AAT 1930

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
ESPECIALIDAD BIOLOGÍA Y QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EMPLEO DEL DIÓXIDO DE CLORO COMO ALTERNATIVA DE CONSERVACIÓN COMO MÍNIMO PROCESAMIENTO DE FRUTAS Y HORTALIZAS (MPFH) EN PLANTAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa L.*) VARIEDAD ICEBERG.

Trabajo de Grado

Autor: Irube Azuaje

Tutor: Dra. Iselen Trujillo

Cotutor: M.Sc. Adriana Izquier

Caracas, 20 de Noviembre de 2015

TESIS
ED 2015
A3

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado titulado: Evaluación del empleo del dióxido de cloro como alternativa de conservación como mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg realizado por: Br. Irube Carolina Azuaje Para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los _____20_____ días del mes de ___noviembre_____ de 2015____.

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA IDECYT CEDAT UNIVERSIDAD SIMÓN RODRÍGUEZ

Iselen Trujillo

C.I.:6524760

RESUMEN

En la industria, la condición sanitaria del producto es indispensable, debido a que los alimentos son susceptibles de sufrir cualquier forma de contaminación, y estos tie como destino final la alimentación humana. Esta calidad, es exigida en especial para la lechuga, ya que es considerada muy delicada en su cultivo. Este trabajo incorpora el dióxido de cloro (ClO_2) como alternativa de conservación con mínimo procesamiento de lechugas variedad Iceberg cultivadas *in vivo.* La desinfección se realizó empleando hojas grandes y afloradas, empleando 5 mg/L de ClO_2 durante 20 min. Se empacó y se almacenó a una temperatura de 7°C por 15 días, determinando concentraciones gaseosas de oxigeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) dentro del empaque, el crecimiento de bacterias y mohos y levaduras, y la calidad sensorial para evaluar el efecto del tratamiento con ClO_2. Los resultados determinaron que en la concentración de gases, hubo diferencias significativas para O_2 y CO_2 entre el control y tratamiento para un nivel de confianza de 95% ($P<0,05$). En los análisis microbiológicos, para bacterias, mohos y levaduras, se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento microbiano, con nivel de confianza del 95 %($P<0,05$).Con respecto a la calidad sensorial, el puntaje de los encuestados favoreció a las muestras tratadas, por lo tanto podríamos decir que, con estos resultados se comprueba que el tratamiento con dióxido de cloro (ClO_2) puede extender la vida útil de lechugas por más de 12 días de almacenamiento, controlando el crecimiento de microorganismos y conservando los atributos de calidad sensorial. Adicionalmente, para fortalecer los métodos de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) se incorporo como alternativa, la propagación *in vitro* como método para el mejoramiento de la vida útil de la lechuga, el cual se realizó a través de plántulas obtenidas por germinación de semillas in vitro en medio MS. Luego de un periodo de incubación de 8 días, las plántulas fueron trasplantadas a un medio MS suplementado con 2 mg/L BA (Benzil-adenina) y 6,5 g/L de agar. En 30 días, se observó la aparición de múltiples brotes, y para el

enraizamiento de los mismos, se empleó un medio MS suplementado con 0,5 mg/L de ANA (ácido naftalenacetico), observándose un alto porcentaje de brotes enraizados, y una alta variabilidad morfológica en las raíces desarrolladas.

INDICE

INTRODUCCIÓN 7

CAPITULO I 9

EL PROBLEMA 9

Planteamiento del problema 9

Justificación 10

Objetivo general: 12

Objetivos específicos: 12

Hipótesis 14

CAPITULO II 15

MARCO TEÓRICO 15

Antecedentes 15

Bases Teóricas 19

La lechuga 19

Métodos de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) .. 25

Dióxido de Cloro 27

El cultivo in vitro como alternativa para obtener plantas de mejor calidad 30

Reguladores de crecimiento 34

Etapas del cultivo in vitro 36

Técnicas de cultivo *in vitro* 38

CAPITULO III 42

MATERIALES Y METODOS 42

Material Vegetal 42

1. Cultivo in vivo de plantas de lechuga (Lactuca sativa L.) 42
2. Cortado 43
3. Desinfección 43
4. Secado 44
5. Empacado 44
6. Almacenamiento 44
7. Evaluación 44
8. Cultivo *in vitro* de lechuga (Lactuca sativa L.): 46
9. Análisis estadísticos 50

CAPITULO IV 51

RESULTADOS Y ANALISIS 51

1. Cultivo *in vivo* 51
2. Cortado 53
3. Desinfección 54
4. Secado 54
5. Empacado 55
6. Almacenamiento 55
7. Evaluación 56
8. Cultivo *in vitro* 70

CAPITULO V 78

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 78

REFERENCIAS 80

INTRODUCCIÓN

La calidad de los alimentos es un conjunto de cualidades, que hacen aceptables los productos para los consumidores. Estas cualidades incluyen tanto las percibidas por los sentidos (cualidades sensoriales): sabor, olor, color, textura, forma y apariencia, como las higiénicas y químicas. En los procesos de manufactura alimentaria, uno de los requisitos indispensables es la condición sanitaria, debido a que los alimentos son susceptibles en todo momento de sufrir cualquier forma de contaminación, considerando que el destino final de los productos es la alimentación humana. Por lo tanto, los consumidores exigen que los productos sean manipulados de acuerdo con ciertos estándares, requerimientos nutricionales y condiciones sanitarias.

Es por ello, que la calidad de los alimentos incluye además la trazabilidad durante los procesos industriales, que va desde la recolección hasta su llegada al consumidor. De allí, que esta se entiende como el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer la historia, la ubicación y la trayectoria del producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado a través de herramientas determinadas.

Esta calidad, es exigida con mayor énfasis entre los alimentos hortícolas, y en especial para lechuga, puesto que es considerada muy delicada en su cultivo, debido a sus características como producto comercial, su fragilidad durante su manipulación en campo, y en los pasos subsiguientes a la cosecha hasta llegar al consumidor (Cabrita y col., 2000). Adicionalmente, esta hortaliza es afectada por agentes microbiológicos que aceleran el proceso de descomposición, lo cual ocasiona que presente una vida útil muy corta.

Por ello, hoy en día, muchos campos de investigación en la alimentación, se han dedicado al estudio de métodos de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH), con la finalidad de tratar de solucionar estos problemas de deterioro y minimizar perdidas a nivel industrial, para así ofrecer un producto de buena calidad.

Esta investigación se planteó evaluar el empleo del dióxido de cloro como alternativa de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg. Para ello, en el desarrollo del trabajo, se encontrará la problemática de la investigación, la justificación y los objetivos a cumplir dentro del capítulo I; en el capítulo II se describe las características principales de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en cuanto a su morfología y exigencias durante la cosecha y postcosecha, los métodos de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas en especial las características principales del dióxido de cloro, su efecto antimicrobiano y efectos en la calidad sensorial, además, se describe el proceso para la obtención de cultivos *in vitro,* como una alternativa para trabajar desde un principio con materiales de mejor calidad. En el capítulo III se presenta toda la metodología y pasos a seguir para el proceso de descontaminación del material vegetal con el dióxido de cloro y la técnica a utilizar para la obtención del cultivo *in vitro* del material vegetal. En el capítulo IV se encuentran los resultados de cada etapa del proceso de descontaminación y las observaciones sobre el estado físico del material vegetal durante cada paso, así mismo se muestran los efectos del dióxido de cloro en la calidad sensorial y su acción antimicrobiana, también se describe el proceso de cultivo *in vitro* y las diferentes variaciones que se realizaron para el desarrollo del material vegetal. Por último, en el capitulo V, están las conclusiones y las recomendaciones para la mejora del proceso de desinfección y la obtención de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg a través de la técnica de cultivo *in vitro.*

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

El procesamiento de los alimentos puede favorecer que los vegetales se degraden más rápidamente por posibles daños ocasionados durante el proceso; igualmente los hacen más susceptible al deterioro microbiano, puesto que la parte interna de los tejidos vegetales quedan expuestos al ambiente. Para contrarrestarlo, se plantea el uso de procesamiento mínimo incluyendo el lavado con dióxido de cloro (ClO_2), como uno de los métodos con mayor potencial de descontaminación en vegetales.

¿Será el empleo del dióxido de cloro (ClO_2) un método efectivo de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH), en plantas de lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg*?*

Adicionalmente, es interesante plantear la combinación de métodos que puedan ofrecernos una mayor eficiencia de esta metodología, de allí que esta investigación plantea además el desarrollo del proceso de propagación *in vitro* de la especie seleccionada para el estudio, como un factor de relevancia en el proceso de conservación del producto, para probar a futuro, procesos de conservación con mínimo procesamiento con la mencionada especie.

Justificación

En la industria de los alimentos se usa una gran variedad de métodos de mínimo procesamiento, con la finalidad de obtener alimentos cortados o pelados, sin alterar gravemente sus características sensoriales, como lo harían el secado o enlatado.

Gran diversidad de industrias cuyo producto es obtenido a través de cultivo *in vivo*, emplean métodos de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) para proveer al consumidor alimentos aptos para el consumo, es decir, vegetales previamente cortados, pelados, lavados y empacados, y que van directo al consumo del cliente (Debevere y col., 2008).

Dentro de los métodos que han resultado eficaces y con resultados satisfactorios en la producción y calidad de alimentos, algunos resultan excesivamente costosos, debido a los materiales y a los equipos necesarios para su aplicación, además de necesitar condiciones muy estrictas, bajo parámetros precisos, para cada tipo de alimentos, por lo cual, estos métodos resultan pocos viables para pequeñas industrias y laboratorios.

Sin embargo, existen métodos de conservación, que presentan una efectividad similar, pero con la gran diferencia de que estos no requieren equipos sofisticados para su aplicación, y los materiales para este procedimiento son fáciles de adquirir y de elaborar.

Entre los métodos de conservación, se encuentra como descontaminante el dióxido de cloro (ClO_2); este está siendo cada vez más utilizado debido a que presenta una alta efectividad contra una amplia variedad de microorganismos, permitiendo prolongar la vida útil de las frutas y vegetales, además, este no produce cantidades importantes de subproductos tóxicos. En este proyecto se trabajará con este método, debido a las

facilidades de adquisición, manipulación y características del mismo, lo que permitirá cumplir con los objetivos planteados.

Por consiguiente, esta investigación pretende evaluar la aplicación de este método de mínima conservación para cultivos de lechuga, con el propósito de obtener resultados que sean significativos para estudios posteriores sobre la aplicación del ClO_2 en cultivos de lechuga, proporcionando además información a la industria alimenticia sobre la utilización del dióxido de cloro como alternativa de conservación dirigido a una mejor producción y a otorgar al consumidor un producto de calidad y seguro a nivel microbiológico, prolongando la vida útil de la hortaliza durante su almacenamiento.

Por otro lado, es importante señalar que existen tecnologías que pueden ayudar en la producción de vegetales de mayor calidad, entre las cuales se puede mencionar el cultivo *in vitro*. El cultivo *in vitro* de plantas ha sido una de las aplicaciones de mayor generalización y repercusión mundial, ya que, favorece la producción de un material más sano y una menor posibilidad de ser infectado por microorganismos, lo que podría alargar la vida de los vegetales cultivados, de allí que muchas industrias (laboratorios comerciales) plantean el uso de técnicas de propagación *in vitro* de plantas para sus productos (Orellana, 1998; Central el Palmar, 2011).

Cabe considerar, que la mayoría de los productos hortícolas que se encuentran en el mercado son cultivados por las industrias alimenticias por método *in vivo*, y que estos son los que están más expuestos a la contaminación por microorganismos. De allí, que se planteó desarrollar el cultivo *in vitro* en el proyecto, ya que por medio de este método se producen cultivos semejantes a los obtenidos *in vivo*, de mejor calidad y con mejores condiciones sanitarias, ya que no están expuestos a agentes contaminantes durante su cultivo, que podría optimizar la conservación con mínimo procesamiento.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general:

Evaluar el empleo del dióxido de cloro como alternativa de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg.

Objetivos específicos:

- Obtener plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg a través de la germinación de semillas (Método *in vivo*).

- Realizar el proceso de lavado con dióxido de cloro como alternativa de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) en plantas de lechuga obtenidas *in vivo*.

- Realizar el proceso de secado y empacado de las plantas de lechuga sometidas a mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH).

- Determinar los niveles de dióxido de carbono y oxigeno durante el almacenamiento de las plantas de lechuga.

- Determinar la efectividad de la alternativa de mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) seleccionada, a nivel microbiológico (conteo de bacterias y mohos y levaduras).

- Determinar la efectividad de la alternativa de mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) a nivel de calidad sensorial.
- Obtener plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg a través de técnicas de propagación *in vitro*, como una técnica que a futuro podría incrementar rendimientos en procesos de conservación con mínimo procesamiento.

Hipótesis

Si el ClO_2 presenta una alta efectividad contra una amplia variedad d microorganismos, permitiendo prolongar la vida útil de las frutas y hortalizas entonces la desinfección con ClO_2 podría ser un método de gran efectividad para l conservación de plantas de lechuga mínimamente procesadas, y a su vez, este proces también podría ser reforzado controlando la forma de cultivo de la especi seleccionada.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

El dióxido de cloro (ClO_2) es un método de conservación MPFH que ha servido para realizar diferentes estudios, en donde se evalúa su eficacia para prolongar la vida útil de vegetales. Al respecto, Debevere y col., (2007a), señalan que el ClO_2 es una alternativa prometedora para prolongar la vida útil de las zanahorias mínimamente procesadas, donde este método no afecta la tasa de respiración, ni los atributos sensoriales de las zanahorias. El dióxido de cloro (ClO_2) es un desinfectante y descontaminante y no reacciona con compuestos orgánicos para producir subproductos clorados, al igual que el cloro liquido e hipocloritos.

Chen y col., (2010), realizaron un estudio donde observaron el efecto del ClO_2 acuoso sobre el pardeamiento enzimático y la vida útil de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) Iceberg y el esparrago durante el procesamiento, ya que, el dióxido de cloro acelera el deterioro fisiológico que puede resultar en la decoloración del material vegetal y ocasionar la pérdida adicional de la nutrición y el sabor. De acuerdo con esta investigación, el pardeamiento u oscurecimiento enzimático se define como la oxidación de fenoles o quinonas que son catalizadas por la polifenol oxidasa en presencia de oxígeno, este trastorno es uno de los más importantes, ya que es fácil de observar por los consumidores y puede ocasionar perdidas comercialmente. Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones más altas de ClO_2 y los tiempos de tratamiento más largos siempre tienen mejores efectos inhibitorios sobre el pardeamiento, es decir, el tratamiento con ClO_2 inhibe efectivamente el pardeamiento, manteniendo el color en un nivel alto, por lo tanto, podría prolongar la vida útil de la lechuga y el espárrago fresco cortado a 14 días aproximadamente.

Adicionalmente, Chen y col., (2010), reportaron que el tratamiento reduce significativamente la microflora inicial de lechuga y espárrago fresco cortado, pero sin eliminarla completamente, ya que el ClO_2 es menos eficaz cuando los microorganismos están ocultos en heridas, por lo tanto, puede aumentar el crecimiento de los microorganismos sobrevivientes al tratamiento (Devliegherey y col., 2008). De hecho, varios autores han reportado que la eficacia de ClO_2 acuoso como desinfectante sobre las verduras frescas o recién cortadas depende de la estructura vegetal y la morfología (presencia de poros, irregularidades de la superficie, lesiones), la distribución de los microorganismos y las habilidades de ciertos microorganismos que forman biopelículas (Gómez-López e Izquier, 2015).

En otra investigación, Allende y col., (2010), compararon la idoneidad del dióxido de cloro acuoso vs hipoclorito de sodio como un desinfectante eficaz para preservar la calidad de la lechuga recién cortada, evitando la formación de subproductos. Para ello, se evaluó el impacto de dióxido de cloro acuoso e hipoclorito de sodio en la microbiota natural y calidad sensorial y la formación de subproductos en la lechuga Iceberg recién cortada. Los resultados de esta investigación, arrojaron que independientemente del tratamiento utilizado, las poblaciones microbianas se reducen después del lavado, es decir, se encontraron reducciones microbianas de 1-2 unidades logarítmicas en comparación con las cargas microbianas antes de lavar. Sin embargo, se reportó un crecimiento gradual durante el almacenamiento tanto para aerobios mesófilos como para mohos y levaduras en ambas soluciones, igual que el estudio anteriormente mencionado.

Adicionalmente, Allende y col., (2010), evaluaron el impacto de las dos soluciones sobre algunos atributos sensoriales de lechuga recién cortada, la evaluación sensorial mostró una buena calidad inicial después del lavado y no hubo influencia de la solución de lavado en los parámetros sensoriales incluyendo gusto y la calidad visual. Durante el almacenamiento, el sabor y la calidad visual de la lechuga recién cortada

se redujeron ligeramente. Ligeros malos olores se detectaron después de 10 días de almacenamiento, pero los panelistas también indicaron que las muestras eran aceptables para el consumo. Como resultado, ninguna de las soluciones de lavado, causó ningún efecto perjudicial en la calidad sensorial de la lechuga (Allende y col., 2010).

En cuanto a la formación de subproductos como trihalometanos (THM) el agua tratada con dióxido de cloro para la lechuga, condujo a la formación de THM, pero por debajo del límite de detección, lo que concuerda con Devliegherey y col., (2008), quienes reportaron que el ClO_2 no produce cantidades importantes de subproductos tóxicos.

Estos estudios han demostrado que el uso del ClO_2 como método de conservación de frutas y hortalizas mínimamente procesadas MPFH, puede mantener los atributos sensoriales y prolongar la vida útil del producto. Sin embargo, se puede mejorar aún más la calidad de las frutas y hortalizas, si se logran estandarizar sus condiciones óptimas del cultivo *in vitro* para esta especie.

El cultivo *in vitro* desde sus inicios hasta la fecha, ha representado un gran aporte para la agricultura, ya que, ha contribuido al aumento y mejoramiento de la producción de alimentos, pues esta tecnología permite obtener material de elevada productividad. El uso de esta técnica ofrece la posibilidad de multiplicar masivamente genotipos valiosos de vegetales por lo que puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de especies de importancia económica. Además, esta técnica se ha desarrollado para la producción de material libre de enfermedades, mejoramiento de calidad fisiológica y fitosanitaria (FAO, 2007). A partir de los últimos años, en una gran cantidad de especies vegetales se ha extendido el empleo de esta técnica, por lo que resulta valiosa su aplicación, en diversas especies vegetales (Kessel, 2008).

Una de las aplicaciones del cultivo *in vitro* de interés agropecuario, se encuentra en la obtención de plantas con resistencia a estrés biótico (virus, insectos, hongos y bacterias), a estrés abiótico (salinidad, sequía, etc.), tolerancia a herbicidas para facilitar el control de malezas y modificación de la calidad nutricional de los cultivos entre otras (Díaz y col., 2010).

Por esta razón, muchos estudios, han utilizado la propagación *in vitro* para el mejoramiento y producción de alimentos en cantidad y calidad suficiente para la creciente demanda comercial. Al respecto, Jiménez (1994), utilizó la propagación *in vitro* de la caña de azúcar debido a la necesidad de utilizar procedimientos rápidos de multiplicación para el mejoramiento en caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido); debido a que el proceso de producción de semilla comercial transcurre en un tiempo excesivo antes de que la caña se plante en producción, mediante un período de 32-36 meses desde que se planta como básica hasta que se cosecha como certificada. Esta técnica ha sido considerada como la de mayor potencial para distribuir material libre de enfermedades, y producir grandes cantidades genéticamente uniformes, gracias a una serie de ventajas que presenta como son la posibilidad de eliminar todo tipo de patógenos incluyendo el saneamiento a virosis y enfermedades.

Igualmente, Ceballos y col., (2002), describieron que desde la década de los años ochenta, la propagación *in vitro* para yuca, ha sido una técnica promisoria que ha permitido la multiplicación masiva de esta hortaliza, además de otras ventajas como proporcionar un material de elite, limpios, apto para la siembra, en cantidades razonables, y con la posibilidad de ser enviados o transportados a cualquier lugar para su cultivo, sin que sean sometidos a restricciones cuarentenarias, permitiendo el desarrollo comercial de la hortaliza. Asimismo, dichos autores, que esta técnica ha sido probada con éxito en cultivo como el café, banano, caña de azúcar y caucho.

Es por ello, que en este trabajo se planteó el uso de técnicas del cultivo *in vitro*, como la micropropagación para la producción de material de mejor calidad, lo que podría generar un periodo de vida útil prolongado.

Bases Teóricas

La lechuga

Origen

El origen de la lechuga no parece estar muy claro, el cultivo de la lechuga se remonta a una antigüedad de 2.500 años, siendo conocida por griegos y romanos. Las primeras lechugas de las que se tiene referencia son las de hoja suelta, aunque las acogolladas eran conocidas en Europa en el siglo XVI (Moreno, 2009).

Sin embargo, algunos autores afirman que procede de la India, pero hoy día los botánicos no se ponen de acuerdo, por existir un seguro antecesor de la lechuga *Lactuca sativa* L. variedad Iceberg, que se encuentra en estado silvestre en la mayor parte de las zonas templadas creciendo en prados, pendientes rocosas y terrenos baldíos desde Asia y norte de África hasta el norte de Europa (García, 2013), siendo las variedades cultivadas actualmente una hibridación entre especies distintas.

Taxonomía y Morfología

La lechuga es una planta anual, que se encuentra dentro de la familia *Asteraceae* y cuyo nombre botánico científico es *Lactuca sativa* L. Posee un sistema radicular profundo y ramificado. Su tallo es cilíndrico corto y muy ramificado. Sus hojas se disponen primeramente en roseta y después forman un cogollo más o menos consistente y apretado, dependiendo de la variedad. Las hojas pueden ser de forma redondeada, lanceolada o casi espatulada con el borde liso, ondulado o aserrado, existiendo una amplia variabilidad varietal. Presenta inflorescencia de color amarillo

dispuesto en racimos o corimbos. Es una planta autógama cuyas semillas, que en realidad son frutos en forma de aquenios típicos, están provistas de pelos plumosos (USDA-NRCS, 2006; López, 2013)

Clasificación

Esta hortaliza es propia de las regiones de clima templado y se cultiva para la alimentación. Es una hortaliza de hoja, que puede ser cultivada todo el año, pero de acuerdo con la variedad, pueden variar sus rendimientos.

Según Blanco y Vecentino, (2006), las variedades de lechuga se pueden clasificar en los siguientes grupos botánicos:

- Romanas o Longifolia: presentan las hojas lisas y erectas, con bordes lisos; forman una cabeza laxa como un pequeño repollo.
- Acogolladas o Capitata: se caracteriza por presentar la cabeza del vegetal firme, suave y semiabierta. Es conocida popularmente como lechuga americana.
- De hojas sueltas: se caracteriza por poseer hojas ásperas, rústicas o ser de hojas suaves.
- Espárrago: son aquellas que se aprovechan por sus tallos, teniendo las hojas puntiagudas y lanceoladas.

Para el desarrollo de este proyecto, se tomará la lechuga Iceberg de la variedad acogollada. Esta lechuga se caracteriza por ser de hojas lisas o crespas, verdes o moradas, tener un ápice oculto, hojas compactas, cabeza envolvente y se encuentra comúnmente en los supermercados del país.

Desarrollo o crecimiento

Según Rincón (2008), esta hortaliza presenta un desarrollo o crecimiento que se divide en cuatro etapas:

1. Etapa inicial: germinación y primeras etapas vegetativas (desarrollo en semillero).

2. Etapa de desarrollo del cultivo: desde el trasplante hasta la formación de una roseta de hojas.

3. Etapa de acogollado: desde la roseta de hojas hasta la formación completa de un cogollo apretado de hojas.

4. Etapa de reproducción: desde el final del acogollado hasta la formación de un tallo floral con semillas.

El ciclo de cultivo comercial de la lechuga Iceberg comprende las tres primeras etapas, la primera de ellas en semillero y las dos siguientes de cultivo en campo, finalizando con la recolección del cogollo de la planta que comprende la parte comercial.

Exigencias del cultivo

Clima

El clima es importante para la duración del ciclo de cultivo y de cada etapa de crecimiento, siendo la temperatura el factor del que depende directamente la duración del ciclo de cultivo, el desarrollo vegetativo y la producción.

La lechuga es una planta de gran adaptabilidad a distintos climas. Puede vivir a temperaturas de 0 °C; pero cuando ésta baja de los 6 °C, suele sentir sus efectos, que si persisten ocasionan lesiones foliares. Por debajo de los 5 °C la lechuga no emite

raíces nuevas, pero sí a partir de los 10 °C. No obstante, soporta peor las temperaturas elevadas que las relativamente bajas. Los climas excesivamente calurosos provocan con mayor facilidad la emisión de tallos y flores, conocida como « subida a flor» o inducción floral de la planta. La temperatura media óptima para la lechuga oscila entre los 15 a los 20°C (Japón, 2000).

Suelo

La lechuga requiere para su cultivo suelos francos o livianos. Es muy sensible al exceso de humedad, la cual le ocasiona pudrición y muerte. Los suelos ricos en materia orgánica son los recomendados para su producción. Es susceptible a la acidez del suelo y valores de pH menores de 5,5 originan un pobre desarrollo, ameritando la práctica del encalado para corregir la acidez. Se considera que un pH de 7,3 es el límite para su desarrollo normal, siendo de 5,8 a 6,6 los valores de mejor aceptación para un buen crecimiento y desarrollo comercial (INIA, 2005).

Siembra

La lechuga es una hortaliza de trasplante por lo que primero se debe hacer un semillero. El trasplante se realiza cuando las plantas tienen entre 10 y 12 cm de altura (entre 30 y 40 días después de la siembra). La siembra se hace en camas de 1 a 20 metros de ancho y en hileras con 15 centímetros de altura. Para los cultivares arrepollados se recomienda una distancia de siembra entre 25 a 45 cm entre plantas y las de cabeza pequeña se adapta a distancias entre 10 y 20 cm (Rincón, 2008).

Riego

La lechuga presenta un sistema radical no muy profundo, por lo que las suplencias de humedad deben ser frecuentes para permitir una absorción satisfactoria. Bajo temperaturas cálidas, el cultivo desarrolla un crecimiento muy rápido, necesitando

una suplencia permanente de humedad en el terreno. Cuando ésta no es satisfecha, se presenta una necrosis marginal en las hojas más jóvenes, la cual desaparece con el suministro de agua. En los primeros 20 días, la frecuencia de riego debe ser corta (uno o dos días), ampliándose progresivamente sin superar los cuatro días, hasta la etapa de cosecha (INIA, 2005).

Cosecha

En la zona cálida, la cosecha se hace entre 80 y 95 días después del trasplante. En ambos casos, la lechuga es cortada por encima del nivel del suelo y colocada en cestas de plástico, quedando lista para ser transportada al mercado. La cosecha es escalonada y la frecuencia de corte dependerá de la demanda. Por las características de la lechuga, su conservación es muy efímera y se recomienda la cosecha en las horas frescas del día (INIA, 2005).

Postcosecha

Después de la cosecha, la hortaliza es trasportada para el procesamiento y almacenamiento. La lechuga presenta una rápida descomposición, la cual, se debe a dos factores que se observan en la postcosecha: el primero es que debido a que el producto después del cortado sigue siendo una estructura viva que mantiene sus reacciones y sistemas fisiológicos activos, que se traduce principalmente en respiración, transpiración y maduración (producción de etileno), por lo tanto, la intensidad de estos procesos conllevan inevitablemente al deterioro, y está regida por las características propias del órgano de la planta que se cosecha e influida fuertemente por el ambiente circundante: temperatura, humedad y composición atmosférica (Cabrita y col., 2000).

Los procesos de respiración, transpiración y maduración están vinculados a procesos que implican el deterioro y la pérdida de atributos de calidad del producto vegetal y

se ven reducidos con la disminución de la temperatura de almacenamiento, de manera particular la respiración. La transpiración implica una pérdida neta de peso fresco en forma de vapor de agua desde los tejidos vegetales que además afectan la calidad visual, como la turgencia y la ausencia de signos de marchitamiento entre otros. El etileno (maduración) se asocia al control de diferentes procesos fisiológicos y está estrechamente vinculado con la senescencia, con el ataque de plagas y enfermedades, y diversos tipos de estrés. Las temperaturas mínimas de almacenamiento dependen tanto de la susceptibilidad del órgano, especie-cultivar y de la manera en que el producto se presenta (entero, pelado, cortado, etc.) ya que su comportamiento no será el mismo. La humedad relativa es otro de los factores postcosecha a considerar durante el almacenamiento de vegetales. La pérdida de agua depende del déficit de vapor de agua y cuanto menor sea éste también lo serán las pérdidas de agua y por ende de calidad (Chiesa, 2010).

El segundo factor es referido a los daños mecánicos por el uso de embalajes y condiciones de transporte inadecuados dentro de la estructura de la comercialización de esta hortaliza (Cabrita y col., 2000). En consecuencia, el uso de herramientas para prolongar la vida útil de vegetales procesados es limitado (Debevere y col., 2008).

Fisiopatía y Desordenes físicos

- Muchas fisiopatías han sido identificadas en lechuga. Algunos de los más importantes desórdenes son los siguientes según Cantwell y Suslow,(2015):
- Puntas Quemadas (tip-burn): es una fisiopatía que se caracteriza por un manchado o quemado de los bordes de las hojas de lechuga, dan una apariencia desagradable y el margen de la hoja dañada es más débil y susceptible a pudriciones.

- Punteado Pardo (russetspotting): es una fisiopatía común debido a la exposición a bajas concentraciones de etileno que produce depresiones oscuras especialmente en la nervadura media de las hojas.
- Mancha Parda (brownstain): esta fisiopatía es causada por la exposición a atmósferas con CO2 sobre 3%, a bajas temperatura. Aparecen como grandes manchas deprimidas de color amarillo rojizo principalmente en la nervadura media de las hojas.
- Costilla Rosada (pinkrib): esta fisiopatía ocasionada por la madurez de las cabezas y el almacenaje a altas temperaturas, en la cual la nervadura de la hoja adquiere una coloración rojiza, lo que incrementa el pardeamiento y susceptibilidad a pudriciones. Las exposiciones a etileno no incrementan esta fisiopatía y atmósferas con bajo oxígeno no lo controlan. (Cantwell y Suslow, 2015).

Métodos de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH)

Los vegetales mínimamente procesados son definidos como cualquier fruta u hortaliza que ha sido alterada físicamente a partir de su forma original, pero que mantiene su estado fresco. En la postcosecha, el producto básico (material vegetal), independientemente de que sea recortado, pelado, lavado y cortado, el 100% es posteriormente empacado en bolsas o pre-envasados. Durante este periodo, microorganismos presentes en la atmosfera, pueden causar enfermedades a los alimentos así como su deterioro, por lo tanto, la descontaminación por MPFH puede producir productos más seguros y más estables.

Debido a esta problemática de la conservación en la postcosecha de frutas y hortalizas, se han empleado métodos de conservación con mínimo procesamiento, para prolongar la vida útil, sin afectar lo fresco del vegetal.

Sin embargo, el verdadero reto en el desarrollo de nuevos productos es conseguir procesos novedosos o estrategias de conservación, que permitan la obtención de alimentos seguros con sus propiedades nutricionales y características benéficas para la salud, muy poco modificadas e incluso potenciadas (Aztiazaran y col., 2007).

Por lo tanto, la extensión de duración de MPFH es hoy día un desafío para la industria alimentaria, así como para las instituciones de investigación, donde las tecnologías de descontaminación están actualmente siendo evaluadas. La estructura de investigación para las pruebas de métodos de descontaminación para prolongar la vida útil de MPFH debe abarcar cinco aspectos diferentes, a saber: (Devliegherey y col., 2008):

1) Reducción del riesgo de infecciones transmitidas por los alimentos e intoxicaciones.

2) Disminución del deterioro microbiano.

3) La preservación de los atributos frescos.

4) La preservación de la calidad nutricional.

5) La ausencia de niveles inaceptables de residuos tóxicos o formación de productos tóxicos.

Todos los métodos MPFH que cumplan con estos aspectos podrán ser utilizados por la industria alimenticia para descontaminación. Actualmente, los métodos más utilizados que cumplen con estas condiciones son según Pelayo (2007):

1.- Aplicación de pulsos eléctricos: que consiste en someter el alimento a un campo eléctrico de alto voltaje.

2.- Aplicación de altas presiones: consiste en someter el alimento a elevadas presiones de hasta 9000 atmosferas.

3.- Irradiaciones: consiste en exponer a dosis establecidas de energía en forma de rayos o partículas (gamma o electrones).

4.- Pulso de luz: es una técnica en donde se aplica pulsos o destellos de luz con un espectro desde el ultravioleta al infrarrojo.

5.- Reactivos químicos: consiste en el tratamiento de alimentos con sustancias químicas, producidas por reacciones químicas entre otras sustancias.

Dentro del grupo de reactivos químicos, están los descontaminantes, incluyendo el dióxido de cloro (ClO_2).

Dióxido de Cloro

El dióxido de cloro (ClO_2) es un desinfectante y descontaminante y no reacciona con compuestos orgánicos para producir subproductos clorados. Es un ión casi completamente monómero de radicales libres. Este es usado como descontaminante de verduras debido a que presenta una serie de características que permiten tener resultados eficaces y manipularlo fácilmente. Devliegherey y col., (2008), considera que estas características son: su potencial bactericida es relativamente independiente en un rango entre pH 4 y 10; es más adecuado que el cloro para el tratamiento de esporas; requiere poco tiempo de contacto; tiene buena solubilidad; no hay corrosión a altas concentraciones, lo que reduce los costos de mantenimiento; no reacciona con amoníaco o sales de amonio; remueve hierro y manganeso mejor que el cloro y puede ser generado localmente.

El ClO_2 puede conseguirse en dos presentaciones, acuoso y gaseoso. El ClO_2 gaseoso tiene la ventaja principal sobre desinfectantes acuosos, ya que, el gas tiene más penetrabilidad, por lo tanto, podría matar a los microorganismos protegidos por irregularidades de la superficie o biopeliculas (*biofilms*). Pero, a pesar de esta eficacia, tiene como desventaja que es muy explosivo, por lo tanto no puede ser transportado fácilmente, además tiene que ser preparado y utilizado con equipos especializados.

Sin embargo, el dióxido de cloro acuoso ha demostrado ser eficaz para eliminar agentes patógenos inoculados en diferentes frutas y hortalizas, aunque no elimina por completo los microorganismos. Además, es de fácil manipulación y preparación puesto que comercialmente consisten de dos bolsas que contienen diferentes concentraciones, listas para ser mezcladas con agua hasta llegar a la concentración deseada. Para la presente investigación, se trabajará con el dióxido de cloro acuoso, debido a su fácil manipulación y preparación de concentraciones (Devliegherey y col., 2008).

El efecto antimicrobiano del ClO_2

La membrana celular ha sido identificada como el principal objetivo de ClO_2 en las células microbianas.El estudio realizado por Devliegherey y col., (2008), indicaron que la lesión letal producida por el ClO_2 a las células microbianas está directamente relacionada con la síntesis de proteínas y pérdida de control de la permeabilidad. Es decir, el efecto del ClO_2 está relacionado con el daño oxidativo de la membrana externa que conduce a la destrucción del gradiente iónico trans-membrana. También en otro estudio, se propuso que algún tipo de daño de la membrana podría ser la causa de que las esporas de hongos mueran, ya que ClO_2, puede causar daños en los pasos iniciales en la germinación de esporas (Devliegherey y col., 2008).

Vida útil de frutas y hortalizas por ClO_2

Según Carrillo y Reyes (2013), la vida útil de un alimento se define como el tiempo finito después de su producción en condiciones controladas de almacenamiento, en las que tendrá una pérdida de sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas, y sufrirá un cambio en su perfil microbiológico.

Estudios realizados, indican que a pesar que el ClO_2 acuoso no tiene una eficiente eliminación de microorganismos, puede prolongar de vida útil de la fruta u hortaliza,

ya que, estos estudios indican una variedad de resultados que van desde la ausencia hasta una inactivación significativa de 4,2 UFC/log para mesófilos bacterias, levaduras y mohos a 4 °C durante 9 días. De esta manera, el ClO_2 prolonga la vida útil de fruta o vegetales (Devliegherey y col., 2008).

Calidad Sensorial del ClO_2

Según Zamora (2007), la calidad de los alimentos puede ser definida como el conjunto de aquellas características que diferencian unidades individuales de un producto y tienen significación en la determinación del grado de aceptabilidad de esta unidad por el comprador. Así, la calidad total de un producto, debe ser analizada por los atributos que la componen, cada uno de los cuales debe ser medido y controlado independientemente.

El análisis de estos atributos se realiza a través de los sentidos. Los sentidos se pueden dividir en dos grupos:

1) En los que el estímulo es físico (vista, audición, tacto, temperatura)

2) Los sentidos químicos, en los que se tiene que establecer un contacto entre las moléculas de algunas especies químicas particulares y un órgano o receptor que recibe el estímulo.

De acuerdo a esto, se desarrollan pruebas que permiten evaluar y mantener el control de calidad de muchos productos en las industrias alimenticias, en especial de frutas y hortalizas. Los tipos de pruebas que se pueden realizar son valorativas y analíticas; para el caso del proyecto se realizaran pruebas valorativas.

Las pruebas valorativas tienen por finalidad evaluar productos con rapidez de acuerdo a su calidad, o bien cuando se desea descartar rápidamente muestras de calidad inferior. Entre estas pruebas de valoración están:

- Prueba Descriptiva: donde las muestras se valoran de acuerdo a una escala de calidad, que va de "excelente" a "malo".
- Prueba Numérica: en donde se define primero la característica que va a ser medida, y se le fijan grados sucesivos que van desde "mejor" a "peor", en relación con la calidad. Se van presentando las muestras, una cada vez, y se valoran según una escala numérica.
- Prueba de Puntaje Compuesto: la evaluación se expresa numéricamente en cómputos parciales, que van comprendidos en una escala cuyo máximo es 100, para la muestra perfecta. El puntaje para cada característica está de acuerdo a la importancia de ésta en la muestra, así la característica más importante del producto tendrá el mayor de los puntaje parciales. El evaluador calificará las muestras otorgando a cada característica, el puntaje que considere adecuado y de acuerdo al máximo indicado.

Para la evaluación sensorial relativa al proyecto se realizó la prueba de puntaje compuesto.

El cultivo in vitro como alternativa para obtener plantas de mejor calidad

El término genérico "cultivo de tejidos vegetales" involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como "cultivo *in vitro* de plantas" por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales) (Segretin, 2007).

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922, se logró el primer experimento exitoso: la

germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias). (Segretin, 2007). Hoy esta técnica tiene numerosas aplicaciones, algunas de ellas son:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año
- Obtención de plantas libres de virus
- Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal)
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas)
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos (ArgenBio, 2015).

Las bases biológicas del cultivo de tejidos: la totipotencia celular

La reproducción asexual de plantas por cultivo *in vitro* es posible gracias a que, en general, varias células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie

ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad se denomina totipotencia celular, y es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta (Segretin, 2007).

La potencialidad de una célula diferenciada (una célula de conducción, epidérmica, etc.) para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta.

Las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

• Una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos (llamados así porque son estructuras similares a un embrión, pero que no se originaron por unión de gametas),

• Una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos) (Segretin, 2007).

La primera respuesta se conoce como procesos indirectos, por la previa formación de un callo, y puede dar origen a una organogénesis indirecta (si se forman órganos), o a una embriogénesis indirecta (si se forman embriones).Mientras que la segunda respuesta se considera organogénesis (formación de órganos) o embriogénesis directa (formación de embriones), ya que no existe una fase previa de formación de callo (Galdeano y col., 2009).

El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante, como por ejemplo. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, etc; y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido), donde se regenerarán una o muchas plantas. Esta técnica se caracteriza por presentar las siguientes ventajas de acuerdo con Sierra (2002):

- Propagación rápida en masa
- Propagación de clones libres de virus
- Mejoramiento vegetal
- La posibilidad de transporte de gran cantidad de material vegetativo
- La posibilidad de producir plantas durante todo el año
- Desarrollo, mantenimiento y distribución de clones específicos con resistencia o tolerancia ante organismos patógenos

Es por ello, que algunas industrias alimenticias, para obtener una mejor calidad en sus productos, utilizan métodos de cultivo *in vitro* para sus cultivos (Central El Palmar, 2011).

Por otro lado, la formulación del medio de cultivo cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), inducción de yemas o raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales.

El éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero la desdiferenciación y luego la rediferenciación celular. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogenética deseada es la composición del medio de cultivo (ArgenBio, 2015).

No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores del crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la propagación in vitro de una planta (Segretin, 2007).

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento, son compuestos orgánicos naturales, que en pequeñas cantidades, y por la naturaleza y el arreglo particular de su molécula, fomentan, inhiben o modifican el crecimiento de los vegetales ejerciendo una profunda influencia en los procesos fisiológicos (Cossio, 2013).

Una sustancia para ser considerada un fitoregulador debe cumplir con algunas premisas, como las señaladas a continuación:

- Ser pleiotrópicas, es decir, que actúan en varios procesos
- Ser sintetizadas en todas las células,
- Regular procesos de correlación (un órgano recibe el estímulo y otro expresa la respuesta)
- Su acción debe ser ocasionada por interacción con los demás reguladores (sinergismos, antagonismos o balance de concentración).

Se dividen en dos grupo: los reguladores de crecimiento u hormonas naturales, que son aquellos que se encuentran en los vegetales, y los reguladores sintéticos, que son compuestos artificiales obtenidos por síntesis química (Cossio, 2013).

A su vez, se puede clasificar a los reguladores de crecimiento en tres grandes grupos de acuerdo a su acción en la planta: aquellos que fomentan el crecimiento (promotores); aquellos que lo inhiben (inhibidores y aquellos que lo retardan (retardantes) (Cossio, 2013).

En el cultivo *in vitro* se trabaja primordialmente con las hormonas promotoras de crecimiento, como lo son auxinas, citoquininas y giberelinas.

Las Auxinas

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol acético AIA, la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas. La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica. Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (Aguilar y col., 2013).

Las principales auxinas sintéticas utilizadas para trabajar en cultivo *in vitro* son: AIA, IBA (ácido indol butírico) y ANA (ácido naftalenacetico).

Citoquininas

Las citoquininas han sido consideradas estructuralmente como derivadas de adeninas o purinas, y dentro de este grupo se incluyen la kinetina, zeatina y benzilaminopurina.

Debido a su variación estructural se han llegado a clasificar en citoquininas isoprenoides y aromáticas.

Este grupo de fitohormonas es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales (Aguilar y col., 2013). La principal citoquinina sintética utilizada para trabajar en cultivo *in vitro* es la Benzil-adenina(BA).

Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de diterpenoides que se definen más por su estructura que por su actividad biológica, contrario a lo que ocurre con las auxinas y las citoquininas. Las giberelinas son hormonas que actúan como reguladores esenciales del desarrollo de las plantas y cubren todos los aspectos de la historia de vida de las plantas, modulando varias respuestas del crecimiento como la germinación de semillas, el crecimiento del tallo, la partenocarpia, la expansión foliar, la elongación de la raíz, la floración y la liberación de enzimas hidrolíticas en algunos tejidos (Aguilar y col., 2013).

Etapas del cultivo in vitro

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro* se pueden distinguir las siguientes etapas:

1) Selección de la planta y/o tejido donante de explantes.

2) Establecimiento o iniciación: consiste en la desinfección de los explantes (generalmente con hipoclorito de sodio) y otros desinfectantes, y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se plantee en la investigación.

3) Multiplicación: multiplicación acelerada de brotes o embriones suficientes para la regeneración del número de plantas necesarias.

4) Enraizamiento: etapa en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.

5) Aclimatación o aclimatización: que es la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones ambientales *in vivo* (suelo o algún sustrato inerte) (Segretin, 2007).

Elementos necesarios para el cultivo de tejidos vegetales

Para llevar adelante este trabajo, se necesitan equipos que generen las condiciones necesarias de esterilidad, como las cámaras de flujo laminar, que son estaciones de trabajo que hacen circular aire filtrado y estéril, protegiendo así lo que se desea trabajar. Además, se necesita un soporte para el explante, que puede ser sólido o líquido, y que está conformado por algún agente gelificante inerte (agar, *gelrite*, etc.); macro y micronutrientes esenciales para la supervivencia de la planta; fuentes de energía hidratos de carbono); vitaminas y agentes reguladores del crecimiento (Ver Tabla 1) que ayudarán a obtener una planta o un órgano en particular, a partir del explante seleccionado. Algunos de los elementos mencionados pueden ser reemplazados por mezclas poco definidas en su composición (jugo de tomate, agua de coco, etc.), que pueden dar buenos resultados, y generalmente resultan más económicas. La acidez de los medios de cultivo para plantas suele variar entre pH=5 y 6,5. Igualmente, deben ser reguladas las condiciones de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo, necesarias para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Segretin 2007).

Según sea el balance hormonal y otras condiciones de cultivo, se puede propiciar la regeneración de distintos órganos o formaciones vegetales. Por ejemplo., si el balance

de citoquininas/auxinas (Ver Tabla 1) es mayor que 1, se favorece la generación d brotes; si es menor que 1, la generación de raíces; y si es igual a 1, la formación d callos.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo in vitro de células vegetales

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar *in vitro*
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada según la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Se usan como soporte: agar, agarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

Técnicas de cultivo *in vitro*

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos d importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizado por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientale controladas (temperatura, humedad y luz). Una vez ajustados los protocolos para l

especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción (Segretin, 2007).

Existen varias técnicas, sin embargo, una de las más empleadas es la micropropagación o propagación clonal, la cual fue la utilizada para la presente investigación.

Micropropagación o propagación clonal

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Osorio, 2014).

Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar:

- Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales

- Permite controlar las condiciones ambientales, debido a la independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada)

- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos

- Evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios esterilizados

- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos

- Permite la obtención de individuos uniformes

- Facilita el transporte del material

La micropropagación consiste en obtener numerosos explantes a partir de una planta madre, los cuales sujetos a condiciones y medios de cultivo adecuados, darán lugar a

nuevas plantas iguales a la planta original, permitiendo su multiplicación (Figura 1) (Segretin, 2007).

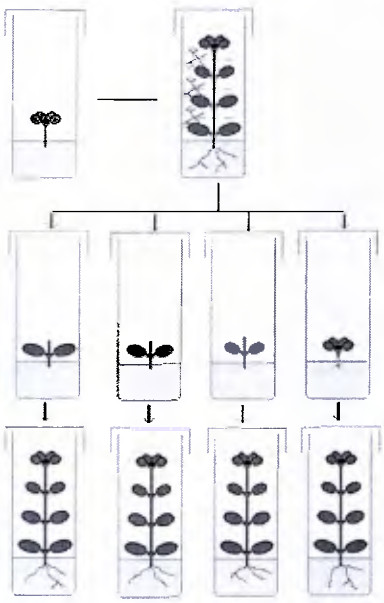


Figura 1. Micropropagación o propagación clonal de plantas por cultivo *in vitro* (ArgenBio, 2015)

La propagación *in vitro*, se divide en estadios o fases, según García y col., (2004):

- Fase 0 corresponde a la preadaptación del material parental condiciones homogéneas que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*.
- Fase I (Inducción o germinación). es la primera etapa del cultivo durante la cual se induce el desarrollo de los meristemas por el empleo de citocininas.
- Fase II (Multiplicación). Los brotes inducidos en la primera fase son multiplicados por medio de la inducción de brotes adventicios para aumentar el número de plantas que se derivan de una sola planta madre.

- Fase III (Preparación de la plántula al suelo o Enraizamiento): los brotes producto de la fase I y II son ahora tratados para inducir la formación de raíces y plántulas completas.
- Fase IV (Trasplante o Aclimatación): es la etapa más difícil del cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes del tubo de ensayo para iniciar su desarrollo en tierra. Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por perdida excesiva de agua o por el ataque de microorganismos.

En este proyecto, se planteó el desarrollo de esta técnica con el fin de obtener plantas por una vía de propagación alternativa con una mejor calidad sanitaria, lo cual a futuro permitiría la combinación de este método con la aplicación de mínimo procesamiento como alternativa de conservación para frutas y vegetales.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Con el propósito de cumplir con los objetivos del trabajo de investigación, se cultivó las plantas de lechuga Iceberg*in vivo* e *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) de la Universidad Simón Rodríguez.

Métodos

1. **Cultivo in vivo de plantas de lechuga (Lactuca sativa L.)**

La siembra de esta especie se llevó a cabo en canteros ubicados en el vivero del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) de la Universidad Simón Rodríguez. Para poder cumplir con la cantidad de lechugas necesarias para realizar la metodología, el cultivo se realizó en dos canteros:

El primer cantero es de 5 m de largo x 80 cm de ancho x 30 cm profundidad, en donde se sembraron dos hileras con 20 lechugas cada una, a una distancia de separación entre cada hortaliza de 25 cm (Fig. 2).

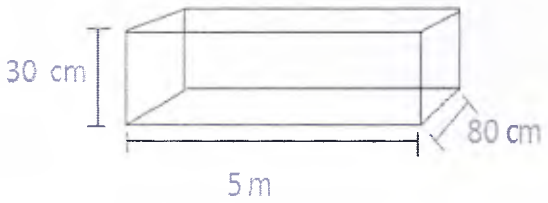


Figura 2. Modelo de cantero

El segundo cantero es de 4,30 m de largo x 1,09 cm de ancho x 30 cm profundidad, en donde se sembró dos hileras de 18 lechugas cada una, a una distancia de separación entre cada hortaliza de 25 cm. Entre ambos canteros se sembró un total de 76 lechugas (Fig. 3).

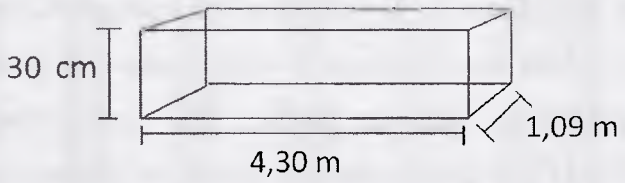


Figura 3. Modelo de cantero

Cabe destacar que para el proceso de desinfección solo se utilizaron 36 lechugas del cultivo *in vivo.* Una vez sembradas, se esperó su desarrollo hasta presentar hojas grandes y tener forma arrepollada, de allí se procedió al cortado.

2. Cortado

Este paso consistió en la recolección de la hortaliza, que se realizó en forma manual, extrayendo la lechuga desde la raíz. A continuación, se enjuagó con agua destilada fría para que las mismas quedaran limpias de cualquier sedimento, una vez limpia la lechuga se procedió a deshojarla.

3. Desinfección

En esta etapa, las lechugas del cultivo *in vivo*, se introdujeron en un envase con capacidad de 80 L, en donde se lavan con agua destilada, y con el agregado de dióxido de cloro (ClO_2) a una concentración de 5 mg/L de ClO_2 (20 lt de agua destilada y en él, se diluyeron 100 ml de ClO_2), con una circulación continua manual durante 20 min.

4. **Secado**

Después del tratamiento de desinfección, las lechugas fueron sometidas a un proces de secado mediante una centrífuga de cestas manual, en donde se elimina el exceso d humedad producido por el lavado para así evitar la multiplicación d microorganismos que suelen aparecer cuando los productos no han estado sometido a un secado correcto.

5. **Empacado**

Posteriormente, una vez removido el exceso de agua de las lechugas, se procedió empacarlas en bolsas herméticas plásticas de polipropileno (ziploc) para impedir l contaminación.

6. **Almacenamiento**

El almacenaje del producto terminado se realizó en una nevera, que posee la condiciones adecuadas de higiene con una temperatura de 7 °C, en donde las lechuga se mantuvieron por 15 días aproximadamente. Durante este periodo, se determinó la concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono dentro de la bolsa, además s realizaron las evaluaciones microbiológicas y sensoriales, para las cuales se tomaro tres muestras de cada cultivo por día.

7. **Evaluación**

Las evaluaciones se realizaron de la siguiente manera:

a) Con muestras sin desinfección con dióxido de cloro (ClO_2) como control: donde se tomaron tres bolsas y
b) Con muestras desinfectadas con dióxido de cloro (ClO_2): donde se tomaron tres bolsas por día de almacenamiento.

Para dichas evaluaciones se tomaron en cuenta dos factores:

7.1 Microbiológico

Antes de realizar los análisis, se tomaron las medidas de gases CO_2 y O_2, esto para comparar la cantidad de microorganismos con la presencia de gases. En cuanto al análisis microbiológico se determinó aerobios totales y mohos y levaduras. Para ello, se pesó asépticamente 30 g de lechuga en una bolsa estéril, se diluyó con 270 ml de solución salina de peptona (8,5 g/L de NaCl y 1 g/L de peptona), se homogenizó durante 1 minuto en un Stomacher 400-circulator SEWARD. Esta dilución es 10^{-1}. Posteriormente se procedió a tomar 1 ml del concentrado y se diluyó en 9 ml de agua peptonada, y así sucesivamente, hasta llegar a una dilución de 10^{-5}.

Dichas diluciones se vertieron en una capsula de petri con Agar Nutritivo (23 g/L) para el recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, y se incubaron a 30 °C durante 3 días. Para determinar mohos y levaduras, se sembró por superficie 0,1 ml del concentrado en medio de cultivo agar papa dextrosa con superficie acidificada con ácido tartárico, y se incubo a 30 °C durante 3 días (Debevere y col., 2007a).

7.2 Calidad Sensorial

Para la evaluación sensorial de las muestras y respectivos controles, se realizó una prueba numérica de calidad de puntaje compuesto, bajo la siguiente escala valorativa: 1 = extremadamente pobre, 3 = Pobre, 5 = indiferente, 7 = Bueno, 9 =

Excelente. Dicha escala fue utilizada para evaluar la calidad de las siguientes características:

Visual:

- Oscurecimiento del borde de la hoja
- Oscurecimiento de la superficie de la hoja
- Marchitez
- Sequedad
- Calidad visual global

Olfativa:

- Olor (Debevere y col., 2007b)

8. Cultivo *in vitro* de lechuga (Lactuca sativa L.):

La técnica de cultivo *in vitro* o propagación clonal, se realizó, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, donde se obtuvo una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante que se utilizó para este caso fueron 36 semillas de lechuga variedad Iceberg geminadas *in vitro*, que originarán plántulas que posteriormente serán propagadas *in vitro* siguiendo las etapas que se describen a continuación, según Muñoz (2007):

- Etapa 1 Germinación *in vitro* de semillas de lechuga:

Antes de sembrar los explantes (semillas) en cada placa, se desinfectaron con un agente químico, generalmente cloro comercial (hipoclorito de sodio al 5%) y agua destilada estéril (Tabla 2), durante 5 min, que se retiró por lavado con agua destilada

estéril. Posteriormente, los explantes se transfirieron al medio de cultivo MS, en condiciones asépticas.

Tabla 2. Solución para desinfección de explantes

Solución	Cantidad por cada 100ml
Hipoclorito de Sodio al 5% (cloro comercial)	50% (50 ml)
Agua Destilada Estéril	50% (50 ml)

Para la germinación se preparó un medio Murashige y Skoog (1962) (Tabla 3) suplementado con tiamina (5mg/L), mioinositol (100mg/L), sacarosa como fuente de carbohidratos (30 mg/L), y como agente gelificante agar (8 g/L). Este agar fue vertido en 26 placas de petri de 9 cm de diámetro (20 ml aproximadamente por cápsula). Posteriormente, una vez gelificado el medio, se colocaron 5 semillas en cada placa.

Tabla 3. Medio de cultivo MS para germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)*in vitro*

Solución	Cantidad por cada Litro
MS	100 ml
Myoinotisol	10 ml
Tiamina	5 ml
Sacarosa	30 gr
Agar	8 gr

- Etapa 2 Multiplicación:

Los propágulos que se desarrollaron en la etapa previa, se transfirieron a un medio d multiplicación (Tabla 4) que contiene MS (1962) suplementado con BA (Benzyl adenine) a diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla 5,con el objeto d obtener numerosos subcultivos.

Tabla 4. Medio de cultivo para etapa de multiplicación de plántulas lechuga (*Lactuc sativa* L.)*in vitro.*

Solución	Cantidad por cada Litro
MS	100 ml
Myoinotisol	10 ml
Tiamina	5 ml
Sacarosa	30 gr
BA	2000µL
Agar	8 gr

Tratamiento	Regulador de Crecimiento	Concentración (mg/l)
M1	BA	0,01
M2	BA	0,25
M3	BA	0,35
M4	BA	0,5
M5	BA	1
M6	BA	2

Tabla 5.concentraciones de BA empleadas en medios de cultivo para la etapa d multiplicación de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) *in vitro.*

- Etapa 3 Preparación de las plántulas para la transferencia al suelo:

Las plántulas obtenidas se transfirieron del medio de multiplicación a un medio de enraizamiento (Tabla 6) MS (1962) suplementado con una fuente de auxinas ANA (0,5 mg/L) e AIB (0,01 mg/L) para obtener el desarrollo de raíces y el fortalecimiento de los brotes, y poder pasar a su proceso de aclimatación o autotrofia a través de la fotosíntesis.

Tabla 6. Composición de medio de cultivo para enraizamiento de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) *in vitro.*

Solución	**Cantidad por Litro**
MS	100 ml
Myoinotisol	10 ml
Tiamina	5 ml
Sacarosa	30 gr
BA	2000 µL
Regulador de crecimiento ANA o AIB	500 µL o 100 µL
Agar	6,5 gr

- Etapa 4 Aclimatación:

Etapa de transferencias de las plántulas, primero al suelo o a algún otro sustrato (arena lavada o vermiculita) y más tarde a tierra abonada en un invernadero. En esta etapa las plántulas se encuentran aún protegidas de la luz solar directa, adaptándose lentamente a las condiciones ambientales.

9. Análisis estadísticos

Los resultados de la descontaminación microbiológica para los cultivos *in vivo,* fueron analizados por la técnica de conteo por unidades formadoras de colonia o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra (Camacho y col., 2009).

Los resultados de gases y microbiológicos, fueron analizados por la prueba **t** (Debevere y col., 2007b). La prueba **t** o el **t** – Student es una prueba de importancia estadística que se utiliza para comparar una serie de datos con otra, comparando dos medias por si se presentan alguna diferencia significativa (Kent, 2003).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y ANALISIS

Material Vegetal

1. Cultivo *in vivo*

La etapa inicial de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg se desarrollaron en semilleros o en macetas con abono (Figura 4), allí se esperó su crecimiento y desarrollo hasta el engrosamiento de hojas y fortalecimiento del tallo (etapa de desarrollo del cultivo) por unos 15 días aproximadamente (Figura 5), para ser luego trasplantadas al cantero, donde se formaron hileras con 20 lechugas cada una, a una distancia 25 cm (Figura 6).

Figura 4. Germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en macetas

Figura 5. Engrosamiento de hojas y tallo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg durante 15 días.

Figura 6. Hileras de lechuga *(Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg trasplantadas después de los 15 días.

Posteriormente al trasplante, se esperó un tiempo de 2 meses para que las lechugas desarrollaran y se formara el cogollo. En esta etapa de acogollado se debió observar la formación completa de un cogollo apretado de hojas. Sin embargo, para este caso no se logró dicha forma, sino se observó un alargamiento del tallo y la formación de hojas intercaladas por cada lado, es decir, no hubo formación de cogollo, sino un crecimiento ascendente (Figuras 7 y 8).

Figura 7. Alargamiento del tallo de lechuga *(Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg sin acogollamiento.

Figura 8. Plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg a los 2 meses de crecimiento.

Esta condición se debió a la fuerte luminosidad y altas temperaturas (> **25** °C), del clima donde se desarrolló el experimento, dando origen a la fisiopatía de la inducción floral (espigado) o subida a flor que perturba el acogollamiento (Luna, 2012).

Una vez logrado el tamaño adecuado de las hojas, se procedió a realizar la recolección y procesamiento de las lechugas, como se indica a continuación:

2. **Cortado**

El proceso de recolección se realizó manualmente en horas de la mañana donde el clima está fresco y hay bajas temperaturas; en este proceso, se extrajo cada lechuga desde la raíz. Inmediatamente, se realizó un enjuague con agua destilada fría, con la finalidad de limpiar cualquier sedimento de tierra y evitar cualquier contaminación.

Después del enjuague, se almacenaron en cavas con envases de agua destilada congelada, para proporcionar frio, de manera de retardar o evitar cualquier proceso de descomposición durante el traslado (Figura 9).

Figura 9. Almacenamiento de la lechuga *(Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en cavas para su transporte

3. **Desinfección**

Esta etapa se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela, en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías el mismo día de la recolección.

Antes de la desinfección se procedió al deshoje de cada lechuga. Durante esta etapa, las lechugas se encontraban en perfectas condiciones, es decir, no se observó ningún proceso de descomposición (marchitez u oscurecimiento) en las hojas de lechuga. Una vez que se obtienen todas las hojas se procedió a la desinfección con dióxido de cloro (ClO_2).

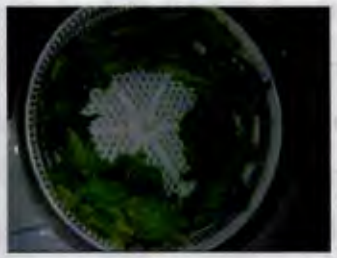
Posteriormente, se realizó la desinfección sumergiendo todas las hojas de lechuga en la solución de ClO_2 a una concentración de 5mg/L durante un periodo de 20 min, luego se retiran y se procede al secado. De acuerdo con Devliegherey y col. (2008), la lechuga debe lavarse a una concentración de 5 mg/L durante 10 min para obtener una reducción de 0,8 log ufc/g, sin embargo, para este trabajo se decidió evaluar un tiempo de lavado de 20 min.

4. **Secado**

Se retiró las hojas de la solución descontaminante y se procedió a remover el agua de las hojas mediante una centrifuga de cesta manual. Este proceso se realizó varias veces con distintos grupos de hojas, puesto que la centrifuga no presentaba la suficiente capacidad para realizarlo en un solo proceso. Este proceso es similar al utilizado a nivel industrial por Debevere (2007b), quien utilizó centrifugas eléctricas de gran capacidad y de alta potencia, para el secado.

A cada grupo de hojas se le realizaron 10 vueltas en la centrifuga (Figura 10). En este proceso las hojas de lechugas no se vieron alteradas por procesos de marchitez, todas preservaron sus atributos de calidad.

Figura 10. Hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en una centrifuga manual



5. **Empacado**

Para el empacado se tomaron 36 bolsas plásticas de polipropileno con cierre hermético (Ziploc) y se le agregaron 49,20 gr de hojas de lechuga a cada bolsa (esta cantidad fue tomada, ya que no se esperaba una alta producción de lechuga, debido a los diferentes contratiempos (problemas de control de plagas y clima) que se habían presentado en la etapa de desarrollo), posteriormente se les remueve el exceso de aire y se cierra la bolsa. Antes de ir al almacenamiento se dividen las bolsas en dos grupos: 18 bolsas para el control y 18 bolsas para las muestras tratadas. Las hojas de lechugas al ser empacadas mantuvieron su buena calidad, no hubo alteración de su calidad.

6. **Almacenamiento**

Luego de tener empacado el producto, se almacenó en una nevera a una temperatura de 7 °C por 15 días. Durante el transcurso del almacenamiento, se tomaron 3 muestras control y 3 muestras tratadas para los respectivos análisis durante los días determinados. Los otros empaques se mantuvieron refrigerados.

7. Evaluación

7.1 Microbiológica

Las muestras se analizaron cada tres días durante el almacenamiento de 15 días, es decir, los días 0 (cero), días 3, 6, 9 y 12 respectivamente. El día 15, no hubo evaluación, ya que, el material vegetal para el control estaba muy descompuesto. Antes de realizar el análisis microbiológico, se tomaron medidas de dióxido de carbono y oxigeno con un medidor CO_2/Oxygen Analyzer Brige Inc. Las medidas se tomaron de cada bolsa control y de las muestras desinfectadas durante los días de análisis, tomando como referencia la medida ambiental. En la Fig. 11 se muestran resultados acerca de la medición de gases en el tejido analizado.

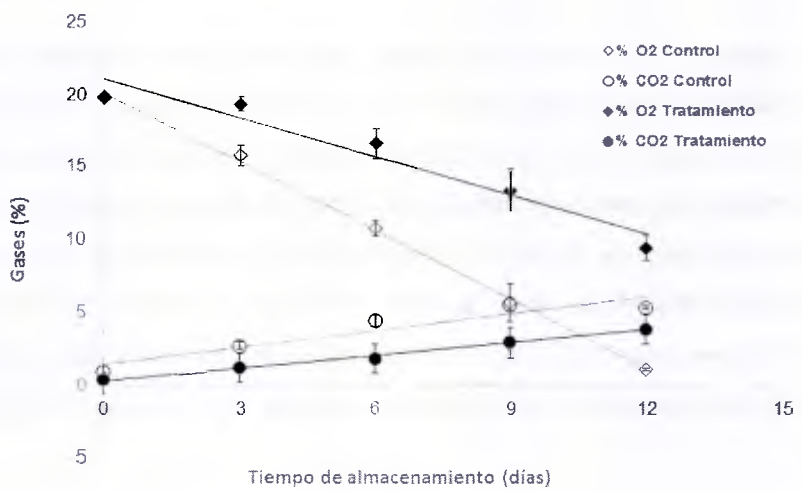


Figura 11. Porcentaje de O_2 y CO_2 determinado para controles y tratamiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.)variedad Iceberg.

La toma de medida de gases en los empaques de alimentos es significativo para la vida útil del producto, puesto que el aumento o la reducción de uno de estos gases, puede permitir la presencia de una fisiopatía o el crecimiento de microorganismos

deteriorativos y/o patógenos que desmejoran la calidad sensorial de los productos frescos y ponen en riesgo la salud del consumidor (Fernández, 2007).

Los datos obtenidos y presentados en la figura 11 son el resultado de la toma de 3 muestras por día de almacenamiento tanto para el control como las muestras desinfectadas. A cada empaque se les tomó la medida de ambos gases. Para las medidas de oxigeno se observó gráficamente que en el día cero, ambas muestras inician con un 20% de O_2, y durante el periodo de almacenamiento, este porcentaje va disminuyendo para cada muestra.

En los controles se observó una reducción de aproximadamente 5% de O_2 por cada 3 días de almacenamiento (días en que se realizaron los análisis), esto significó que para el día 12 el porcentaje de O_2 casi llegara a su consumo total aproximado de0 %. A diferencia del control, las muestras con tratamiento presentaron una reducción de aproximadamente un 3 % por cada 3 días, lo que permitió que para el último día de análisis el empaque presentara un valor cercano al 10% de O_2. Esto concuerda con Debevere y col., (2007b), en el cual las muestras tratadas mantuvieron un nivel de oxigeno mayor de 3% durante toda la vida útil.

Esta diferencia en la reducción de O_2 entre ambas muestras, se comprobó mediante el análisis estadístico, en el que la prueba t confirmó una diferencia significativa entre las muestras control y las desinfectadas con ClO_2, con un nivel de confianza de 95%.

Al mismo tiempo que los porcentajes de O_2 se redujeron en los empaques, los niveles de CO_2 para ambas muestras aumentaron en proporciones distintas, teniendo el control el porcentaje más alto con un valor aproximado de 5% y las muestras tratadas un valor aproximado de 4%. Sin embargo, la comparación entre las muestras para CO_2, demostró la existencia de diferencias significativas entre el control y tratamiento para un nivel de confianza de 95% ($p<0,05$), indicando que las muestras tratadas presentan una eficacia del 1,7% por debajo de los controles en el aumento del CO_2 en

los empaques de lechugas (*Lactuca sativa.* L.) Iceberg mínimamente procesadas con ClO_2.

El aumento de la concentración de CO_2 por encima de un 5% ocasionó el deterioro de las hojas de lechuga por la presencia de una fisiopatía llamada mancha parda o Brown Stain, estas son lesiones marrones que aparecen durante el almacenamiento a bajas temperaturas causadas por atmósferas altas en CO_2. Se caracteriza por la aparición de manchas rojizas, en la nervadura media de las hojas de lechuga (Luna, 2012). Las mismas, pueden oscurecerse o agrandarse con el tiempo, provocando la descomposición de la hoja.

Sin embargo, en las muestras desinfectadas con ClO_2, la concentración del CO_2 fue menor como se comentó previamente, lo que posiblemente ocasionó menor descomposición del material vegetal por fisiopatía Brown Stain. Además, los porcentajes de gases son aceptables para no causar deterioro en las hojas de lechuga, es decir, el ClO_2 fue capaz de mantener las concentraciones de O_2 yCO_2 en los niveles aceptables, lo suficiente para retardarla respiración sin causar descomposición (Debevere, 2007a).Gómez-López e Izquier (2015), reportaron que el ClO_2en forma de gas o acuosa no causa el pardeamiento de los productos mínimamente procesados.

Por otro lado, es necesario destacar que para la toma de gases, no se tomó en cuenta la permeabilidad de gases del empaque, ni el porcentaje de respiración de la lechuga dentro del empaque, lo cual ocasiona variación en los niveles de gases a parte del ocasionado por el crecimiento microbiológico.

Posterior al análisis de gases, se procedió a realizar las pruebas microbiológicas para aerobios mesófilos y mohos y levaduras. Los datos se tomaron del conteo de placas por unidades formadoras de colonias (UFC) por gramos. Los resultados se aprecian en las siguientes figuras:

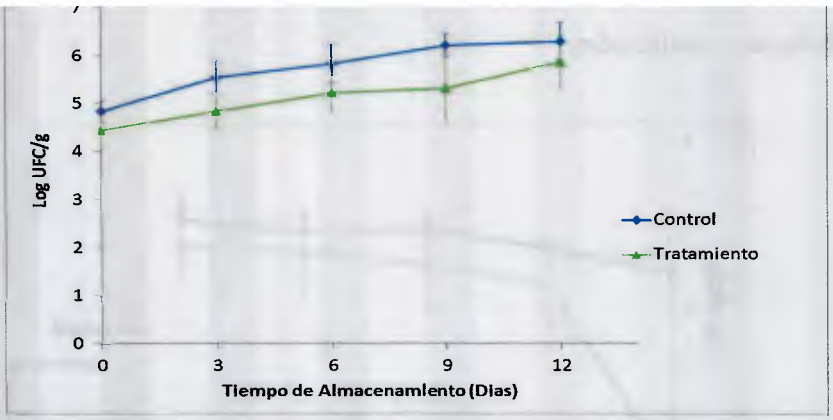


Figura12. Valores promedios del crecimiento bacteriano en las hojas de lechugas (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg para control y tratadas

En la figura 12 se observa que al inicio de los análisis (día cero), las muestras presentaron una mínima diferencia en el crecimiento bacteriano, siendo la muestra control quien tuvo mayor crecimiento con 4,8 Log (UFC/g); esto indica que el tratamiento con ClO_2, disminuyó la microflora presente en las muestras desinfectadas (Allende y col., 2010), más no la eliminó por completo. Esto se debe a que el tratamiento con ClO_2 puede reducir la microflora, pero no es capaz de eliminarla completamente, ya que el ClO_2 es menos eficaz cuando los microorganismos están ocultos en heridas, por lo tanto, puede aumentar el crecimiento de los microorganismos sobrevivientes al tratamiento (Devlieghere y col., 2008b).

De hecho, que la tasa de crecimiento de microorganismos en las muestras dos muestras (control y tratadas) aumentó gradualmente durante el almacenamiento. Estos resultados son similares a los estudios realizados por Chen y col., (2010) y Allende y col., (2010). Sin embargo, a pesar del aumento de la flora bacteriana en ambos tratamientos (control y muestras desinfectadas), el análisis estadístico encontró diferencias significativas entre el crecimiento microbiano, con nivel de confianza del

95 %. Esto confirma que el tratamiento con ClO_2 redujo la flora bacteriana inicial de las lechugas desinfectadas.

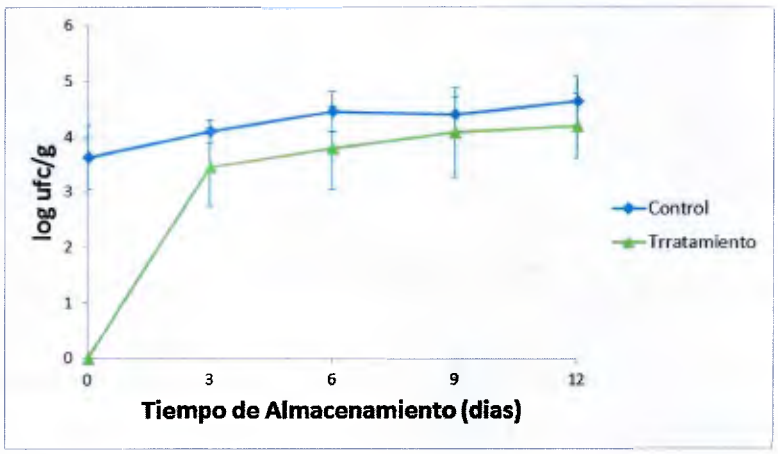


Figura 13. Valores promedios del crecimiento de mohos y levaduras en las hojas de lechugas (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg para control y tratadas

A diferencia del estudio para aerobios mesófilos, los resultados para mohos y levaduras (Fig.13) registraron que para el día cero (0), la desinfección de las muestras tratadas logró una fuerte reducción para el recuento de mohos y levaduras, mientras que en los controles prevaleció la presencia de estos con un 3,6 Log (UFC/g). Los análisis estadísticos indican que entre ambas muestras hubo una diferencia significativa ($p<0,05$). Esto indica que el ClO_2 puede limitar el crecimiento para mohos y levaduras en los empaques de lechugas Iceberg mínimamente procesadas.

Desde el punto de vista microbiológico, una extensión de la vida de anaquel significa que los recuentos microbianos de las muestras no tratadas (control) deberían alcanzar el máximo especificado antes que los productos tratados (Debevere y col., 2008). Para determinar el final de la vida útil, se tomaron en cuenta según Debevere y col.,

(2008), los siguientes rangos: 8 log UFC/g para mesófilo, 5 log UFC/g para mohos y levaduras.

De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto para los controles como las muestras tratadas, los resultados entran dentro del rango aceptable, véase la Tabla 8.

Tabla 8. Comparación de resultados de análisis microbiológicos en las muestras estudiadas

Análisis microbiológico	**Final de vida útil**	**Control**	**Tratamiento**
Mesófilos	8 log UFC/g	6,2 log UFC/g	5,8 log UFC/g
Mohos y levaduras	5 log UFC/g	4,6 log UFC/g	4,1 log UFC/g

A pesar de que los valores son aceptables para ambos casos, las muestras que fueron lavadas con ClO_2, presentaron un conteo menor de microorganismos, lo que contribuye a la preservación de la calidad sensorial, ya que no causó deterioro en el producto como se mostrará a continuación.

7.2 Evaluación Sensorial

La evaluación sensorial se realizó en la Universidad Católica Andrés Bello, en los laboratorios de la escuela de Educación mención Biología y Química. Las encuestas fueron elaboradas el día cero y el último día de análisis, el día 12. Las muestras utilizadas para el estudio fueron las mismas a las cuales se le realizó la evaluación microbiológica. Las encuestas se realizaron a 18 personas entre mujeres y hombres, para ambas muestras, control y desinfectadas. Los resultados obtenidos se representaron de acuerdo a la evaluación inicial y la final para cada ítem:

- Oscurecimiento del borde

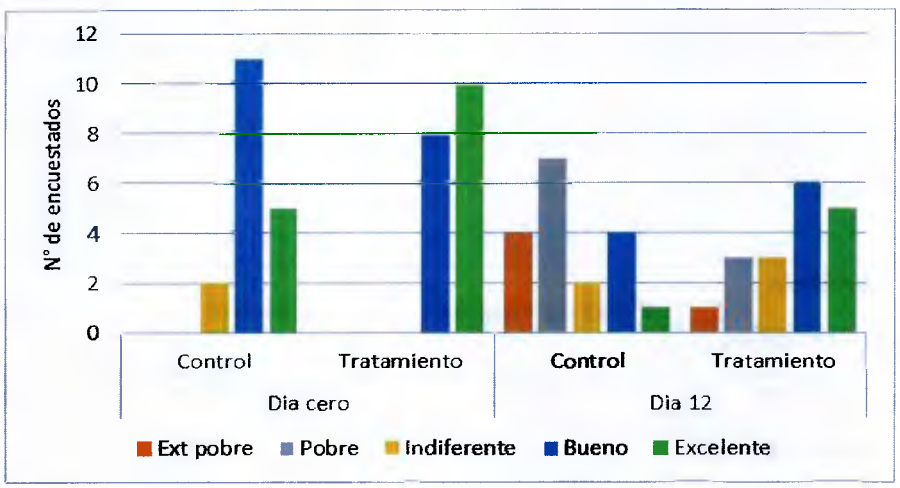


Figura 14.Grafica que representa el puntaje obtenido de calidad de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg para el oscurecimiento de borde de las muestras control y las muestras con tratamiento, en el día cero y el día 12.

En la figura 14, se observa que para el día 0, tanto las muestras control como las desinfectadas presentaron buena calidad, lo que indican que al momento del empacado se encontraban en excelentes condiciones, pero resalta que las muestras desinfectadas, en el día cero, mostraron mayor puntaje de la calidad "excelente" con respecto al control. Por otro lado, a los 12 días de almacenamiento, ambas muestras presentaron cambios; en las muestras controles hubo mucho oscurecimiento en el borde de las hojas de lechuga, por lo que la calidad de la misma fue pobre, por el contrario, las muestras tratadas con ClO_2 presentaron muy poco oscurecimiento, y se apreció nuevamente, mejor calidad del producto.

- Oscurecimiento de la superficie.

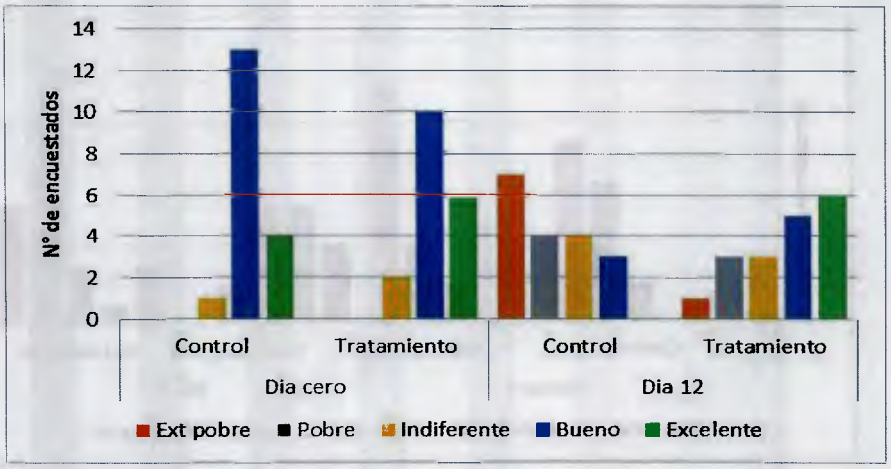


Figura 15.Grafica que representa el puntaje obtenido de calidad de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg para el oscurecimiento de la superficie de las muestras control y tratamiento, en el día cero y el día 12.

En la figura 15 se observó que en el día 0, ambas muestras control y tratamiento presentaron buena calidad, pero siendo mayor el puntaje de "excelente" para la muestra desinfectada con ClO_2. A los 12 días, el control presenta más de la mitad de oscurecimiento de la hoja, lo que causó una pérdida total de la calidad; por el contrario las muestras tratadas, presentaron muy poco oscurecimiento de la superficie, mostrando mejor calidad sensorial para los encuestados.

- Marchitez

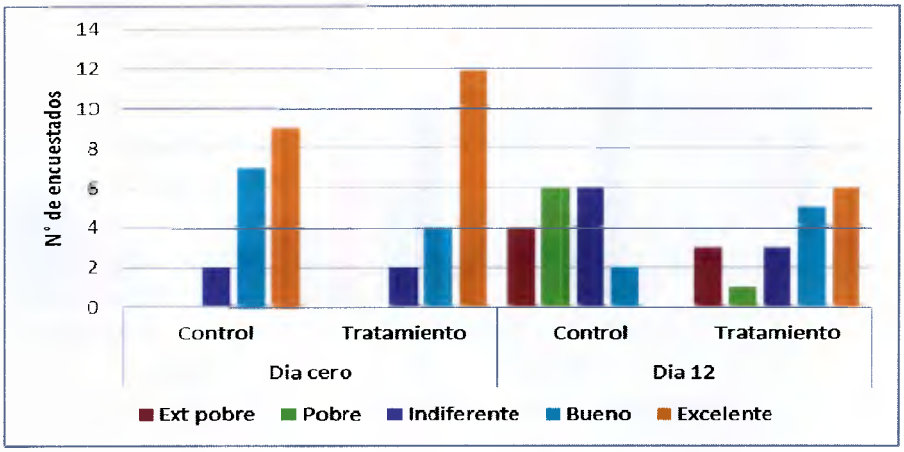


Figura 16.Grafica que representa el puntaje obtenido de calidad de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg para la marchitez de las muestras control y tratamiento, en el día cero y el día 12.

La figura 16, muestra la buena calidad de las hojas estudiadas, ya que no presentaron marchitez ni las muestras controles, ni para las desinfectadas en el día 0, pero siendo evidente la mejor apreciación de calidad para la muestra tratada con el desinfectante estudiado. Después de 12 días, los controles desmejoran su calidad, observándose marchitez en gran parte de la superficie de la hoja. En cambio, la presencia de marchitez para las muestras tratadas fue menor, lo que quiere decir, que las hojas de lechugas mantienen mejor su color y calidad, a pesar del tiempo que permanecieron en almacenamiento.

- Sequedad

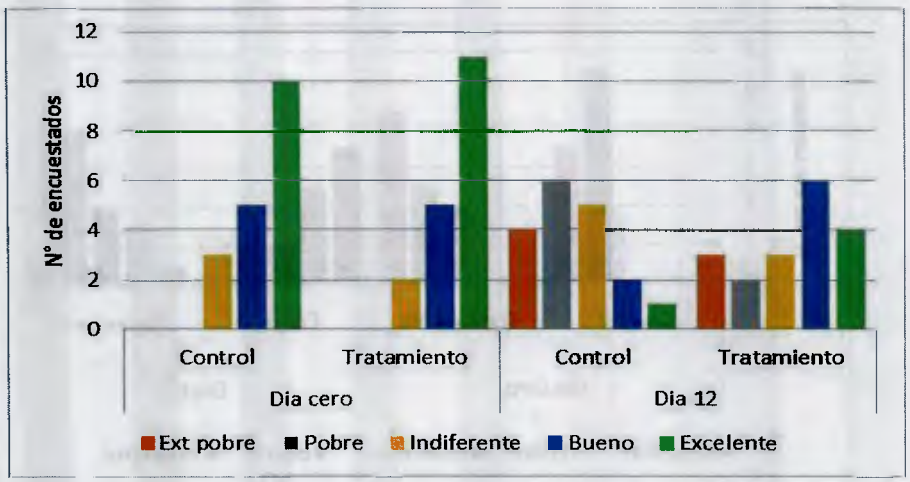


Figura 17. Grafica que representa el puntaje obtenido de calidad de la lechuga (*Lactuca sativa* L.)variedad Iceberg para la sequedad de las muestras control y tratamiento, en el día cero y el día 12.

La sequedad en las lechugas se visualiza cuando las hojas presentan flacidez. En el análisis para el día 0, ambas muestras (control y tratamiento), no mostraron sequedad, es decir, se observó una hoja crujiente de buena calidad. Para el día 12, las muestras controles presentaron puntajes más bajos en la calidad, ya que las hojas mostraban sequedad, manifestándose como flacidez. Por otro lado en las muestras tratadas, la sequedad no se hizo presente en la mayoría de las muestras lo que refleja que la hoja de lechuga se mantuvo crujiente y de buena calidad (Fig. 17).

- Calidad Visual

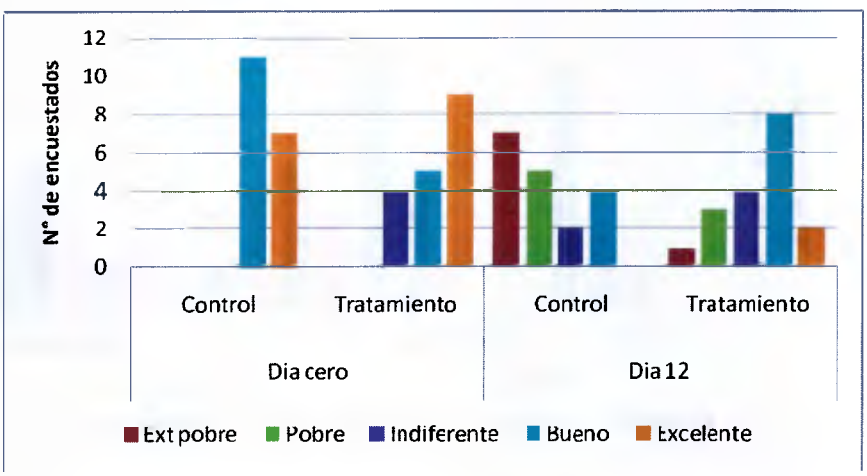


Figura 18. Grafica que representa el puntaje obtenido de calidad de la lechuga (*Lactuca sativa* L.)variedad Iceberg para la calidad visual de las muestras control (sin desinfección ClO_2) y las muestras con tratamiento de ClO_2, en el día cero y el día 12.

La grafica 18, muestra los resultados de calidad visual general de las hojas de lechuga, es decir, que la hoja presentó un color verde y se encontraba crujiente. Estas características fueron identificadas con la opción "excelente" y "buena" para control y tratamiento. En el último día de análisis, el control presentó deterioro completo en la hoja, con una calidad pobre y extremadamente pobre. En el caso de las muestras tratadas la calidad visual se mantiene con un puntaje alto entre los encuestados, es decir el resultado fue "bueno" y "excelente" visualmente para el consumo humano, lo que implica que las muestras siguen siendo aprobadas por el mercado para ser comercializadas, puesto que como se comentó previamente, también presentaban un crecimiento microbiológico dentro de los limites.

- Calidad Sensorial Olfativa

Olor

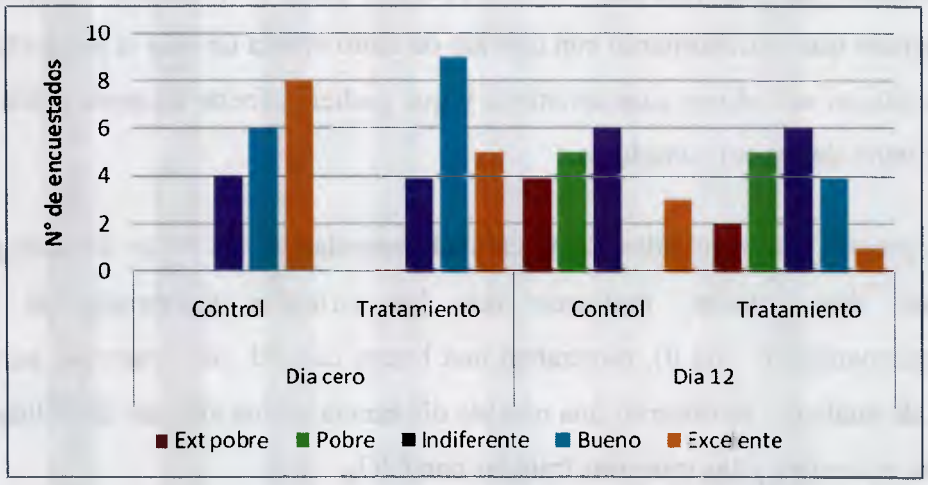


Figura 19.Grafica que representa el puntaje obtenido de calidad de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg para la calidad olfativa (olor) de las muestras control y tratamiento, en el día cero y el día 12.

Tanto las muestras control como las desinfectadas, presentaron en el día cero un olor característico señalado como "bueno" y "excelente, además agradable para el consumo, pero es de notar que para el caso de la muestra desinfectada, el puntaje mayor fue "bueno" y no "excelente". Para el día 12, las muestras control no presentaron su olor característico, sino fétido, reflejado mediante la evaluación, como un olor pobre o extremadamente pobre. Ese olor ocasionó que la muestra no fuera nada agradable para su consumo. Sin embargo, para las muestras tratadas los encuestados resaltaron que las hojas no presentaban este olor característico, es decir, les era indiferente, no había un olor agradable, ni un olor fétido. A pesar de que en esta etapa las hojas de lechugas tratadas presentaban una calidad visual buena, por no presentar un olor característico, para los encuestados no se le hizo grato el consumo.

En este sentido, Allende y col., (2010), reportaron en un estudio sobre la idoneidad de dióxido de cloro acuoso vs hipoclorito de sodio como desinfectantes eficaces para preservar la calidad de la lechuga recién cortada, ligeros malos olores que se detectaron después de10días de almacenamiento, pero los panelistas también indicaron que las muestra serán aceptables para el consumo. Se puede asumir entonces que el tratamiento con dióxido de cloro aporta un olor al producto, que no se asocia con sus olores característicos y que pudiera afectar la apreciación de calidad por parte de los consumidores.

En general, los resultados de la calidad sensorial de las hojas de lechugas control como desinfectadas, indicaron que los atributos sensoriales al inicio del almacenamiento (día 0), mostraban una buena calidad. Sin embargo, para el último día de análisis, se observó una notable diferencia en los atributo de calidad sensorial entre el control y las muestras tratadas con ClO_2.

Allende y col., (2010) reportaron que los atributos sensoriales muestran buena calidad sensorial inicial después lavado para las muestras tratadas y en comparación a las muestras controles no hubo diferencias significativas con 20 mg/L de ClO_2 acuoso. Igualmente Chen y col. (2010), evaluaron la calidad sensorial para espárragos y lechuga a una concentración de ClO_2 de 100 mg/L por 20 min, donde se registró que no hubo alteración de los atributos sensoriales después del lavado, ni diferencias con respecto al control. En lechuga recién cortada, Rodgers y col. (2004), no encontraron diferencias en la calidad sensorial de las muestras tratadas con 5 mg/L de ClO_2 acuoso para 5 min respeto con los controles. Por otro lado, Kim y col. (2008), señalaron que el tratamiento acuoso ClO_2 no afectó el color de la lechuga recién cortada durante el almacenamiento.

Las puntuaciones para los controles disminuyeron severamente al final del almacenamiento con respecto a las obtenidas en el día 0. Durante el almacenamiento, los atributos: marchitez, oscurecimiento de superficie y borde, aumentaron notablemente, de tal manera que para el día 12, el material vegetal se deterioró en su totalidad (lo que es coherente con los resultados del ensayo de crecimiento microbiano), por lo tanto la calidad visual y olor, fueron no gratos para los encuestados, concluyendo que las muestras controles no son aceptables para el consumo.

En cambio, las muestras tratadas con ClO_2, mantuvieron las puntuaciones más altas de calidad sensorial en comparación con el control para el día 12. Los atributos sensoriales: marchitez, sequedad, oscurecimiento de borde y superficie, se mantuvieron aceptables por los encuestados, ya que el tratamiento controló el crecimiento microbiano, e impidió el deterioro del material vegetal, permitiendo que la calidad visual fuera aceptable por los encuestados, lo que favorece la comercialización del producto.

Este resultado se vio favorecido al aumentar el tiempo de exposición del material vegetal con el desinfectante por 20 min, como lo reconoce Chen y col., (2010), que mencionan en su estudio que los tiempos de tratamiento más largos siempre tienen mejores efectos inhibitorios sobre pardeamiento, es decir, el tratamiento con ClO_2 inhibe efectivamente el pardeamiento, manteniendo el color en un nivel alto, por lo tanto, podría prolongar la vida útil de la lechuga.

Podríamos decir que, con estos resultados se comprueba que el tratamiento con dióxido de cloro (ClO_2) acuoso a una concentración de 5mg/L durante 20 minutos, puede extender la vida útil de lechugas por más de 12 días de almacenamiento, controlando el crecimiento de microorganismos y conservando los atributos de calidad sensorial

8. Cultivo *in vitro*

Para la propagación *in vitro* de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg, se procedió con las siguientes etapas:

Etapa 1 Germinación *in vitro* de semillas de lechuga:

Las semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg se desinfectaron con las condiciones señaladas en la Tabla 1. Posteriormente, para la preparación del medio de cultivo MS, se realizó una cambio en la concentración del agente gelificante agar, ya que la semilla de lechuga necesita un medio más suave para la germinación, puesto que la raíz es muy débil y necesita un sustrato blando, que le permita penetrar y abrirse camino hasta afianzarse. La concentración de agar que se utilizó para la preparación del medio de cultivo MS fue de 6,5 g/L, quedando la preparación del medio de cultivo como se señala en la Tabla 9.

Tabla 9. Medio de cultivo definitivo para la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg

Solución	**Cantidad por cada Litro**
MS	100 ml
Myoinotisol	10 ml
Tiamina	5 ml
Sacarosa	30 gr
Agar	6,5 gr

Una vez preparado el medio de cultivo y sembrados los explantes en medio de MS, se llevaron a un cuarto de crecimiento con una temperatura de 18 °C y exposición a la luz por 24 horas, donde se incubaron hasta su germinación. La germinación se

observó a los 8 días de incubación, donde había presencia de raíz con vellosidades y hojas, posteriormente se trasplantaron a medios de multiplicación (Fig.20).

Figura 20. Germinación de semilla de lechuga (*Lactuca sativa* L.)variedad Iceberg después de los 8 días de su cultivo *in vitro*

Acosta y col., (2004), mencionan que la germinación de una semilla de lechuga (*Lactuca sativa* L.), está influenciada por varios factores. El primero de ellos es la temperatura que debe estar entre los 15 a 20 °C. También debe controlarse la humedad y la disponibilidad de luz. Cuando todos estos factores se presentan idóneamente, la semilla podrá germinar en un rango no mayor de 15 días. Por el contrario, si esas condiciones no se observan, las semillas se inhibirán y permanecerán en estado de latencia.

Etapa 2 Multiplicación:

En esta etapa, las semillas germinadas al tener sus órganos definidos (raíz y hojas largas), fueron usadas como explantes y trasplantadas a un medio de multiplicación. Este medio presenta la misma base del medio MS con la adición de BA (Benzyl-adenine) (Tabla 3). Durante esta etapa, se realizaron varios ensayos, con la finalidad de estandarizar la concentración adecuada para la producción de brotes. Las concentraciones de BA que se probaron fueron señaladas en la Tabla 4.

Todos los tratamientos empleados, produjeron callos organogénicos (tejido indiferenciado) (Tabla 9) (Fig. 21). Estos resultados son semejantes a los de Capote y col., (2000), quienes utilizaron BA para la regeneración de plantas a concentraciones 0, 0,1 y 1 mg/L, obteniendo como respuesta formación de callos en plantas de cebolla.

Por otro lado, Núñez y col., (2004), demostraron que el Biobras-6 y el MH-5 estimularon la formación de callos y brotes a partir de cotiledones, cuando se añadieron a concentraciones de 0.001 y 0.01 mg/L respectivamente, al medio de cultivo con la presencia de 6-BAP (0.1 mg/L).

Figura 21. Callos organogénicos (tejido indiferenciado) de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en medio de multiplicación

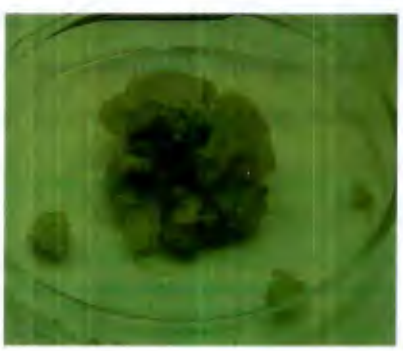


Tabla 9. Respuesta de los explantes de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en el medio de multiplicación

Regulador de Crecimiento	Concentración (mg/l)	Respuesta (Brotes)
BA	0.01	Sin Brotes (callos)
BA	0.25	Sin Brotes (callos)
BA	0.35	Sin Brotes (callos)
BA	0.5	Sin Brotes (callos)
BA	1	Sin Brotes (callos)
BA	2	Brotes (cinco por capsula)

Debido a estos resultados, se decidió duplicar la dosis a 2 mg/L de BA, para buscar la diferenciación de brotes, lo que trajo como resultado, que en un periodo de 10 días, se observara dicho proceso, lo que permitió que los mismos fueran divididos y sembrados en otros medios con la misma concentración para obtener mayor multiplicación. (Fig. 22 y 23).Ese mismo efecto, lo lograron Bazaldúa y col., (2002), al emplear BA a 2mg/L para la inducción de brotes en plantas de tomate. También Salgado y Suarez, (2008), utilizaron BA para propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, en donde se obtuvieron multiplicación de brotes bien diferenciados y desarrollados con morfología normales.

Figura 22. Multiplicación de brotes de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg en medio de multiplicación.

Figura 23. Plántulas de de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg con hojas largas y fuertes, seleccionadas para ser transferidas a medios de enraizamiento.

Etapa 3 Enraizamiento de las plántulas para la transferencia al suelo:

Una vez multiplicados los explantes, se seleccionaron aquellos que presentaron un desarrollo óptimo de hojas (largas y fuertes) (Fig. 23), para ser transferidos a otros medios con reguladores de crecimiento encargados de inducir procesos de enraizamiento. Los medios fueron suplementados con hormonas AIB y ANA (Acido Naftalacético) con las concentraciones pautadas en la Tabla 6, hasta obtener un enraizamiento adecuado. Los resultados relativos al enraizamiento de las plántulas, se obtuvieron a los 15 días de haber transferidos las plantas a dichos medios, donde el medio suplementado con ANA fue el que reporto resultados exitosos (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento en el proceso de enraizamiento de plantas in vitro de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Iceberg

Regulador de Crecimiento	**Concentración (mg/l)**	**Resultado**
AIB	0,01	Sin respuesta
ANA	0,5	Formación de raíces

En la Tabla 10 se muestra que en el medio suplementado con 0,01 mg/L de AIB, no hubo formación de raíces, por el contrario en el medio suplementado con 0,5 mg/L de ANA se observó una alta presencia de raíces con variabilidad en ancho y en tamaño de las mismas (Fig. 24). Estos resultados son semejantes a los de Capote y col., (2000), quienes adicionaron ANA (1 y 2 mg/L) al medio de cultivo para la inducción de raíces, donde se observó aparición y fortalecimiento de raiceas *in vitro*. Por otro lado, Salgado y col., (2008), utilizaron ANA en combinación de BA para la regeneración de raíces (0,5 y 1 mg/L)y De Jesús y col., (2006), utilizaron ANA en diferentes concentraciones (0,1; 0,5 y 1 mg/L) para enraizamiento de Madevilla

blanca *(Mandevilla laxa),* observándose formación de raíz a una concentración de 0,5 mg/L.

Figura 24. Presencia de raíces de plantas in vitro de lechuga (*Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg en medio de enraizamiento al utilizar ANA (0,5 mg/L)

El medio suplementado con ANA favoreció el fortalecimiento de raíces, sin embargo, aunque hubo un desarrollo de raíces para esta concentración, el tallo de los explantes no presentó un desarrollo óptimo, es decir, no se observó engrosamiento de tallo, ni crecimiento de hojas, lo que no permitió el paso de los explantes a la etapa de aclimatación (Fig. 25).

Figura 25. Desarrollo débil de tallos y hojas de plantas in vitro de lechuga (*Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg en medio de enraizamiento

Etapa 4. Aclimatación

Para que una planta pueda pasar a esta etapa, debe presentar ciertas características, relacionadas a la morfología de cada planta. En el caso de la lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg, esta debe presentar una raíz larga y gruesa, un tallo medianamente grueso con ramificaciones de hojas desde la base, estas hojas además deben presentar 1 cm de grosor y 5 cm de largo aproximadamente; y un borde aserrado propio de esta hortaliza. Todas estas características, se deben observar en la etapa anterior. Por tal motivo, debido a que el material vegetal en la etapa de enraizamiento no alcanzó las características morfológicas necesarias, no se pudo llevar a cabo el proceso de aclimatación.

Sin embargo, esta etapa es muy importante debido a que el éxito o el fracaso de todo el proceso *in vitro* depende de la aclimatación, puesto que, los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales debido a que crecen bajo una ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo. Es por ello, que en esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferentes tipos, que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales (Castillo, 2004).

Estos cambios, deben permitir el fortalecimiento y desarrollo del material vegetal tal cual como se espera en un cultivo *in vivo*, es decir, en el caso de la lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg, al ser pasadas del medio de enraizamiento al de aclimatación, las mismas se encuentran en la etapa de desarrollo del cultivo *in vivo,* por lo que se espera que a partir de ese momento, estas empiecen el engrosamiento de hojas y fortalecimiento de tallo hasta el acogollamiento, donde empieza la postcosecha.

Por otro lado, esta etapa es muy importante, puesto que dependiendo del crecimiento y el desarrollo de las plántulas de lechuga, estas pueden ser seleccionadas para su procesamiento por MPFH, ya que, en primer lugar, deben presentar similitud entre las características de un cultivo *in vivo* que es utilizado como producto comercial. De esta manera, al presentar semejanzas pueden ser elegidas para MPFH, y posteriormente ser comercializadas al mismo nivel que un cultivo *in vivo*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después del análisis realizado para evaluar el empleo del dióxido de cloro como alternativa de conservación con mínimo procesamiento de frutas y hortalizas (MPFH) en las plantas de lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg, se llegó a las siguientes conclusiones:

1) La obtención de lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg a través del cultivo *in vivo,* se logró en un clima con temperatura mayor a 25 °C, donde no se observó acogollamiento.
2) El secado de la lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg se llevó a cabo exitosamente en varias etapas por la cantidad de material; y para el empacado del material vegetal las bolsas de polipropilenos funcionó satisfactoriamente durante el almacenamiento.
3) En la determinación de gases se corrobora que las muestras desinfectadas conservaron la cantidad de gases aceptables para la vida útil de la lechuga.
4) Se confirmó la efectividad del ClO_2 en la reducción de microorganismos (aerobios mesófilos y mohos y levaduras) causantes del deterioro de calidad en la lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg.
5) Se confirma la efectividad del ClO_2 en la conservación de atributos de calidad para lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg.
6) En relación con la vida en anaquel, se recomienda extender el estudio para más días de almacenamiento para determinar el tiempo de vida útil aproximado en cuanto a su calidad microbiológica y sensorial.
7) La obtención del cultivo *in vitro* lechuga *(Lactuca sativa* L.*)* variedad Iceberg se logró a través de un proceso de micropropagación, culminando en forma exitosa hasta la etapa de enraizamiento.

8) El resultado de la presente investigación permitió determinar que este método puede ser empleado a nivel industrial en la descontaminación de plantas de lechugas *Iceberg* como mínimo procesamiento MPHF, cuyo uso favorecerá la preservación del material vegetal en empaques y almacenamiento. Igualmente, plantea que para investigaciones futuras se podría comprobarla aplicación de este método junto con el cultivo *in vitro* para beneficio del rendimiento en la calidad, los atributos sensoriales y el periodo de vida útil.

Recomendaciones

1) Se recomienda realizar la etapa de desarrollo de cultivo *in vivo* en un clima más cálido para producir acogollamiento.
2) En el lavado con dióxido de cloro del cultivo *in vivo,* se recomienda considerar la cantidad de material vegetal a desinfectar para evitar la prolongación del tiempo de exposición del producto con el desinfectante.
3) El proceso de secado es recomendable realizarlo en una centrifuga con mayor capacidad.
4) Se recomienda estudiar más a fondo el efecto de la descontaminación sobre el olor del producto, con la intención de minimizar el efecto que pueda causar sobre su calidad y apreciación por parte de los consumidores.
5) Para el cultivo *in vitro* es recomendable aumentar la dosis de los reguladores de crecimiento para el fortalecimiento del tallo de las plántulas propagadas y llevar a cabo la etapa de aclimatación.
6) Al completar la etapa de aclimatación por cultivo *in vitro*, se debe realizar la desinfección con ClO_2 y posteriormente realizar los análisis de gases, microbiológico y sensoriales, para su comparación con el cultivo *in vivo.*

REFERENCIAS

Acosta, D. Repetto, C y Tarigo A. (2004). ***Evaluación Agronómica de Biofertilizantes en la producción de Lechuga (Lactuca sativa* L.*) a campo.*** Universidad de la Republica Facultad de Agronomía. Uruguay. [Tesis en línea]. Consultado el 30 de Agosto de 2015 en:http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/textostesis/2004/3171tar1.pdf

Aguilar, M, Melgarejo, L y Romero, M. (2013). ***Fitohormonas.*** Laboratorio de Fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia

Allende A. Gil, M. López-Gálvez, F. Martínez-Sánchez, A. Truchado, P y Tudela, J. (2010). ***Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation.*** PostharvestBiology and Technology 55 (2010) 53–60

ArgenBio, (2015). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. ***Cultivo in vitro de plantas y su relación con la Biotecnología.*** Cuaderno N°35. Por qué Biotecnología. Programa Educativo (PQBio). [en línea]. Consultado el 12 de Noviembre de 2015 en: http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=35

Astiazarán, H. Cruz, R. Gorinstein, S. González, G. Martín, O y Robles, M. (2007).***Frutos Tropicales Mínimamente Procesados: Potencial Antioxidantey su Impacto en la Salud.****INCI.* 2007, vol.32, n.4, pp. 227-232. ISSN 0378-1844.

Bazaldúa C. García, A. Jiménez, A. Salcedo, G. Trejo, G y Ventura, E. (2002). ***Propagación in vitro de plantas de tomate con tolerancia a enfermedades de tipo viral.*** Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos.

Blanco, E y Vecentino, B. (2006). ***"Cultivo de Lechuga – Experiencia de producción en verano"*** Informe Técnico. Publicaciones Regionales INTA. El Colorado Argentina.

Cabrita, M. Gil, R. Quintero, I y Zambrano J. (2000). ***Evaluación en campo y postcosecha de nueve cultivares de lechuga (Lactuca sativa* L).**.Rev. Fac. Agron. (LUZ) 17: 482-491

Camacho, A.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B. Serrano y Velázquez, O. (2009). ***Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos***. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Cantwell, M y Suslow, T. (2015). ***Lechuga: De Cabeza o Arrepollada (Crisphead o Iceberg): Recomendaciones para mantener la Calidad Postcosecha***. Department of PlantSciences, University of California, Davis.[Pag web en linea] Disponible en: http://postharvest.ucdavis.edu/Hortalizas/Lechuga/

Capote, A.Diaz, O y Mayor, Z. (2000).***Estudio de la variabilidad inducida en célulasy plántulas de cebolla (Allium cepa, L.) cv. Caribe-71 regeneradas in vitro.*** Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT).La Habana. Cuba.

Carrillo, M y Reyes, A. (2013). ***Vida útil de los alimentos.*** Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.

Castillo, A. (2004). ***Propagación de plantas** por cultivo in vitro: una biotecnología **que nos acompaña** hace **mucho tiempo***. INIA, Uruguay.

Ceballos, H. Chavarriaga, P. Escobar, R.Fregene, M. Roca, W y Tohme, J. (2002). ***Biotecnología para la Yuca.*** Capitulo 21. La Yuca en el Tercer Milenio. Compilación. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali.Colombia. Pag 377.

Central El Palmar (2011).[Pag web en linea] Disponible en: http://www.elpalmar.com.ve/pages/servicios_biotecnologia.htm

Chen, Z.Zhub, C. Zhangb, Y.Debao, N yDub, J. (2010).***Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce (Lactuca sativa L.).***Postharvest Biology and Technology 58 (2010) 232–238

Chiesa, A. (2010).***Factores precosecha y postcosecha que inciden en la calidad de la lechuga.***Cátedra de Horticultura, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

Cossio, L. (2013). ***Reguladores de Crecimiento.*** Universidad Nacional del Nordeste Argentina. Fisiología Vegetal. [Guía de estudio] Disponible en:http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20de%20Crecimiento%20en%20las%20plantas.pdf

Debevere, J.Devliegherey, F. Gómez-López, V y Ragaert P. (2007a). ***Shelf-life extension of minimally processed carrots by gaseous chlorine dioxide.*** International Journal of Food. Microbiology 116: 221–227

Debevere, J.Devliegherey, F. Gómez-López, V.Jeyachchandran, V y Ragaert, P.(2007b). ***Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine.*** International Journal of Food Microbiology 121: 74–83.

Debevere, J.Devliegherey, F. Gómez-López, V y Ragaert, P. (2008).***Decontamination Methods to Prolong the Shelf-life of Minimally Processed Vegetables, State-of-the-art.*** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48:487–495.

Devliegherey, F. Gómez-López, V. Ragaert, P.Rajkovic,A y Smigic N. (2008).***Chlorine dioxide for minimally processed Produce preservation: A review.*** Trends in Food Science &Technology xx.1-10.

Díaz, M.Franzone, P. Ríos, R y Zappacosta, D. (2010).***Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal.*** Parte II: Métodos para generar y analizar diversidad. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Pág. 242.

FAO (2007). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. ***Material de propagación de calidad declarada.*** Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente. Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente Incompleta

Fernández, J. Gago, L. García, E. (2007). ***Tecnologías de envasado en atmosfera protectora.*** [Libro en línea]. Consultado el 25 de mayo de 2014 en:http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=ContentDisposition&blobheadervalue1=filename%3DBVCM001697.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352861356462&ssbinary=true

Galdeano, E.Luciani, G y Olmos, E. (2009). ***Micropropagación.*** Capitulo I. Parte IV Métodos de Propagación y Conservación de Germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.

García, M, López A, Quintero, R y López-Munguía, A. (2004). ***Biotecnología Alimentaria.*** [Libro en línea]. Consultado el 1 de Agosto de 2010 en: http://books.google.co.ve/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA78&dq=que+es+micropropagacion&hl=es&ei=6fVhTMK6B4-W8AT0jKi_Cw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=7&ved=0CEkQ6AEwBg#v=onepage&q&f=false

García, M (2013).***El Cultivo de la Lechuga. The letucce growing.*** Cultivos Herbáceos Intensivos. Universidad de Valladolid. Palencia. [En línea].Consultado el 25 de Octubre de 2015 en: https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2012/446/42109/1/Documento2.pdf

Gómez – López V e Izquier A (2015). ***Chlorine Dioxide in Preservation of Minimally Processed Horticultural Produce.***En prensa.

INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (2005). ***Cultivo de Hortalizas en Venezuela.*** Ministerio de Ciencia y Tecnología. Serie de manuales de cultivo INIA N°2. Pag. 191

Japón, J. (2000). ***La Lechuga.*** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España [Libro en línea] Consultado el 15 de septiembre de 2015
en:http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1977_10.pdf

Jiménez, E.(1994). ***Propagación in vitro de la caña de azúcar (Saccharum spp hibrido).***Universidad Central de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara. Cuba

Kent, M.(2003). ***Diccionario Oxford de medicina y ciencias del deporte.*** [Libro en línea]. Consultado el 3 de Marzo de 2011 en:
http://books.google.com/books?id=O7hn1Z_oJd0C&pg=PA757&dq=que+es+prueba+student+test+estadistica&hl=es&ei=h8hvTYzpOonVgAeK771S&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5&ved=0CD4Q6AEwBA#v=onepage&q&f=false

Kessel, A.(2008). ***Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies.*** Cultivos Tropicales, 2008, vol. 29, no. 3, p. 27-37

Kim, Y. Lee, S.Park ,J. Park ,J. Chung, M. Kwon, K. Chung, K. Won, M. y Song, K.(2008). ***Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes on stored 'Iceberg' lettuce by aqueous chlorine dioxide treatment*** .Journal of FoodScience73, M418-M422.

López, A. (2013). ***Calidad y autenticidad de pimiento (Capsicum annum L.) y lechuga (Lactuca sativa L.)cultivados bajo sistemas de producción sostenible.*** [Tesis en línea]. Consultado el 8 de septiembre de 2015 en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/146259/TALM.pdf;jsessionid=EEC372958EFA1C68926281028C91B5AB.tdx1?sequence=1

Luna, M.(2012).***Influencia de los Factores Pre y Postcosecha en la Calidad de la Lechuga IV Gama***.[Tesis en línea]. Consultado el 8 de Agosto de 2015 en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/104604/TMCLR.pdf;jsessionid=67D22757074BCB664051DA005BA99AE3.tdx1?sequence=1

Moreno, A. (2009). ***Efectos de la iluminación con luz UV-C sobre microfloranatural en tres variedades de lechuga frescas (Lactuca sativa L.) cortadas de ensaladas listas para servir de distribución comercial.*** Tesis de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Pág. 20.

Muñoz, M. (2007). ***Biotecnología.*** El cultivo de células y tejidos. CapítuloVII. Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires, Argentina. Pág. 122-123.

Núñez, M., Siquiera, W. J., Hernández, M. M., Zullo, M. A. T., Robaina, C., y Coll, F. (2004). ***Efecto del BIOBRAS-6 y el MH-5 en la inducción de callos y brotes en lechuga (Lactuca sativa L.).*** *Cultivos Tropicales 25* (4): 5-9.

Orellana, P.(1998). ***Introducción a la propagación masiva***. Capitulo 7. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Autor: J. N. Pérez Ponce. 390 p.

Osorio, J. (2014). ***Establecimiento de cultivos in vitro de albahaca (Ocimum basilicum) para la producción de aceite esencial.***Universidad Autónoma del Estado de México. [Tesis en línea] Consultado el 30 de Octubre de 2015 en: http://ri.uaemex.mx/bitstream/123456789/14819/1/Tesis.417185.pdf

Pelayo, M. (2007). ***Métodos alternativos de conservación de alimentos.*** [en línea]. Consultado el 1 de Agosto de 2010 en: http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2007/06/15/27934.php

Rincón, L. (2008). ***La fertirrigación de la lechuga Iceberg.*** [Libro en línea]. Consultado el 18 de Agosto de 2015 en: http://www.precirieg.net/documentacion/lechugaIceberg.pdf

Rodgers, S. Cash, J.Siddiq, MyRyser, E. (2004). ***A comparison of different chemical sanitizers for inactivating Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe.*** *Journal of Food Protection* 67, 721-731.

Salgado, J y Suarez, I. (2008). ***Propagación in vitro de Stevia rebaudiana bert. (Asteraceae-eupatorieae) a través de organogénesis.*** Universidad de Córdoba, Departamento de ingeniería Agronómica.

Segretin, M. (2007).***Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).*** Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología.

Sierra, R. (2002). ***El Álamo Temblón (Populus tremula L.) Bases para su cultivo, gestión y conservación.***[Libro en línea]. Consultado el 30 de Julio de 2010 en:http://books.google.co.ve/books?id=pwk4sGACFmgC&pg=PA173&dq=cultivos+in+vitro&hl=es&ei=Z95hTLrNPIG88gaGq-SVCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CCwQ6AEwAQ#v=onepage&q=cultivos%20in%20vitro&f=false

USDA-NRCS (2006).***The Plants Database*** (http://plants.usda.gov/23 de febrero 2007). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490. USA.

Zamora, E. (2007). ***Evaluación Objetiva de la Calidad Sensorial de Alimentos procesados*** [Libro en línea]. Editorial Universitaria. La Habana, Cuba. Disponible en: http://revistas.mes.edu.cu/elibro/libros/tecnologia/9789591605818.pdf/view