

CONCURSO NACIONAL

ESTUDIOS Y PROYECTOS DE INNOVACIÓN AGRARIA 2014-2015

PLAN OPERATIVO F UPP 73 01

MODIFICACIÓN N° 1

Nombre iniciativa:	Desarrollo de una nano-emulsión basada en compuestos naturales extraídos de desechos agroindustriales para prevenir la putrefacción en cerezas y mantener su calidad en postcosecha.
Ejecutor:	Universidad del Bío Bío
Código:	PYT-2015-0218
Fecha:	07 de enero de 2016

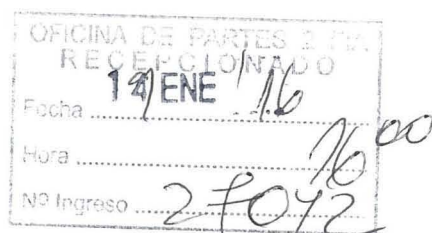


Tabla de contenidos

Tabla de contenidos	2
I. Plan de trabajo.....	3
1. Configuración técnica del proyecto	3
2. Costos totales consolidados	27
II. Detalle administrativo (Completado por FIA).....	28

I. Plan de trabajo

1. Configuración técnica del proyecto

1.1. Objetivos del proyecto

1.1.1. Objetivo general¹

Desarrollar nano-emulsiones utilizando compuestos cuticulares extraídos desde desechos de tomates para prevenir la partidura en cerezas y mantener su calidad en postcosecha

1.1.2. Objetivos específicos²

Nº	Objetivos Específicos (OE)
1	Obtener ceras cuticulares desde desechos de tomate, mediante extracción por solvente asistida por altas presiones hidrostáticas (APH).
2	Desarrollar formulaciones de nano-emulsiones, utilizando componentes cuticulares extraídos de desechos de tomate, polisacáridos y tensoactivos, mediante técnica de homogenización por alta presión (HAP).
3	Evaluar la efectividad de las nano-emulsiones para prevenir y/o reducir la incidencia de partidura en cerezas, mediante su aplicación por técnica de electrospray asistida por aire.
4	Analizar el efecto de la aplicación de las nano-emulsiones sobre los parámetros de calidad en postcosecha de cerezas
5	Proteger y transferir los resultados obtenidos.

¹ El objetivo general debe dar respuesta a lo que se quiere lograr con el proyecto. Se expresa con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

² Los objetivos específicos constituyen los distintos aspectos que se deben abordar conjuntamente para alcanzar el objetivo general del proyecto. Cada objetivo específico debe conducir a uno o varios resultados. Se expresan con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

1.2. Resultados esperados e indicadores: Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.							
Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
1	1	Obtención de ceras cuticulares desde desechos de tomate para elaboración de las nano-emulsiones	Porcentaje de ceras	g ceras/100 g de tomate seco	0	1,0 %	Mayo 2016 (*)
1	2	Comprobación del rendimiento del proceso de obtención de las ceras en otra temporada	Porcentaje de ceras	g ceras/100 g de tomate seco	0	1,0 %	Julio 2016 (*)

³ Considerar que el conjunto de resultados esperados debe dar cuenta del logro del objetivo general de la propuesta.

⁴ Los indicadores son una medida de control y demuestran que efectivamente se obtuvieron los resultados. Pueden ser tangibles o intangibles. Siempre deben ser: cuantificables, verificables, relevantes, concretos y asociados a un plazo.

⁵ Indicar el nombre del indicador en forma sintética.

⁶ Expresar el indicador con una fórmula matemática.

⁷ Completar con el valor que tiene el indicador al inicio de la propuesta.

⁸ Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar en la propuesta.

⁹ Indicar la fecha en la cual se alcanzará la meta del indicador de resultado.

Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
2	3	Obtención nano-emulsión fisicoquímicamente estable	Distribución del Tamaño partícula Potencial Z	Medido por equipo Zetaziser	0 0	20 µm 30 mV	Septiembre 2016 (*)
2	4	Validación del método de obtención de la nano- emulsión más estable con ceras obtenidas en otra temporada	Distribución del Tamaño partícula Potencial Z	Medido por equipo Zetaziser	0 0	20 µm 30 mV	Octubre 2016 (*)
3	5	Nano-emulsión de ceras cuticulares capaz de reducir en forma efectiva la partidura en cerezas	% de reducción de partidura respecto a las cerezas control no tratadas	$\frac{\% \text{ control} - \% \text{ emulsión}}{\% \text{ control}} \times 100$	100 %	40 %	Enero 2017 (*)
3	6	Comprobación de la efectividad de la nano- emulsión para reducir la partidura de cerezas en una segunda temporada	% de reducción de partidura respecto a las cerezas control no tratadas	$\frac{\% \text{ control} - \% \text{ emulsión}}{\% \text{ control}} \times 100$	100 %	40 %	Enero 2018 (*)
3	7	Validación de la nano- emulsión más efectiva en cerezas variedad Bing	% de reducción de partidura respecto a las cerezas control no tratadas	$\frac{\% \text{ control} - \% \text{ emulsión}}{\% \text{ control}} \times 100$	100 %	40 %	Enero 2018 (*)

Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
4	8	Mantención de la calidad de cerezas recubiertas con nano-emulsión durante almacenamiento en postcosecha	• Pitting inducido	Diámetro y profundidad daño	2 depresiones diámetro < 3 mm	Sin daño	Marzo 2017 (*)
			• Pérdida de peso	$\% PP = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$	10 %	3 %	
			• Firmeza	Fuerza compresión (N)	25-40	25-40	
			• Sólidos solubles	° Brix	17-21	17-21	
			• Acidez titulable	% de ácido málico.	1 – 1,1	1 – 1,1	
			• Tasa de respiración	mL CO ₂ /kg·hr	3 - 5	3 - 5	

Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
4	9	Comprobación de los parámetros de calidad de cerezas recubiertas con nano-emulsión durante almacenamiento en postcosecha durante la segunda temporada	• Pitting inducido • Pérdida de peso • Firmeza • Sólidos solubles • Acidez titulable • Tasa de respiración	Diámetro y profundidad daño $\% PP = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$ Fuerza compresión (N) ° Brix % de ácido málico mL CO₂/kg·hr	2 depresiones diámetro < 3 mm 10 % 25-40 17-21 1 – 1,1 3 - 5	Sin daño 3 % 25-40 17-21 1 – 1,1 3 - 5	Marzo 2018 (*)
5	10	Evaluación económica y de competitividad de la nano-emulsión seleccionada en el proyecto.	• Estudio económico y de competitividad	Informe de evaluación económica y de competitividad	0	1	Diciembre 2017 (*)

Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

N° OE	N° RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
5	11	Estudio de patentamiento	Solicitud de patente	Envío de solicitud	No	Sí	Marzo 2018 (*)
5	12	Difusión	Lanzamiento de Proyecto	Actividad de Lanzamiento	0	1	Junio 2015 (*)
			Publicaciones en medios regionales y pagina web de la UBB	N° publicaciones	0	3	Abril 2015 Diciembre 2016 Marzo 2018 (*)
			Seminario Científico-técnico	Desarrollo de Seminario	0	1	Marzo 2018 (*)
			Seminario de difusión de resultados finales	Desarrollo de Seminario	0	1	Abril 2018 (*)

(*) En cada fecha de alcance de meta, se elaborará un reporte y/o informe de laboratorio en el cual se indique el logro de las metas señaladas para cada resultado esperado.

1.3. Indicar los hitos críticos para el proyecto.

Hitos críticos ¹⁰	Resultado Esperado ¹¹ (RE)	Fecha de cumplimiento (mes y año)
Definición de protocolos para los procesos de extracción de las ceras cuticulares	Obtención de ceras cuticulares desde desechos de tomate	Mayo 2016
	Comprobación del rendimiento del proceso de obtención de las ceras	Julio 2016
Establecimiento del protocolo para el desarrollo de nano-emulsión mediante técnica de homogenización por altas presiones	Obtención de nano-emulsión físicoquímicamente estable	Septiembre 2016
	Validación del método de obtención de la nano-emulsión más estable	Octubre 2016
Selección de la formulación de nano-emulsión más efectiva para reducir la partidura	Nano-emulsión de ceras cuticulares capaz de reducir en forma efectiva la partidura en cerezas	Enero 2017
	Comprobación de la efectividad de la nano-emulsión para reducir la partidura de cerezas	Enero 2018
	Validación de la nano-emulsión más efectiva en cerezas variedad Bing	Enero 2018
Selección de la formulación de nano-emulsión más efectiva para mantener la calidad postcosecha de las cerezas	Mantención de la calidad de cerezas recubiertas con nano-emulsión durante almacenamiento en postcosecha.	Marzo 2017
	Comprobación de los parámetros de calidad de cerezas recubiertas con nano-emulsión durante almacenamiento en postcosecha	Marzo 2018
Establecimiento del know how relacionado con protocolo de extracción de las ceras cuticulares y el desarrollo y aplicación de la nano-emulsión óptima para la prevención de la partidura	Estudio de patentabilidad	Marzo 2018

¹⁰ Un hito representa haber conseguido un logro importante en la propuesta, por lo que deben estar asociados a los resultados de éste. El hecho de que el hito suceda, permite que otras tareas puedan llevarse a cabo.

¹¹ Un hito puede estar asociado a uno o más resultados esperados y/o a resultados intermedios.

- 1.4. Método: identificar y describir los procedimientos que se van a utilizar para alcanzar cada uno de los objetivos específicos del proyecto. (Incluir al final, las actividades de difusión y transferencia de los resultados del proyecto) (máximo 8.000 caracteres para cada uno).

Método objetivo 1: Obtener ceras cuticulares desde desechos de tomate, mediante extracción por solvente asistida por altas presiones hidrostáticas (APH)

La empresa Sugat Chile Ltda. proveerá los desechos de tomates (tomaza) para la extracción de las ceras cuticulares, las cuales serán utilizadas para la preparación de las formulaciones de nano-emulsiones. Debido a que la empresa procesa diferentes tipos de pulpa de frutas y pasta de tomate, ésta adecuará parte de sus procesos de elaboración para la obtención de residuos exclusivamente de tomate. Además realizará análisis fisicoquímicos a la tomaza para asegurar su estandarización, brindará el apoyo de dos Ingenieros de proceso y de técnicos u operarios para la separación de la tomaza, el envasado, estibado y su almacenamiento.

Estos desechos serán trasladados a la Planta Piloto de la Universidad del Bio Bio para su posterior procesamiento.

Pretratamiento:

Estos desechos se someterán a un secado en estufa de aire forzado a 40° C hasta una humedad de 10%. Los desechos secos se someterán a un proceso de separación de las semillas y posteriormente a un proceso de molienda para reducir su tamaño y facilitar la extracción de los componentes cuticulares.

Aislación de las cutículas:

Las muestras secas se incubarán en una solución de buffer de ácido cítrico a pH 4.0, conteniendo pectinasa (90 ml/L) y celulasa (5 g/L), la solución se someterá a vacío para acelerar el proceso de separación de la cutícula, de acuerdo al procedimiento señalado por Peschel et al., (2007).

Extracción y caracterización de las ceras cuticulares:

A las cutículas aisladas se les someterá a un proceso de extracción de sus ceras cuticulares con cloroformo y/o metanol, asistido con el uso de altas presiones hidrostáticas en un equipo (AVURE Inc Kent, WA. USA), a temperatura ambiente. Se utilizará un proceso de presión pulsada, de 300 MPa durante lapsos de 30 segundos cada uno por un tiempo total de 3 minutos. Posteriormente la mezcla será filtrada, centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante separado se concentrará mediante evaporación a vacío a 40 °C y se almacenará en refrigeración hasta su caracterización. Esta actividad se realizará en la Planta Piloto de la Universidad de La Serena.

La caracterización de las ceras se realizará mediante técnica CG-MS, de acuerdo a metodología descrita por Vogg et al., (2004). Este análisis será realizado por el Laboratorio de Experimentación, Control y Certificación (Lecyca) de la Universidad del Bio Bio.

Método objetivo 2: Desarrollar formulaciones de nano-emulsiones, utilizando componentes cuticulares extraídos de desechos de tomate, polisacáridos y tensoactivos, mediante técnica de homogenización por alta presión (HAP).

Formación de las nano-emulsiones:

La composición de las formulaciones de nano-emulsión a estudiar, incluirá la combinación de cada uno de los componentes a cada una de sus concentraciones, mediante un diseño experimental completamente aleatorizado:

Componentes	Concentración
Extracto de ceras cuticulares	0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 %
Ácido esteárico	1.0 y 2.0 %
Tween 80	1.0 y 2.0 %
HPMC (Hidroxipropilmetilcelulosa)	1.0 y 2.0 %
CaCl ₂	0.0, 0.5 %

El ácido esteárico y Tween 80 se utilizarán para aumentar la estabilidad de las emulsiones, disminuir su tensión superficial y mejorar el proceso de mojado de la superficie de las cerezas. Cloruro de calcio se utilizará como un osmoregulador en las nano-emulsiones y HPMC actuará como una matriz soporte de las ceras.

Para la preparación de las formulaciones se empleará el método emulsionado. Las cantidades precisas de hidroxipropilmetilcelulosa se disolverán en agua destilada a 70 °C, manteniendo una agitación constante en agitadores magnéticos hasta su completa dispersión y solubilización. Los componentes hidrofóbicos (cera cuticular, ácido esteárico y Tween 80) previamente disueltos, serán mezclados con la disolución polimérica y sometidos a un proceso de pre-homogenización (Ultra Turrax T25) a una velocidad de 10.500 rpm. Finalmente, esta mezcla será tratada en un homogeneizador de alta presión (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido) a una presión de 200 y 300 MPa a 70 °C.

Caracterización de la nano-emulsión y de los recubrimientos formados:

Tamaño de partículas de la emulsión. El tamaño de las gotas, en las emulsiones diluidas será medido utilizando el equipo Zetasizer, (MALVERN INSTRUMENT). El tamaño promedio de las partículas será reportado, usando la teoría de Mie. El potencial Z de las nano-emulsiones, parámetro asociado a la estabilidad de las emulsiones, será cuantificado utilizando también el equipo Zetasizer, modelo (MALVERN INSTRUMENT)

Medición de Turbidez. La turbidez de las muestras será medida utilizando un espectrofotómetro UV visible (Agilent 7010). Las muestras diluidas en buffer serán medidas a 600 nm.

Caracterización reológica: Las curvas de flujo serán obtenidas utilizando un reómetro Physica® MC300 (Physica USA Inc., Spring, TX) conectado a una interfase (Rheolab, MC120). La temperatura de las formulaciones (25 °C) será controlada con un baño de agua (Physica® Viscometherm, VT 10). El reómetro será controlado con el software US200 v2.0 (Physica® USA Inc., Spring, TX). Los datos obtenidos a través del software US200 Physica® serán graficados y analizados utilizando los modelos de plástico de Bingham, ley de la potencia, Herschel-Bulkley, Casson y Ostwald. La viscosidad para cada una de las formulaciones se obtendrá a partir del modelo que mejor se ajuste en un intervalo de gradiente de velocidad de 0,1 a 1000 s⁻¹.

Mojabilidad de la superficie de las cerezas con las nano-emulsiones

a) **Tensión superficial de las emulsiones:** La tensión superficial de las emulsiones será medida utilizando el método de la gota suspendida (Wu, 1974). Este método se basa en el análisis del

perfil de la gota suspendida que se encuentra en equilibrio hidrodinámico e interfacial. Utilizando la ecuación de Bashforth y Adams, obtendremos la tensión superficial.

$$\gamma = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot (d_e)^2}{H}$$

Dónde:

g: aceleración de gravedad

$\Delta\rho$: diferencia de densidad entre la gota y el aire

d_e : diámetro ecuatorial de la gota

d_s : diámetro horizontal, en un plano medido a una distancia d_e desde la base de la gota

H : factor de corrección determinado por el parámetro de forma S

Angulo de contacto: El ángulo de contacto de cada emulsión con la superficie de la cereza será obtenido a través del análisis de imagen de la gota sobre la superficie de la cereza, usando el software ImageJ. Las imágenes serán adquiridas mediante una cámara digital réflex con lente macro.

Estudio estructural de las emulsiones y de los recubrimientos secos: Previo a un proceso de tinción, cada formulación se someterá a un análisis estructural mediante microscopía óptica para conocer la distribución de los componentes hidrófobos. La estructuración alcanzada por los recubrimientos secos se estudiará mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual se realizará en el Laboratorio de Microscopía Electrónica. U de Concepción.

Permeabilidad al vapor de agua y oxígeno. La permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono de los recubrimientos aislados, se realizará siguiendo las normas ASTM F-1249 y ASTM D-3985. Estas mediciones se realizarán en el Laboratorio de Envases (LABEN-Chile) de la Universidad de Santiago de Chile.

Método objetivo 3: Evaluar la efectividad de las nano-emulsiones para prevenir y/o reducir la incidencia de partidura en cerezas, mediante su aplicación por técnica de electro spray asistida por aire.

Las cerezas utilizadas en este ensayo serán de la variedad Sweet heart, proporcionadas por la Sociedad Agrícola Millahue Ltda, de su fundo Millahue, ubicada en Retiro, Los Maitenes s/n, Provincia de Linares, VII Región del Maule.

Determinación de cracking inducido en laboratorio.

Para evaluar el efecto de las nano-emulsiones sobre la partidura de las cerezas, se utilizarán cerezas segregadas de la variedad Sweet heart, proporcionadas por la Sociedad Agrícola Millahue Ltda.

Recubrimiento de las cerezas en ensayos de laboratorio: Las cerezas serán recubiertas con las nano-emulsiones utilizando un equipo electro spray asistido por aire durante 30 segundos. Para ello se instalará un aspersor electrostático sobre la primera sección de una correa transportadora. Luego las cerezas recubiertas serán secadas con aire circulante a 30 °C, en la segunda sección de la correa transportadora. Con este propósito específico se construirá un sistema de aplicación de las nano-emulsiones, compuesto por una correa transportadora, la que incluirá una sección de aspersión y otra de secado. Posteriormente, las cerezas recubiertas serán puestas en envases plásticos (clamshell) y almacenadas a 0 °C. Un grupo control de cerezas será sometido al mismo proceso, pero utilizando agua destilada en lugar de las nano-emulsiones. Estas muestras serán utilizadas para evaluar el comportamiento y estabilidad de los recubrimientos formados a una temperatura de almacenamiento de 0°C y también para evaluar el efecto de estos recubrimientos sobre la susceptibilidad de las cerezas al cracking, mediante la determinación del índice de partidura.

Índice de partidura y su ubicación: Los frutos sin recubrimiento (control) y aquellos recubiertos con las distintas nano-emulsiones, se depositarán en una bandeja de germinación y se sumergirán en agua destilada por un periodo de 5 horas, de acuerdo a la metodología descrita por Christensen (1972). A intervalos de una hora se observarán todos los frutos y aquellos con daño de partidura serán extraídos y eliminados para poder determinar el índice de partidura (IP), según la fórmula propuesta por Verner y Blodgett, adaptada por Christensen (1972) y Moing et al.(2004), como se indica en la fórmula siguiente:

$$IP = \sum (Nt \times Fp) \times MVP^{-1} \times 100$$

IP: Índice de partidura; Nt: Número de frutos partidos a tiempo t; Fp: Factor de partidura a tiempo t; $\sum (Nt \times Fp)$: Total de partidura al cabo de 5 horas ; MVP: Máximo valor posible (18 frutos x 5 horas).

Determinación de la incidencia a la partidura. Ensayos en terreno.

Los ensayos para evaluar el efecto de las nano-emulsiones sobre la incidencia de la partidura en las cerezas durante su desarrollo y maduración, se realizarán en el fundo Millahue, perteneciente a la Sociedad Agrícola Millahue Ltda, que se encuentra ubicada en Retiro, Los Maitenes s/n, Provincia de Linares, VII Región del Maule. Los ensayos se realizarán en árboles del cultivar Sweet heart.

Se establecerá un sistema de bloques completamente al azar considerando tres bloques. En cada bloque se considerarán parcelas experimentales de un árbol por tratamiento. De acuerdo a los resultados preliminares de inducción de cracking en condiciones de laboratorio, se seleccionará la formulación de nano-emulsión que haya generado los mejores resultados y se utilizarán en los ensayos de campo.

El área superficial de las cerezas aumenta rápidamente durante las últimas 4 semanas antes de la cosecha, lo que coincide con la etapa III de crecimiento del fruto, donde la cutícula se adelgaza y pierde elasticidad, provocando fracturas cuticulares (Peschel *et al.*, 2007). Por esta razón, se ha definido realizar las aplicaciones de la nano-emulsión seleccionada a las cerezas a los 64, 70 y 75 días después de plena floración (DDPF). La cantidad de nano-emulsión a aplicar a cada árbol será alrededor de 1,7 litros, cantidad equivalente al utilizado para las aspersiones foliares de calcio (Wermund et al., 2005).

Los tratamiento a aplicar a los árboles de cerezos, mediante el uso de un equipo electro-spray asistido con aire (Mobile backpack sprayer, 15 litros, Electrostatic Spraying Systems) serán los siguientes:

Tratamiento 1: Sin aplicación de nano-emulsión (testigo)

Tratamiento 2: Aplicación foliar de agua pura, a los 64, 70 y 75 DDPF.

Tratamiento 3: Aplicación foliar de Formulación nano-emulsión de cera al 1% de sólidos, a los 64 DDPF

Tratamiento 4: Aplicación foliar de Formulación nano-emulsión de cera al 1% de sólidos, a los 64 y 70 DDPF.

Tratamiento 5: Aplicación foliar de Formulación nano-emulsión de cera al 1% de sólidos, a los 64, 70 y 75 DDPF.

Durante los ensayos de aplicación de las nano-emulsiones a los frutos en los árboles, se mantendrá la aplicación habitual de otros productos agroquímicos para evaluar una posible interacción con las nano-emulsiones. Estas actividades serán coordinadas y supervisadas por dos Ingenieros Agrónomos de la Sociedad Agrícola Millahue Ltda.

Al momento de la cosecha, para cada tratamiento aplicado se evaluará la incidencia a la partidura en forma porcentual. Para ello se considerará el total de las cerezas de cada árbol que presente un

calibre exportable (> 22 mm), identificando el tipo de partidura producida.

Determinación del índice de partidura. Ensayos en Laboratorio. Para evaluar el índice de partidura de las cerezas inducido en laboratorio, se recolectarán 56 frutos por tratamiento, desde los cuatros puntos cardinales del árbol expuestos al sol. Estas se transportarán en un cooler hasta la Planta Piloto de la Universidad del Bío Bío, campus Fernando May, Chillán. Los frutos serán depositados en una bandeja de germinación, la cual será sumergida en agua destilada por un período de 5 horas. Cada una hora se revisarán las bandejas para registrar partiduras.

La efectividad de la nano-emulsión seleccionada previamente a través de los ensayos de inducción de partidura en cerezas, también será validada en otra variedad de cereza que también es susceptible a la partidura como lo es la “Bing”. Esta validación se realizará al tercer año de ejecución del proyecto.

Método objetivo 4: Analizar el efecto de la aplicación de las nano-emulsiones sobre los parámetros de calidad en postcosecha de cerezas.

Para la determinación del efecto de las nano-emulsiones en la calidad de la fruta en postcosecha, se recolectarán 600 frutos de los árboles a los que se le aplicaron cada uno de los tratamientos descritos anteriormente y se trasladarán en un cooler hasta la Planta Piloto de la Universidad del Bío Bío, los frutos serán separados en 6 grupos y cada grupo en 5 subgrupos y se almacenarán en clamshell a 0 °C, durante un período de 28 días. Los siguientes parámetros de calidad serán evaluados a los días 0, 7, 14, 21 y 28.

Determinación de pitting inducido.

El daño por pitting será evaluado mediante la generación de un impacto y la toma de una impresión con una matriz de alginato para ser evaluada bajo microscopio (Axio Star plus, Carl Zeiss, Alemania) y obtener así el diámetro y profundidad del daño.

Determinación de la tasa de respiración

La tasa respiratoria se medirá determinando cuantitativamente la cantidad de anhídrido carbónico (CO₂) generado durante un proceso respiratorio a través de un sistema cerrado. La tasa de respiración será evaluada bajo condiciones de almacenamiento de 0°C.

Pérdida de peso

Las pérdidas de peso se medirán con una balanza de precisión y será calculada como:

$$\text{Pérdida de peso: } \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100$$

Donde

W_i: Peso inicial de la muestra

W_f: Peso final de la muestra

Los resultados son expresados en porcentaje de pérdida de peso.

Determinación de firmeza del fruto mediante Instron y Cherrytex.

Se utilizara un texturómetro Instron (Modelo 3345, Instron Corp, Canton MA, USA) y se evaluará la curva de fuerza-deformación. La firmeza se evaluara midiendo la fuerza de compresión (N) y deformación sufrida por el fruto (mm) para medir fuerza de ruptura y el módulo de Young.

Se comparará los resultados con Cherrytex Cv2 (g.mm⁻¹), instrumento utilizado en packings de cerezas.

Determinación de sólidos solubles (°Brix).

El contenido de sólidos solubles totales será medido a partir del jugo prensado de las cerezas, utilizando un refractómetro Leica, modelo Mark II, con control de temperatura (20° C). Los resultados serán expresados en °Brix.

Determinación de acidez titulable

1 ml de jugo de cereza prensada se diluirá con 25 ml de agua destilada. La muestra se titulará con hidróxido de sodio 0,1 M hasta un pH final de 8,1 (AOAC, 1980). Finalmente la acidez se expresará como porcentaje de ácido málico.

Determinación de pH.

El pH se determinará con un pH-metro digital.

Color: El color de las cerezas se medirá por reflectancia sobre la superficie de la piel, utilizando un colorímetro Minolta CR-200 (Minolta, Tokyo, Japan), con observador 2° e iluminante C. El colorímetro será calibrado con una placa blanca estándar y las coordenadas colorimétricas L* (luminosidad), a* (tonalidad de verde a rojo) y b* (tonalidad de azul a amarillo) del sistema CIELab serán medidas. A partir de estas coordenadas, se calcularán los parámetros de color: croma (C*ab) y ángulo de tono (h*ab), los cuales son efectivos para describir la apariencia del color visual (Bernalte *et al.* 2003)

Croma $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

Angulo de tono $h^*_{ab} = \arctg(b^*/a^*)$

Determinación de Ψ_w en fruta

El potencial hídrico (Ψ_w) se determinará mediante método psicrométrico (Praeger *et al.*, 2009) con un Psyprodata logger (Wescor Inc Logan, USA) al que va conectado una cámara C-52 (higrómetro de punto de rocío),

Estas evaluaciones se realizarán también en cerezas de la variedad Bing, durante el tercer año de ejecución del proyecto.

Método objetivo 5: Proteger y transferir los resultados obtenidos.

El conocimiento generado en el desarrollo de las nano-emulsiones, mediante técnica de homogenización por altas presiones (HAP) para evitar la partidura en cerezas y la metodología utilizada para la aplicación de las nano-emulsiones sobre las cerezas mediante sistema electrospray asistido por aire, serán protegido mediante la presentación de una solicitud de patente nacional ante el INAPI. A su vez, se realizará una evaluación económica y de competitividad de la nano-emulsión seleccionada en el proyecto.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto serán transferidos a empresas fabricantes de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, entre otras, interesada en comercializar la nano-emulsión. Se contempla a su vez, el desarrollo de capacitación y asistencia técnica a las empresas que adquieran la licencia, como así también a los pequeños, medianos y grandes productores de cerezas, que serán los usuarios finales de la nano-emulsión desarrollada.

Una vez adjudicado el proyecto se realizará difusión a través de los diarios de circulación regional y por medio de la página web de la Universidad del Bío Bío. También al inicio del proyecto se realizará



una actividad de lanzamiento, en la cual se darán a conocer los objetivos y los alcances del proyecto. Esta actividad se realizará en las dependencias de la Universidad del Bio Bio (Chillán).

Se considera la realización de dos Seminario Científico-Técnico orientado al sector productivo. En el primero se orientará a difundir los resultados sobre el desarrollo de nano-emulsiones utilizando compuestos cuticulares extraídos de desechos de tomate y su aplicación para reducir la partidura en cerezas y mantener su calidad en postcosecha.

Antes de finalizar el proyecto se realizará un segundo Seminario en el cual se darán a conocer los resultados finales obtenidos. En todas las actividades de difusión se espera una asistencia de aproximadamente 120 personas, conformadas por pequeños, medianos y grandes productores de cerezas, asociaciones de productores y exportadores (ASOEX, FEDEFruta), representantes de instituciones públicas (SAG, INIA,...) entre otros.

1.5. Actividades: Indicar las actividades a llevar a cabo en el proyecto, asociándolas a los objetivos específicos y resultados esperados.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Actividades
1	1	Obtención de los componentes cuticulares de desechos de tomates para el desarrollo de las nano-emulsiones	- Adecuación de líneas de procesos en planta de Sugat Chile Ltda. para la obtención de desechos exclusivamente de tomates, provenientes tanto de proceso en frío como en caliente. - La empresa Sugat Chile Ltda. realizará análisis fisicoquímicos a la tomaza (desechos de tomates) para caracterizarlos. La tomaza será separada, envasada y almacenada en las bodegas de la empresa. - Secado en estufa de aire forzado a 40° C hasta una humedad de 10%. Los desechos secos se someterán a un proceso de separación de las semillas y posteriormente a un proceso de molienda para reducir su tamaño y facilitar la extracción de los componentes cuticulares. - Estudios preliminares para determinar las condiciones óptima de aislación y extracción de ceras cuticulares (tipo de enzima, tipo de solvente, proporción desechos de tomate: solvente, tiempo y presión a aplicar en equipo APH). - Cuantificación e identificación de las ceras cuticulares mediante CG-MS.

1	2	Comprobación del rendimiento del proceso de obtención de ceras en otras temporadas	- Adecuación de líneas de procesos en planta de Sugat Chile Ltda. para la obtención de desechos exclusivamente de tomates, provenientes tanto de proceso en frío como en caliente. - La empresa Sugat Chile Ltda. realizará análisis fisicoquímicos a la tomaza (desechos de tomates) para caracterizarlos. La tomaza será separada, envasada y almacenada en las bodegas de la empresa. - Secado en estufa de aire forzado a 40° C hasta una humedad de 10%. Los desechos secos se someterán a un proceso de separación de las semillas y posteriormente a un proceso de molienda para reducir su tamaño y facilitar la extracción de los componentes cuticulares. - Extracción de las ceras cuticulares aplicando las condiciones óptimas determinadas inicialmente. - Cuantificación e identificación de las ceras cuticulares mediante CG-MS.
2	3	Obtención nano-emulsión fisicoquímicamente estable.	- Definición de las formulaciones de nano-emulsiones a estudiar. Establecimiento de las concentraciones y las proporciones de ceras cuticulares, polisacárido y tensoactivo a utilizar en las nano-emulsiones. - Establecimiento de las condiciones de proceso del equipo HAP (presión y temperatura) para la obtención de las nano-emulsiones. - Preparación de las nano-emulsiones y evaluación de su estabilidad y propiedades interfaciales. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones, potencial Z, medición de viscosidad, tensión superficial, ángulo de contacto. - Estudio estructural de las emulsiones y de los recubrimientos secos formados, mediante SEM y/o TEM. - Determinación de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno de los recubrimientos formados.

2	4	Validación del método de obtención de la nano-emulsión más estable con ceras obtenidas en otras temporadas	- Preparación de las nano-emulsiones empleando las condiciones de proceso seleccionadas inicialmente. - Evaluación de su estabilidad y propiedades interfaciales. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones, potencial Z, medición de viscosidad, tensión superficial, ángulo de contacto. - Estudio estructural de las emulsiones y de los recubrimientos secos formados, mediante SEM y/o TEM. - Determinación de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno de los recubrimientos formados.
3	5	Nano-emulsión de ceras cuticulares capaz de reducir en forma efectiva la partidura en cerezas	- Evaluación de la mojabilidad de las cerezas por las nano-emulsiones, mediante ángulo de contacto y determinación de tensión superficial. - Determinación del nivel de deposición de las nano-emulsiones en las cerezas mediante técnica gravimétrica y microscopia fluorescencia. - Caracterización de la homogeneidad, espesor y microestructura del recubrimiento formado mediante SEM. - Evaluación del grado de partidura inducida en las cerezas recubiertas, en condiciones de laboratorio. Se cuantificará el índice de cracking y se comparará con frutas control, no recubiertas. - Evaluación del efecto de aplicación foliar, en terreno, de la nano-emulsión seleccionada, mediante sistema electrospray asistido por aire, sobre la partidura en cerezas. Se cuantificará el porcentaje total de incidencia a la partidura, el porcentaje de reducción de la partidura respecto a las muestras no recubiertas, el índice de cracking inducido.

3	6	Comprobación de la efectividad de la nano-emulsión para reducir la partidura de cerezas en una segunda temporada	- Evaluación de la mojabilidad de las cerezas por las nano-emulsiones, mediante ángulo de contacto y determinación de tensión superficial. - Determinación del nivel de deposición de las nano-emulsiones en las cerezas mediante técnica gravimétrica y microscopia fluorescencia. - Caracterización de la homogeneidad, espesor y microestructura del recubrimiento formado mediante SEM. - Evaluación del grado de partidura inducida en las cerezas recubiertas, en condiciones de laboratorio. Se cuantificará el índice de cracking y se comparará con frutas control, no recubiertas. - Evaluación del efecto de aplicación foliar, en terreno, de las nano-emulsiones seleccionadas, mediante sistema electropray asistido por aire, sobre la partidura en cerezas. Se cuantificará el porcentaje total de incidencia a la partidura, el porcentaje de reducción de la partidura respecto a las muestras no recubiertas y el índice de cracking inducido.
3	7	Validación de la nano-emulsión más efectiva en cerezas variedad Bing	- Evaluación del efecto de aplicación foliar, en terreno, de la nano-emulsión seleccionada, mediante sistema electropray asistido por aire, sobre la partidura en cerezas de la variedad Bing. - Cuantificación del porcentaje total de incidencia a la partidura, el porcentaje de reducción de la partidura respecto a las muestras no recubiertas, el índice de cracking inducido.
4	8	Mantenimiento de la calidad de cerezas recubiertas con nano-emulsión durante almacenamiento en postcosecha	- Estudio del impacto de la aplicación de las nano-emulsiones sobre los parámetros de calidad en postcosecha de las cerezas, durante almacenamiento refrigerado. Mediante la evaluación del pitting inducido, tasa de respiración, pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles, acidez titulable, pH, color y potencial hídrico.

4	9	Comprobación de los parámetros de calidad de cerezas recubiertas con nano-emulsión durante almacenamiento en postcosecha en otras temporadas	- Estudio del impacto de la aplicación de las nano-emulsiones sobre los parámetros de calidad en postcosecha de las cerezas, durante almacenamiento refrigerado. Mediante la evaluación del pitting inducido, tasa de respiración, pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles, acidez titulable, pH, color y potencial hídrico.
5	10	Evaluación económica y de competitividad de la nano-emulsión	- Estudio económico y de competitividad de la nano-emulsión seleccionada en el proyecto
5	11	Estudio de patentamiento y transferencia de resultados	- Solicitud de patentamiento a INAPI. - Transferencia de resultados a empresas fabricantes de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, entre otras, en caso de adquirir la licencia.
5	12	Difusión de resultados	- Lanzamiento del proyecto. - Publicación en diarios regionales y página web de la Universidad del Bío Bío. - Seminario de difusión Científico-Técnico al sector productivo. - Seminario de difusión de resultados finales.

1.6. Carta Gantt: Indicar la secuencia cronológica para el desarrollo de las actividades señaladas anteriormente de acuerdo a la siguiente tabla:

N° OE	N° RE	Actividades	Año 2015 / 2018											
			Trimestres											
			2015			2016			2017			2018		
1	1, 2	- Adecuación de líneas de procesos para obtención de Tomasa, provenientes tanto de proceso en frío como en caliente.												
		- Análisis fisicoquímicos a la tomaza, envasada y almacenada en las bodegas de la empresa	X			X								
		Pretratamiento de la tomaza. Secado, separación de semillas y molienda	X			X								
		Estudios preliminares para determinar las condiciones óptima de aislación y extracción de ceras cuticulares (tipo de enzima, tipo de solvente, proporción desechos de tomate: solvente, tiempo y presión a aplicar en equipo APH)				X	X							
		Extracción de las ceras cuticulares aplicando las condiciones óptimas determinadas inicialmente						X						
		Cuantificación e identificación de las ceras cuticulares mediante CG-MS.				X	X	X						
		Definición de las formulaciones de nano-emulsiones a estudiar. Establecimiento de las concentraciones y las proporciones de ceras cuticulares, polisacárido y tensoactivo a utilizar en las nano-emulsiones.						X	X					

N° OE	N° RE	Actividades	Año 2015 / 2018															
			Trimestres															
			2015				2016				2017				2018			
2	3, 4	Establecimiento de las condiciones de proceso del equipo HAP (presión, temperatura) para la obtención de las nano-emulsiones.					X	X										
		Preparación de las nano-emulsiones y evaluación de su estabilidad y propiedades interfaciales. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones, potencial Z, medición de viscosidad, tensión superficial, ángulo de contacto.						X	X									
		Estudio estructural de las emulsiones y de los recubrimientos secos formados, mediante SEM y/o TEM.						X	X	X								
		Determinación de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno de los recubrimientos formados.						X	X	X								
3	5, 6	Evaluación de la mojabilidad de las cerezas por las nano-emulsiones, mediante ángulo de contacto y determinación de tensión superficial.							X	X			X	X				
		Determinación del nivel de deposición de las nano-emulsiones en las cerezas mediante técnica gravimétrica y microscopía fluorescencia.							X	X			X	X				
		Caracterización de la homogeneidad, espesor y microestructura del recubrimiento formado mediante SEM							X	X			X	X				

N° OE	N° RE	Actividades	Año 2015 / 2018											
			Trimestres											
			2015			2016			2017			2018		
		Evaluación del grado de partidura inducida en las cerezas recubiertas, en condiciones de laboratorio. Mediante el índice de cracking.						X	X			X	X	
		Evaluación del efecto de aplicación foliar, en terreno, de la nano-emulsión seleccionada, mediante sistema electrospray asistido por aire, sobre la partidura en cerezas Se cuantificará el porcentaje total de incidencia a la partidura, el porcentaje de reducción de la partidura respecto a las muestras no recubiertas, el índice de cracking inducido.						X	X			X	X	
3	7	Evaluación del efecto de aplicación foliar, en terreno, de la nano-emulsión seleccionada, mediante sistema electrospray asistido por aire, sobre la partidura en cerezas de la variedad Bing.										X	X	
		Cuantificación del porcentaje total de incidencia a la partidura, el porcentaje de reducción de la partidura respecto a las muestras no recubiertas, el índice de cracking inducido en cerezas variedad Bing.										X	X	
4	8, 9	Estudio del impacto de la aplicación de las nano-emulsiones sobre los parámetros de calidad en postcosecha de las cerezas, durante almacenamiento refrigerado. Mediante la evaluación del pitting inducido, tasa de respiración, pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles, acidez titulable, pH, color y potencial hídrico.						X	X			X	X	

N° OE	N° RE	Actividades	Año 2015 / 2018															
			Trimestres															
			2015				2016				2017				2018			
5	10	Estudio económico y de competitividad de la nano-emulsión seleccionada en el proyecto												X				
5	11	Solicitud de patentamiento a INAPI													X			
		Transferencia de resultados a empresas fabricantes de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, que adquieran la licencia, así como también a los pequeños, medianos y grandes productores de cerezas, mediante el desarrollo de capacitación y asistencia técnica.													X			
5	12	Lanzamiento del proyecto	X															
		Publicación en diarios regionales y página web de la Universidad del Bio Bio	X							X					X			
		Seminario de difusión Científico-Técnico al sector productivo													X			
		Seminario de difusión de resultados finales														X		
1-5	1-9	Análisis y discusión de resultados obtenidos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
1-5	1-9	Preparación y envío de artículos científicos				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
1-5	1-9	Participación en actividades de capacitación	X															

1.7. Actividades de difusión programadas:

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Junio 2015	Universidad del Bio Bio	Lanzamiento del Proyecto	120	Pequeños, medianos y grandes productores de cerezas, asociaciones de productores y exportadores (ASOEX, FEDEFruta), representantes de instituciones públicas (SAG, INIA,...), empresas fabricantes de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, entre otras.	La invitación a esta actividad se realizará mediante envío de e-mail, correo postal, invitación ampliada mediante publicación en página web de la Universidad del Bio Bio y en el diario local.
Marzo 2018	Universidad del Bio Bio	Seminario de difusión Científico-Técnico	120	Pequeños, medianos y grandes productores de cerezas, asociaciones de productores y exportadores (ASOEX, FEDEFruta), representantes de instituciones públicas (SAG, INIA,...), empresas fabricantes de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, entre otras.	La invitación a esta actividad se realizará mediante envío de e-mail, correo postal, invitación ampliada mediante publicación en página web de la Universidad del Bio Bio y en el diario local.
Abril 2018	Universidad del Bio Bio	Seminario de difusión de resultados finales	120	Pequeños, medianos y grandes productores de cerezas, asociaciones de productores y exportadores (ASOEX, FEDEFruta), representantes de instituciones públicas (SAG, INIA,...), empresas fabricantes de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, entre otras.	La invitación a esta actividad se realizará mediante envío de e-mail, correo postal, invitación ampliada mediante publicación en página web de la Universidad del Bio Bio y en el diario local.

2. Costos totales consolidados

2.1. Estructura de financiamiento.

		Monto (\$)	%
FIA			
Contraparte	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total Contraparte		
Total			

2.2. Costos totales consolidados.

II. Detalle administrativo (Completado por FIA)

- Los Costos Totales de la Iniciativa serán (\$):

Costo total de la Iniciativa		
Aporte FIA		
Aporte Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	
	Total Contraparte	

- Período de ejecución.

Período ejecución	
Fecha inicio:	20 de abril de 2015
Fecha término:	20 de julio de 2018
Duración (meses)	39 meses

- Calendario de Desembolsos

Nº	Fecha	Requisito	Observación	Monto (\$)
1		Firma de Contrato	Cancelada	
2	16.09.2015	Aprobación Informe de Saldo N° 1	Cancelada	
3	30.11.2015	Aprobación Informe Técnico y Financiero N° 1	Cancelada	
4	28.03.2016	Aprobación Informe de Saldo N° 2		
5	23.08.2016	Aprobación Informe Técnico y Financiero N° 2		
6	17.02.2017	Aprobación Informe Técnico y Financiero N° 3		
7	30.08.2017	Aprobación Informe Técnico y Financiero N° 4		
8	27.02.2018	Aprobación Informe Técnico y Financiero N° 5		
9	10.11.2018	Aprobación Informe Técnico y Financiero Final	hasta	
Total				

(*) El informe financiero final debe justificar el gasto de este aporte

- Calendario de entrega de informes

Informes Técnicos	
Informe Técnico de Avance 1:	Entregado
Informe Técnico de Avance 2:	10.06.2016
Informe Técnico de Avance 3:	09.12.2016
Informe Técnico de Avance 4:	16.06.2017
Informe Técnico de Avance 5:	15.12.2017

Informes Financieros	
Informe Financiero de Avance 1:	Entregado
Informe Financiero de Avance 2:	10.06.2016
Informe Financiero de Avance 3:	09.12.2016
Informe Financiero de Avance 4:	16.06.2017
Informe Financiero de Avance 5:	15.12.2017

Informes de Saldo	
Informe de Saldo N°1:	Entregado
Informe de Saldo N°2:	21.03.2016

Informe Técnico Final:	31.08.2018
Informe Financiero Final:	31.08.2018

- Además, se deberá declarar en el Sistema de Declaración de Gastos en Línea los gastos correspondientes a cada mes, a más tardar al tercer día hábil del mes siguiente.