebanadas, heridas) la pulpa puede contaminarse y permitir el crecimiento de microorganismos. Los estudios de crecimiento de *L. monocytogenes* en frutas con bajo contenido de ácido son casi inexistentes.

Parish y Higgins (1989) informaron de la supervivencia de *L. monocytogenes* en suero naranja estéril en el que el pH se ajustó de 3,6 a 5,0. Para un inóculo inicial de 10⁶ UFC / ml, se recuperó > 25 UFC / ml después de 90 días a pH 4.8 y 5.0 con incubación a 4 °C. Al final de la incubación de 7 días a 30 °C, no se recuperaron células viables a estos niveles de pH. Sin embargo, el crecimiento fue evidente en suero naranja a pH 4.8 y 5.0 a 30 °C, así como a pH 5.0 a 4 °C. En nuestro trabajo hemos podido comprobar también que la listeria inoculada iba creciendo en las piezas de naranja al aumentar los días de incubación

Beuchat y Brackett (1991) estudiaron las tasas de crecimiento y muerte de *L. monocytogenes* inoculados en tomates crudos enteros y tomates picados. El crecimiento del agente patógeno ocurrió en tomates enteros mantenidos a 21 °C pero no a 10 °C, mientras que la tasa de mortalidad en tomates cortados fue mayor que 21 °C en comparación con 10 °C, durante un período de 8 días. Pao et al. (1998) estudiaron la supervivencia y el crecimiento de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en naranja de Hamlin pelada, con un pH promedio de 6.0 a 6.5 en la superficie y 3.8 en el jugo. Se observó crecimiento con todos los patógenos probados solo a la temperatura de almacenamiento abusiva (24 °C), con *L. monocytogenes* aumentando aproximadamente 1,5 unidades logarítmicas después de 1 día de incubación. La refrigeración (4 u 8 °C) inhibió eficazmente el crecimiento de todos los patógenos y causó la reducción de la población de *Salmonella* spp. y *S. aureus* al final del almacenamiento durante 14 días. Conway et al. (2000) informaron el crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas de manzana incubadas a 5, 10 y 20 °C. Se observó un

aumento de 1 log en la población bacteriana a 20 °C después de 7 días, mientras que a 5 °C el microorganismo sobrevivió más de 12 días.

Ukuku y Fett (2002) estudiaron el comportamiento de *L. monocytogenes* inoculados en superficies de melón y la eficacia de los tratamientos de lavado para reducir la transferencia de la corteza a las piezas recién cortadas. La inoculación directa de *L. monocytogenes* en piezas recién cortadas mostró supervivencia, pero no el crecimiento del microorganismo durante el almacenamiento durante 15 días a 4 °C. El crecimiento fue evidente después de 4 h de almacenamiento a 8 y 20 °C. En nuestro caso en las piezas de melón se observó un crecimiento progresivo de listeria hasta los 5 días de incubación, manteniéndose el recuento hasta el día 7

Si tenemos en cuenta estos estudios y el pH de los alimentos utilizados, nuestros resultados reflejan que en la naranja que es un fruto cítrico el crecimiento de *Listeria innocua* ha sido menor que en el melón.

Además se observa como en nuestro ensayo conforme han pasado los días, las UFC de *Listeria* han ido aumentando de 2 a 3 unidades logarítmicas, corroborando así los estudios anteriores.

Respecto a los recubrimientos con quitosano según Kucukgulmez et al., 2011, ofrecen un amplio potencial para poder ser aplicado a la industria alimentaria debido a sus propiedades y también a su interés como conservante de muchos alimentos (Aider, 2010). Según Ziani et al., 2009 retrasa el crecimiento de bacterias, dato que en parte hemos confirmado en este estudio, dónde se refleja cómo ha disminuido el crecimiento de *L. innocua* en las muestras tratadas, siendo más efectivo el recubrimiento en la naranja que en el melón

Según Atares et al., 2010, el quitosano puede ser utilizado en conjunto con otros compuestos como es el caso de una mezcla con almidones, proteínas y lípidos, donde han demostrado poseer las características deseables para los productos frescos: buenas propiedades de barrera, insípidos y transparentes. En nuestro caso hemos podido comprobar que al mezclar el quitosano con EDTA un potente antimicrobiano y de cuya mezcla no se conocen muchos estudios, en el caso del melón los resultados son similares para los dos recubrimientos, mientras que en el caso de la naranja el quitosano es más efectivo sólo.

Ya que se ha descrito también otro tipo de combinaciones del quitosan cómo son los aceites esenciales de diferentes orígenes, como es el caso del aceite de bergamota, canela, vainilla, rosas, cítricos como el limón, mandarina y naranja, entre otros (Rico et al., 2012), viendo los resultados del presente trabajo se podría pensar en combinar el quitosan y EDTA con estos aceites para aumentar así la actividad antimicrobiana en los recubrimientos y poder asegurar la vida útil y la no patogenicidad de estas frutas durante su periodo de conservación.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos decir que:

1. Los recubrimientos alimentarios pueden ser una buena técnica para la conservación de frutas frente a la contaminación por *L. innocua*.
2. El tipo de recubrimiento necesario va a ser diferente dependiendo del tipo de alimento, de su pH o de su cantidad de agua.
3. Los recubrimientos con quitosano son más efectivos en gajos de naranja que en trozos de melón.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdollahi, M.; Rezaei, M.; Farzi, G. (2012): Improvement of active chitosan film properties with Rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (4), 847–853.

Aider, M. (2010): Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. *Food science and technology*, 43, 837 – 842.

Atarés, L.; Bonilla, J.; chiralt, A. (2010): Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100 (4), 678–687.

Avena-Bustillos,R.; Krochta,J.; Salveit, E. (1997): Water vapour resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride films. *Journal of Food Science*, 62, 351–354.

Badawy, M.E.; Rabea, E. (2011): A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1–29.

Baldwin, E. A.; Nisperos, M. O.; Baker, R. A. (1995): Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 509–552.

Banks, N. H. (1984): Some effects of TAL Pro-long coating on ripening bananas. *Journal of Experimental Botany*, 35, 127–137.

Barbosa-Cánovas, G.; Olivas, G.I. (2009): *Edible Films and Coatings for Food Applications*. 211–238. New York: Springer.

Bautista-Baños, S.; Hernández-Lauzardo, A.N.; Velázquez-del Valle, M.G.; Hernández-López, M.; Ait Barka, E.; Bosquez-Molina, E.; Wilson, C.L. (2006): Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25 (2).

Ben-Yehoshua, S. (1969): Gas exchange, transportation, and the commercial deterioration in storage of orange fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 94, 524–528.

Beuchat, L.B.; Brackett, R.E. (1991): Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (5), 1367 – 1371.

Bourtoom, T., (2008): Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15, 237–248.

Bouwmeester, H.; Dekkers, S.; Noordam, M.; Hagens, W.; Bulder, A.; De Heer, C.; Ten Voorde, S.; Wijnhoven, S.; Marvin, H.; Sips, A. (2007): Review of health safety aspects of nanotechnology in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 53, 52–62.

Brackett, R.E., (1999): *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in products of plant origin*. In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 631–655. New York: Marcel Dekker.

Chu, C. L. (1986): Post storage application of TAL pro-long on apples from controlled atmosphere storage. *Horticultural Science*, 21, 267–268.

Cisneros-Zevallos, L.; Krochta, J.M. (2003): Viscosity of coating solution applied to fruits and vegetables by dipping method. *Journal of Food Science*, 68, 503–509.

Cisneros-Zevallos, L.; Krochta, J. M. (2003): Dependence of coating thickness on viscosity of coating solution applied to fruits and vegetables by dipping method. *Journal of Food Science*, 68, 503–510.

Conway, W.S.; Leverentz, B.; Saftner, R.A.; Janisiewicz, W.J.; Sams, C.E.; Leblanc, E., (2000): Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease*, 84 (2), 177 – 181.

Davey, M.E.; O'Toole, G.A. (2000): Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847–867.

de-Azevedo, H. M. C. (2012): *Edible coatings*. In S. Rodrigues, & F. A. N. Fernandes (Eds.), *Advances in fruit processing technologies*. 345–361. FL: CRC Press.

Decher, G. (2003): *Polyelectrolyte multilayers, an overview*. In: *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*. 207–243.

Dhall, R. K. (2013): Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435–450.

Donlan, R.M. (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881–890.

Doores, S. (1993): *Organic acids*. In: Antimicrobials in Food. Davidson, P. M. and Branen, A. L., Eds. 95–136. New York: Marcel Dekker.

Doyle, M.P. (1990): Fruit and vegetable safety—microbiological considerations. *Horticultural Science*, 25 (12), 1478 – 1482.

Dunne, W.M. Jr (2002): Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 15, 155–166.

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

Eum, H.; Hwang, D.; Linke, M.; Lee, S.; Zude, M. (2009): Influence of edible coating on quality of plum (*Prunus salicina* Lindl.cv. “Sapphire”). *European Food Research and Technology*, 229, 3, 427–434.

Fain, A.R. (1996): A review of the microbiological safety of fresh salads. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 16 (3), 146 – 149.

Fishman, M. L.; Friedman, R. B.; Huang, S. J. (Eds.) (1994): *Polymers from agricultural coproducts*. In: ACS symposium series 575. Washington, DC: American Chemical Society.

García, M.A.; Pinott, A.; Martino, N.M.; Zaritzky, N.E. (2009): *Edible Films and Coatings for Food Applications*. 169–203. New York: Springer.

Guilbert, S.; Gontard, N. (1995): *Edible and biodegradable food packaging*. In: Foods and Packaging Materials—Chemical Interactions. Ackermann, P., Jagerstad, M. and Ohlsson, T., Eds. 159–168. London: The Royal Society of Chemistry.

Guilbert, S.; Gontard, N.; Gorris, L. G. M. (1996): Prolongation of the shelf life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Food Science and Technology*, 29, 10–17.

Guzey, D.; McClements, D. J. (2006): Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 227–248.

Hall, E.G; Scott, K.J. (1977): *Storage and Market Diseases of Fruit*. Melbourne: Commonwealth Scientific and Industrial Research.

Han, J. (2002): *Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents*. In: Protein-based Films and Coatings. 485–498. Gennadios, A., Ed. Boca Raton, FL: CRC Press

Howard, L. R.; Dewi, T. (1995): Sensory, microbiological and chemical quality of mini-peeled carrots as affected by edible coating treatment. *Journal of Food Science*, 60, 142–144.

Jagannath, J.H.; Nanjappa, C.; Das Gupta, D.K.; Bawa, A.S. (2003): Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 88, 64-71.

Jimenez, M.; García, H. S.; Beristain, C. I. (2004): Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *European Food Research and Technology*, 219, 588–592.

Karbowiak, T.; Debeaufort, F.; Voilley, A. (2007): Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloid*, 21, 879–888.

Kim, K.W.; Ko, C.J.; Park, H.J. (2002): Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *Journal of Food Science*, 67, 218–222.

Kucukgulmez, A.; Celik, M.; Yanar, Y.; Sen, D.; Polat, H.; Kadak, A.E (2011): Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126 (3), 1144–1148.

Lau, O. L.; Meheriuk, M. (1994): The effect of edible coatings on storage quality of 'McIntosh', 'Delicious' and 'Spartan' apples'. *Canadian Journal of Plant Science*. 74, 847–852.

Lin,D.; Zhao,Y. (2007): Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 60–71.

López, O.V.; García, M.A.; Zaritzky, N.E. (2008): Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73, 573–581.

Lopez-Rubio, A.; Gavara, R.; Lagaron, J. M. (2006): Bioactive packaging: Turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 567–575.

Lowing, P.H.; Cutts, D.F. (1982): The preservation of fresh fruits and vegetables. *Proceedings of the International Institute of the Food Science and Technology Annual Symposium*. 52–54.

Maqbool, M.; Ali, A.; Ramanchandran, S.; Smith, D.; Alderson, P. (2010): Control of Postharvest Anthracnose of Banana Using a New Edible Composite Coating. *Crop Protection*, 1136–1141.

McClements, D. J.; Decker, E. A.; Weiss, J. (2005): *Novel procedure for creating nano-laminated edible films and coatings*. 05-27. University of Massachusetts: U.S. Patent Application.

McHugh, T. H.; Senesi, E. (2000): Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 65, 480–485.

Miller, W. R.; Spalding, D. L.; Risse, L. A. (1983): Decay firmness and color development of Florida bell peppers dipped in chlorine and imazalil and film wrapped. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 96, 347–350.

Nisperos-Carriedo, M. O.; Baldwin, E. A.; Shaw, P. E. (1992): Development of an edible coating for extending postharvest life of selected fruits and vegetables. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 104, 122–125.

Nussinovitch, A. (2003): *Water Soluble Polymer Applications in Foods*. Oxford: Blackwell Science.

Parish, M.E.; Higgins, D.P. (1989): Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, 52 (3), 144 – 147.

Park, J. W.; Testin, R. F.; Vergano, P. J.; Park, H. J.; Weller, C. L. (1994): Fatty acid distribution and its effect on oxygen permeability in laminated edible films. *Journal of Food Science*, 61, 401–406.

Park, S.; Zhao, Y. (2004): Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1933–1939.

Pao, S.; Brown, E.; Schneider, K.R. (1998): Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *Journal of Food Science*, 63 (2), 359 – 362.

Parra, D.; Tadini, C.; Ponce, P.; Lugão, A (2004): Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, 58, 475 – 481.

Penteado, A. L.; Leitao, M. F. F. (2004): Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 89–94.

Regalado, C.; Pérez-Pérez, C.; Lara-Cortés, E.; García-Almendarez, B. (2006): *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. 2-18. Kerala: Research Signpost.

Rico, R.F.; Gutiérrez, C.C.; Díaz-Moreno, C. (2012): Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales en la calidad microbiológica de mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente procesado. *Vitae*, 19 (1), 117–119.

Ryall, A.L.; Pentzer, W.T. (1982): Handling, Transportation and Storage of Fruit and Vegetables. *Fruits and Tree Nuts*, 2.

Sánchez-González, L.; Pastor, C.; Vargas, M.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. (2011): Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60 (1), 57–63.

Santerre, C. R.; Leach, T. F.; Cash, J. N. (1989): The influence of the sucrose polyester, Semperfresh™, on the storage of Michigan grown 'McIntosh' and 'Golden Delicious' apples. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 293–305.

Silva-Weiss, A.I.; hl, M.; Sobral, P.J.A.; Gómez---Guillén, M.C.; Bifani, V. (2013): Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. *Journal of Food Engineering*, 5, 200–216.

Smith, S. M.; Stow, J. R. (1984): The potential of a sucrose ester coating material for improving the storage and shelf-life qualities of cox's orange pippin apples. *Annals of Applied Bioogy*, 104, 383–391.

Snowdon, A.L. (1991): *A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*. London: Vegetables, Wolfe Scientific.

Spittstoesser, D.F. (1987): *Fruits and fruit products*. In Food and Beverage Mycology. 28-101. New York: Van Nostrand Reinhold.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209.

Ukuku, D.O.; Fett, W. (2002): Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. *Journal of Food Protection*, 65 (6), 924–930.

Valencia-Chamorro, S.A.; Palou, L.; Del Río, M.A.; Pérez-Gago, M.B. (2011): Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 872–900.

Van Houdt, R.; Michiels, C.W. (2010): Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer Surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1117–1131.

Vargas, M.; Pastor, C.; Chiralt, A.; McClements, J.D.; González-Martínez, Ch. (2008): Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 496–511.

Wang,L.; Liu,L.; Holmes,J.; Kerry,J.F.; Kerry,J. (2007): Assesment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1128–1138.

Weiss, J.; Takhistov, P.; McClements, D. J. (2006): Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71, 107–116.

Ziani, K.; Fernández-Pan, I.; Royo, M.; Maté, J.I. (2009): Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2309–2314.