



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Tema:**

**Actividad antimicrobiana de Recubrimientos de Quitosano y  $\epsilon$ -Polilisina en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea***

---

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Trabajo de Titulación parte del Proyecto de investigación “Desarrollo de nuevas tecnologías de acondicionamiento postcosecha para berries”, aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1302-CP-U-P-2015. Coordinado por Ph.D. Sandra Horvitz.

**Autora:** María Samantha Cabezas Medina

**Tutora:** Ph.D. Sandra Susana Horvitz Szoichet

Ambato – Ecuador

Febrero – 2017

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Ph.D. Sandra Susana Horvitz Szoichet**

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 04 de enero del 2017



Ph.D. Sandra Susana Horvitz Szoichet

AAA483083

**TUTORA**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María Samantha Cabezas Medina, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



María Samantha Cabezas Medina

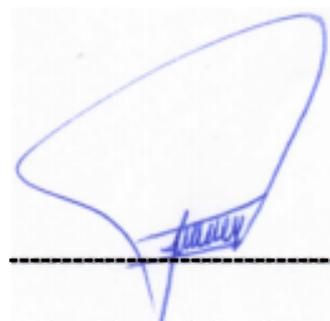
180334035-3

**AUTORA**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación “Actividad antimicrobiana de Recubrimientos de Quitosano y  $\epsilon$ -Polilisina en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*”, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

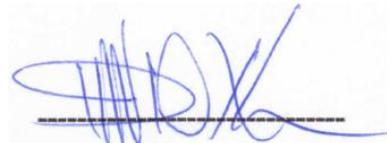


Presidente del Tribunal



Lic. Mg. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9



Lic. M.Sc. Paulo Santiago Baquero Icaza

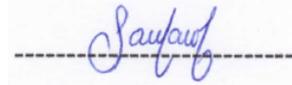
C.I. 180323354-1

Ambato, 16 de enero del 2017

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Proyecto de Investigación o parte de él, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



María Samantha Cabezas Medina

180334035-3

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

Más que un Trabajo de Titulación, ésta es la consolidación de sueños e ilusiones que no sólo han sido míos. Este trabajo es la cristalización de los deseos y anhelos de una madre abnegada y fuerte de quien fui su ancla en esta vida.

Ha llegado el momento de corresponder, en parte, aquel trabajo de tiempo completo que involucra el ser madre y es por esto que dedico mi amor, mi esfuerzo, mi tiempo y mis energías y las dejo plasmadas como testigo de la entrega incondicional de aquel ser que me enseñó a ser firme a pesar de lo difícil que resulte avanzar hacia una meta.

No ha sido nada fácil sin embargo, aquí está el resultado de enseñanzas relacionadas al sacrificio, responsabilidad y entrega de mis seres queridos. Aquí está el resultado del amor de mis padres, de mis hermanos y de mis pequeños sobrinos. Aquí está una pequeña proporción de mí, este es mi aporte a la investigación.

## AGRADECIMIENTOS

Soy creyente de un Dios amoroso que ha sido mi apoyo y fortaleza y sé que esta conquista no la he logrado sola. Reconozco que cada paso dado hasta aquí ha sido con su consentimiento sabiendo que mis metas se proyectan más allá de un título.

Agradezco a las doctoras Sandra Horvitz y Mirari Arancibia que, con su personalidad contrastante, encaminaron mi trabajo con paciencia, preocupación y dedicación y, entiendo que lo hicieron no sólo por cumplir con sus labores profesionales sino porque su interés común es aportar a la investigación y hacerlo bien.

Agradezco a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por la acogida y por compartir sus conocimientos en estos cinco años de educación superior. Me llevo el ejemplo de docentes de los que aprendí que ser profesional no sólo se vincula a un título habilitante sino, a cualidades éticas que vencen paradigmas de superioridad.

Gracias a mi familia por su ánimo y por confiar en mí. Gracias a mis padres por contribuir a mi proceso de madurez y ser la razón para plantearme nuevos retos y superarlos; gracias a Danilo, Diana y Mario por sus valiosos consejos y amor, por sus manifestaciones de cariño poco convencionales que sólo entre hermanos entendemos. Gracias a David, Juan José, Paula, Daniela y Odalis por su inocencia y ternura y por potenciar en mí el compromiso de ser su tía ejemplo. Gracias a mi fiel compañero y amigo Alex Bombón por alentarme durante los momentos más oscuros y tristes de estos últimos cinco años. Y gracias a todos quienes, con sus destellos, ayudaron a que no pierda mi luz ni mi objetivo.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1. Tema.....	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos .....	4

### CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos.....	5
2.2. Hipótesis.....	10
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis.....	10

### CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y Métodos.....	11
3.1.1. Materia prima.....	11
3.1.2. Envasado y almacenamiento.....	11
3.1.3. Reactivos.....	11
3.1.4. Preparación de los recubrimientos comestibles.....	12
3.1.5. Inoculación de patógenos.....	12
3.1.6. Recubrimiento de las moras.....	12

3.1.7.	Actividad antimicrobiana de los recubrimientos .....	12
3.1.8.	Medición de pH .....	13
3.2.	Diseño experimental.....	13
3.3.	Análisis estadísticos.....	13

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1.	Actividad antibacterial de los recubrimientos de quitosano y de $\epsilon$ -polilisina. 14
4.2.	Actividad antifúngica de los recubrimientos de quitosano y de $\epsilon$ -polilisina... 20
4.3.	Verificación de hipótesis..... 23

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1.	Conclusiones.....	24
5.2.	Recomendaciones.....	24
	Referencias bibliográficas.....	26
	Anexos.....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Estructura del quitosano.....	5
<i>Figura 2.</i> Envoltura celular de bacterias Gram-negativas .....	7
<i>Figura 3.</i> Pared celular y membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> .....	8
<i>Figura 4.</i> Estructura de la $\epsilon$ -polilisina.....	8
<i>Figura 5.</i> Localización del sector en el que se recolectaron las moras de Castilla (Universidad Técnica de Ambato – Campus Querochaca).....	34
<i>Figura 6.</i> Fruta recolectada.....	34
<i>Figura 7.</i> Envasado de la fruta.....	35
<i>Figura 8.</i> Activación y siembra de <i>E. coli</i> (ATCC 25922) y <i>S. enterica</i> (ATCC 9842).....	36
<i>Figura 9.</i> <i>B. cinerea</i> .....	36
<i>Figura 10.</i> Inoculación de <i>B. cinerea</i> .....	37
<i>Figura 11.</i> Distribución de los recubrimientos comestibles de quitosano y $\epsilon$ -polilisina.....	38
<i>Figura 12.</i> Colonias de <i>E. coli</i> en agar cromogénico.....	38
<i>Figura 13.</i> Colonias de <i>E. coli</i> en caldo MacConkey con agar.....	39
<i>Figura 14.</i> Colonias de <i>S. enterica</i> en agar SS .....	39
<i>Figura 15.</i> Medición de pH.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Recuentos de <i>E. coli</i> en muestras de mora control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y $\epsilon$ -polilisina, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1$ °C .....	14
<i>Tabla 2.</i> Recuentos de <i>S. enterica</i> en muestras de mora control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y $\epsilon$ -polilisina, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1$ °C.....	16
<i>Tabla 3.</i> pH de moras de Castilla control y recubiertas con quitosano y con $\epsilon$ -polilisina durante 10 días de almacenamiento en refrigeración a $6 \pm 1$ °C.....	17
<i>Tabla 4.</i> <i>B. cinerea</i> en moras de Castilla control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y $\epsilon$ -polilisina, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1$ °C .....	20

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue estudiar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina en moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ( $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup>) y *Botrytis cinerea* ( $10^3$  conidios·ml<sup>-1</sup>). Las moras inoculadas fueron almacenadas a  $6 \pm 1$  °C durante 10 días y los análisis microbiológicos se realizaron cada 2 días. La máxima inhibición en el crecimiento de *E. coli* con los recubrimientos de quitosano fue de 3,22 log ufc·g<sup>-1</sup> y en *S. enterica* fue de 3,24 log ufc·g<sup>-1</sup> en los diez días de evaluación mientras que el crecimiento de *B. cinerea* fue inhibido en el día 8. Asimismo, el recubrimiento de  $\epsilon$ -polilisina inhibió el crecimiento de *S. enterica* durante los diez días y, en los días 8 y 10, redujo la proliferación de *E. coli* (2,88 y 3,22 log ufc·g<sup>-1</sup>, respectivamente) y de *B. cinerea*. El pH ácido de las moras de Castilla favoreció tanto la inhibición de las bacterias patógenas como el crecimiento del moho *B. cinerea*. Se concluyó que los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina poseen actividad antibacteriana y antifúngica y que esta actividad fue superior cuanto mayor fue el tiempo de exposición del recubrimiento con los microorganismos.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, recubrimientos, moras inoculadas

## ABSTRACT

The aim of this research was to study the antimicrobial activity of chitosan and  $\epsilon$ -polylysine coatings on blackberries (*Rubus glaucus* Benth) inoculated with *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ( $10^3$  cfu·g<sup>-1</sup>) and *Botrytis cinerea* ( $10^3$  conidias·ml<sup>-1</sup>). The inoculated blackberries were stored at  $6 \pm 1$  °C for 10 days and microbiological analyses were evaluated every two days. Maximum inhibition of *E. coli* growth with chitosan coating was 3,22 log cfu·g<sup>-1</sup> and *S. enterica* was 3,24 log cfu·g<sup>-1</sup> for ten days of evaluation while growth of *B. cinerea* was inhibited in day 8. Likewise,  $\epsilon$ -polylysine coating inhibited *S. enterica* growth during ten days and, on days 8 and 10, it reduced also the proliferation of *E. coli* (2,88 and 3,22 log cfu·g<sup>-1</sup>, respectively) and *B. cinerea*. Blackberries' acid pH enhanced both, pathogenic bacteria's inhibition and growth of the mold *B. cinerea*. From this work, it was concluded that chitosan and  $\epsilon$ -polylysine coatings have antibacterial and antifungal activity and that this activity was higher as the exposure time of the coating with the microorganisms was longer.

**Keywords:** Antimicrobial activity, coatings, inoculated blackberries

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador se calcula que la superficie plantada con mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) asciende a 5200 hectáreas y el 50 % de esta extensión se ubica en la provincia de Tungurahua (**Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [MAGAP], 2013**). La mora de Castilla es una fruta delicada y muy perecedera. Además, al ser no climatérica interrumpe su maduración de forma irreversible una vez que ha sido separada de la planta por lo que debe ser cosechada al alcanzar un estado apropiado de madurez, es decir, cuando presenta un color negro brillante, consistencia firme y un equilibrio entre ácidos y azúcares, determinado por la relación de acidez titulable y °Brix (**Ayala, Valenzuela y Bohórquez, 2013; Mañeru, 2014**). Estas características limitantes de la mora de Castilla inciden en las pérdidas post-cosecha que pueden llegar hasta un 30 % de la producción nacional (**Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [MAGAP], 2011**).

Otra característica de la mora de Castilla es que carece de una estructura que la proteja de daños mecánicos durante su recolección, manejo post-cosecha y comercialización. Así, las lesiones físicas aceleran el deterioro de la mora mientras que, su alto contenido de azúcares favorece la proliferación de *Botrytis cinerea* que penetra el tejido vegetal a través de heridas o aberturas naturales para finalmente diseminarse, colonizar y macerar el tejido de mora infectado y causar la podredumbre gris (**Martínez y Moreno, 2008**). Otros microorganismos patógenos que afectan la calidad de la mora y constituyen una amenaza para la seguridad alimentaria son *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* que son los agentes causales más comunes de las enfermedades gastroenterológicas.

Una alternativa para controlar las afecciones microbiológicas es la aplicación de recubrimientos comestibles. Las propiedades que deberían poseer estos recubrimientos son: biodegradación, baja toxicidad, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana de

amplio espectro (**Valenzuela y Arias, 2012**). Dos polímeros que cumplen con estas condiciones son el quitosano y la  $\epsilon$ -polilisina.

La efectividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina depende de su concentración en términos de la conformación del polímero (**Goy, Morais y Assis, 2016**). Así, algunos autores afirman que la efectividad antimicrobiana del quitosano aumenta cuando su grado de desacetilación es mayor y su peso molecular menor, facilitando las interacciones electrostáticas y el ingreso de los oligómeros de quitosano en las células de los microorganismos (**Hernández-Ochoa, Gonzales-Gonzales, Gutiérrez-Mendez, Muñoz-Castellanos y Quintero-Ramos, 2011; Valenzuela y Arias, 2012**). De la misma manera, la efectividad antimicrobiana de la  $\epsilon$ -polilisina depende de la longitud de su cadena policationica, relacionada con su interacción con las moléculas de carga negativa de las estructuras celulares de mohos y levaduras y bacterias Gram positivas y Gram negativas, causantes del deterioro de los alimentos (**Chheda y Vernekar, 2015**).

El objetivo de la presente investigación fue estudiar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina en moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema

Actividad antimicrobiana de recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*

### 1.2. Justificación

El creciente interés por reducir el uso de preservantes químicos en productos hortofrutícolas ha impulsado el desarrollo y el uso de recubrimientos comestibles con características antimicrobianas para ajustarse a las necesidades de una agricultura sustentable. Entre las moléculas biológicamente activas empleadas para la producción de recubrimientos comestibles, se encuentran el quitosano y la  $\epsilon$ -polilisina, que poseen un amplio espectro antimicrobiano contra patógenos y microorganismos esporulantes, incluyendo a hongos y bacterias que se desarrollan en alimentos tanto de origen animal como vegetal (Aider, 2010; Chheda y Vernekar, 2015).

Tungurahua es una de las principales provincias productoras de mora de Castilla en Ecuador, pero las pérdidas post-cosecha son muy elevadas, pudiendo alcanzar hasta un 30 % de la producción. Una de las principales causas de pérdidas post-cosecha es la podredumbre gris, causada por *Botrytis cinerea* (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [MAGAP], 2011). Además, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* son bacterias patógenas que pueden desarrollarse sobre las frutas y causar enfermedades gastroenterológicas. Asimismo, la capacidad de sobrevivir fuera de su hospedero convierte a *E. coli* en un indicador ideal para evaluar la contaminación fecal en los sistemas de producción agrícola y de los alimentos (Bisen, Debnath y Prasad, 2012).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

- Estudiar la actividad antimicrobiana de recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar la actividad antibacterial de los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina frente a *Escherichia coli*.
- Evaluar la actividad antibacterial de los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina frente a *Salmonella enterica*.
- Determinar la inhibición fúngica de *Botrytis cinerea* mediante la aplicación de los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

Los recubrimientos comestibles son sustancias elaboradas a partir de polisacáridos, lípidos y proteínas o mezclas de éstos, que son aplicados sobre la superficie de distintos alimentos para protegerlos de daños mecánicos, físicos y químicos, así como de ataques microbianos (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013; Velázquez-Moreira y Guerrero-Beltrán, 2014). Entre los polímeros bioactivos empleados en la producción de recubrimientos comestibles se encuentran el quitosano, que es extraído del exoesqueleto de los crustáceos y la  $\epsilon$ -polilisisina, sintetizada a partir de procesos metabólicos de *Streptomyces albulus* y *Streptomyces ahygroscopicus* (Hiraki et al., 2003; Liu, Wu, Zhang y Mo, 2015). Tanto el quitosano como la  $\epsilon$ -polilisisina son materiales de alta biodegradación, presentan un amplio espectro antimicrobiano y no son tóxicos para los seres humanos ni para el ambiente (Bautista-Baños, Hernández-Lauzardo, Velázquez del Valle, Bosquez-Molina y Sánchez-Domínguez, 2005).

El quitosano es un polímero policatiónico constituido por cadenas aleatorias de  $\beta$  (1-4)-D-glucosamina y de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces O-glucosídicos  $\beta$  (1-4) (Figura 1) (Beltrán, 2010). El quitosano proviene de la desacetilación de la quitina y se caracteriza por su alta compatibilidad con compuestos orgánicos (aceites esenciales, ácidos orgánicos, etanol, etc.) e inorgánicos (iones metálicos, sílica, carbonatos, etc.) y facilidad de modificación química (Jianglian y Shaoying, 2013; Kong, Chen, Xing y Park, 2010).

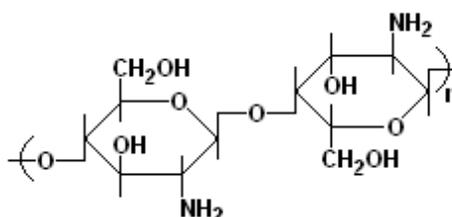


Figura 1. Estructura del quitosano (Escorcía, Hernández, Sánchez y Benavente, 2009).

El quitosano ha demostrado actividad antimicrobiana en frutas y hortalizas contra bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en arándanos, melón, piña y rábano negro. También fue eficaz en la inhibición del crecimiento de *Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii* y *Shewanella putrefaciens* en maqui (**Genskowsky et al., 2015; Jovanovic, Klaus y Niksic, 2016**). Además, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano contra mohos fitopatógenos como *Alternaria kikuchiana* Tanaka y *Physalospora piricola* Nose en peras; *Botrytis cinerea* en uvas y pimientos; *Penicillium expansum*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* en tomates; *Rhizopus spp.* y *Cladosporium spp.* en fresas; *Fusarium spp.*, *Colletotrichum musae* y *Lasiodiplodia theobromae* en bananas; *Colletotrichum acutatum* en arándanos y *Penicillium spp.* y *Alternaria spp.* en manzanas (**Borges, et al., 2000; Jia, Shiping, Xianghong y Yong, 2007; Garrido, 2008; Kiu Kiu, Jitareerat, Kanlayanarat y Sangchote, 2007; Liu, Tian, Meng y Xu, 2007; Meng, Yang, Kennedy y Tian, 2010; Muñoz, Moret y Garcés, 2009; Park, Stan, Daeschel y Zhao, 2005; Romanazzi, Nigro, Ippolito, DiVenere y Salerno, 2002**).

Los mecanismos de acción de los recubrimientos de quitosano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son dependientes de la composición química de sus envolturas celulares (**Valenzuela y Arias, 2012**). En este sentido, el mecanismo de acción contra bacterias Gram-positivas se fundamenta en el carácter catiónico del quitosano, responsable de la interacción entre los ácidos teicoicos de carga negativa presentes en la envoltura celular de estas bacterias con los grupos amino del quitosano (**Valenzuela y Arias, 2012**).

En el caso de las bacterias Gram-negativas, **López (2012)** explicó que el mecanismo de acción del quitosano se deriva de su capacidad de actuar como agente quelante. En otras palabras, los grupos amino distribuidos en la cadena del quitosano retienen los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  para establecer interacciones electrostáticas con los grupos aniónicos de los lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa. Esto provoca

una desestabilización de la membrana y la consecuente salida de sustancias intracelulares que conllevan a la muerte celular (**Kong, Chen, Liu, Liu, Meng y Yu, 2008**).

La mayor efectividad antimicrobiana del quitosano contra las bacterias Gram-negativas en relación a las Gram-positivas podría deberse a una mayor distribución de las cargas negativas en su superficie celular que facilita las interacciones con los grupos amino del quitosano (**Chung et al., 2004**). Entre las bacterias Gram-negativas se encuentran *E. coli* y *S. enterica* que poseen una envoltura celular similar a la que se detalla en la figura 2.

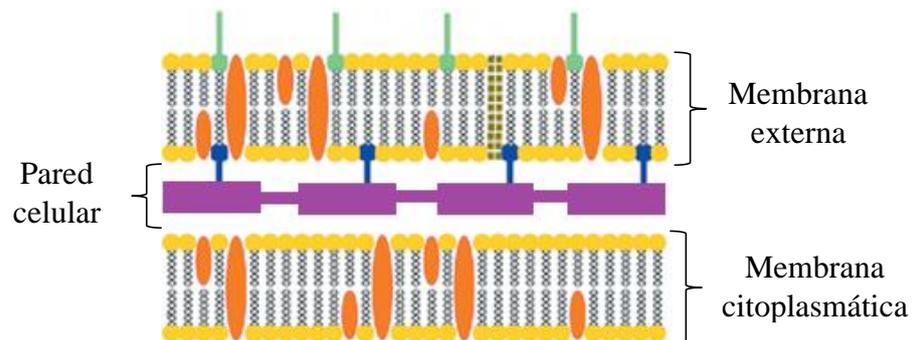


Figura 2. Envoltura celular de bacterias Gram-negativas

Fosfolípidos (amarillo con negro), proteínas (naranja), peptidoglicano (morado), lipoproteínas (azul), lipopolisacáridos (turquesa) y porina (verde) (**Mora, 2012**).

Al igual que en las bacterias, los mecanismos de acción del quitosano contra mohos y levaduras dependen de la composición de su pared celular. *B. cinerea* es un moho formado por hifas que poseen una envoltura celular semejante a la de las levaduras (**FunG, 2016**). En este sentido, **Pontón (2008)** afirmó que la pared celular de los mohos y levaduras está compuesta por quitina (10 – 20 %), glucano (50 – 60 %) y glicoproteínas (20 – 30 %), distribuidos de acuerdo a la figura 3.

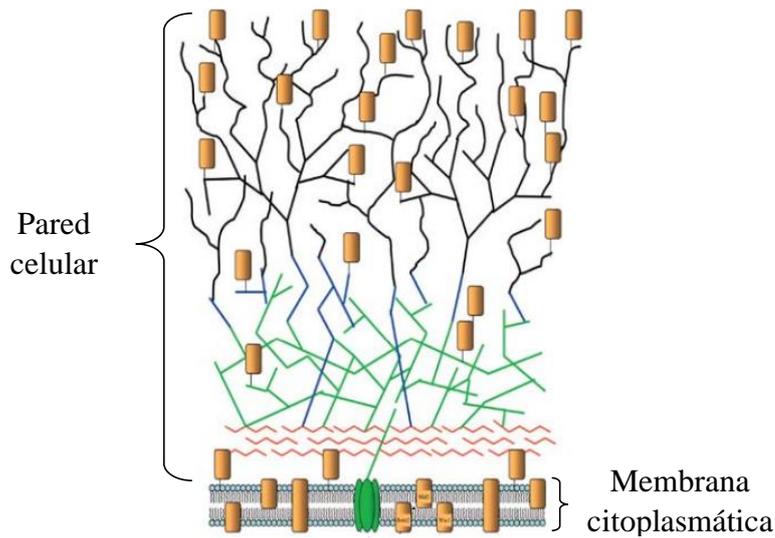


Figura 3. Pared celular y membrana plasmática de *S. cerevisiae* y *C. albicans*

Quitina (rojo),  $\beta$ -1,3-D-glucano (verde),  $\beta$ -1,6-D-glucano (azul), y glicoproteínas: mananos (negro) y proteínas (rectángulos de color naranja) (Pontón, 2008).

Valenzuela y Arias (2012) establecieron que la difusión de los grupos amino, favorecida por la protonación de éstos a pH ácido, provoca la desorganización de los polisacáridos que componen la pared celular de los hongos e interrumpe su función protectora. Como consecuencia, los fosfolípidos de la membrana plasmática se exponen a reacciones electrostáticas con los grupos de carga positiva del quitosano y esto provoca la inhibición de la formación de esporas e hifas debido al ingreso de los oligómeros de quitosano que inhiben la acción de varias enzimas e interfieren en la síntesis de proteínas (Ayala et al., 2014).

La  $\epsilon$ -polilisina es un homopolímero formado por aproximadamente 30 subunidades de L-lisina unidas por enlaces entre el grupo carboxílico y el grupo épsilon amino de las moléculas de lisina adyacentes (Figura 4) (Chand, Singh, Pandey y Mishra, 2012). Además de las propiedades descritas anteriormente, se caracteriza por ser hidrosoluble, no tóxico y estable a altas temperaturas (Chheda y Vernekar, 2015).

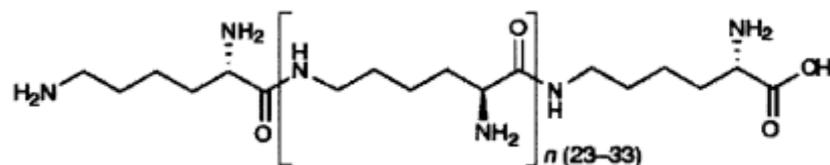


Figura 4. Estructura de la  $\epsilon$ -polilisina (Purac Biochem b.v., 2010).

Los recubrimientos de  $\epsilon$ -polilisina se han aplicado en hortalizas como brócoli y coliflor pero no se han encontrado estudios en moras ni en otras frutas (**Geornaras, Yoon, Belk, Smith y Sofos, 2007**). Sin embargo, existen investigaciones que demuestran la actividad antimicrobiana de este polímero en alimentos de origen vegetal como arroz, vegetales cocidos y ensaladas y en otros de origen animal, como pollo, carne y pescado (**Chheda y Vernekar, 2015; Feng et al., 2016**). Además, se han publicado resultados sobre el efecto antimicrobiano de  $\epsilon$ -polilisina contra las bacterias patógenas *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* y en hongos como *Candida albicans* y *Fusarium solani* (**Zhou et al., 2011**). También se ha comprobado la actividad antimicrobiana de  $\epsilon$ -polilisina frente a *E. coli*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* evidenciándose la inhibición de su actividad en mortadela, leche, arroz, vegetales y en carne asada (**Geornaras et al., 2007; Chang, Lu, Park, y Kang, 2010**).

**Zhou et al. (2011)** y **Hyldgaard et al (2014)** afirmaron que el mecanismo de acción de la  $\epsilon$ -polilisina contra bacterias se basa en la interacción efectiva entre los grupos catiónicos del polímero y los grupos fosfato de los fosfolípidos de las membranas lipídicas de estos microorganismos. Como consecuencia, se producen cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram-positivas y en las membranas externa y citoplasmática de las bacterias Gram-negativas hasta provocar la liberación de los componentes celulares y la muerte celular (**Chheda y Vernekar, 2015; Ye et al., 2013**).

Al igual que el quitosano, el mecanismo de acción de la  $\epsilon$ -polilisina contra mohos y levaduras sugiere la adsorción del polímero en su superficie celular hasta provocar la desorganización de los polisacáridos que componen la pared celular y de los fosfolípidos que conforman la membrana citoplasmática de estos microorganismos (**Zhou et al., 2011**). Una vez que la  $\epsilon$ -polilisina ingresa a las células fúngicas se interrumpen procesos metabólicos mediante la supresión del ciclo de Krebs y de la glicólisis, provocando así un desbalance en las funciones celulares de estos microorganismos (**Bo et al., 2014**).

## **2.2. Hipótesis**

### **Hipótesis Nula**

Los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina no presentan actividad antimicrobiana en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*.

### **Hipótesis Alternativa**

Los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina presentan actividad antimicrobiana en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*.

## **2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **2.3.1. Variable independiente**

Recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina.

### **2.3.2. Variable dependiente**

Crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*.

## CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales y Métodos

#### 3.1.1. Materia prima

Se recolectaron manualmente 6 kg de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) provenientes del campus Querochaca de la Universidad Técnica de Ambato. Se retiraron los pedúnculos de las moras y se descartó la fruta inmadura y deteriorada.

#### 3.1.2. Envasado y almacenamiento

Se distribuyeron 9 moras de Castilla dentro de envases de tereftalato de polietileno (PET) transparentes, en tres grupos: sin recubrimiento (control), recubrimiento con quitosano y recubrimiento con  $\epsilon$ -polilisina. El almacenamiento se realizó a temperatura de refrigeración ( $6 \pm 1$  °C) durante 10 días.

#### 3.1.3. Reactivos

Agua de peptona tamponada (Merck KGaA; Alemania)

Medios de cultivo:

Chromocult® agar para coliformes (Merck KGaA, Alemania)

Caldo MackConkey (Neogen® Corporation, USA)

Bacto™ Agar (Becton Dickinson and Company, USA)

Bacto® agar SS (Becton Dickinson and Company, USA)

Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (Neogen® Corporation, USA)

Quitosano con peso molecular de 1700 kDa y grado de desacetilación de 86 %

Ácido láctico 85 % (PromeClin, Ecuador)

$\epsilon$ -polilisina con peso molecular de 4,13 kDa (Zhejiang Silver-Elephant Bio-engineering Co. Ltd, China)

Glicerol (Invitrogen™, USA)

Gelatina (Mallinckrodt Baker Inc, USA)

### **3.1.4. Preparación de los recubrimientos comestibles**

#### **3.1.4.1. Quitano**

Se preparó una solución de quitano al 1 % p/v en ácido láctico 1 % p/v. Se agitó durante 24 horas a 40 °C con ayuda de una plancha de calentamiento modelo C-MAG HS 7 (IKA®, Alemania). Una vez solubilizado se incorporó glicerol (1 % p/v).

#### **3.1.4.2. ε-polilisina**

La ε-polilisina (0,065 g/250 ml) fue incorporada en una solución de gelatina (4 % p/v) en agua a 40 °C. Una vez solubilizada, se añadió glicerol a razón de 1 % p/v.

### **3.1.5. Inoculación de patógenos**

Las moras de Castilla fueron inoculadas con  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de *E. coli* (ATCC 25922, USA) y *S. enterica* (ATCC 9842, USA) y con  $10^3$  conidios·ml<sup>-1</sup> de *B. cinerea* (Bioseb Organics Cía. Ltda., Ecuador) para cada grupo (control y recubiertas con quitano y ε-polilisina). En todos los casos se consideró una relación de 100 µl de suspensión de microorganismo por cada 10 g de fruta.

Previo a la inoculación con *B. cinerea*, las moras fueron desinfectadas con etanol al 70 % (p/v) durante 10 segundos, lavadas con agua destilada estéril y secadas a temperatura ambiente.

### **3.1.6. Recubrimiento de las moras**

Los recubrimientos se aplicaron con ayuda de un atomizador y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de su almacenamiento en refrigeración ( $6 \pm 1$  °C).

### **3.1.7. Actividad antimicrobiana de los recubrimientos**

El día inicial se determinó la activación de las cepas de *E. coli*, *S. enterica* y de *B. cinerea*. Luego se determinó la presencia de microorganismos patógenos en la materia prima. Para esto, se homogeneizaron 5 g de mora de Castilla de cada tratamiento en 45 ml de agua de peptona (200 rpm, 2 min) usando un homogeneizador Stomacher® 400 circulator (Seward, UK) y se hicieron diluciones seriadas.

100 µl de cada dilución fueron sembrados en superficie en los siguientes medios de cultivo: cromogénico (Merck KGaA, Alemania) y MacConkey (Neogen® Corporation, USA) para *E. coli*, Salmonella Shigella (Becton Dickinson and Company, USA) para *S. enterica* y Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (Neogen® Corporation, USA) para *B. cinerea*.

Las muestras inoculadas con *E. coli* y *S. enterica* se incubaron a 37 °C durante 48 h y las muestras inoculadas con *B. cinerea* se incubaron a 25 °C durante 5 días en una incubadora de convección forzada modelo IFA-110T-8 (ESCO Isotherm®, Singapur). Los análisis microbiológicos fueron realizados los días 1, 3, 6, 8 y 10 de almacenamiento. Se utilizaron 3 envases PET por tratamiento, por microorganismo y por día de evaluación. Los recuentos de colonias se hicieron por duplicado, se promediaron y los resultados se expresaron en log (ufc·g<sup>-1</sup>) a excepción de los obtenidos para *B. cinerea* que fueron evaluados cualitativamente.

#### **3.1.8. Medición de pH**

El pH se determinó usando un pH-metro Accumed™ modelo AB 200 (Fisher Scientific™, USA). Las mediciones se realizaron tres veces por recubrimiento y por día de evaluación.

### **3.2. Diseño experimental**

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas por recubrimiento.

### **3.3. Análisis estadísticos**

Los datos fueron analizados en el programa estadístico IBM SPSS Statistics Version 21. Los resultados se analizaron empleando un ANOVA de un solo factor y cuando éste fue significativo, la comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Actividad antibacterial de los recubrimientos de quitosano y de $\epsilon$ -polilisina

Los recuentos microbianos de las placas de caldo MacConkey con agar fueron poco confiables debido al débil viraje del indicador púrpura de bromocresol que en presencia de bacterias Gram-negativas debió tornarse amarillo debido a la acidificación del medio como consecuencia de la fermentación de la lactosa de la fórmula empleada. Fue por esto que la evaluación de la actividad antibacterial de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina contra *Escherichia coli* se realizó considerando los recuentos microbianos en placas con agar cromogénico por la mayor confiabilidad de los resultados basados en la fácil identificación y diferenciación entre colonias coliformes y colonias de *E. coli*.

En la tabla 1 se muestran los recuentos microbiológicos ( $\log(\text{ufc}\cdot\text{g}^{-1})$ ) de *E. coli* durante el almacenamiento refrigerado ( $6 \pm 1$  °C) en moras de Castilla control y recubiertas con quitosano y con  $\epsilon$ -polilisina.

**Tabla 1**

*Recuentos de E. coli en muestras de mora control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y  $\epsilon$ -polilisina, almacenadas durante 10 días a  $6 \pm 1$  °C*

Día	Recuentos microbiológicos ( $\log(\text{ufc}\cdot\text{g}^{-1})$ )		
	Control	Quitosano	$\epsilon$ -Polilisina
1	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>	3,05 $\pm$ 0,19 <b>B b</b>
3	3,08 $\pm$ 0,23 <b>B b</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>	2,95 $\pm$ 0,00 <b>B b</b>
6	2,84 $\pm$ 0,06 <b>B b</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>	3,05 $\pm$ 0,23 <b>B b</b>
8	2,88 $\pm$ 0,01 <b>B b</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>
10	3,22 $\pm$ 0,04 <b>B b</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>	0,00 $\pm$ 0,00 <b>A a</b>

Los valores corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de evaluación.

El día 1 sólo se evidenció crecimiento de colonias de *E. coli* en las muestras de moras de Castilla recubiertas con  $\epsilon$ -polilisina. Los días de evaluación 3 y 6, el recubrimiento de quitosano presentó una actividad antimicrobiana superior a la de  $\epsilon$ -polilisina y redujo los recuentos con respecto al control. Finalmente, los días 8 y 10, los recuentos fueron superiores en el control con respecto a las moras con ambos recubrimientos. Estos resultados indican que los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina poseen actividad bactericida contra *E. coli*.

La ausencia de colonias de *E. coli* en los diez días de almacenamiento a  $6 \pm 1$  °C evidencia la efectividad antimicrobiana del recubrimiento de quitosano obteniéndose resultados similares a los expuestos por **Krasaekoopt y Mabumrung (2008)**. Estos autores reportaron la inhibición total de *E. coli* inoculada en melones que fueron almacenados por quince días a 10 °C.

Los resultados de la tabla 1 indican que la aplicación del quitosano en las moras de Castilla redujo entre 2,84 y 3,22 unidades logarítmicas de *E. coli* con respecto al control coincidiendo con **Bautista-Baños, Romanazzi y Jiménez-Aparicio (2016)** quienes reportaron una reducción de 1,5 unidades logarítmicas de *E. coli* inoculada en ciruelas chinas recubiertas con quitosano al 0,1 %.

Asimismo, la reducción de 2,88 y 3,22 unidades logarítmicas en los días 8 y 10, respectivamente evidenció la efectividad antimicrobiana del recubrimiento de  $\epsilon$ -polilisina contra *E. coli*. Estos resultados son similares a los reportados por **Zhou et al., (2011)** quienes evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de  $\epsilon$ -polilisina contra *E. coli* consiguiendo una reducción de 2,8 unidades logarítmicas.

En la tabla 2 se muestran los recuentos microbiológicos ( $\log(\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1})$ ) de *S. enterica* durante el almacenamiento refrigerado ( $6 \pm 1$  °C) en moras de Castilla control y recubiertas con quitosano y con  $\epsilon$ -polilisina.

**Tabla 2**

*Recuentos de S. enterica en muestras de mora control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y ε-polilisina, almacenadas durante 10 días a 6 ± 1 °C*

Día	Recuentos microbiológicos (log (ufc·g <sup>-1</sup> ))		
	Control	Quitosano	ε-Polilisina
1	3,24 ± 0,01 B c	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a
3	2,90 ± 0,02 B b	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a
6	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a
8	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a
10	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a	0,00 ± 0,00 A a

Los valores corresponden a la media ± la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de evaluación.

En el caso de *S. enterica* se observó una completa inhibición de este patógeno en la mora recubierta tanto con quitosano como con ε-polilisina durante todo el periodo de almacenamiento.

El recubrimiento de quitosano redujo 3,24 y 2,90 unidades logarítmicas de *S. enterica* con respecto al control. Estos resultados son similares a los reportados por **Jin y Gurtler (2015)** quienes establecieron una reducción de 3,6 unidades logarítmicas de *S. enterica* inoculada en tomate almacenado por catorce días a 10 °C. Además, la inhibición completa de *S. enterica* observada en este estudio coincide con los resultados de **Krasaekoopt y Mabumrung (2008)** quienes estudiaron la actividad antimicrobiana del quitosano en melones inoculados con *Salmonella spp.* y establecieron que este recubrimiento inhibió totalmente el crecimiento de este microorganismo.

Los resultados obtenidos con el recubrimiento de ε-polilisina contra *S. enterica* coincidieron con los reportados por **Geornaras et al., (2007)** quienes observaron la

inhibición total de *Salmonella* inoculada en brócoli y coliflor almacenados durante seis días a 12 °C.

Otro factor que incidió en la efectividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina fue el pH del medio en el que se aplicaron. Así, el pH ácido contribuye a la protonación de los grupos amino del quitosano y de la  $\epsilon$ -polilisina y esto a su vez incrementa las interacciones entre las cargas positivas con las negativas de la envoltura celular de *E. coli* y de *S. enterica* (Ayala, 2015; Rodríguez, Valderrama, Alarcón y López, 2010). Además, la completa inhibición del crecimiento de estos patógenos podría atribuirse a que el pH mínimo de crecimiento para *E. coli* es de 4,4 y para *S. enterica* de 3,8 (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Erika; 2013a y b).

En la tabla 3 se presentan los promedios de las mediciones de pH realizadas por triplicado en las moras de Castilla durante los días de almacenamiento en refrigeración ( $6 \pm 1$  °C).

**Tabla 3**

*pH de moras de Castilla control y recubiertas con quitosano y con  $\epsilon$ -polilisina durante 10 días de almacenamiento en refrigeración a  $6 \pm 1$  °C*

Día	Control		Quitosano		$\epsilon$ -Polilisina	
1	3,16 $\pm$ 0,03	<b>A a</b>	3,24 $\pm$ 0,07	<b>A ab</b>	3,25 $\pm$ 0,09	<b>A a</b>
3	3,16 $\pm$ 0,02	<b>A a</b>	3,22 $\pm$ 0,03	<b>B a</b>	3,20 $\pm$ 0,03	<b>AB a</b>
6	3,24 $\pm$ 0,02	<b>A b</b>	3,25 $\pm$ 0,02	<b>A ab</b>	3,25 $\pm$ 0,04	<b>A a</b>
8	3,29 $\pm$ 0,05	<b>A b</b>	3,28 $\pm$ 0,03	<b>A b</b>	3,28 $\pm$ 0,04	<b>A a</b>
10	3,14 $\pm$ 0,02	<b>A a</b>	3,29 $\pm$ 0,01	<b>C b</b>	3,20 $\pm$ 0,02	<b>B a</b>

Los valores corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento.

Los pHs evaluados en la mora podrían haber dificultado el transporte de nutrientes para generar energía destinada al mantenimiento de las células por lo que se indujo a la muerte de *E. coli* y de *S. enterica* debido a que ocurre una disminución en la cantidad de proteínas que intervienen en el metabolismo del ADN, lo que conlleva a la interrupción de la replicación de las células (**González, 2010; Tsai y Su, 1999**). En este sentido, **Gündüz (2013)** estableció que el pH ácido de las bayas frescas y procesadas es responsable de una reducción de 0,63 a 0,66 unidades logarítmicas de *Salmonella spp.* durante su almacenamiento refrigerado a 4 °C. Asimismo, **Yang, Hewes, Salaheen, Federman y Biswas (2014)** evidenciaron la actividad biológica antimicrobiana de la mora al determinar una reducción de 1 a 3 unidades logarítmicas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

Las diferencias estadísticamente significativas entre los días de almacenamiento de las muestras control podrían atribuirse a una variabilidad intrínseca debida a la capacidad tampón de los ácidos orgánicos de las frutas dependiente de su estado de madurez que, en las moras de Castilla no es homogéneo (**Holcroft, Gil y Kader, 1998**). Las moras recubiertas con quitosano y con  $\epsilon$ -polilisina no mostraron cambios significativos en su pH durante los días de su almacenamiento coincidiendo con las afirmaciones de **Duran et al., (2016)** y **Li et al., (2014)** quienes determinaron que el quitosano y la  $\epsilon$ -polilisina retardan los cambios de pH en los alimentos.

Según **Ayala (2015)** y **Geng et al., (2014)** los resultados favorables en la inhibición de *E. coli* y *S. enterica* pueden atribuirse al peso molecular de los recubrimientos y a los grados de desacetilación del quitosano y de polimerización de la  $\epsilon$ -polilisina. Así, **Goy, de Britto y Assis (2009)** establecieron que toda molécula de quitosano con un peso molecular superior a 150 kDa y con un grado de desacetilación mayor al 85 % es considerado de alto peso molecular y comercialmente aceptable.

Los resultados de la inhibición de las colonias bacterianas usando quitosano coincidieron con lo reportado por **Venugopal (2016)** quien aplicó quitosano de alto peso molecular (1333 kDa) con un grado de desacetilación mayor al 80 % observando

la inhibición de bacterias Gram-negativas, entre las que se encontraron *E. coli* y *Salmonella spp.* Asimismo, estos resultados coincidieron con las afirmaciones de **Lárez-Velásquez (2008)** quien estableció una relación directamente proporcional entre estos factores (peso molecular y grado de desacetilación del quitosano) y determinó que un alto peso molecular involucra un mayor número de grupos amino que se adhieren a la superficie celular de las bacterias Gram-negativas. Desde el punto de vista bioquímico, la inhibición de *E. coli* y *S. enterica* pudo deberse a la fijación del quitosano a la superficie bacteriana, alterando la permeabilidad de la membrana externa e hidrolizando el peptidoglicano de la pared celular que involucró la liberación de los electrolitos y de otros componentes proteicos provocando así la muerte celular (**Goy et al., 2009**).

Del mismo modo, la reducción de la carga microbiana de *E. coli* y de *S. enterica* con el recubrimiento de  $\epsilon$ -polilisina podría atribuirse a cambios en la longitud de su cadena policatiónica relacionada directamente con su peso molecular y grado de polimerización. **Chheda y Vernekar (2015)** establecieron que la longitud de la cadena de  $\epsilon$ -polilisina se modifica en función al tiempo de acción en las células microbianas. En otras palabras, mientras mayor fue el tiempo de contacto entre la  $\epsilon$ -polilisina y las células de *E. coli* y *S. enterica*, mayor fue la efectividad antibacteriana en las moras de Castilla. Según **Geng et al., (2014)**, la  $\epsilon$ -polilisina con más de nueve residuos de lisina garantiza una adecuada inhibición de colonias bacterianas.

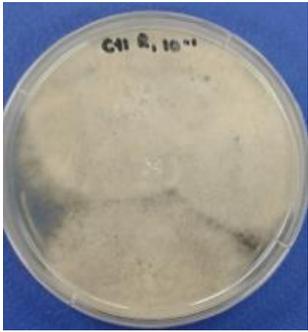
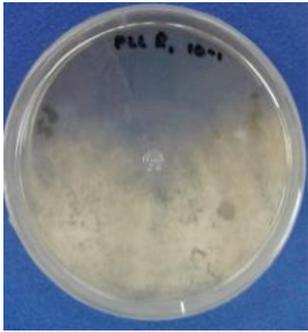
Los resultados de la inhibición de *E. coli* y *S. enterica* coincidieron con los reportados por **Zhou et al., (2011)** quienes evaluaron la efectividad antimicrobiana de  $\epsilon$ -polilisina de 3,35 kDa equivalente a 28 monómeros de lisina obteniendo resultados favorables frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo a las estudiadas en esta investigación. El enfoque bioquímico sugiere que la  $\epsilon$ -polilisina desestabiliza las membranas externa y citoplasmática de las bacterias Gram-negativas mediante la interacción de los fosfolípidos de carga negativa que las constituyen, con los cationes divalentes de la  $\epsilon$ -polilisina hasta formar vesículas que inducen a la muerte de las células bacterianas (**Ye et al., 2013**).

#### 4.2. Actividad antifúngica de los recubrimientos de quitosano y de $\epsilon$ -polilisina

En la tabla 4 se muestra la evaluación cualitativa del crecimiento de *B. cinerea* durante el almacenamiento refrigerado ( $6 \pm 1$  °C) en moras de Castilla control y recubiertas con quitosano y con  $\epsilon$ -polilisina.

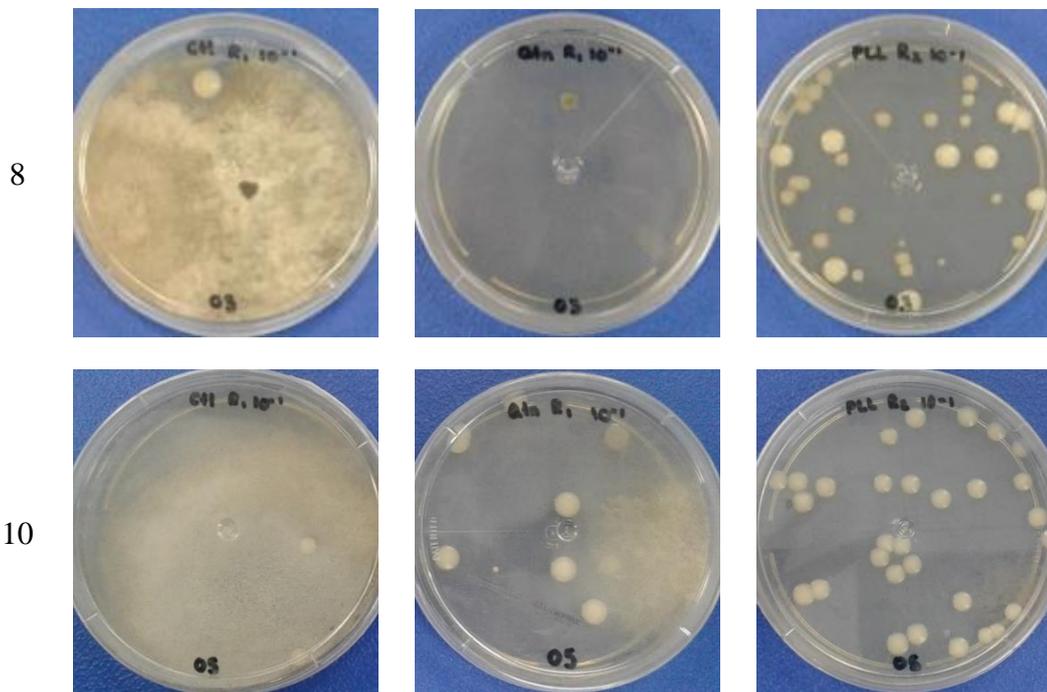
**Tabla 4**

*B. cinerea* en moras de Castilla control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y  $\epsilon$ -polilisina, almacenadas durante 10 días a  $6 \pm 1$  °C

Día	Tratamientos		
	Control	Quitosano	$\epsilon$ -Polilisina
1			
3			
6			

**Tabla 4 (continuación)**

*B. cinerea* en moras de Castilla control (sin recubrimiento) y recubiertas con quitosano y  $\epsilon$ -polilisina, almacenadas durante 10 días a  $6 \pm 1$  °C



A diferencia de las bacterias, los conidios de los mohos como *B. cinerea* germinan en medios ácidos de pH entre 3 y 7 (**Figuroa y García, 2002**). Esto se evidenció en las muestras control en las que el micelio se extendió en gran parte de la superficie del medio de cultivo. Además, la efectividad antifúngica del quitosano es dependiente de su tiempo de exposición en la célula del microorganismo (**Bautista-Baños, Hernández-López y Bosquez-Molina, 2004**).

En efecto, en este estudio se observó que el quitosano mostró una mayor efectividad antifúngica ocho días después de haber sido aplicado en las moras de Castilla. Los mohos son susceptibles al efecto antimicrobiano del quitosano en cierta fase de su crecimiento por lo que posiblemente en el día de evaluación 8, *B. cinerea* atravesaba la fase de latencia que es en la que muestra una mayor sensibilidad a los mecanismos del quitosano (**Goy et al., 2009**).

La actividad antifúngica del recubrimiento de  $\epsilon$ -polilisina en el día 1 fue deficiente ya que se evidenció el crecimiento de *B. cinerea* y de colonias de levaduras propias de la microbiota de las moras. Al comparar las características macroscópicas de las levaduras observadas con las identificadas por **Cevallos (2014)** en la misma fruta, se considera que podría tratarse de las especies *Candida sorbosivorans*, *Clavispora lusitaniae*, *Meyerozyma guilliermondii* o *Wickerhamomyces onychis*.

Al igual que en el quitosano, la efectividad antimicrobiana de  $\epsilon$ -polilisina se incrementó en función al tiempo de exposición del polímero en la célula fúngica. Así, en los días de evaluación 3 y 6 se observó que la propagación del hongo en el medio de cultivo disminuyó hasta que en el día 8 fue nula. El día 10 los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina aplicados a las moras de Castilla no inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* atribuyéndose a la fragmentación de los polímeros en cadenas constituidas por menos de 5 residuos para el quitosano y por menos de 10 residuos para la  $\epsilon$ -polilisina lo cual redujo su actividad antimicrobiana (**Chheda y Vernekar, 2015; El Hadrami, Adam, El Hadrami y Daayf, 2010**).

En el caso de los hongos, el peso molecular y el grado de desacetilación deben ser bajos ya que la actividad antifúngica del quitosano aumenta mientras el peso molecular y el grado de desacetilación disminuyen (**Hussain, Singh, y Chittenden, 2012**). En este sentido, **Yoonkyung et al. (2008)** establecieron que la actividad antifúngica del quitosano de bajo peso molecular (10 kDa) contra *B. cinerea* es mayor a la que se observa utilizando quitosano de mayor peso molecular. En otras palabras, un peso molecular bajo facilita la difusión de los oligómeros de quitosano a través de los canales de transporte dispuestos en la membrana celular de las células de *B. cinerea*.

El enfoque bioquímico establece que la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* ocurre por la interacción entre los grupos amino de los oligómeros de quitosano con el ADN, impidiendo su transformación en ARNm lo que interfiere en la síntesis de proteínas en las células de *B. cinerea* (**Edirisinghe, Ali, Maqbool y Alderson, 2014; Galván-Márquez, Akuaku, Cruz, Cheetham, Golshani y Smith, 2013**).

Los resultados favorables observados con el recubrimiento de  $\epsilon$ -polilisina se atribuyeron a las interacciones electrostáticas entre los grupos amino del polímero con los grupos carboxilo de las glicoproteínas presentes en la pared celular de *B. cinerea* (Chheda y Vernekar, 2015). Del mismo modo que con el quitosano, el recubrimiento con  $\epsilon$ -polilisina indujo cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática hasta provocar la liberación de componentes celulares y el consecuente daño fisiológico y muerte de la célula (Chheda y Vernekar, 2015; Bo et al., 2014).

#### **4.3. Verificación de hipótesis**

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa indicando que los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina sí presentan actividad antimicrobiana en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea*.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

Los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina demostraron una respuesta inhibitoria contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea* en moras de Castilla almacenadas en refrigeración durante 10 días a  $6 \pm 1$  °C.

El recubrimiento de quitosano fue más eficiente que el de  $\epsilon$ -polilisina en las moras de Castilla inoculadas con *E. coli*. La inhibición total de este microorganismo aplicando el recubrimiento de  $\epsilon$ -polilisina fue evidente únicamente en los días de almacenamiento 8 y 10.

La inhibición del crecimiento de *S. enterica* en las moras de Castilla control y recubiertas con quitosano y con  $\epsilon$ -polilisina demostró la incidencia del pH ácido de las moras en la inhibición del patógeno además de influir en el incremento de la efectividad antibacterial de los recubrimientos.

La actividad antifúngica de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina fue superior a un tiempo de exposición mayor de los polímeros en las células de *B. cinerea*.

#### 5.2. Recomendaciones

Ampliar el estudio de la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina en frutas y hortalizas nativas inoculadas con bacterias y hongos patógenos, causantes de enfermedades gastroenterológicas y de pérdidas post-cosecha, respectivamente.

Comparar la efectividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo estudios microscópicos que establezcan la relación entre el mecanismo de acción del recubrimiento y la composición de la envoltura celular de las bacterias.

Evaluar el efecto de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina en la cinética de crecimiento de microorganismos patógenos para determinar la fase de desarrollo en la que su susceptibilidad a compuestos antimicrobianos es mayor.

Estudiar el efecto antifúngico de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina de bajo peso molecular en frutas susceptibles a infecciones de hongos fitopatógenos.

Evaluar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y de  $\epsilon$ -polilisina en función al tiempo y condiciones de almacenamiento mediante ensayos *in vitro*.

## Referencias bibliográficas

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT – Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Ayala, A., Colina, M., Molina, J., Vargas, J., Rincón, D., Medina, J.,...Cárdenas, H. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet que produce la *Sigatoka negra* que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6), 312-338.
- Ayala, G. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria*, 2(2015), 32-38.
- Ayala, L. C., Valenzuela, C. P., y Bohórquez, Y. (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis estados de madurez. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 10-18.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., y Bosquez-Molina, E. (2004). Growth inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 178-186.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez del Valle, M. G., Bosquez-Molina, E., y Sánchez-Domínguez, D. (2005). Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 7(1), 1-6.
- Bautista-Baños, S., Romanazzi, G., y Jiménez-Aparicio, A. (Ed.). (2016). *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. Cambridge, USA: Academic Press.
- Beltrán, J. (2010). *Extracción y caracterización de quitosano del camarón titi y su aplicación en la liberación controlada de un fármaco* (Tesis de pregrado). Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia.
- Bisen, P., Debnath, M., y Prasad, G. (2012). *Concepts and Applications*. Somerset, USA: Wiley-Blackwell.
- Bo, T., Liu, M., Zhong, C., Zhang, Q., Su, Q. Z., Tan, Z. L.,...Jia, S. R. (2014). Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of  $\epsilon$ -poly-L-Lysine on

- Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4454-4465.
- Borges, A., Borges, A., Gutiérrez, A., Paz-Lago, D., Cabrera, G. Fernández, M.,... Acosta, A. (2000). Tomato-*Fusarium oxysporum* interactions: I-chitosan and MSB effectively inhibits fungal growth. *Cultivos Tropicales*, 21(4), 13-16.
- Cevallos, C. (2014). *Determinación de la biodiversidad y distribución geográfica de levaduras asociadas a frutos de mora de Castilla (Rubus glaucus) de tres localidades de la provincia de Tungurahua* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Chand, S., Singh, A., Pandey, A. K., y Mishra, A. (2012). Review on production and medical applications of  $\epsilon$ -polylysine. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 78-81.
- Chang, S. S., Lu, W. Y. W., Park, S. H., y Kang, D. H. (2010). Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by  $\epsilon$ -polylysine. *International Journal of Food Microbiology*. 141(3), 236-241.
- Chheda, A. H., y Vernekar, M. R. (2015). A natural preservative  $\epsilon$ -poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry. Mini Review. *International Food Research Journal*, 22(1), 23-30.
- Chung, Y. C., Su, Y. S., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. C., y Lin, J. G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936.
- Duran, M., Aday, M. S., Zorba, N., Temizkan, R., Büyükcan, M. B., y Caner, C. (2016). Potential of antimicrobial active packaging 'containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating' to extend shelf life of fresh strawberry, *Food and Bioproducts Processing*, 98, 354-363.
- Edirisinghe, M., Ali, A., Maqbool, M., y Alderson, P. (2014). Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes, *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4078-4083.
- El Hadrami, A., Adam, L., El Hadrami, I., y Daayf, F. (2010). Chitosan in Plant Protection, *Marine Drugs*, 8(4), 968-987.

- Escorcía, D., Hernández, D., Sánchez, M., y Benavente, M. (2009). Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas, *Revista Científica Nexa*, 22(2), 45-55.
- Feng, L., Shi, C., Bei, Z., Li, Y., Yuan, D., Gong, Y., y Han, J. (2016). Rosemary extract in combination with  $\epsilon$ -Polylysine enhance the quality of chicken breast muscle during refrigerated storage, *International Journal of Food Properties*, 1-11.
- Figueroa, C., y García, C. (2002). *Aislamiento e identificación de Botrytis sp. en áreas de invernadero y postcosecha en un cultivo de rosas de la sabana de Bogotá mediante el empleo de placas Petrifilm* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Elika. (2013a). *Escherichia coli*. Recuperado de: [http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf).
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Elika. (2013b). *Salmonella*. Recuperado de: [http://www.elika.net/datos/pdfs\\_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf](http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf).
- FunG. (2016). Hongos filamentosos: entre la hifa y el micelio. Recuperado de: <https://hongosmasquecallampas.wordpress.com/2016/02/>.
- Galván Márquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., y Smith, M. L. (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 108-112.
- Garrido, O. (2008). The effect of chitosan as a fungistatic agent on cut apples, *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 9(2), 148-152.
- Geng, W., Yang, C., Gu, Y., Liu, R., Guo, Y., Wang, X.,... Wang, S. (2014). Cloning of  $\epsilon$ -poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL) synthetase gene from a newly isolated  $\epsilon$ -PL-producing *Streptomyces albulus* NK660 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *Microbial biotechnology*, 7(2), 155-164.
- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernandez-Lopez, J., Muñoz, L. A., y Viuda-Martos, M. (2015). Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *LWT – Food Science and Technology*, 64(2), 1057-1062.

- Geornaras, I., Yoon, Y., Belk, K. E., Smith, G. C., y Sofos, J. N. (2007). Antimicrobial activity of epsilon-polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. *Journal of Food Science*, 72(8), M330–M334.
- González, M. V. (2010). *Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (Cinnamomum zeynalicum)* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Goy, R., de Britto, D., y Assis, O. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241-247.
- Goy, R., Morais, S., y Assis, O. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 122-127.
- Gündüz, G. T. (2013). Antimicrobial activity of sloe berry purees on *Salmonella spp.* *Food Control*, 32(2), 354-358.
- Hernández-Ochoa, L., Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Mendez, N., Muñoz-Castellanos, L. N., y Quintero-Ramos, A. (2011). Estudio de la actividad antibacterial de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 198-205.
- Hiraki, J., Ichikawa, T., Ninomiya, S., Seki, H., Uohama, K., Seki, H.,...Barnett, J. (2003). Use of ADME studies to confirm the safety of  $\epsilon$ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 328-340.
- Holcroft, D., Gil, M., y Kader, A. (1998). Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(1), 136-140.
- Hussain, I., Singh, T., y Chittenden, C. (2012). Preparation of chitosan oligomers and characterization: their antifungal activities and decay resistance. *Holzforschung*, 66, 119-125.

- Hyldgaard, M., Mygind, T., Vad, B., Stenvang, M., Otzen, D., y Meyer, R. (2014). The antimicrobial mechanism of action of epsilon-Poly-L-Lysine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7758-7770.
- Jia, L., Shiping, T., Xianghong, M., Yong, X. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300-306.
- Jianglian, D., y Shaoying, Z. (2013). Application of Chitosan Based Coating in Fruit and Vegetables Preservation: A Review. *Food Processing and Technology*, 4(5). doi:10.4172/2157-7110.1000227.
- Jin, T., y Gurtler, J. B. (2012). Inactivation of *Salmonella* on tomato stem scars by edible chitosan and organic acid coatings. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1368-1372.
- Jovanovic, G. D., Klaus, A. S., y Niksic, M. P. (2016). Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. *Revista Argentina de Microbiología*, In Press, Corrected Proof. doi:10.1016/j.ram.2016.02.003.
- Kiu Kiu, W. N., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S., y Sangchote, S. (2007). Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45(3), 333-340.
- Kong, M., Chen, X., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H., y Yu, L. J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(2), 197-202.
- Kong, M., Chen, X., Xing, K., y Park, H. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.
- Krasaekoopt, W., y Mabumrung, J. (2008). Microbiological Evaluation of Edible Coated Fresh-Cut Cantaloupe. *Natural Science*, 42(3), 552-557.
- Lárez-Velásquez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1-22.

- Li, Y-Q., Han, Q., Feng, J-L., Dai, Z-Y., Liu, W., y Mo, H-Z. (2014). Effects of  $\epsilon$ -Polylysine on Physicochemical Characteristics of Chilled Pork. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2507-2515.
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., y Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300-306.
- Liu, S. R., Wu, Q. P., Zhang, J. M., y Mo, S. P. (2015). Efficient production of  $\epsilon$ -poly-L-lysine by *Streptomyces ahngroscopicus* using one-stage pH control fed-batch fermentation coupled with nutrient feeding. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 358-365.
- López, M. A. (2012). *Obtención y caracterización de quitosanos modificados: ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Mañeru, M. (2014). *El huerto en casa*. Ciudad de México, México: Selector.
- Martínez, M., y Moreno, Z. (2008). *Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de Botrytis sp, en condiciones semicontroladas* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Meng, X., Yang, L., Kennedy, J., y Tian, S. (2010). Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 70-75.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2011). *INIAP genera tecnología para la mora de castilla en Tungurahua*. Recuperado de: [http://agronegocioecuador.ning.com/notes/INIAP\\_genera\\_tecnolog%C3%A1\\_Da\\_para\\_la\\_mora\\_de\\_castilla\\_en\\_Tungurahua](http://agronegocioecuador.ning.com/notes/INIAP_genera_tecnolog%C3%A1_Da_para_la_mora_de_castilla_en_Tungurahua).
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). *Día de campo en mora de Castilla organiza el INIAP*. Recuperado de: <http://www.agricultura.gob.ec/dia-de-campo-en-mora-de-castilla-organiza-el-iniap/>
- Mora, X. (2012). Diferenciando bacterias Gram+ y Gram-. *Selecciones avícolas*, 25-27.

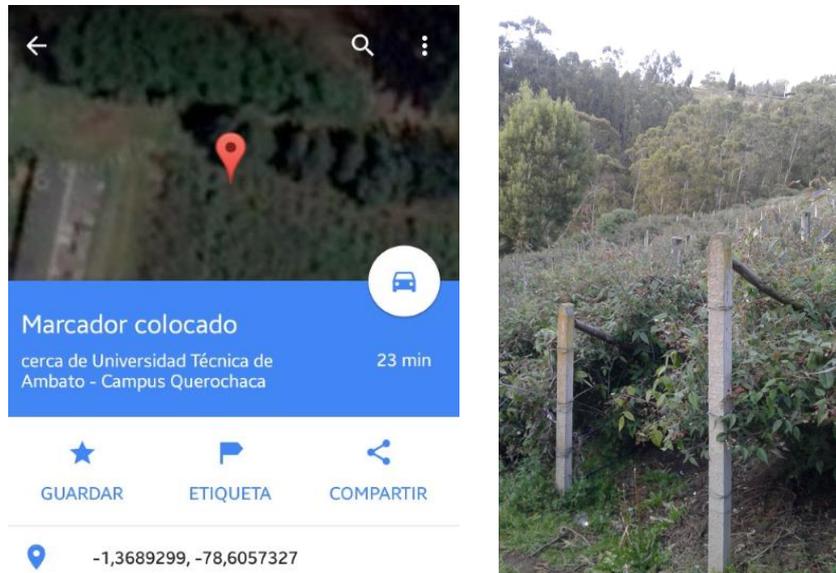
- Muñoz, Z., Moret, A., Garcés, S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum sp.* on tomatoes and grapes. *Crop protection*, 28(1), 36-40.
- Park, S-I., Stan, S. D., Daeschel, M. A., y Zhao, Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science*, 70(4), M202-M207.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 78-82.
- Purac Biochem b.v. (2010). Epsilon-Polylysine GRAS Notice. Recuperado de: <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM269521>.
- Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarcón, H., y López, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), 336-354.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., DiVenere, D., y Salerno, M. (2002). Effects of Pre- and Postharvest Chitosan Treatments to Control Storage Grey Mold of Table Grapes. *Journal of Food Science*, 67(5), 1862-1867.
- Tsai, G. J., y Su, W. H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62(3), 239-243.
- Valenzuela, C., y Arias, J. I. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en ciencias veterinarias*, 27(1), 33-47.
- Vázquez-Briones, M. C., y Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 5-14.
- Velázquez-Moreira, A., y Guerrero-Beltrán, J. A. (2014). Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 5-12.
- Venugopal, V. (2016). *Marine Polysaccharides: Food Applications*. Florida, USA: CRC Press.
- Yang, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C., y Biswas, D. (2014). Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of *Lactobacillus*, *Food Control*, 37(1), 15-20.

- Ye, R., Xu, H., Wan, C., Peng, S., Wang, L., Xu, H....Wei, H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of  $\epsilon$ -poly-L-lysine. *Biochemical and Biophysical research communications*, 439(1), 148-153.
- Yoonkyung, P., Kim, M-H., Park, S-C., Cheong, H., Jang, M-K., Nah, J-W...Hahm, K-S. (2008). Investigation of the Antifungal Activity and Mechanism of Action of LMWS-Chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(10), 1729-1734.
- Zhou, C., Li, P., Qi, X., Mohamed, A. R., Poon, Y. F., Cao, Y.,...Chan-Park, M. (2011). A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-L-lysine. *Biomaterials*, 32, 2704-2712.

## Anexos

### Anexo A. Fotografías de la Fase Experimental

#### Anexo A-1. Cosecha de la fruta



Fuente: Google Maps

Figura 5. Localización del sector en el que se recolectaron las moras de Castilla (Universidad Técnica de Ambato – Campus Querochaca).



Figura 6. Fruta recolectada



*Figura 7. Envasado de la fruta*

## Anexo A-2. Activación e inoculación de patógenos

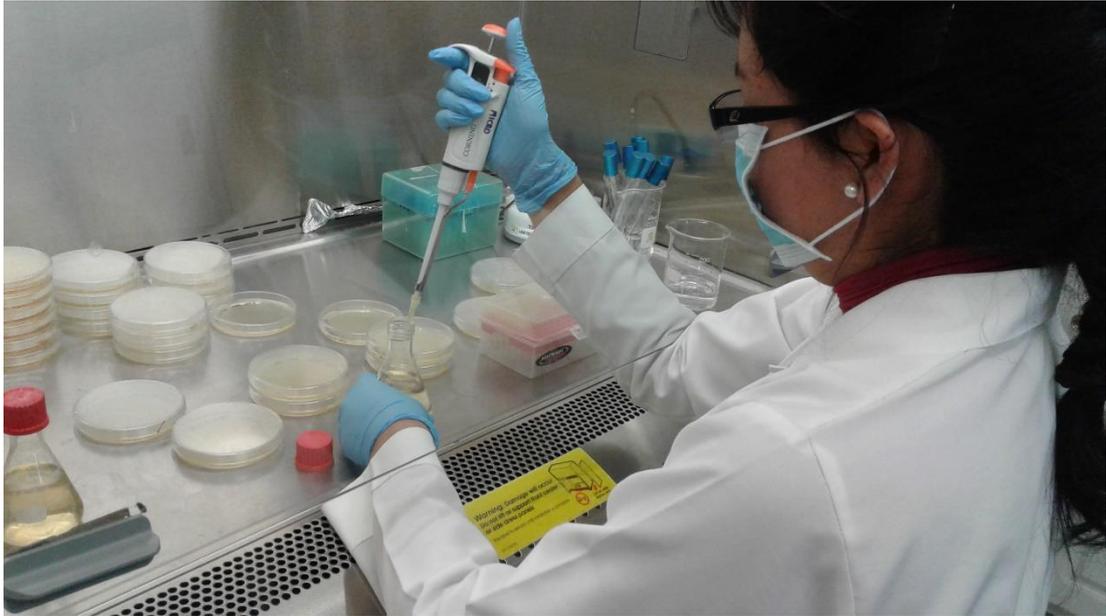


Figura 8. Activación y siembra de *E. coli* (ATCC 25922) y *S. enterica* (ATCC 9842)

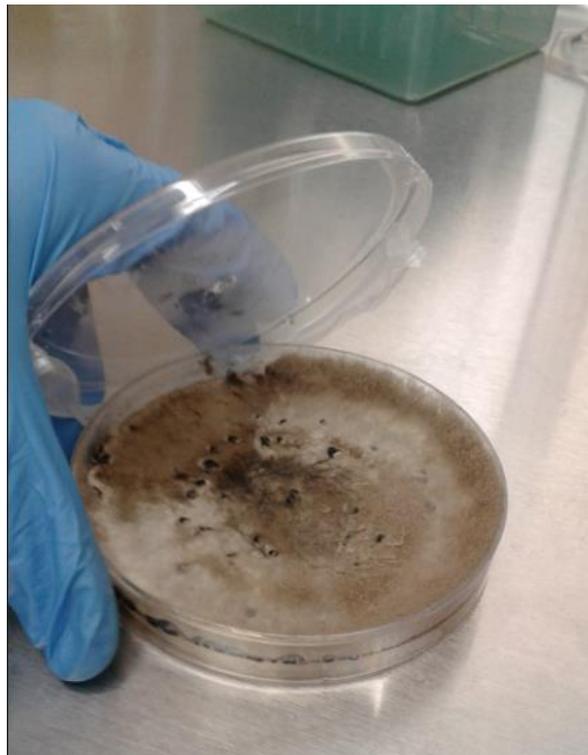


Figura 9. *B. cinerea* (Bioseb Organics Cía. Ltda)

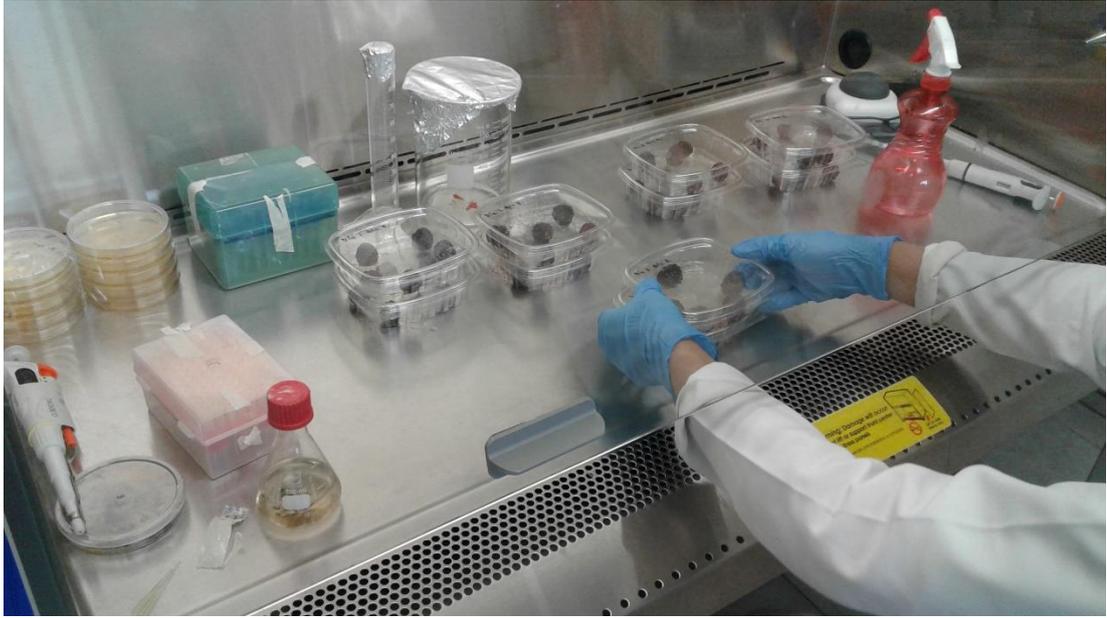


Figura 10. Inoculación de *B. cinerea*

### Anexo A-3. Actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y $\epsilon$ -polilisina

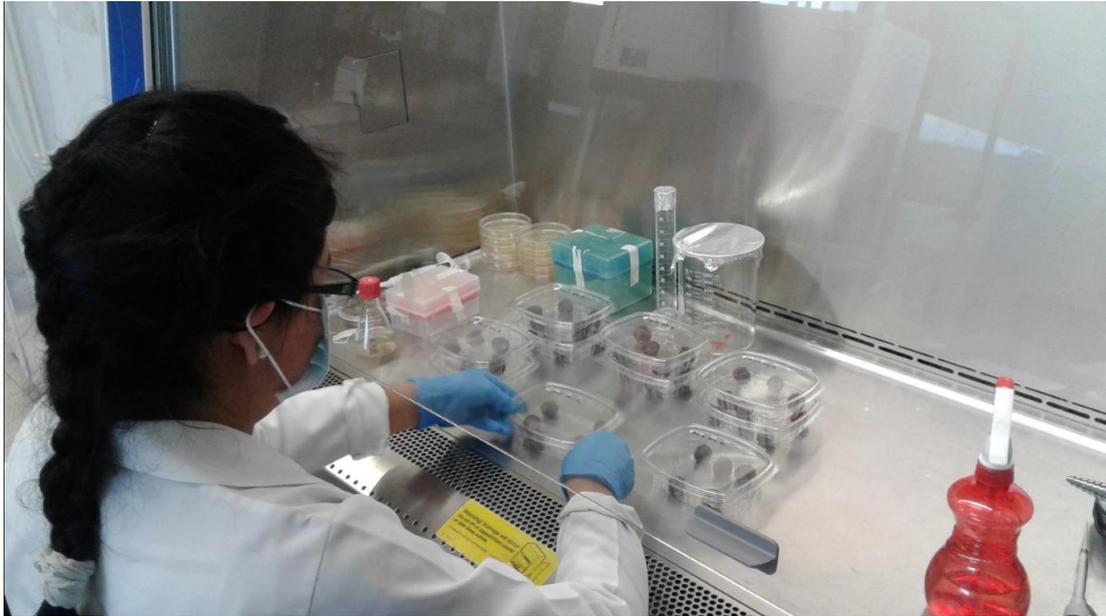
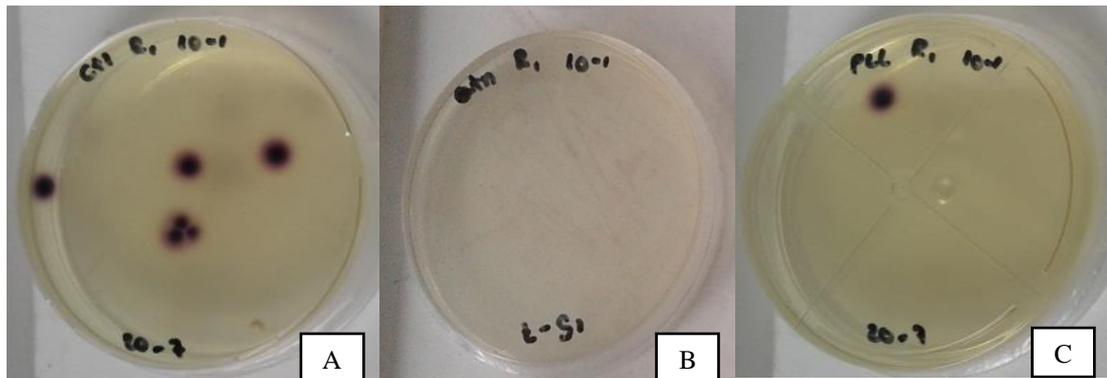
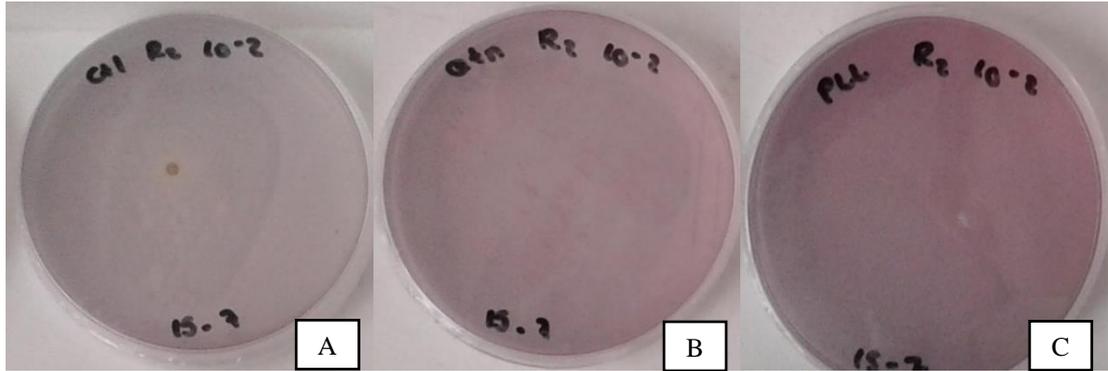


Figura 11. Distribución de los recubrimientos comestibles de quitosano y  $\epsilon$ -polilisina



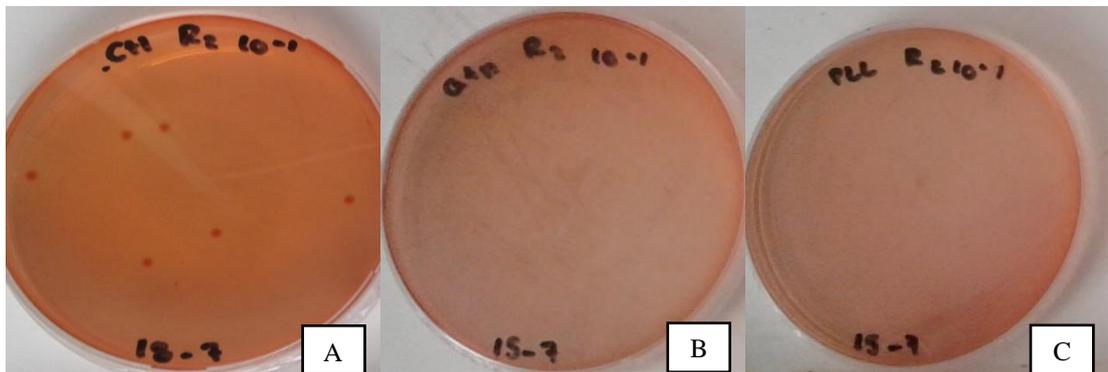
A) Placa control; B) Placa inoculada con moras recubiertas con quitosano; C) Placa inoculada con moras recubiertas con  $\epsilon$ -polilisina

Figura 12. Colonias de *E. coli* en agar cromogénico



A) Placa control; B) Placa inoculada con moras recubiertas con quitosano; C) Placa inoculada con moras recubiertas con  $\epsilon$ -polilisina

Figura 13. Colonias de *E. coli* en caldo MacConkey con agar



A) Placa control; B) Placa inoculada con moras recubiertas con quitosano; C) Placa inoculada con moras recubiertas con  $\epsilon$ -polilisina

Figura 14. Colonias de *S. enterica* en agar SS



Figura 15. Medición de pH  
39