

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



**RECUBRIMIENTO CON GEL DE QUITOSANO AL 1% DEL
FRUTO ENTERO DE “camu camu” *Myrciaria dubia*
(H.B.K) Mc. Vaugh PARA INHIBIR LAS LEVADURAS
PRESENTES EN SU SUPERFICIE**

Tesis que presenta la Bachiller en Ciencias

Vanessa Haydée Gugliermi Gallegos

Para optar el Título de LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Lima – Perú

2018

Asesor de Tesis:

Dr. José Luis Bauer Cuya

Departamento De Ciencias Celulares y Moleculares

Sección Microbiología

Unidad de Biominería y Medio Ambiente

Jurado calificador:

Presidente: Dra. Rosario Rojas Duran

Secretario: Dr. Camilo Díaz Santibañez

Vocal: Dra. Susana Zurita Macalupu

DEDICATORIA

Dedico la presente investigación a mi familia. Iniciaré agradeciéndole a mi Madre Haydée Gallegos, ya que gracias a su esfuerzo y tenacidad logró junto conmigo iniciar y terminar este camino que yo me tracé en la vida.

Pero nada hubiera sido posible en mi vida sin los sabios consejos diarios de mis abuelos maternos, los pilares de mi familia y a la vez mis padres. Mi abuelo Manuel Gallegos, un hombre a seguir para mí. Te amo y agradezco Papá Manuel por cada palabra tuya, porque por ti, mi vida cambió. Mi abuela Olinda Mendoza, la edificadora de nuestro hogar, me enseñaste con el ejemplo, que uno hace su propio destino. Nada seríamos sin ti mamá Olinda.

De igual modo quiero agradecer a mi hermana Lorena y a mi sobrino valentino, ya que ellos formaron parte de toda esta travesía mía. Me ayudaron y me dieron su apoyo cada vez que yo los necesité.

Y por último y no por eso menos importante a mi Hijo Carlos, porque desde que llegaste a mi vida, eres mi estímulo día a día para tener un futuro diferente y ser un buen ejemplo para ti. Te agradezco hijo mío por existir, por estar a mi lado, por haberme elegido como tu madre, tengo tanto que agradecerte en la vida que no terminaría nunca de expresar mi amor hacia ti. Pero terminaré diciéndote; Nada fue fácil hijo mío, todo me costó mucho esfuerzo y dedicación. Ahora... todo depende de ti, y yo estaré ahí a tu lado, como siempre...para darte la mano y guiarte en este camino de la vida.

AGRADECIMIENTO

- A mi asesor el Dr. José Luis Bauer Cuya, por sus sabios consejos, guía y paciencia en la elaboración de mi investigación de tesis.
- A mis amigos y compañeros por cada momento que compartimos, por tantos días, noches y madrugadas de estudio, por tantas tacitas de café juntos, por tantos...Vamos sí se puede!!
- Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi querido amigo y compañero Jesús Alberto, porque compartió conmigo miles de momentos, conversaciones y reflexiones.... Además, me brindó su apoyo y ánimo en muchísimos momentos en mi vida universitaria. Te deseo todo el éxito posible, sé que ahora estudias para ser médico y sé que serás el mejor, porque lo eres!! Un abrazo por siempre mi amigo.

INDICE

Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo principal.....	14
2.2 Objetivos secundarios.....	14
3. MÉTODOLÓGÍA	15
3.1 Diseño.....	15
3.2 Criterios de selección.....	15
3.3 Elementos del estudio.....	15
3.4 Materiales.....	16
3.5 Procedimientos.....	16
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSION.....	30
6. CONCLUSIONES	34
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35
8. ANEXOS	41

Resumen

El “camu camu” (*Myrciaria dubia*) es una fruta nativa de la Amazonía Peruana, de alto valor nutritivo y con gran potencial de exportación. Su almacenamiento es afectado por las levaduras que crecen en su superficie, alterando sus características organolépticas y duración. El objetivo del estudio fue aplicar gel de quitosano al 1% en frutos de “camu camu”, para inhibir las levaduras de la superficie y evaluar su influencia en el mejoramiento de la calidad y conservación. Se procesaron 242 frutos procedentes de la provincia de Coronel Portillo, ciudad de Pucallpa, en el departamento de Ucayali. Primero, se utilizaron 26 frutos divididos en dos grupos de 13. Un grupo fue sometido a una inmersión en gel de quitosano al 1% P/V con ácido acético a pH 5 y el otro fue el grupo control. Posteriormente, se realizó el secado de los frutos y ambos grupos fueron almacenados en oscuridad por 5 días, determinando diariamente parámetros de calidad, evaluaciones sensoriales, organolépticas y pérdidas fisiológicas de peso. En el 2º grupo se utilizó 56 frutos para aislar e identificar especies de levaduras, los cuales fueron lavados con agua destilada por 20 minutos, con posterior siembra del inóculo, con esto se permitió realizar varias pruebas como; Prueba rápida de KOH, Tinción Gram, API 20 C AUX, Prueba rápida del tubo germinativo y Prueba rápida de clamidospora. El tercer grupo, consistió en el aislamiento de levaduras que posteriormente fueron sometidas a diferentes concentraciones 1%, 0.5%, 0.25% y 0.125% del gel quitosano. En el 4º grupo usó 06 frutos divididos en tres grupos de 02. Un grupo fue inmerso en gel de quitosano al 1%, el otro grupo fue inmerso en agua destilada, y el otro grupo fue inmerso en ácido acético al 1%, durante 13 minutos. Para cada minuto, se tomaron muestras para recuento de colonias de levaduras. El último grupo utilizó 26 frutos para determinar el crecimiento de microorganismos a través del tiempo en la inmersión del fruto en el gel de quitosano. Los resultados del estudio permitieron evidenciar que los frutos de “camu camu” tratados con gel de quitosano al 1% tienen una menor pérdida de peso al comparar con los frutos sin tratamiento, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Se logró identificar *Trichosporum mucoide* y *Candida zeylanoides*. Todas las concentraciones de geles de quitosano utilizadas resultaron efectivas inhibiendo las levaduras. Los resultados de recuento de levaduras evidenciaron que si bien el uso de únicamente ácido acético disminuye el crecimiento al aumentar el tiempo de inmersión (ρ Sp: -1.0, $p < 0.05$), al utilizar el gel de quitosano al 1%, no se evidenció crecimiento en ninguno de los tiempos de inmersión. Y por último los resultados de la inmersión del fruto de “camu camu” en el gel de quitosano al 1 % en el tiempo, tampoco se evidenció crecimiento de microorganismos en ninguno de los tiempos. Los Resultados del estudio demuestran el uso potencial del gel de quitosano al 1% como inhibidor de la flora fúngica de la superficie del “camu camu” y como alternativa para su preservación y mejora en almacenamiento.

Palabras claves: gel cobertor de quitosano, “camu camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K) *Mc. Vaugh*, levaduras, Perú.

Abstract

“camu camu” (*Myrciaria dubia*) is an Amazon native fruit with high nutritional value and great potential for exportation. Its storage is affected by the yeasts that grow on its surface, altering its organoleptic characteristics and duration. The aim of the study was to apply 1% chitosan gel in “camu camu” fruits, to inhibit surface yeasts and to evaluate its influence on quality and conservation. A total of 242 fruits from the province of Coronel Portillo, city of Pucallpa, in the department of Ucayali were processed. First, 26 fruits were divided into two groups of 13. One group was submerged in a 1% P/V chitosan gel with acetic acid and the other was the control group. Subsequently, the fruits were dried and both groups were stored in the dark for five days, determining daily quality parameters, sensory, organoleptic evaluations and determination of the mass of the fruits. The second group used 56 fruits for the isolation and identification of yeast species, which were washed with distilled water for 20 minutes, with subsequent sowing of the inoculum, with this several tests were allowed such as; The KOH test, Gram stain, API 20 C AUX, Germ Tube Test, chlamyospore test. The third group consisted in the isolation of yeasts that were subsequently submerged in different concentrations of chitosan gel at 1%, 0.5%, 0.25% and 0.125%. The fourth group used 06 fruits were divided into three groups of 02. One group was submerged in chitosan gel at 1%, the other group was submerged in distilled water, and another group was submerged in acetic acid at 1%, For 13 minutes. For each minute, samples were taken for counting yeast colonies. The last group used 26 fruits for determine the growth of microorganisms over time in the immersion in chitosan gel. The results of the study showed that “camu camu” fruits treated with 1% chitosan gel had a lower weight loss when compared to fruits without treatment, being statistically significant ($p < 0.05$). *Trichosporum mucoïd* and *Candida zeylanoides* were identified. All concentrations of chitosan gel used were effective inhibiting yeasts. The yeast count results showed that although the use of only acetic acid decreases growth by increasing the immersion time (ρ Sp: -1.0, $p < 0.05$), when using 1% chitosan gel, no growth was observed in any of the immersion times. Finally, the results of the immersion 1% chitosan gel of “camu camu” fruits, in the time, no growth of microorganisms was observed in any of the immersion times. The results of the study demonstrate the potential use of 1% chitosan gel as an inhibitor of fungal flora on the surface of “camu camu” and as a new alternative for its preservation and storage improvement.

Key words: chitosan gel, “camu camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh, yeast, Peru

1. INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polisacárido natural de mayor abundancia en la naturaleza después de la celulosa¹. Se ha reportado la presencia de este polisacárido en los exoesqueletos de artrópodos fósiles como los trilobites^{1,2}.

De igual forma se encuentra en el exoesqueleto de todos los crustáceos como α (Alfa) quitina, aunque también son fuente de quitina la pluma del calamar que es β (Beta) quitina y además tenemos la γ (Gamma) quitina que está presente en la pared celular de hongos²

La quitina (Figura 1) se encuentra presente en la tierra hace más de 570 millones de años. La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos, los cuales podemos encontrarlos en las áreas costeras ya que las empresas procesadoras de crustáceos causan un gran impacto ambiental negativo²

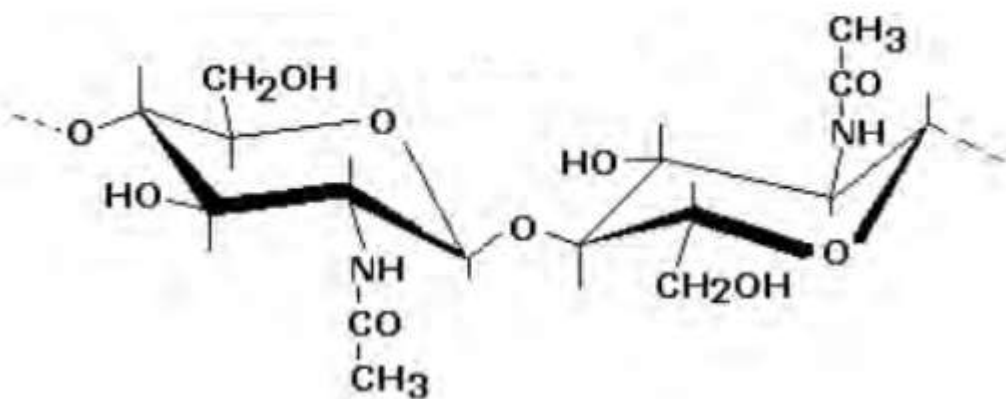


Figura 1. Unidad repetitiva de la quitina.

Fuente: Cuizano N, Llanos B, *et al.* Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2013

El quitosano (Figura 2) es un polímero que se obtiene de la quitina, y está constituido por dos residuos monoméricos, uno acetilado y otro desacetilado³. Son largas cadenas de moléculas de glucosa entrelazadas entre sí y estructuralmente formado por unidades de glucosamina y en menor medida N-acetil D-glucosamina, unidos entre sí por enlaces glucosídicos del tipo beta (1 \rightarrow 4)³. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es

2 amino 2 desoxi - D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y 2 acetamida- 2 desoxi- D glucopiranososa N-acetil glucosamina³.

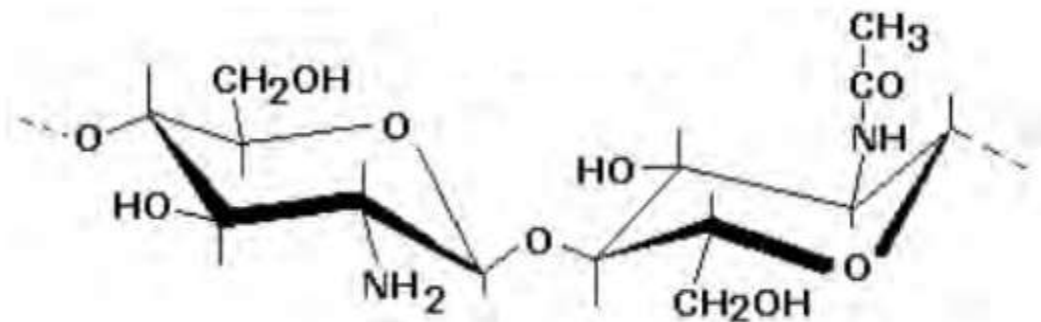


Figura 2 Unidad repetitiva quitosano.

Fuente: Cuizano N, Llanos B, *et al.* Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2013

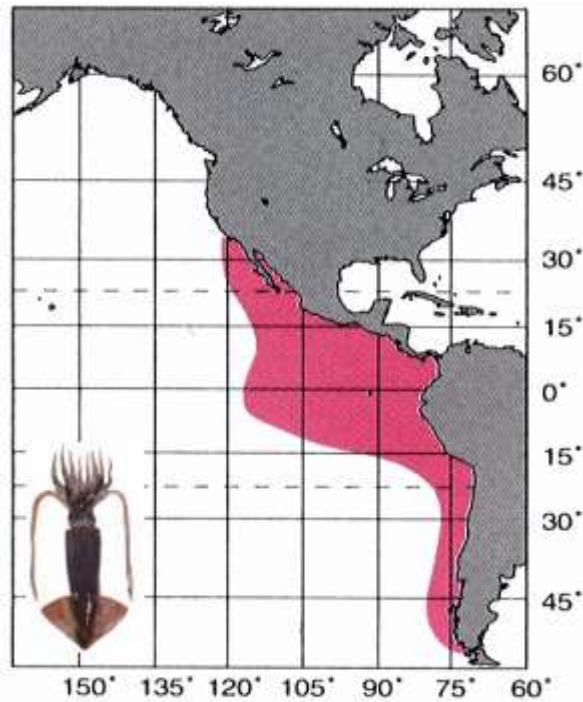
Además, el quitosano presenta enlaces de hidrógeno, estos están ampliamente extendidos a lo largo de toda su estructura química, esta es una propiedad importante ya que le confiere rigidez y estabilidad térmica a la estructura. El quitosano se obtiene por la reacción de desacetilación térmica alcalina de la quitina y es utilizado como biomaterial al que se le ha eliminado los grupos acetilos para generar grupos aminos en el carbono dos, debido al grupo amino libre en su estructura el quitosano posee un comportamiento marcadamente básico⁴

La quitina es de lenta degradación, por lo que su acumulación es una preocupación de la industria. Por tanto el uso de productos de valor agregado como el quitosano resulta de gran interés⁵

La producción de quitina y quitosano se basa frecuentemente en los desechos de caparzones de crustáceos procedentes de las industrias conserveras y de flotas pesqueras. En la zona costera peruana se extrae *Dosidicus gigas*, conocido como pota a nivel industrial y artesanal (Figura 3 A). La fuente de quitina es la pluma de la pota⁶



A



B

Figura 3. Vista dorsal del calamar (A) y distribución geográfica del calamar *Dosidicus gigas* (B).

Fuente: <http://www.imarpe.gob.pe/paita,2009>

Se ha reportado actividad antifúngica y antibacteriana del quitosano⁷. Además se conoce que reduce el crecimiento de numerosas especies de hongos inhibiendo incluso la esporulación, lo que le brinda un amplio espectro de acción que incluye hongos filamentosos y levaduras⁸. El efecto antimicrobiano del quitosano se atribuye a la capacidad quelante y a la presencia de un grupo amino con carga positiva que interactúa con los compuestos de carga opuesta de la superficie de los hongos. Esta interacción genera la lisis y pérdida de compuestos protéicos y componentes intracelulares. Sus propiedades antimicrobianas sumadas a su origen natural, capacidad de ser biodegradable y no tóxico, le ha permitido tomar gran importancia en la industria alimentaria, biomedicina, agricultura, entre otros^{9,12}

Las cubiertas de quitosano han sido utilizadas en la industria alimentaria como alternativa de control contra hongos e inducción de mantenimiento de frutos y aumento de vida útil^{13,14} Las cubiertas comestibles participan generando un

microclima el cual favorece la prolongación de la vida útil del alimento. Diversos estudios sugieren que la cubierta de quitosano modifica la atmósfera controlando el intercambio gaseoso a través de la membrana, la cual retrasa la respiración y las reacciones oxidativas¹⁵. Las propiedades antimicrobianas y antifúngicas del quitosano junto con su capacidad de formar biopelículas o recubrimientos justifican su uso en la agricultura moderna e industria alimentaria para ser empleado como una estrategia orientada a prolongar la vida útil de los alimentos.

El “camu camu”, (*Myrciaria dubia*), es un fruto nativo del Perú, que se desarrolla naturalmente en suelos inundables y sembrado en suelos no inundables, de gran importancia económica para la agroindustria y exportación del Perú. Es calificado como el cultivo bandera de la Amazonía Peruana, por su alta concentración de ácido ascórbico, sus niveles fluctúan de 2700 a 3200 mg/100g. Adicionalmente posee vitamina B, fósforo, Beta-caroteno, Calcio, Hierro, Proteínas, Riblofavina, Tiamina, Niacina y es rico en bioflavonoides componentes que convierten al camu camu en un poderoso antioxidante natural que estimula e incrementa la capacidad de defensa del organismo¹⁶. De acuerdo con las colecciones depositadas en el Missouri Botanical Garden, la especie *Myrciaria dubia* en Sudamérica está presente en Bolivia, Brasil, Ecuador, Guayana, Venezuela y Perú¹⁶ (Figura 4)



Figura 4. Distribución de *Myrciaria dubia* en Sudamérica.

Fuente: <http://www.sinchi.org.co> 2010

Por lo antes expuesto, el objetivo del estudio fue determinar la capacidad de la cubierta del gel de quitosano al 1% para inhibir la flora fúngica de superficie del fruto “camu camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh, con el fin de prolongar su vida útil.

2. OBJETIVOS

a. Objetivo principal

Determinar la capacidad del tratamiento con gel de β -quitosano al 1%, para inhibir las levaduras presentes en la superficie del fruto entero de “camu camu”.

b. Objetivos secundarios

1. Comparar la calidad de las evaluaciones sensoriales, organolépticas y pérdidas fisiológicas de peso del fruto de “camu camu” a temperatura ambiente de 18 a 23 °C con y sin tratamiento.
2. Realizar el recuento de colonias de levaduras de superficie del fruto entero de “camu camu” con y sin tratamiento.
3. Aislar e identificar la flora fúngica de la superficie de los frutos de “camu camu”
4. Evaluar la inhibición de las levaduras en gel de quitosano a distintas concentraciones: 1%, 0.5%, 0.25% y 0.125%

3. MÉTODOLOGÍA

3.1 Diseño

Se realizó un estudio prospectivo y experimental iniciado en noviembre del 2016

3.2 Criterios de selección:

3.2.1 Criterios de Inclusión:

Frutos de “camu camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh, con tamaños homogéneos, estado de madurez maduro, con presencia de pedúnculo y libre de grietas, golpes o daños mecánicos. El agricultor cosecho los frutos directamente de la planta y los depositó en una tina donde fueron agrupados para luego ser embalados y transportados en un camión desde la ciudad de Pucallpa hasta Lima.

3.2.2 Criterios de Exclusión:

Frutos de “camu camu” que presenten cortes, aplastamiento y/o marchitamiento.

3.3 Elementos de estudio

Se procesaron 242 frutos de “camu camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc. Vaugh. Los frutos son procedentes de la provincia de Coronel Portillo ciudad de Pucallpa, en el departamento de Ucayali. El fruto fue adquirido directamente del agricultor el Sr. Miguel Bardales Mozombite, el predio se encuentra ubicado en el kilómetro 30 Pucallpa – Campo verde. En esta ubicación, entramos 8 kilómetros y nos encontramos con el fundo de nombre Palmagro, que está camino al caserío San Cristobal de Agua Blanca.

Los frutos fueron transportados vía terrestre de Pucallpa a Lima y presentados a la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Departamento De Ciencias Celulares y Moleculares, Sección Microbiología – Unidad de Biominería y Medio Ambiente, en cajas térmicas de Tecnopor y sellados con bolsa film. Se tuvieron en cuenta los criterios de selección.

3.4 Materiales

3.4.1 Medio de cultivo y diluyente

Se utilizó el medio Agar Sabouraud Glucosado más cloranfenicol (Para inhibir la flora bacteriana) a pH 5.6 y como diluyente se usó agua destilada.

3.4.2 Materiales de Laboratorio y reactivos

El β -quitosano fue obtenido por desacetilación homogénea alcalina, el cual fue suministrado por el laboratorio de Biominería y Medio Ambiente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se utilizaron materiales de laboratorio para microbiología básica como: matraces, pipetas graduadas, mechero, micropipetas, tips, probetas, vasos precipitados, varillas de vidrio, frascos estériles, asa Drigalsky, ácido acético, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, placas petri, medio de cultivo agar Sabouraud glucosado, cloranfenicol, alcohol 96°, entre otros.

3.4.3 Instrumentación

Agitador magnético con calefacción-Cimarec, modelo sp131630-33q marca Thermo ori3n. Ba3o maría modelo Basic WNB marca Memmert. Balanza de precisi3n de 420 g de capacidad sensibilidad 0.01 g Marca Ohaus. Estufa, modelo UN260, marca Memmert. Refrigeradora dom3stica, Agitador de paleta, modelo ss10, marca Stuart. Vortex modelo LP marca Thermo Fisher Scientific. Entre otros.

3.5 Procedimientos

3.5.1 Evaluaciones f3sicas y organol3pticas

Se utilizaron 26 frutos divididos en dos grupos de 13. Un grupo fue sometido al gel de β -quitosano al 1% P/V con ácido ac3tico a pH 5 y el otro fue el grupo control, sin inmersi3n. Cabe mencionar que se realizaron dos an3lisis previos con igual n3mero de frutos para estandarizar la t3cnica. El gel β -quitosano utilizado en el estudio, fue brindado por el laboratorio de Biominería y Medio Ambiente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual presentaba una desacetilaci3n mayor a 80 %.

Posteriormente, se realizó el secado de los frutos que fueron inmersos en el gel β -quitosano, los frutos se dejaron suspendidos en un colador por 20 minutos hasta su completo secado, esto se realizó en completa esterilidad, dentro de una cabina de bioseguridad tipo 2, cuando el fruto camu camu ya estaba seco fue puesto cada muestra en un frasco estéril y estos fueron almacenados en oscuridad por cinco días, determinando diariamente los parámetros de calidad, evaluaciones sensoriales, organolépticas y pérdidas fisiológicas de peso.

a. Pérdida fisiológica de peso

Se pesaron los frutos diariamente con ayuda de una balanza de precisión marca Ohaus de 400g y sensibilidad de 0.01g. Se calculó el porcentaje de pérdida de peso con la siguiente ecuación:


$$\% \text{ Pérdida} = \left(\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

Diariamente se realizaron pesajes de la masa de los frutos de “camu camu” con tratamiento y sin tratamiento durante cinco días. Los frutos se mantuvieron almacenados en frascos estériles a temperatura ambiente de 18 a 23°C.

b. Características organolépticas

Durante la evaluación de la pérdida fisiológica de peso, se describieron las características organolépticas de color, olor y textura. Los parámetros a evaluar están descritos en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Atributos físicos empleados para evaluar los frutos “Camu camu”

Estado de maduración	Color de cáscara	Olor	Textura	Fotografía
Maduro	100% pigmentación rojiza	Característico	Dura	

c. Área superficial del fruto de “camu camu”

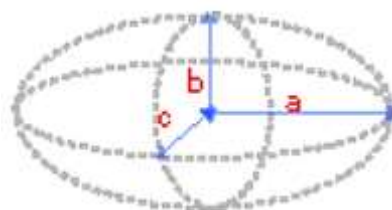
Para hallar el número aproximado de microorganismos del área superficial de cada fruto de “camu camu” se utilizó la fórmula del Elipsoide propuesta por Knud Thomsen, definida en la siguiente manera:

$$SA = 4 \cdot \pi \left(\frac{a^p b^p + a^p c^p + b^p c^p}{3} \right)^{1/p}$$

Donde:

a, b y c = Son distancias verticales desde el origen del elipsoide hasta la superficie.

Figura 6 Área superficial del fruto de “camu camu”



Donde **p** es una constante = 1.6075, produciendo un error relativo de 1.061% Y π define la relación de la circunferencia de cualquier círculo a su diámetro y es aproximadamente igual a 3,1416. (Anexo 4 - Fotografía 1)

3.5.2 Aislamiento e identificación de levaduras

Se utilizaron 56 frutos de “camu camu” para el aislamiento e identificación de levaduras. Se utilizó la técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en agua destilada, con agitación constante por 20 minutos, con posterior siembra en agar Sb, el inóculo fue de 100ul. Las levaduras obtenidas son colonias diferenciadas de 24 a 48 h de crecimiento. Mediante esta técnica se determinaron cinco pruebas rápidas: KOH al 10%, Tinción Gram, Identificación bioquímica API 20 CAUX, Tubo germinativo y Clamidospora.

3.5.3 Observación morfológica de las levaduras

Se verificó la presencia de levaduras después de 48 horas de cultivo, observando las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas de la superficie del fruto de “camu camu” en placas con agar Sabouraud glucosado más cloranfenicol a pH 5.6

Se describieron las características macroscópicas de las colonias presentes en las placas y se observaron microscópicamente las levaduras, realizando la prueba rápida con KOH al 10% y además se realizó la técnica de Tinción Gram. Se realizaron resiembras de los aislamientos de las colonias de levaduras observadas para obtener cultivos puros (Anexo 4 - Fotografía 2).

a. Prueba rápida con KOH al 10 %

Con ayuda de un asa de siembra se tomó una colonia del cultivo de levaduras, previamente se añadió una gota de KOH al 10 % a una lámina porta objeto, estos dos se mezclaron se cubrieron con una laminilla y se observó al microscopio óptico con objetivos de 10x y 40x. Mediante esta técnica diagnóstica se detectó la presencia de levaduras o estructuras fúngicas con características morfológicas definidas.

Esta técnica utiliza un reactivo muy simple, no necesita fijación y se observa de forma inmediata. Se pueden observar levaduras en gemación que es su forma de reproducción.

b. Tinción Gram

Es una técnica micro diagnóstica que nos permite observar y confirmar de manera rápida y precisa las características morfológicas de las levaduras. Además, éstas se reproducen asexualmente por gemación y son capaces de tener un comportamiento como Gram positivas, el color que presentan luego de la tinción se debe a la composición de la pared celular de la levadura y no tiene tanta importancia como en las bacterias, ya que en ellas si existe una clasificación por medio de la tinción Gram lo que no ocurre con las levaduras.

La muestra fue fijada y teñida sobre la lámina porta objeto, una vez seca la lámina, fue observada al microscopio óptico con objetivo de 40X.

3.5.3.1 Identificación bioquímica de los aislados

Las colonias de levaduras fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas en el Instituto Nacional de Salud, gracias a la Dra. Susana Zurita.

Las cepas aisladas serán enfrentadas a las diferentes concentraciones del gel de quitosano.

Se usó el sistema comercial API 20 CAUX, el cual es rápido y preciso para la identificación de levaduras mediante la asimilación de carbohidratos. Cada especie posee un perfil bioquímico específico y sólo se reproducen las capaces de utilizar el sustrato correspondiente. (Anexo 4 – Fotografía 4 A, B, C, D)

Esta galería API 20 CAUX, está diseñada para la identificación de levaduras y consta de 20 microtubos con el correspondiente medio deshidratado en cada uno de los cuales se realizó una prueba bioquímica determinada. Los microtubos fueron inoculados con cepas de colonias diferenciadas de 24 a 48 h de crecimiento. Este sistema permite identificar un total de 34 especies diferentes de levaduras.

Adicionalmente, se realizaron dos pruebas complementarias a los análisis bioquímicos, la prueba rápida de tubo germinativo y la prueba rápida de Clamidospora, pruebas de utilidad para la detección de especies de *Candida*.

3.5.4 Inmersión en gel de quitosano al 1%, 0.5%, 0.25% y 0.125%

Se realizó este análisis de manera individualizada, enfrentando a cada una de las especies de levaduras previamente ya identificadas por el método API.

Se preparó una suspensión en caldo Sabouraud, el cultivo fue incubado por 48 horas a 37°C. Pasadas las 48 horas de incubación se centrifugó la suspensión por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se preparó una suspensión con agua ácida a 0.5 en la escala de Mc Farland. La medición se realizó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm equivalente a una densidad óptica de 0.05 unidades teniendo como blanco agua destilada.

Se prepararon 4 diferentes concentraciones del gel de quitosano al 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%. Se tomó 1mL de la solución Mc Farland y se diluyó en 9 mL del gel de quitosano en cada uno de los casos. Se dejó actuar por 10 minutos con agitación constante de 500 rpm, obteniendo una solución aproximada de 1.5×10^7 UFC/ml.

Se sembró por diseminación por triplicado en placas de Agar Sabouraud con Cloranfenicol a pH 5.6 y se cultivó a temperatura ambiente de 24 a 48 h.

El grupo control constó de 9 mL de agua destilada, más 1 mL de la solución Mc Farland. 100uL de esta última solución 1.5×10^7 UFC/mL fueron sembrados por diseminación en placas de Agar Sabouraud con Cloranfenicol a pH 5.6 y luego cultivados a temperatura ambiente de 24 a 48 horas. Finalmente, se realizó la siembra de 100uL de esta solución stock en agar Sabouraud. Cada grupo fue sembrado por triplicado. (Anexo 2 – Esquema 4)

3.5.5 Recuento de colonias de levaduras

Se utilizaron 6 frutos de “camu camu” divididos en tres grupos de dos. Cabe mencionar que se realizaron cuatro análisis previos con igual número de frutos para estandarizar la técnica. Cada grupo recibió tratamientos detallados a continuación.

3.5.5.1 Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en gel de quitosano al 1% en ácido acético a pH 5

El tratamiento estuvo basado en la técnica de inmersión, donde se sumergió una sola muestra en el gel de quitosano al 1 % con ácido acético a pH 5 por diferentes tiempos y con agitación constante de 500 rpm. Se tomó una muestra de 100ul en cada minuto, desde el minuto 1 hasta el minuto 13 y se sembró por triplicado en placas con agar sabouraud con cloranfenicol a pH 5.6 (Anexo 2 – Esquema 1). Pasadas las 48 h se realizó el recuento de colonias por placa, con este número se determinó la carga microbiana aproximada por cm^2 del área superficial de cada fruto de “camu camu”.

Control: Adicionalmente se trabajó una muestra control, realizando el mismo procedimiento pero en agua destilada.

Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en agua destilada (Control)

Mediante la técnica de inmersión en agua destilada estéril, se observó y contó la carga inicial microbiana. Para determinar la carga inicial se sumergió una sola muestra sin tratamiento en agua destilada durante 13 minutos.

Se tomó una muestra de 100ul en cada minuto, desde el minuto 1 hasta el minuto 13 (La muestra estuvo en agitación constante de 500 rpm en un Vortex Mixer, marca Thermo Scientific). (Anexo 2 – Esquema 3).

Se sembró por diseminación en placas petri con agar sabouraud más Cloranfenicol a pH 5.6 por triplicado y se cultivó a temperatura ambiente de 24 a 48 h. Pasadas las 48 h se realizó el recuento de colonias por placa, con este número se determinó la carga microbiana aproximada por cm² del área superficial de cada fruto de “camu camu”.

3.5.5.2 Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en agua ácida al 1% a pH 5

El tratamiento estuvo basado en la técnica de inmersión, donde se sumergió una sola muestra en el agua ácida (ácido acético) al 1 % a pH 5 por diferentes tiempos y con agitación constante de 500 rpm. Se tomó una muestra de 100ul en cada minuto, desde el minuto 1 hasta el minuto 13 y se sembró en placas con agar sabouraud con Cloranfenicol a pH 5.6 por triplicado. (Anexo 2 – Esquema 2). Pasadas las 48 h se realizó el recuento de colonias por placa, con este número se determinó la carga microbiana aproximada por cm² del área superficial de cada fruto de “camu camu”.

Control: Adicionalmente se trabajó una muestra control, realizando el mismo procedimiento pero en agua destilada.

Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en agua destilada (Control)

Mediante la técnica de inmersión en agua destilada estéril, se observó y contó la carga inicial microbiana. Para determinar la carga inicial se sumergió una sola muestra sin tratamiento en agua destilada durante 13 minutos.

Se tomó una muestra de 100ul en cada minuto, desde el minuto 1 hasta el minuto 13 (La muestra estuvo en agitación constante de 500 rpm en un Vortex Mixer, marca Thermo Scientific). (Anexo 2 – Esquema 3).

Se sembró por diseminación en placas petri con agar sabouraud más Cloranfenicol a pH 5.6 por triplicado y se cultivó a temperatura ambiente de 24 a 48 h. Pasadas las 48 h se realizó el recuento de colonias por placa, con este número se determinó la carga microbiana aproximada por cm² del área superficial de cada fruto de “camu camu”.

3.5.6 Inmersión del fruto de “camu camu” y Crecimiento de microorganismos en el gel de β - quitosano al 1% en ácido acético a pH 5 en el transcurso del tiempo, desde el minuto 1 hasta el minuto 13.

Se utilizaron 26 frutos de “camu camu” para este tratamiento, cabe mencionar que se realizaron dos análisis previos con igual número de frutos para estandarizar la técnica.

La técnica consistió en sumergir, agitar y eliminar en cada minuto una muestra del fruto. Se sumergieron al final trece muestras en el gel de quitosano al 1 % con ácido acético a pH 5 a través de los diferentes tiempos, la agitación fue constante y de 500 rpm. En cada minuto se tomó una muestra de 100ul, desde el minuto 1 hasta el minuto 13 y se sembró por triplicado en placas con agar sabouraud con cloranfenicol a pH 5.6 (Anexo 2 – Esquema 5). Pasadas las 48 h se realizó el recuento de colonias por placa.

3.6 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos, se generaron bases de datos utilizando el programa Excel 2013 de Microsoft Office. Las bases generadas fueron importadas utilizando el paquete estadístico STATA 14. Se realizaron dos pruebas estadísticas, una fue la prueba de Mann-Whitney que fue utilizada para el análisis de la variable peso. Además, usando el programa estadístico mencionado se determinó la correlación entre la variable dependiente e independiente que son de tipo monótonica, ya que al aumentar el tiempo en minutos, disminuye el conteo de colonias de levaduras, esta fue determinada con la prueba estadística de correlación de Spearman. Ambas pruebas con un nivel de significancia de 0.05

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación física y organoléptica

a. Pérdida fisiológica de peso del fruto “camu camu”

Los pesos iniciales de los frutos de “camu camu” se encuentran señalados en el Anexo 3 (Tablas 1 y 2). Los resultados de la pérdida de peso sugieren que hay diferencia estadística entre el peso en gramos perdido de los frutos de “camu camu” con tratamiento (Inmersión del fruto en el gel de quitosano al 1%) y sin tratamiento (Mann-Whitney test, $P < 0.05$). Se evidenció que los 13 frutos sin tratamiento tienen una mayor pérdida de peso en gramos en comparación con los 13 frutos con tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de pérdida de peso del fruto camu camu en cinco días.

Nº de Muestra	PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DEL FRUTO													Promedio del % de Pérdida de peso
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Sin tratamiento	10	11	11	10	10	10	10	10	9	10	10	10	11	10
Con tratamiento	5	6	4	4	4	5	6	4	4	4	6	7	5	5

b. Características organolépticas

Trece frutos sin tratamiento (control) iniciaron con consistencia dura, el color de la cáscara era rojo, opaco y con olor característico. Al pasar los cinco días pre establecidos, todos los frutos se encontraron marchitos, el color de la cáscara era naranja, opacos y con olor a vinagre. Los frutos bañados en agua ácida al 1% iniciaron con consistencia dura, el color de la cáscara era rojo y estaban limpios ya que fueron lavados en el agua ácida y el olor que tenían era característico. Después de los cinco días pre establecidos, el 70% de los frutos se encontraron marchitos, opacos y con olor a vinagre.

Por otro lado, los frutos que recibieron tratamiento con gel quitosano al 1% inicialmente presentaron consistencia dura, el color de la cáscara era rojo, con brillo y con olor característico. Después de los cinco días pre establecidos, a diferencia de los otros dos grupos, todos los frutos de este grupo presentaban aún dureza, cáscara roja y olor característico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características organolépticas

CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS		
	Día 1	Día 5
control	<ul style="list-style-type: none"> -Iniciaron con consistencia dura -Color de cáscara roja -Olor característico -Sin brillo 	<ul style="list-style-type: none"> - Frutos marchitados 100% - Color de cáscara naranja - Con olor a vinagre - Sin brillo
Los frutos bañados en agua ácida al 1%	<ul style="list-style-type: none"> -Iniciaron con consistencia dura -Color de la cáscara roja -Olor característico -Estaban limpios ya que fueron lavados en el agua ácida 	<ul style="list-style-type: none"> - Frutos marchitados 70 % - Color de la cáscara roja - Con olor a vinagre - Sin brillo, limpios
Los frutos bañados en quitosano al 1%	<ul style="list-style-type: none"> -Iniciaron con consistencia dura -Color de la cáscara roja -Olor característico -Con brillo 	<ul style="list-style-type: none"> - Frutos aun con dureza 100% - Color de la cáscara roja - Olor característico - Con brillo

4.2 Identificación de las levaduras

4.2.1 Características morfológicas

Se realizó la observación de las características morfológicas de las colonias. Se aislaron dos tipos de colonias según las características que presentaban. (Cuadro 3). Adicionalmente se observaron las características microscópicas de las colonias aisladas. Mediante el examen directo de KOH al 10 % y se observaron los organismos levaduriformes que estaban en gemación, y

mediante la Tinción Gram se observó que levaduras en gemación se comportaban como Gram positivas. (Anexo 4 – Fotografía 2)

Cuadro 3. Características macroscópicas de las colonias de levaduras aisladas de la superficie del fruto de “camu camu” en placas con agar Sabouraud.

COLONIA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS
1	Blancas, redondas, borde regular, plana, lisas, 1 mm de diámetro
2	Blancas, redondas, borde irregular, convexa, rugosa, 1.5 mm de diámetro

4.2.2 Identificación bioquímica, API 20 C AUX

Basado en las reacciones bioquímicas, se identificaron dos especies: *Trichosporum mucoide* y *Candida zeylanoides*. (Anexo 4 – fotografía 4. A, B, C, D). Como complemento a este análisis bioquímico se realizaron dos pruebas más, una fue la prueba rápida del tubo germinativo y la otra fue la prueba rápida de clamidospora, ambas dieron negativo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Levaduras aisladas del fruto de “camu camu” e identificadas bioquímicamente por API 20C AUX

NUMERO DE COLONIA AISLADA	IDENTIFICACION BIOQUIMICA- API 20C AUX
1	<i>Trichosporum mucoide</i>
2	<i>Candida zeylanoides</i>

4.2.3 Crecimiento según exposición a quitosano al 1%, 0.50%, 0.25%, 0.125%

No se observó el crecimiento de *Trichosporum mucoide* ni de *Candida zeylanoides* en ninguna de las concentraciones de quitosano señaladas. (Anexo 3, Tabla 6).

4.3 Recuento de colonias de levaduras

Los resultados para los diferentes protocolos de inmersión están señalados en el Anexo 3 (Tablas 4-6). Los resultados del recuento de levaduras evidenciaron que el uso de únicamente ácido acético presenta desde el primer minuto una significativa disminución en comparación con el control, además se observa que disminuye el crecimiento al aumentar el tiempo de inmersión (rho Sp: -1.0, $p < 0.05$).

Sin embargo, al utilizar el gel de quitosano al 1%, no se evidenció crecimiento en ninguno de los tiempos de inmersión.

De igual forma al utilizar el gel de quitosano a diferentes concentraciones 1%, 0.50%, 0.25%, 0.125%, no se evidenció crecimiento en ninguno de los tiempos de inmersión.

Tabla 5. Inmersión del fruto en agua ácida

Inmersión del fruto en agua ácida - Recuento de levaduras por cm ²					
Tiempo de exposición de una sola muestra	Agar Sb Colonias Replica 1	Agar Sb Colonias Replica 2	Agar Sb Colonias Replica 3	promedio de 3 replicas	control agua destilada
1 minuto	108	99	104	103,6	609
2 minuto	89	76	79	81,3	629
3 minutos	80	75	74	76,3	808
4 minutos	65	69	62	65,3	856
5 minutos	55	52	48	51,6	938
6 minutos	40	45	39	41,3	1039
7 minutos	39	35	34	36	1083
8 minutos	25	21	24	23,3	1117
9 minutos	21	19	24	21,3	1199
10 minutos	20	18	19	19	1238
11 minutos	20	16	15	17	1315
12 minutos	20	15	15	16,6	1359
13 minutos	15	12	15	14	1412

3.6.2 Recuento de colonias de levaduras en el transcurso del tiempo, desde el minuto 1 hasta el minuto 13.

No se observó crecimiento de levaduras en los diferentes tiempos de inmersión del fruto de “camu camu” en el gel de quitosano al 1% que fueron señalados (Anexo 3, Tabla 7).

5. DISCUSION

El presente estudio determinó el uso potencial del gel de β - quitosano al 1% como inhibidor de crecimiento de levaduras en la superficie del fruto de “camu camu”, con el fin de mejorar las condiciones de almacenamiento y estabilidad del producto. Se evaluó la pérdida de peso de frutos tratados con gel de β - quitosano al 1% y frutos sin tratamiento. Los resultados sugieren una menor pérdida de peso en los frutos tratados en comparación con los no tratados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Con estos resultados se comprueba lo mencionado en el artículo realizado por (Salvador A, et al., 2003), donde se confirmó la propiedad de mantener la menor pérdida de peso y firmeza en frutos relacionados tales como; fresa, mango, piña, etc. Y que la mayor efectividad se encuentra en los frutos con tratamiento a diferencia del control⁴⁵. Por otro lado se realizó una evaluación organoléptica de los frutos de “camu camu” tratados con gel de β - quitosano al 1% por un lapso de cinco días. Los resultados evidenciaron una mejor conservación en términos de color, consistencia y olor, en comparación con frutos no tratados. Es importante mencionar, que la formación del gel de β - quitosano al 1% se confirmó visualmente por la formación de una película con brillo sobre el fruto “camu camu”, aunque se recomienda realizar la observación mediante un microscopio de barrido, para ver la formación del cobertor. Otros estudios han demostrado que el quitosano involucra una ralentización del desarrollo microbiano en la superficie mejorando la tasa de respiración y obteniendo frutos con mayor firmeza, consistencia y características nutritivas^{24,25}.

Esta investigación fue realizada en diferentes estaciones del año, iniciando en noviembre del 2016 hasta agosto del 2017 en la cual, solamente se ha encontrado y aislado dos diferentes especies de levaduras presentes en la superficie del fruto de “camu camu”; *Trichosporum mucoide* y *Candida zeylanoides*, siendo esta última cepa también reconocida e identificada por E. Flores (2015).

De igual manera se evaluó la capacidad de inhibición del gel β – quitosano sobre las dos levaduras aisladas de la superficie del fruto de “camu camu” y

para ello se utilizó gel de β – quitosano a distintas concentraciones (1%, 0.50%, 0.25%, 0.125%). No observándose crecimiento de cepas de levaduras, en ninguna de las concentraciones utilizadas, notando que existe un gran rango de inhibición de estas levaduras y que la mínima inhibición encontrada para *Trichosporum mucoide* y *Candida zeylanoides* fue de 0.125%. Los resultados de inhibición de la cepa aislada *Candida zeylanoides* en β – quitosano al 0.5% en ácido acético, fueron corroborados frente a los estudios realizados por E. Flores (2015) donde indica que la cepa *Candida zeylanoides* presenta un porcentaje de inhibición del 100 % en quitosano al 0.5 % en ácido acético¹⁸. Así mismo (Ramos M, Bautista S. et al., 2010) menciona el uso de distintas concentraciones de quitosano para reportar su efecto fungicida en el control poscosecha de distintos frutos⁴⁹. La efectividad antimicrobiana del quitosano y la mínima inhibición, depende del tipo de estructura que tenga, puede ser; α (Alfa), β (Beta), y (Gamma). Además, el grado de desacetilación, tamaño molecular, protonación de los grupos aminos y polimerización de la estructura^{2,46}

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de colonias de levaduras mediante el uso de la técnica de recuento en placa a diferentes tiempos. No evidenciándose crecimiento de colonias en ninguno de los tiempos de inmersión del fruto en el gel de β – quitosano al 1% a pH 5. Por otro lado, tenemos la inmersión realizada en agua ácida al 1% a pH 5, donde sí obtuvimos resultados que evidenciaron que el uso únicamente del ácido acético disminuye el crecimiento microbiano al aumentar el tiempo de inmersión. Y por último, al realizar la inmersión del fruto en el gel de β – quitosano al 1% a pH 5 pero esta vez evaluándolo a través del tiempo para ver si concentra microorganismos en el gel, los resultados obtenidos no evidenciaron crecimiento de colonias en ninguno de los tiempos de inmersión. Tales resultados sugieren el potencial uso inhibitorio que tiene el gel de β – quitosano. Una de las principales razones por las que el β – quitosano posee esta característica es la presencia de un grupo amino con carga positiva, el cual se cree que interactúa con los fosfolípidos con cargas negativas presentes en la superficie de la pared celular de las levaduras²⁶⁻²⁸. Esta interacción genera la lisis y pérdida de compuestos proteicos y componentes

intracelulares. Es importante recalcar que este mecanismo de acción aún no es conocido²⁶⁻²⁸.

Sumado a esto, se ha reconocido las propiedades del quitosano como ligando selectivo a metales y la posterior inhibición de toxinas²⁹. También se han reconocido otras propiedades tales como: capacidad de inhibición de síntesis de ARN mensajero e impedimento de la traducción celular y síntesis de proteínas³⁰. Por tal razón, el β – quitosano es un biopolímero con actividad antifúngica que se presenta como una alternativa natural, brindando mayor tiempo de vida útil al fruto.

En la actualidad, los agricultores se han visto en la necesidad de utilizar plaguicidas en sus cultivos, los cuales poseen una gran capacidad de bioacumulación en la cadena trófica y escasa biodegradabilidad, exponiendo a la población a una serie de químicos nocivos para la salud. Es por ello que liberar el plaguicida encapsulado con geles de quitosano y que este pueda biodegradarse, implica un avance importante en la conservación del medio ambiente⁵¹. Su liberación de forma controlada, es uno de los grandes retos del siglo XXI⁵¹.

En el Perú, todas las industrias camaroneras generan gran cantidad de residuos, los cuales causan un gran impacto ambiental negativo. Estos residuos contienen quitina, materia prima utilizada para la obtención del quitosano^{38,40}. Investigaciones realizadas por (Jamab MS 2009; Burt S. 2004) resaltan el beneficio de conocer las diversas opciones y utilidades que nos brinda la quitina y el quitosano, lo cual nos permite su uso en la agricultura contra el deterioro o pérdida total de los frutos postcosecha, por causa del incremento de las levaduras^{38,40}.

En el análisis de la pérdida fisiológica de peso, según metodología, se realizó la inmersión del fruto solamente en el gel de β – quitosano al 1% a pH 5. Adicionalmente se debió haber abarcado las otras tres concentraciones utilizadas en el estudio de investigación (0.50%, 0.25%, 0.125%), ya que sería muy útil saber cómo se comportan estos cobertores con respecto al peso. Es por ello que se recomienda que futuras investigaciones trabajen con las cuatro concentraciones y evalúen tanto características organolépticas, como la

pérdida fisiológica del peso. De igual manera es preciso mencionar, que la evaluación organoléptica debe realizarse mediante un panel de catadores entrenados, una limitación en este estudio, fue que las características organolépticas sólo fueron evaluadas por el investigador. Además de esto, es necesario definir el grado de maduración del fruto no sólo visualmente como se realizó, sino determinándolo mediante la escala Brix.

Asimismo es recomendable que futuras investigaciones conozcan el tamaño del polímero β – quitosano a utilizar en la inhibición de las levaduras, ya que influye en la efectividad antimicrobiana del quitosano.

La industria de producción de “camu camu” en el Perú se presenta como una alternativa rentable por la disponibilidad de mercado y relativa facilidad de crecimiento. Por ello, tiene el potencial de convertirse en un fruto nativo con gran potencial económico en la Amazonía peruana⁴¹. La implementación del uso de quitosano como alternativa natural para la preservación del producto, traería consigo mejoras en la producción con un mayor desarrollo comercial y posibilidad de mayor desarrollo industrial e impacto social en las comunidades.

El presente estudio deja cimientos para futuras investigaciones ya que los datos obtenidos se pueden extrapolar. Se recomienda en base a estos resultados usar una muestra de “camu camu” mucho más grande para la realización de un proyecto piloto y de esta manera proseguir con la investigación.

6. CONCLUSIONES

1. El uso del gel de β – quitosano al 1% sobre el fruto de “camu camu” permitió una mejor conservación y mantenimiento de las características organolépticas hasta por 5 días, en comparación con los frutos sin tratamiento.
2. Se aislaron e identificaron *Candida zeylanoides* y *Trichosporum mucoide* como levaduras presentes en la superficie del fruto entero de “camu camu”
3. El uso de gel de β – quitosano al 1% impidió el desarrollo de *Candida zeylanoides* y *Trichosporum mucoide* por diferentes tiempos (una sola muestra) desde el minuto 1 hasta el minuto 13, en comparación con los frutos no tratados.
4. El uso de gel de β – quitosano inhibió por completo el crecimiento de *Candida zeylanoides* y *Trichosporum mucoide* a diferentes concentraciones 0.125%, 0.25%, 0.5% y 1%, en comparación con los frutos controles.
5. El uso del gel de β – quitosano al 1% en el transcurso del tiempo, impidió el desarrollo de *Candida zeylanoides* y *Trichosporum mucoide* en los diferentes tiempos (trece muestras) de inmersión desde 1 minuto hasta 13 minutos, en comparación con los frutos sin tratamiento.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato MA, Rivero-González D, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosano en microorganismos fitopatógenos. Revista Chapingo serie Horticultura 2009; 15: 307-317.
2. Villanueva-Tiburcio J, Condezo-Hoyos L, Ramirez E. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). Food Science and Technology. 2010; 30(Suppl. 1), 151-160.
3. Rodríguez A, Ramírez M, Rivero D, Bosquez E, Barrera L, Bautista S. Propiedades Químico–Estructurales y actividad Biológica de la Quitosana en microorganismos Fitopatógenos. Revista Chapingo serie Horticultura. 2009; 15(3): 307-317.
4. Hernández M, Barrera J. Camu camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-Sinchi (Primera edición) Bogotá: Editorial: Legis S.A Colombia; 2015: 162p.
5. Hirano S. Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials. Polymer International. 1999; 48, 732-734.
6. Instituto del Mar del Perú. Bioecología y pesquería del recurso pota *Dosidicus gigas* en la costa norte del Perú. [Internet]. 2009. [citado el 15 de Set. de 2017]. Disponible en: http://www.imarpe.gob.pe/paita/conferencias/pota_paita09.pdf
7. Muzzarelli C. Muzzarelli RAA. Chitin related food science today (and two centuries ago). Agro Food Industry Hi-Tech. 2003; 14(5), 39-42.
8. Sahoo S, Board R, Roller S. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganism in chilled pork products. Food Microbiology 2002; 19,175C82.
9. Ayala G. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. ScientiaAgroalimentaria. 2015;32-38

10. FAO. Fichas técnicas: productos frescos de frutas. [Internet] [citado el 15 de Set. de 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-au173s.pdf>
11. Ramírez MA, Cabrera G, Gutiérrez A, Rodríguez T. Metodología de obtención de quitosana a bajas temperaturas a partir de quitina de langosta. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Cuba. Cultivos Tropicales. 2000; vol. 21, 81-84p.
12. Bautista Baños S, Hernández López M, Guillén Sánchez D, Tejacal IA. Influencia del recubrimiento con quitosano y la temperatura de almacenamiento en la calidad postcosecha y niveles de infección en la ciruela mexicana. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. [Internet]. 2006. [citado el 15 de Set. de 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/813/81370207.pdf>
13. DeCapdeville G, Wilson CL, Beer SV, Aist JR. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested red delicious apple fruit. *Phytopathology*. 2002; 92(8):900-8.
14. Romanazzi G, Nigro F, Ippolito A, Venere D, Salerno M. 2002. Effects of preC and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*. 2002; Vol. 67, Nr. 5.
15. Cantón E, Martín E, Espinel A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de sensibilidad a los anti fúngicos. Revista Iberoamericana de Micología [Internet]. 2007. [citado el 15 de Set. de 2017]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
16. Rabea M, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003; 4 (6), pp1457-1465.
17. Yuyama K, Aguiar J, Yuyama L. Camucamu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amazónica*. 2002; 32(1):169-174.
18. Flores Espinoza ME. Inhibición de levaduras de camu-camu (*Myrciariadubia* H.B.H Mc. Vaugh) por geles de quitosano al 0.5%. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
19. Vargas M, Pastor C, Chiralt A, McClements DJ, González-Martínez C. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally-processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008; 28, 496-511.

20. Vargas M, Albors A, Chiralt A, González-Martínez C. Application of Chitosan Methylcellulose Edible Coatings to Strawberry Fruit. En: Proceedings of the IUFOST 2006-13th World Congress of Food Science & Technology. Food is Life. 2006; 389-390.
21. Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. Estudio preliminar del uso de recubrimientos de quitosano y de microorganismos eficaces en el control postcosecha de la podredumbre azul de las naranjas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 2007; 1415-1423.
22. Perdones A, Cháfer M, González-Martínez C, Chiralt A, Vargas, M. Aplicación de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón en fresones. Jornadas de la Cátedra Fomesa. Universidad Politécnica de Valencia. 2010.
23. Du J, Gemma H, Iwahori, S. Effects of chitosan on the storage of peach, japanese pear and kiwifruit. Journal of the Japanese Society of Horticultural Science. 1997; 66(1), 15-22.
24. Li H, Yu T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. Journal of The Science of Food and Agriculture. 2000; 81-269.
25. Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, Wilson, CL. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection. 2003; 22, 1087-1092.
26. Chen CS, Liau WY, Tsai GJ. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. Journal of Food Protection. 1998; 61, 1124–1128.
27. Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YL. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology. 1999; 10, 37-51.
28. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 2003; 4, 1457–1465.

29. Cuero RG, Osuji G, Washington A. Ncarboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zink. *Biotechnology Letters*. 1991; 13, 441-444.
30. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial Action of Chitosan *Food Biotechnology*. 1992; 6, 257- 272.
31. Hernandez-Lauzardo AN, Bautista-Banos S, Velazquez-del Valle MG, Mendez-Montealvo MG, Sanchez-Rivera MM; Bello-Perez, LA. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*. 73, 541–547. 2008
32. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*. 2001; 44, 71-76.
33. Prapagdee B, Kotchadat K, Kumsopa A, Visarathanonth N. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Bioresource Technology*. 2007; 98(1), 1353-1358.
34. Rodríguez A, Ramírez M, Cárdenas RM, Rodríguez A, Bautista Baños S. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de Plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pycularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2006; 24(1), 1-7.
35. Van SN, Minh HD, Anh DN. Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in greenhouse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2013; 2(4), 289-294.
36. HadwigeR LA. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Science*. 2013; 208, 42-49.
37. Badui DS. *Química de los Alimentos*. 4 ed. México: Pearson; 2006.
38. Jamab MS, Niazmand R. Effect of essential oil of *Mentha piperita* and *Ziziphora clinopodioides* on *Lactobacillus acidophilus* activity as bioyogurt starter culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sciences*. 2009; 6, 129-131.

39. Lemay MJ, Choquette J, Delaquis PJ, Claude G, Rodrigue N, Saucier L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 78, 217- 226.
40. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94, 223-253.
41. Imán C, Melchor F. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia*. *Scientia Agropecuaria*. 2011; 2 (4): 289-201.
42. CODEX ALIMENTARIUS. Normas internacionales de los alimentos. CODEX STAN 192-1995 Cuadro III. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org>
43. Contreras A, Pérez B, Salvador A, Bermejo A, Rojas C. Physico-Chemical, Sensory and nutritional quality of oranges cv. Valencia coated with chitosan. *Centro de Tecnología Postcosecha, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* 46:441-453. 2012.
44. Rodríguez A, Ramírez M, Rivero D, Bosquez E, Bautista S. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(3), 307-317. 2009.
45. Salvador A, Cuquerella J, Monterde A. Efecto del quitosano aplicado como recubrimiento en mandarinas fortune. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 2003.
46. Valenzuela C, Arias J. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias* V27 N° 1 2012.
47. Ramos M, Bautista S, et al. Antimicrobial Compounds Added in Edible Coatings for Use in Horticultural Products. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2010.
48. López L. et al. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Revista. Chapingo Serie Horticultura* 19(13):315-331, 2013.

49. Ramos M, Bautista S, Troncoso R, Bosquez E, Alía I, et al. Papaya Postharvest Handling in México: Use of chitosan and Isothiocyanates to control postharvest diseases. Global Science Books. 2010.
50. Mármol z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, et al. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Revista Tecnocientífica URU. 2011
51. Lugo E, García C y Ruelas R. Nanotechnology and nanoencapsulation of pesticides. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable Ra Ximhai Vol. 6. Número 1, pp. 63-67. 63. 2010.
52. Mariné A, y Vidal M. Seguridad y riesgo de toxicidad de los Alimentos: Un debate actual. Arbor CLXVIII, 661 43-63 pp. 2001.
53. Cuizano N, Llanos B, Díaz C, Jacinto C, Medina R , et al. Estudio de la biosorción de cromo (vi) con quitosano cuaternario reticulado para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas. Rev Soc Quím Perú. 79 (4) 2013

8. ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO 1

Preparación de geles de quitosano con ácido acético

Se preparó cuatro diferentes concentraciones de geles quitosano:

- Gel quitosano al 1% con ácido acético
- Gel quitosano al 0.5% con ácido acético
- Gel quitosano al 0.25% con ácido acético
- Gel quitosano al 0.125% con ácido acético

Preparación del gel de quitosano al 1% con ácido acético

La técnica que se utilizó para la preparación del gel de quitosano fue estandarizada en el Laboratorio de Biominería y Medio Ambiente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La materia prima es la quitina de la pluma de pota del Dosidicus gigas, a partir de la cual se obtuvo el quitosano por procesos de desacetilación térmica alcalina, el cual luego mediante un proceso de hidratación se convirtió en gel utilizando ácido acético.

Para la preparación del gel de quitosano al 1% con ácido acético, se pesó 10 g de quitosano pulverizado y se mezcló con cantidad de agua destilada estéril suficiente para su hidratación por 30 minutos con posterior adición del ácido acético. Esta preparación tiene que ser con agitación constante por 3 horas a temperatura ambiente, hasta obtener un gel claro, homogéneo y transparente. Los geles de quitosano se mantienen a temperatura ambiente. El pH final del gel de quitosano fue de 5.

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$X \times 99.5 = 1000 \times 1\%$$

$$X = 1000 / 99.5 = 10ml \text{ De ácido acético}$$

Preparación del gel de quitosano al 0.5% con ácido acético

El quitosano ya preparado al 1% fue diluido al 0.5%, para ello sé tomo 50 ml de la solución de quitosano al 1% y se completó con agua destilada el volumen final de 100 ml.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \times X = 0.5 \times 100$$

$$X = 50 \text{ ml De agua destilada}$$

Preparación del gel de quitosano al 0.25% con ácido acético

El quitosano ya preparado al 1% fue diluido al 0.25%, para ello sé tomo 25 ml de la solución de quitosano al 1% y se completó con agua destilada el volumen final de 100 ml.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \times X = 0.25 \times 100$$

$$X = 25 \text{ ml De agua destilada}$$

Preparación del gel de quitosano al 0.125% con ácido acético

El quitosano ya preparado al 1% fue diluido al 0.125%, para ello sé tomo 12.5 ml de la solución de quitosano al 1% y se completó con agua destilada el volumen final de 100 ml.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

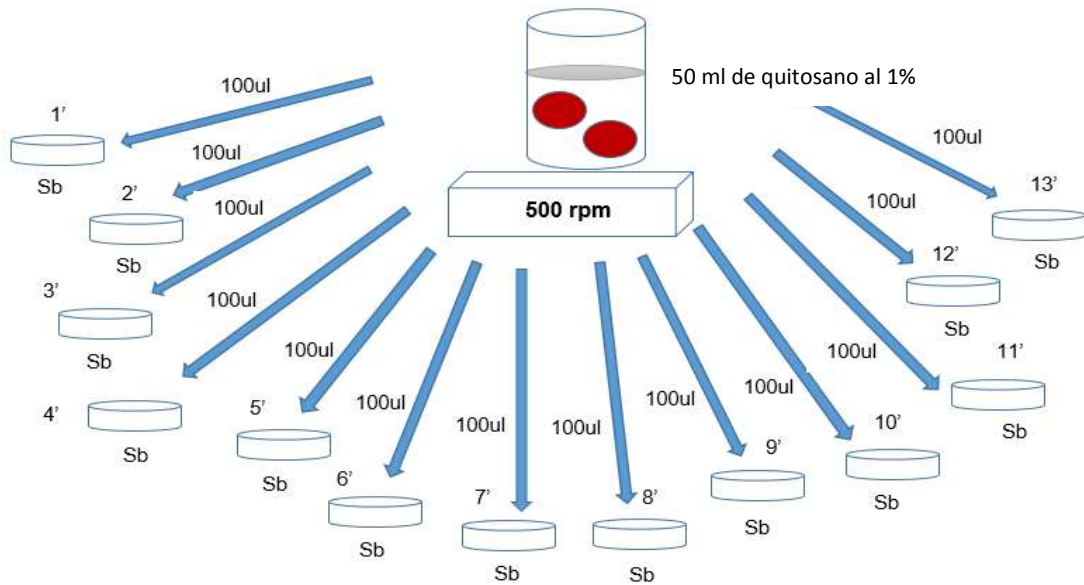
$$1 \times X = 0.125 \times 100$$

$$X = 12.5 \text{ ml De agua destilada}$$

ANEXO 2

ESQUEMA 1

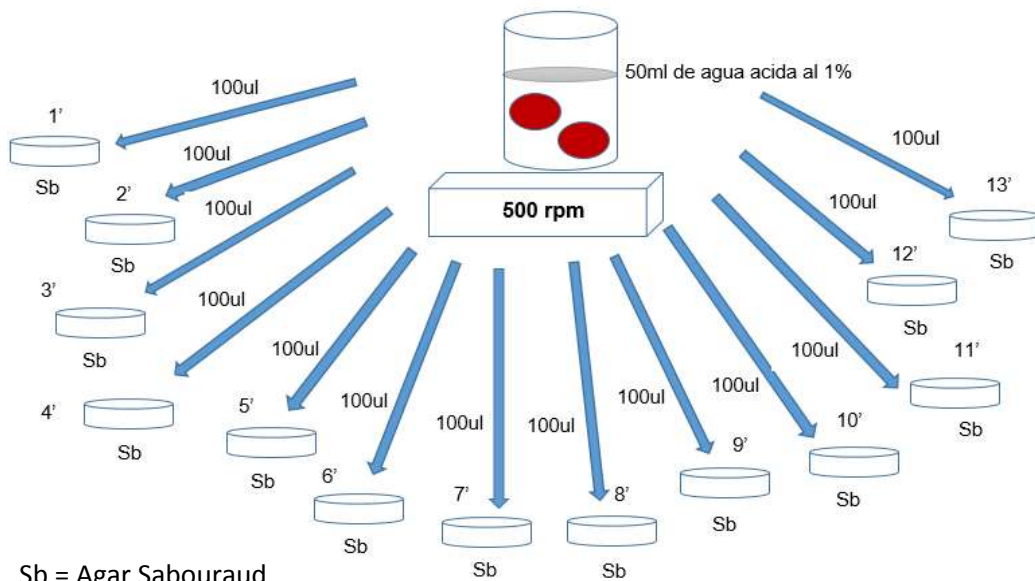
Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en gel quitosano al 1% en ácido acético a pH 5



Sb = Agar Sabouraud

ESQUEMA 2

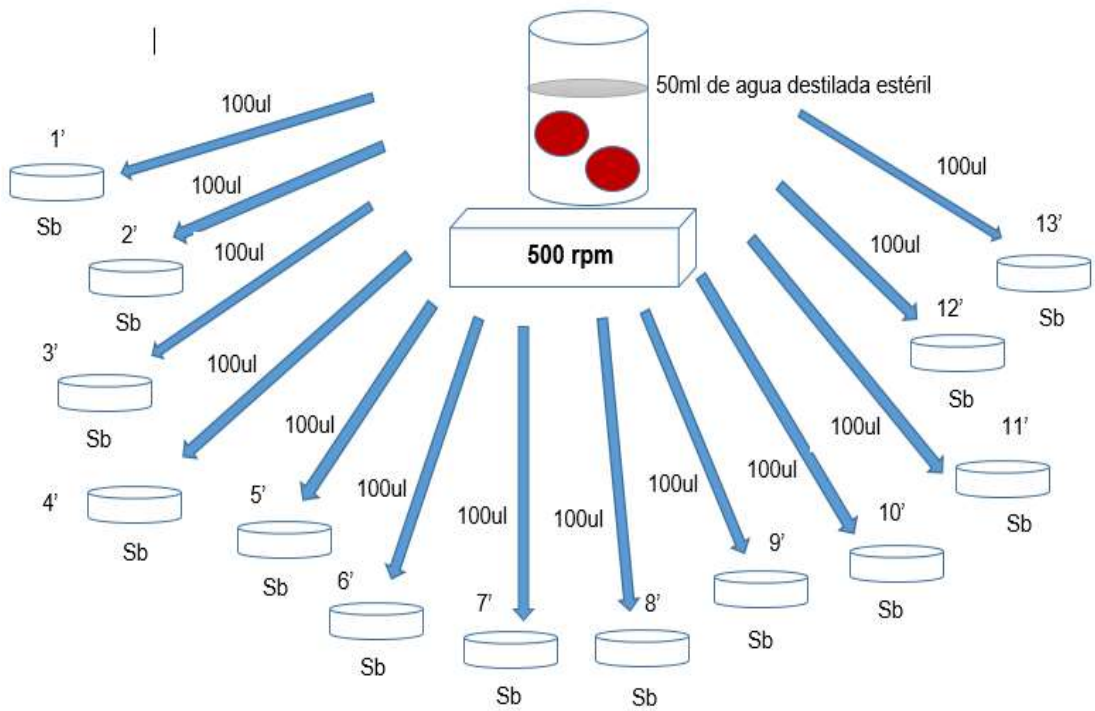
Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en agua ácida a pH 5



Sb = Agar Sabouraud

ESQUEMA 3

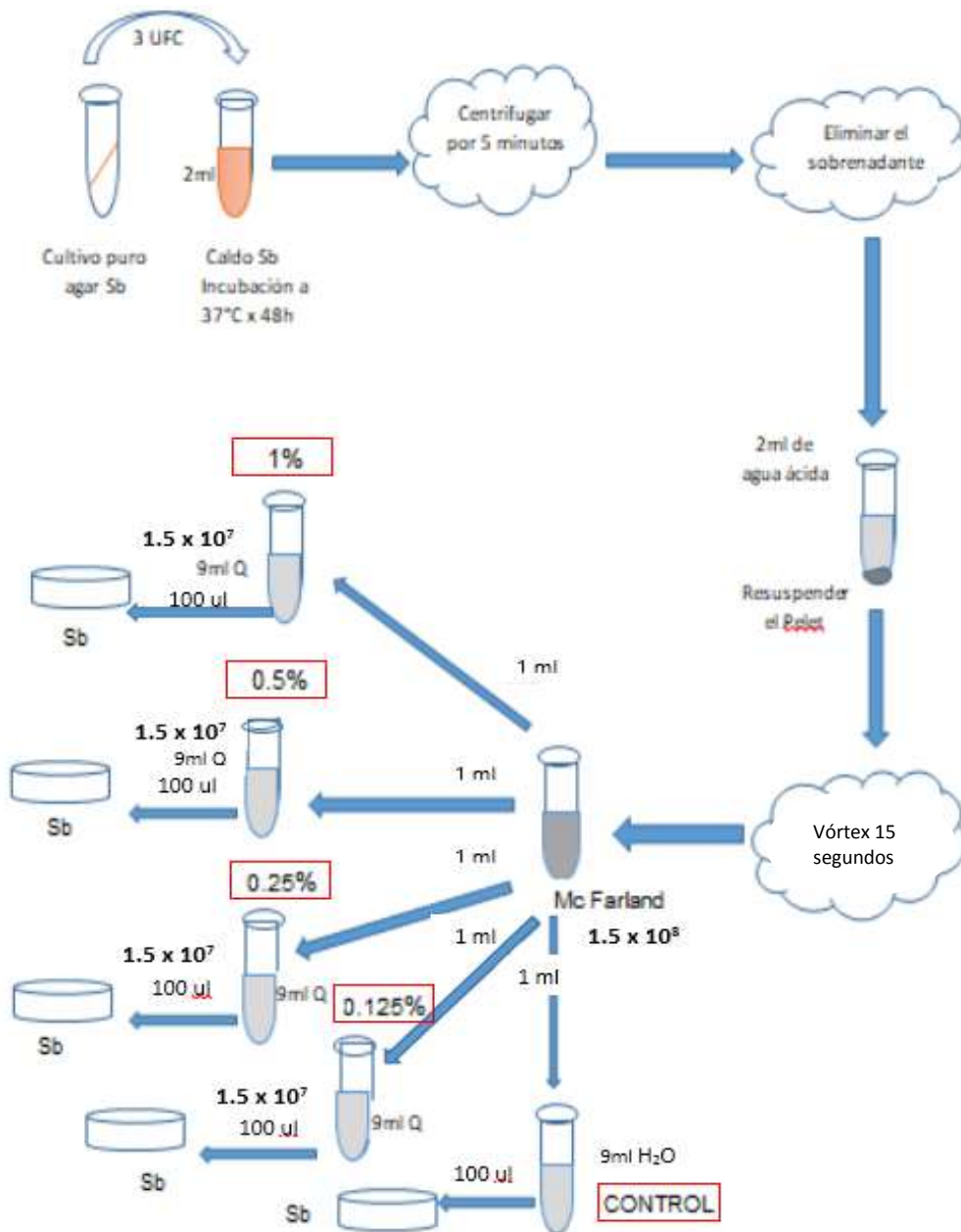
Técnica de Inmersión del fruto de “camu camu” en agua destilada estéril



Sb = Agar Sabouraud

ESQUEMA 4

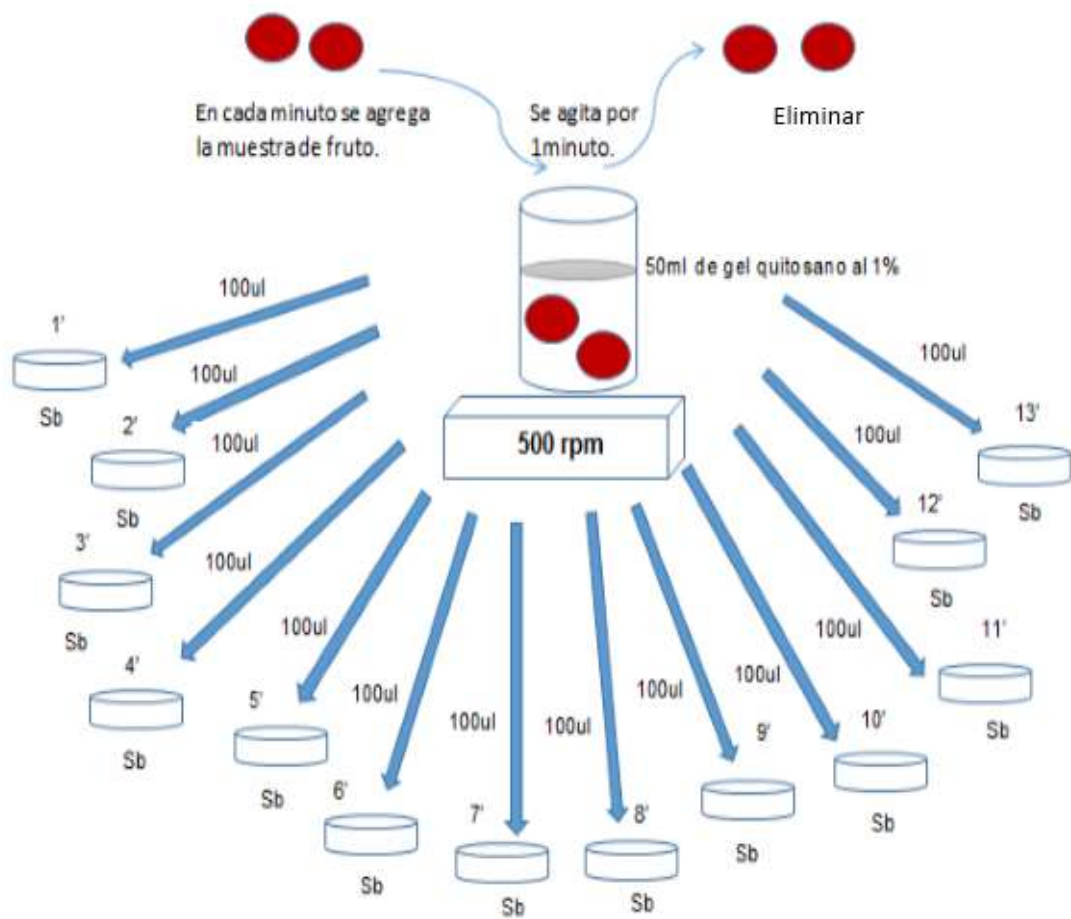
Exposición de levaduras a diferentes concentraciones del gel de quitosano al 1%, 0.50%, 0.25%, 0.125%



Sb = Agar Sabouraud

ESQUEMA 5

Inmersión del fruto de “camu camu” y Crecimiento de microorganismos en el gel de quitosano al 1% en ácido acético a pH 5 en el transcurso del tiempo



Sb = Agar Sabouraud

ANEXO 3

Tabla 1. PESO DEL FRUTO SIN TRATAMIENTO (CONTROL)

Peso del fruto sin tratamiento.						
Número de muestra	Peso de la Muestra (g)					
	Tiempo 0 horas	Tiempo 24 horas	Tiempo 48 horas	Tiempo 72 horas	Tiempo 96 horas	Diferencia 0h-96h
1	5,45	5,29	5,09	5,00	4,91	0,54
2	6,21	6,06	5,78	5,66	5,54	0,67
3	5,40	5,26	5,02	4,91	4,79	0,61
4	6,03	5,87	5,61	5,51	5,40	0,63
5	7,27	7,09	6,83	6,67	6,55	0,72
6	5,67	5,53	5,31	5,19	5,10	0,57
7	5,38	5,24	5,02	4,93	4,83	0,55
8	6,46	6,31	6,03	5,93	5,82	0,64
9	6,29	6,13	5,89	5,82	5,70	0,59
10	7,21	7,03	6,78	6,63	6,50	0,71
11	5,98	5,83	5,63	5,50	5,40	0,58
12	5,49	5,35	5,14	5,02	4,92	0,57
13	6,19	6,03	5,79	5,64	5,53	0,66

Tabla 2. PESO DEL FRUTO CON TRATAMIENTO DEL GEL DE QUITOSANO

Peso del fruto con tratamiento del gel de quitosano						
Número de muestra	Peso de la Muestra (g)					
	Tiempo 0 horas	Tiempo 24 horas	Tiempo 48 horas	Tiempo 72 horas	Tiempo 96 horas	Diferencia 0h-96h
1	7,22	7,13	7,02	6,94	6,87	0,35
2	5,42	5,34	5,24	5,15	5,08	0,34
3	5,38	5,32	5,24	5,18	5,14	0,24
4	5,62	5,57	5,48	5,44	5,42	0,2
5	5,32	5,30	5,11	5,14	5,12	0,2
6	6,03	6,00	5,88	5,80	5,74	0,29
7	7,27	7,20	7,06	6,95	6,85	0,42
8	6,89	6,85	6,75	6,66	6,59	0,3
9	7,20	7,14	7,03	6,98	6,93	0,27
10	7,65	7,58	7,49	7,39	7,33	0,32
11	5,21	5,17	5,04	4,95	4,88	0,33
12	6,19	6,13	5,98	5,86	5,76	0,43
13	5,38	5,34	5,22	5,15	5,11	0,27

Tabla 3. PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DEL FRUTO DE “CAMU CAMU”

Pérdida de porcentaje de peso del fruto sin tratamiento				Pérdida de porcentaje de peso del fruto con tratamiento			
Peso de la muestra en gramos				Peso de la muestra en gramos			
Muestra	Tiempo 0 horas	Tiempo 96 horas	% de perdida	Muestra	Tiempo 0 horas	Tiempo 96 horas	% de perdida
1	5,45	4,91	10	1	7,22	6,87	5
2	6,21	5,54	11	2	5,42	5,08	6
3	5,40	4,79	11	3	5,38	5,14	4
4	6,03	5,40	10	4	5,62	5,42	4
5	7,27	6,55	10	5	5,32	5,12	4
6	5,67	5,10	10	6	6,03	5,74	5
7	5,38	4,83	10	7	7,27	6,85	6
8	6,46	5,82	10	8	6,89	6,59	4
9	6,29	5,70	9	9	7,20	6,93	4
10	7,21	6,50	10	10	7,65	7,33	4
11	5,98	5,40	10	11	5,21	4,88	6
12	5,49	4,92	10	12	6,19	5,76	7
13	6,19	5,53	11	13	5,38	5,11	5
		promedio	10			promedio	5

Tabla 4. TÉCNICA DE INMERSIÓN DEL FRUTO EN GEL DE QUITOSANO AL 1% CON ÁCIDO ACÉTICO.

Inmersión del fruto en gel de quitosano al 1% con ácido acético				
Tiempo de exposición de una sola muestras	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 1	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 2	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 3	control agua destilada Recuento x cm²
Tiempo 1 minuto	SC	SC	SC	609
Tiempo 2 minutos	SC	SC	SC	629
Tiempo 3 minutos	SC	SC	SC	808
Tiempo 4 minutos	SC	SC	SC	856
Tiempo 5 minutos	SC	SC	SC	938
Tiempo 6 minutos	SC	SC	SC	1039
Tiempo 7 minutos	SC	SC	SC	1083
Tiempo 8 minutos	SC	SC	SC	1117
Tiempo 9 minutos	SC	SC	SC	1199
Tiempo 10 minutos	SC	SC	SC	1238
Tiempo 11 minutos	SC	SC	SC	1315
Tiempo 12 minutos	SC	SC	SC	1359
Tiempo 13 minutos	SC	SC	SC	1412

***SC=sin crecimiento**

Tabla 5. TÉCNICA DE INMERSIÓN DEL FRUTO EN AGUA ÁCIDA A PH 5

Inmersión del fruto en agua ácida - Recuento de levaduras por cm ²					
Tiempo de exposición de una sola muestra	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 1	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 2	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 3	promedio de 3 replicas	control agua destilada
Tiempo 1 minuto	108	99	104	103,6	609
Tiempo 2 minuto	89	76	79	81,3	629
Tiempo 3 minutos	80	75	74	76,3	808
Tiempo 4 minutos	65	69	62	65,3	856
Tiempo 5 minutos	55	52	48	51,6	938
Tiempo 6 minutos	40	45	39	41,3	1039
Tiempo 7 minutos	39	35	34	36	1083
Tiempo 8 minutos	25	21	24	23,3	1117
Tiempo 9 minutos	21	19	24	21,3	1199
Tiempo 10 minutos	20	18	19	19	1238
Tiempo 11 minutos	20	16	15	17	1315
Tiempo 12 minutos	20	15	15	16,6	1359
Tiempo 13 minutos	15	12	15	14	1412

**Tabla 6. EXPOSICIÓN DE LEVADURAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DEL GEL QUITOSANO AL 1% CON ÁCIDO ACÉTICO**

EXPOSICIÓN DE LEVADURAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL GEL QUITOSANO AL 1% CON ACIDO ACETICO					
Grupos Concentración 1,5x10⁸ UFC/ml	Volumen	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 1	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 2	Agar Sabouraud glucosado Colonias Replica 3	control agua destilada Recuento x cm²
1%	100 ul	SC	SC	SC	609
	100 ul	SC	SC	SC	629
	100 ul	SC	SC	SC	808
0,50%	100 ul	SC	SC	SC	856
	100 ul	SC	SC	SC	938
	100 ul	SC	SC	SC	1039
0,25%	100 ul	SC	SC	SC	1083
	100 ul	SC	SC	SC	1117
	100 ul	SC	SC	SC	1199
0,125%	100 ul	SC	SC	SC	1238
	100 ul	SC	SC	SC	1315
	100 ul	SC	SC	SC	1359

***SC=sin crecimiento**

Tabla 7. Inmersión del fruto camu camu y crecimiento de microorganismos en gel quitosano al 1% en ácido acético a pH 5 en el transcurso del tiempo

INMERSIÓN DEL FRUTO CAMU CAMU Y CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN GEL QITOSANO AL 1% EN EL TRANSCURSO DEL TIEMPO													
Tiempo de exposición de las diferentes muestras	1 Inmersión	2 Inmersión	3 Inmersión	4 Inmersión	5 Inmersión	6 Inmersión	7 Inmersión	8 Inmersión	9 Inmersión	10 Inmersión	11 Inmersión	12 Inmersión	13 Inmersión
1 minuto	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
2 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
3 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
4 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
5 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
6 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
7 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
8 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
9 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
10 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
11 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
12 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
13 minutos	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC

*SC=sin crecimiento

ANEXO 4

FOTOGRAFIA 1

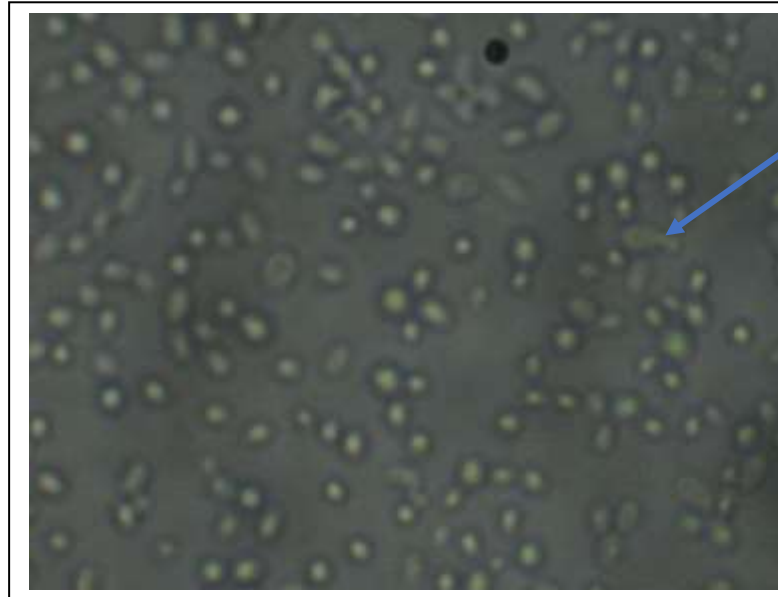
PROCEDIMIENTO PARA HALLAR EL ÁREA SUPERFICIAL DEL FRUTO CAMU CAMU



FOTOGRAFIA 2

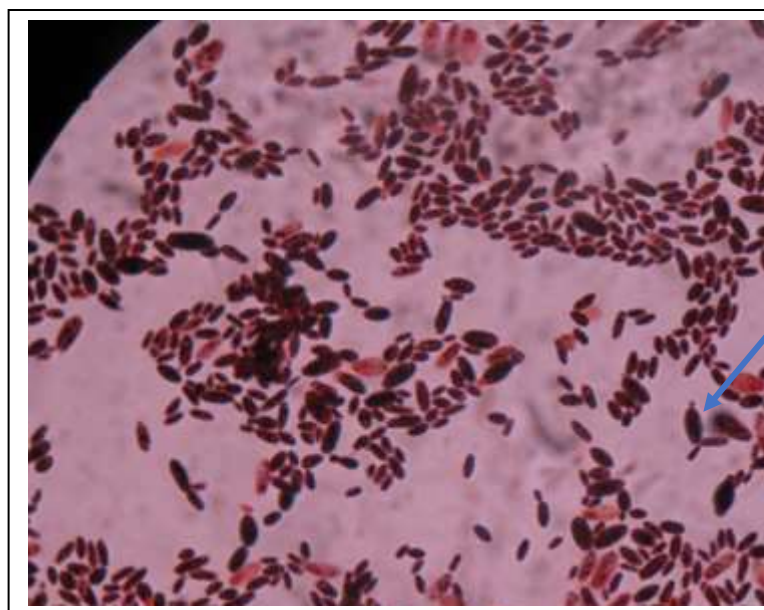
OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA MICROBIANA

Levaduras observadas con KOH al 10%



Levadura en
gemación

Levaduras observadas con la técnica de Gram.

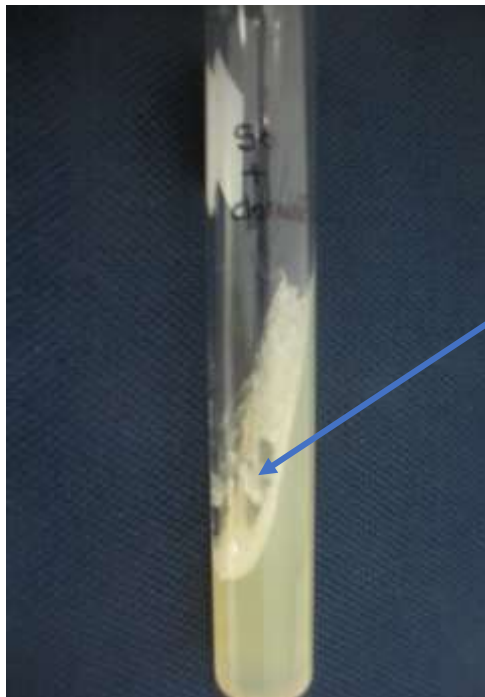


Levadura en
gemación

FOTOGRAFIA 3

CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS

Cultivo de levaduras en medio Sabouraud más cloranfenicol pH 5



Crecimiento de levaduras, aspecto cremoso, color blanquecino.

FOTOGRAFIA 4

CARACTERIZACIÓN BIOQUIMICA DE LAS LEVADURAS

Resultados muestran un claro predominio de la especie *Trichosporum mucoides* con un 96.1%, frente a un 2.2% de *Cryptococcus laurentii*

A

APIweb

API 20 C AUX V4.0

REFERENCIA: [] FECHA: 13/04/15

COMENTARIO: []

BUENA IDENTIFICACION

Galeria: API 20 C AUX V4.0

Perfil: 2577777

Nota:

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Trichosporon mucoides</i>	96.1	0.93	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.2	0.64	ARA 99% HYPH 25%

Resultados de las pruebas Bioquímicas realizadas con el método Api 20 C AUX

B

API 20 C AUX

REF: tubo 2 col 2

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

48 h

72 h

0 GEL GEL TRG ARA XYL ADO XLT GAL IND SCR MDG NAG CEL LAC MAL SAC TRE MLZ RAF

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

Ident. / Ταυτοποίηση :
T. mucoides 96.1%

Resultados muestran a la especie **Candida zeylanoides** con un **33.5 %** frente a un **58.9 %** de **Candida albicans 2**.

C

APIweb

API 20 C AUX V4.0

REFERENCIA: [] FECHA: 13/04/15

PERFIL DUDOSO

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Candida albicans 2	58.9	0.23	GLY 1% XLT 75% MAL 90% TRE 5%
Candida zeylanoides	33.5	0.18	XYL 0% GAL 1%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Candida tropicalis	3.7	0.07	GLY 9% ADO 99% MAL 99%

Resultados de las pruebas Bioquímicas realizadas con el método **Api 20 C AUX**

D

API 20 C AUX

REF: Tubal col 1

MIC CS+ Urea-

BIOMÉRIEUX

6	5	4	3	2	1	4	4
---	---	---	---	---	---	---	---

Ident. / Ταυτοποίηση:
Colb2 58.9%
C zeylanoides 33.5%

FOTOGRAFIA 5
PREPARACIÓN DEL GEL QUITOSANO



MEDICIÓN DEL pH DEL GEL QUITOSANO



FOTOGRAFIA 6

TÉCNICA DE INMERSIÓN DEL FRUTO CAMU CAMU



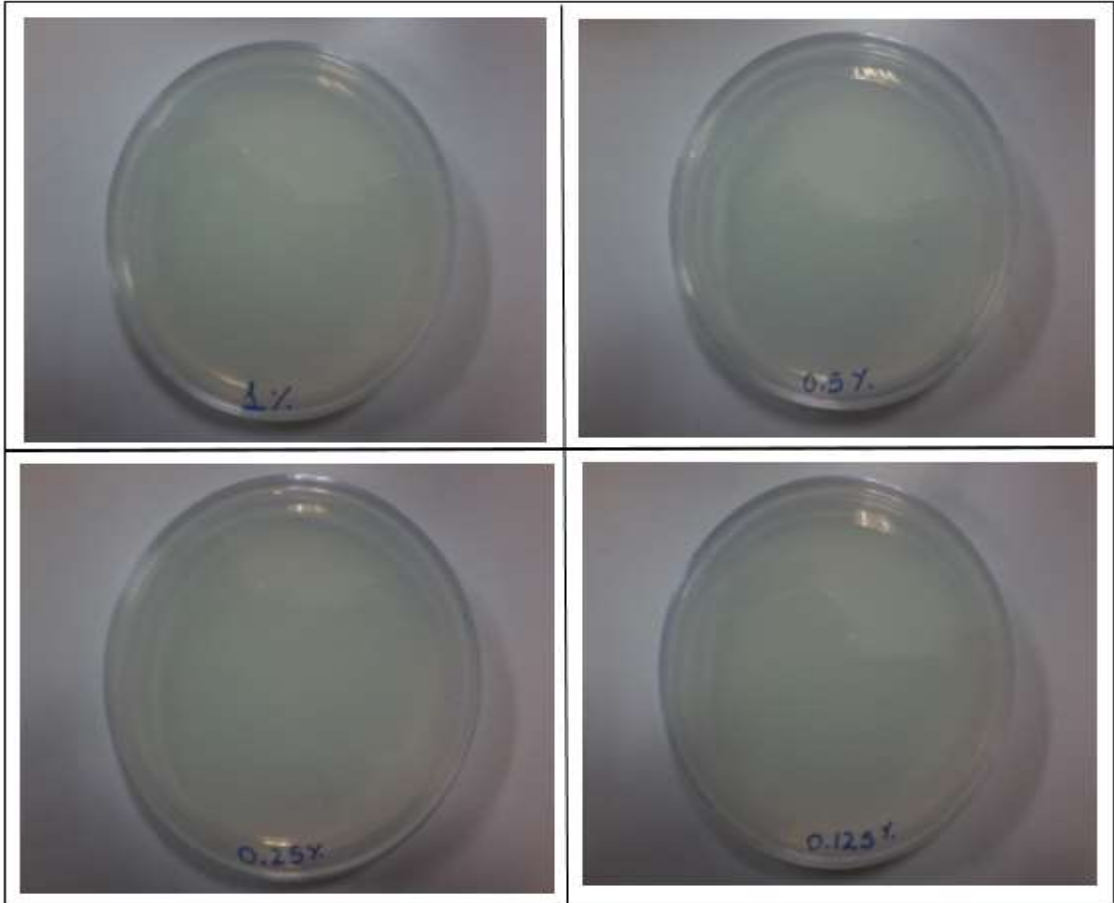
AGITADOR ORBITAL

DETERMINACIÓN FÍSICA Y ORGANOLEPTICA



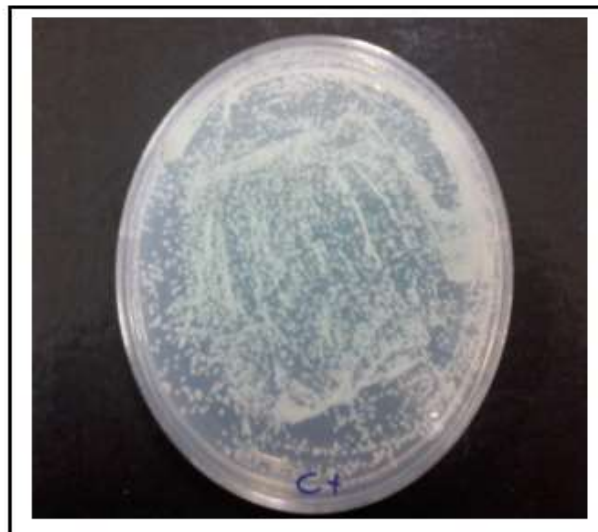
FOTOGRAFIA 7

EXPOSICIÓN DE LEVADURAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL GEL QUITOSANO AL 1%, 0.50%, 0.25%, 0.125%



FOTOGRAFIA 8

CRECIMIENTO DE LEVADURAS, CONTROL POSITIVO



ANEXO 5

Análisis estadístico

- a. Evaluación de los supuestos. Se describen aspectos importantes del diseño y presentación de salidas de Stata (gráficos, tablas, etc.) como imágenes pegadas en Word, en forma ordenada y entendible.

La variable dependiente **dif** es una variable de tipo numérica y es definida como la diferencia de peso en gramos de los frutos de camu camu desde el primer día hasta el quinto (P0-P96), es decir, es el peso perdido en gramos durante cada tratamiento. La variable **Tto** es una variable categórica dicotómica. La variable **Tto** fue creada para definir el uso del tratamiento. Se codificó 1 como uso de tratamiento y 0 como ausencia del mismo.

La variable **dif**, la variable dependiente, no sigue una distribución normal. Para demostrarlo se utilizó el comando: summarizedif, detail

```
. summ dif, d
```

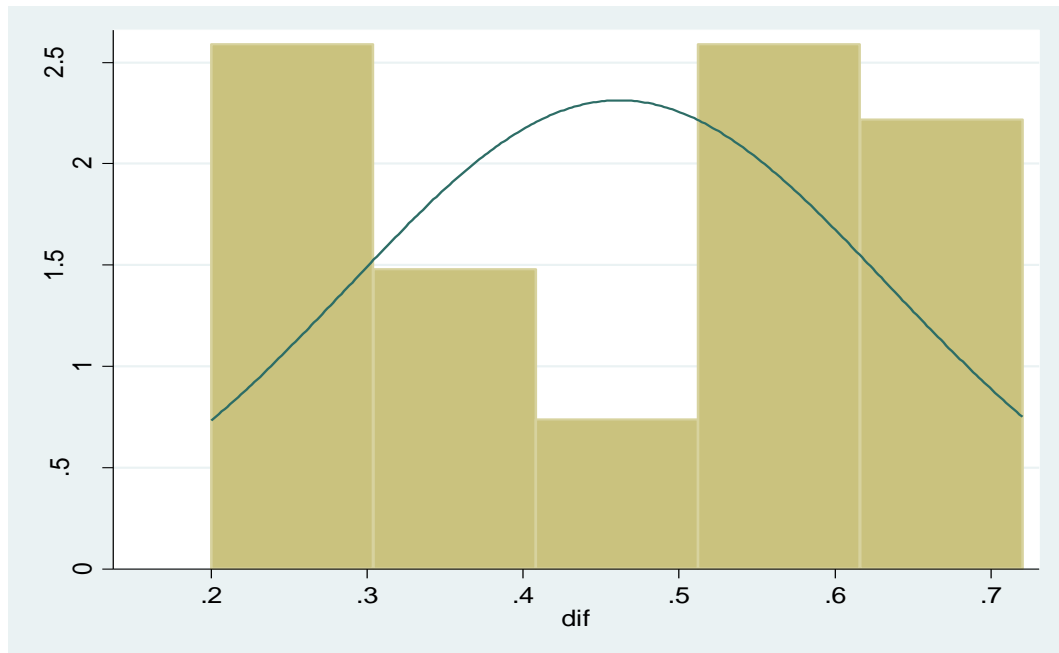
dif			
Percentiles	Smallest		
1%	.2	.2	
5%	.2	.2	
10%	.24	.24	Obs 26
25%	.3	.27	Sum of Wgt. 26
50%	.485		Mean .4615385
		Largest	Std. Dev. .1724805
75%	.61	.66	
90%	.67	.67	Variance .0297495
95%	.71	.71	Skewness -.0607423
99%	.72	.72	Kurtosis 1.501622

```
. tabstat dif, s(n mean median ske kur)
```

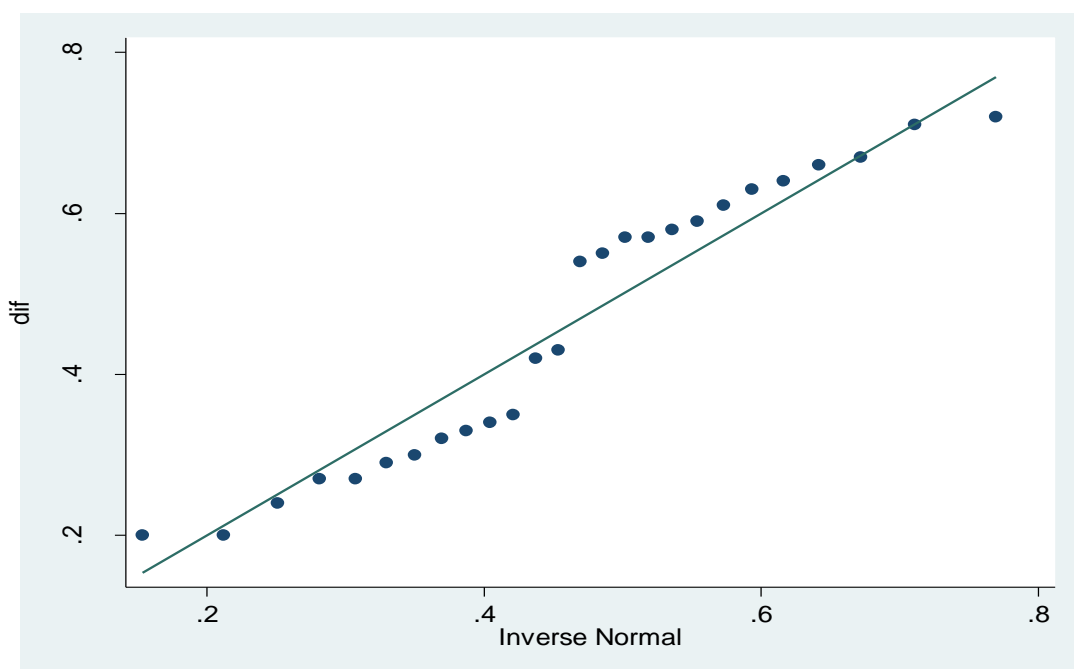
variable	N	mean	p50	skewness	kurtosis
dif	26	.4615385	.485	-.0607423	1.501622

El cuadro de salida resultante brinda información sobre Skewness y Kurtosis, dos valores numéricos que pueden indicarme la posible distribución normal de los datos. En una distribución normal, el valor de Skewness debe estar cercano a 0 y el valor de Kurtosis cercano a 3.

Finalmente, y sólo para fines ilustrativos, se utilizó el comando **histogramdif** que permite obtener el siguiente gráfico:

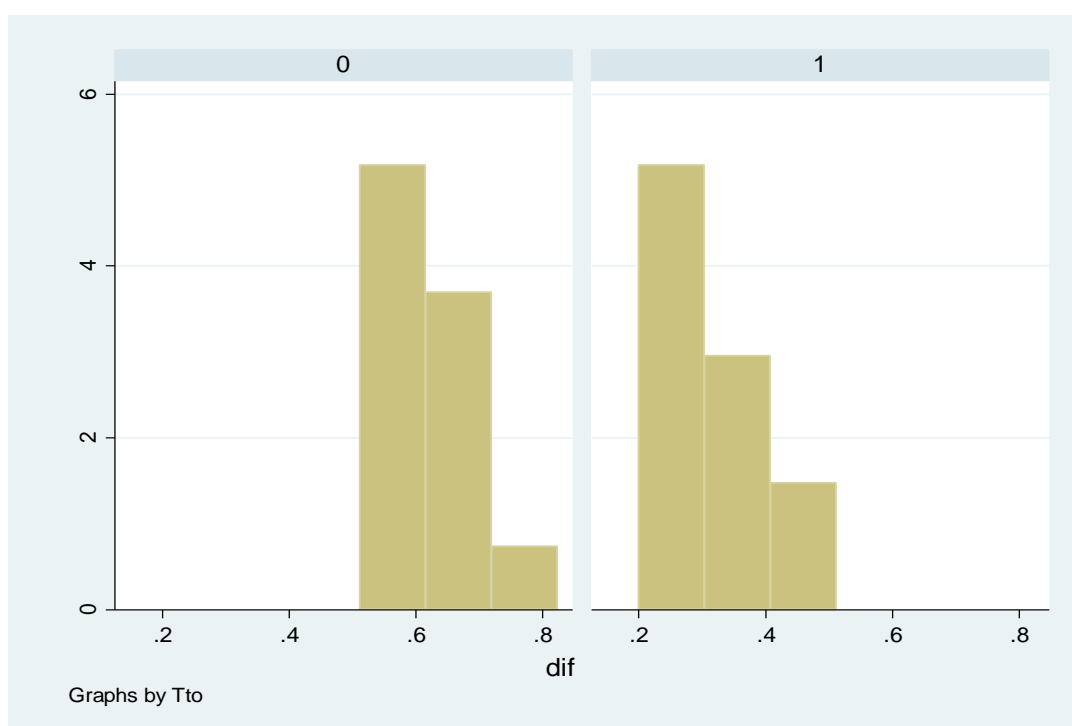


Como se puede observar, los datos no siguen una distribución normal. Inclusive, se puede utilizar: `qnormdif`, para tener otro gráfico y observar la normalidad. En concordancia con el gráfico anterior, los datos no siguen una distribución normal.



Dada las características de la variable dependiente **dif** y la variable independiente **Tto** que es categórica dicotómica, se utilizará una prueba **NO PARAMÉTRICA**. Se plantea utilizar la prueba de Mann-Whitney y se evaluarán los supuestos:

- **Independencia de observaciones y aleatoriedad:** Evaluar si las muestras utilizadas para el análisis han sido extraídas de manera independiente y en forma aleatoria de sus respectivas poblaciones. Se evaluaron frutos de camu camu independientes para cada grupo: con y sin tratamiento.
- **Escala de medición al menos de ordinal:** La variable **dif** que es el peso de los frutos de camu camu después de 5 días de tratamiento, está medida en escala de razón.
- **La variable dependiente numérica:** la variable **dif** es una variable numérica, que representa el peso en gramos.
- **La distribución de la variable dependiente tiene la misma forma en ambas poblaciones.** Para corroborarlo, utilizaremos el comando **histogramdif, by(Tto)** para ver la distribución de la variable dependiente para los distritos “sin tratamiento, = 0” y “con tratamiento=1”.



Adicionalmente, para analizar la distribución, se presenta los estadísticos de medida de tendencia central de los pesos en gramos **dif** según el uso o no de tratamiento. Se usó el comando: **tabstatdif, s(n mean skekur p25 p50 p75) by(Tto)**

Summary for variables: dif
by categories of: Tto (Tto)

Tto	N	mean	skewness	kurtosis	p25	p50	p75
0	13	.6184615	.3921934	1.959951	.57	.61	.66
1	13	.3046154	.2385095	2.341347	.27	.3	.34
Total	26	.4615385	-.0607423	1.501622	.3	.485	.61

→ Con lo observado, proseguimos con la prueba Mann-Whitney. En ella se establecerá la siguiente Hipótesis estadística nula y alterna:

Ho: La mediana del peso perdido en gramos de los frutos de camu camu con el uso de tratamiento es igual a la mediana del peso perdido en gramos de los frutos de camu camu sin el uso de tratamiento. (Mediana A= Mediana B)

Ha: La mediana del peso perdido en gramos de los frutos de camu camu con el uso de tratamiento es diferente a la mediana del peso perdido en gramos de los frutos de camu camu sin el uso de tratamiento. (Mediana A≠ Mediana B)

Para la evaluación, se utilizará el comando: ranksum (dif), by(Tto)

```
. ranksum (dif), by(Tto)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tto	obs	rank sum	expected
0	13	260	175.5
1	13	91	175.5
combined	26	351	351

```
unadjusted variance      380.25
adjustment for ties      -0.39
```

```
adjusted variance      379.86
```

```
Ho: dif(Tto==0) = dif(Tto==1)
```

```
z = 4.336
```

```
Prob > |z| = 0.0000
```

Decisión estadística

Rechazamos la hipótesis nula, debido a que el valor p es menor al nivel de significación previamente establecido.

Conclusión

Los resultados sugieren que hay diferencia estadística entre el peso en gramos perdido de los frutos de camu camu con tratamiento y sin tratamiento.

Interpretación del resultado de la prueba.

Con los datos podemos evidenciar que los frutos de camu camu sin tratamiento tiene una mediana de la pérdida de peso en gramos es mayor a los frutos de camu camu con tratamiento.

- b. Segundo análisis: tiempo de exposición ácido acético y crecimiento de levaduras.

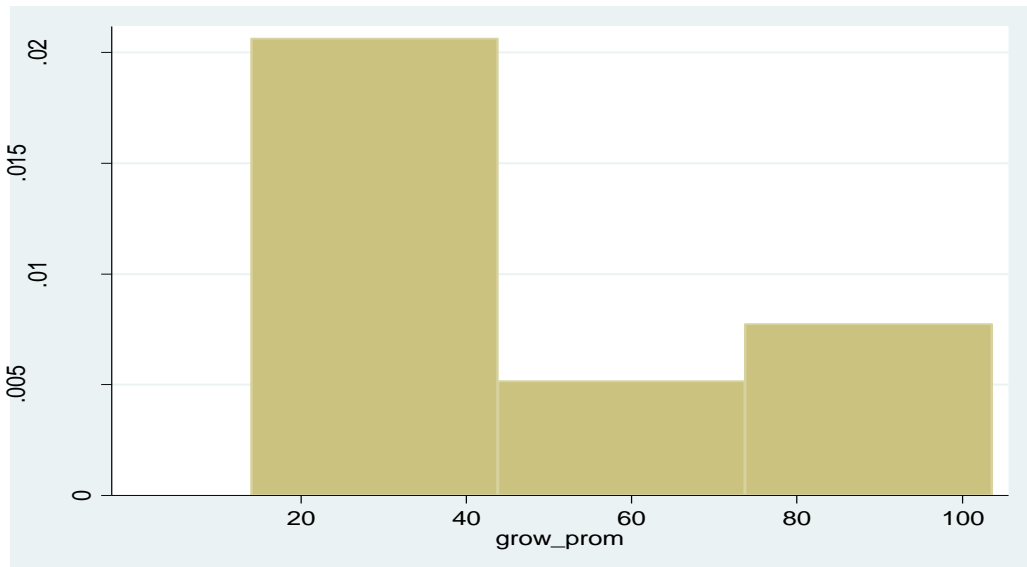
Se creó una base de datos según formato indicado en el archivo: *Segundo_analisis_tesis.dta*. En ella, se identificó el promedio como **grow_prom** y los tiempos como **time**. Se planteó una correlación, para decidir la metodología a utilizar, se debe identificar la distribución:

La variable **grow_prom**, la variable dependiente, no sigue una distribución normal. Para demostrarlo se utilizó el comando: `summarize grow_prom, detail`

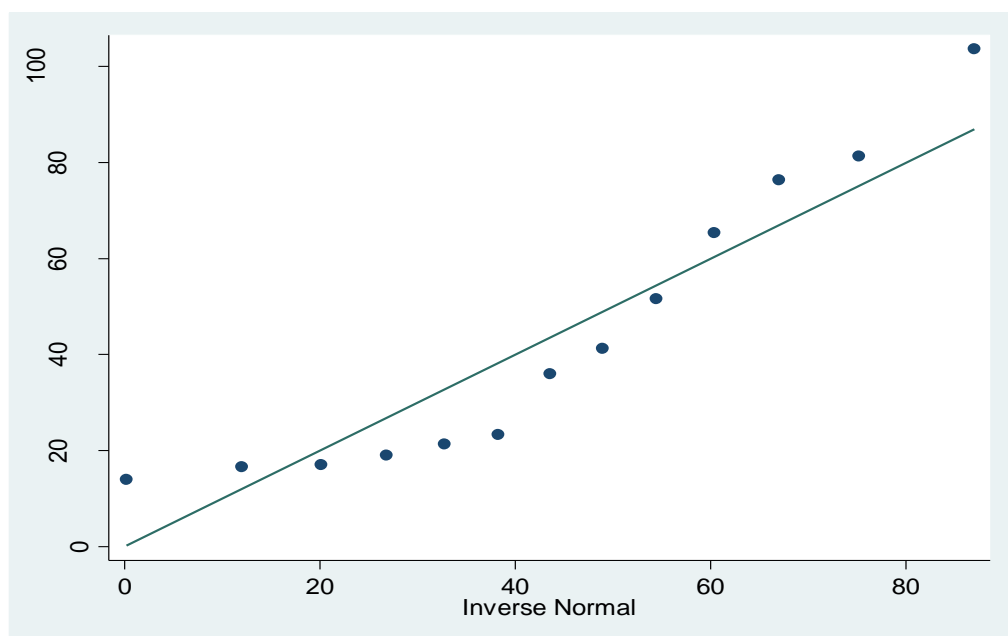
```
. summ grow, d
```

grow_prom				
Percentiles		Smallest		
1%	14	14		
5%	14	16.6		
10%	16.6	17	Obs	13
25%	19	19	Sum of Wgt.	13
50%	36		Mean	43.58462
		Largest	Std. Dev.	29.60261
75%	65.3	65.3		
90%	81.3	76.3	Variance	876.3147
95%	103.6	81.3	Skewness	.7239905
99%	103.6	103.6	Kurtosis	2.227653

El cuadro de salida resultante brinda información sobre Skewness y Kurtosis, dos valores numéricos que pueden indicarme la posible distribución normal de los datos. En una distribución normal, el valor de Skewness debe estar cercano a 0 y el valor de Kurtosis cercano a 3. Finalmente, y sólo para fines ilustrativos, se utilizó el comando **histogramgrow_prom** que permite obtener el siguiente gráfico:

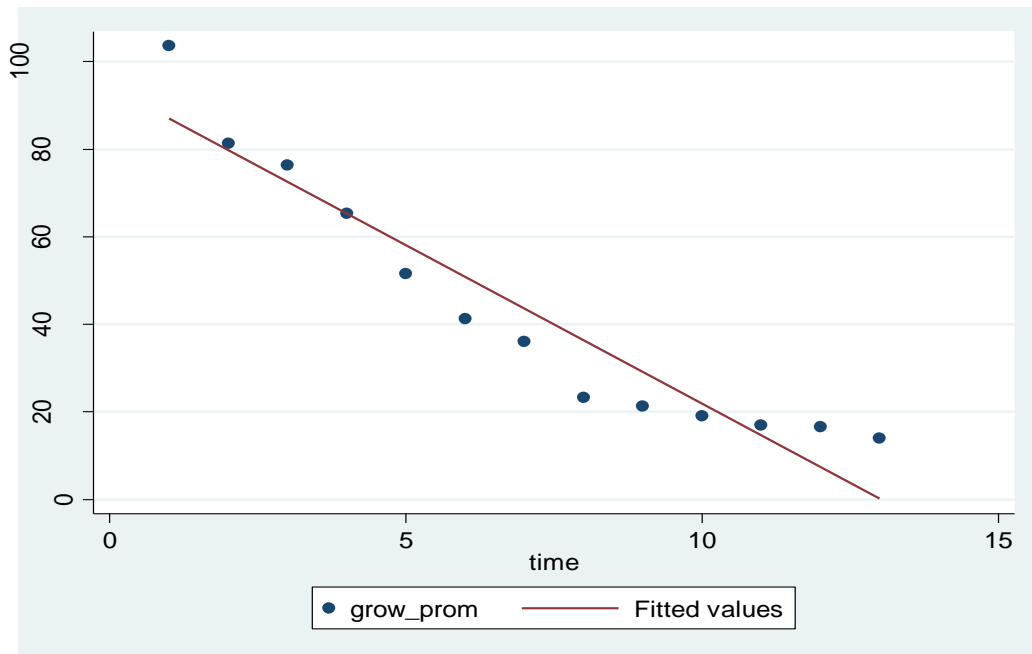


Como se puede observar, los datos no siguen una distribución normal. Inclusive, se puede utilizar: `qnormgrow_prom`, para tener otro gráfico y observar la normalidad. En concordancia con el gráfico anterior, los datos no siguen una distribución normal.



Dada las características de la variable dependiente **grow_prom** y la variable independiente **time**, se utilizará una prueba **NO PARAMÉTRICA**. Se plantea utilizar la prueba de correlación de Spearman.

El tipo de relación entre la variable dependiente e independiente es de tipo **monotónica**, es decir, al aumentar el tiempo en minutos, disminuye el conteo de colonias de levaduras. Con el comando **twowayscatter grow_prom time || lfit grow_prom time** se observa el siguiente gráfico.



Se debe considerar adicionalmente:

- **Escala de medición al menos de ordinal**

➔ Dada la naturaleza de los datos y evaluación de supuestos, se concluye utilizar la prueba de correlación de Spearman, útil para muestras pequeñas. En ella se establecerá la siguiente Hipótesis estadística nula y alterna:

Ho: No existe correlación entre el crecimiento de colonias de levaduras del fruto camu camu y el tiempo de inmersión en ácido acético ($\rho_S=0$).

Ha: Existe correlación entre el crecimiento de colonias de levaduras del fruto camu camu y el tiempo de inmersión en ácido acético ($\rho_S \neq 0$)

Para la evaluación, se utilizará el comando: **spearman (grow_prom) (time)**

```
. spearman grow_prom time

Number of obs =      13
Spearman's rho =    -1.0000

Test of Ho: grow_prom and time are independent
Prob > |t| =      69    0.0000
```

Decisión estadística

Rechazamos la hipótesis nula, debido a que el valor p es menor al nivel de significación previamente establecido.

Conclusión

El coeficiente de spearman encontrado (-1.0000) indica una fuerte relación monotónica entre la variable **grow_promy time**, y que esta es de negativa.

Interpretación del resultado de la prueba.

Se interpreta que a mayor tiempo en minutos de inmersión en ácido acético, menor es la cantidad de colonias (UFC/cm²) de levadura encontradas.