



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**DETECCIÓN DE PATULINA EN MANZANA “GOLDEN
DELICIOUS” Y EN PRODUCTOS DERIVADOS
ELABORADOS INDUSTRIAL Y ARTESANALMENTE
COMERCIALIZADOS EN MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

GABRIELA HERMOSILLO MORENO

ASESOR(A):DRA. MARÍA ANDREA TREJO MÁRQUEZ

COASESOR (A): DRA. MARTHA YOLANDA QUEZADA VIAY



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Detección de patulina en manzana "Golden Delicious" y en productos derivados elaborados industrial y artesanalmente comercializados en México

Que presenta la pasante: Gabriela Hermosillo Moreno

Con número de cuenta: 410004856 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ignacio Martínez Trejo	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

A DIOS por ser la fuerza y amor que abunda mi corazón.

A MIS PADRES, por todo su apoyo, amor y cariño expresado en consejos y preocupaciones. Por ser la principal razón para que yo sea la persona a la que me he convertido. Mi eterna gratitud y cariño por siempre.

A MIS HERMANOS, Paula y Toño. Por ser los acompañantes eternos que agradezco tener en mi vida. Mi cariño y mejores deseos para ustedes siempre.

A MIS AMIGOS, por su sinceridad y cariño desde los años de secundaria hasta en la universidad. Por brindarme momentos de alegría que disfrute en su momento y que siempre quedarán grabadas en mi corazón.

Y a todos aquellos que creyeron y creen en mi.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Andrea Trejo Márquez por su gran apoyo y confianza en todo momento y por brindarnos más allá de lo que un académico ofrece. Mi sincera admiración y respeto.

A la Dra. Martha Yolanda Quezada Viay por sus enseñanzas sobre el interesante mundo de los hongos, por su comprensión, tiempo y apoyo en todo momento. Gracias por crear un ambiente de lo más agradable. Mi sincero agradecimiento y admiración.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por ser clave fundamental para la realización de la Tesis. Muchas gracias.

A la M. en C. Selene Pascual Bustamante y M. en C. Alma Adela Lira por ser ejemplos de admiración e inspiración. Por brindar consejos y la motivación para concluir la TESIS.

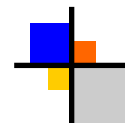
A mis sinodales Dra. Francisco Montiel Sosa, Dra Carolina Moreno, Dra. Andrea Trejo Márquez, M. en C. Ignacio Martínez Trejo y M. en C. Alma Adela Lira por indicarme las correcciones necesarias para presentar un mejor trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Postcosecha de generaciones previas y sucesivas. Por enriquecer y hacer tan agradable la realización de este proyecto. Por todas las alegrías y frustraciones que pasamos juntos. Por toda la convivencia familiar del CAT que te hace sentir como en una segunda casa.

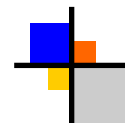
Y de antemano agradezco a la UNAM y sobre todo a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, nuestra segunda casa, donde emprendí esta maravillosa carrera profesional, lugar de grandiosas personas (académicos, compañeros y amigos de carrera) que me contagiaron de su creatividad, alegría, inspiración, amistad, anhelos y motivación para culminar esta maravillosa carrera. Por TODO, ¡Gracias UNAM!

ÍNDICE

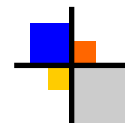
	Página
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	IX
Resumen.....	2
Introducción	4
1. Antecedentes	7
1.1 Manzana	7
1.1.1. Descripción.....	7
1.1.2. Variedades	8
1.1.2.1. Principales variedades explotadas en México.....	10
1.2 Importancia económica	10
1.2.1. Producción mundial	10
1.2.2. Producción nacional.....	11
1.2.3. Importación.....	12
1.2.4. Exportación	13
1.2.5. Productos industrializados de manzana en México	14
1.3. Composición química y valor nutricional.....	15
1.4. Pérdidas postcosecha	16
1.5. Hongos y sus toxinas.....	18
1.5.1. <i>Penicillium</i>	19
1.5.1.1. Características del género <i>Penicillium</i>	20
1.5.2. <i>Penicillium expansum</i>	21
1.5.3. Factores que influyen en la contaminación de manzanas con <i>Penicillium expansum</i>	24
1.5.4. Micotoxinas	25
1.5.5. Clasificación de las micotoxinas	25



1.6.	Patulina	28
1.6.1.	Factores que afectan la producción de patulina en manzana	30
1.6.2.	Toxicidad y límites tolerables.....	31
1.6.3.	Principales efectos fisiopatológicos.....	32
1.6.4.	Mecanismo de acción de la patulina	33
1.6.5.	Detoxificación.....	34
1.6.6.	Métodos de control de la micotoxina	34
1.6.7.	Métodos para determinar la patulina	36
1.7.	Cromatografía en capa fina	37
2.	Objetivos	41
2.1.	Objetivo general.....	41
2.2.	Objetivos particulares	41
2.2.1.	Objetivo particular 1	41
2.2.2.	Objetivo particular 2	41
2.2.3.	Objetivo particular 3	41
3.	Materiales y métodos.....	43
3.1.	Cuadro metodológico.....	43
3.2.	Material biológico	44
3.3.	Muestreo	44
3.4.	Almacenamiento de manzanas “Golden Delicious”	45
3.5.	Identificación de hongos en la superficie de la manzana	45
3.5.1.	Aislamiento y purificación del hongo de la manzana	46
3.5.1.1.	Preparación del medio de cultivo.....	46
3.5.1.2.	Siembra del hongo en agar-papa-dextrosa	46
3.5.2.	Identificación macroscópica.....	47
3.5.2.1.	Preparación de medios de cultivo específicos	47
3.5.2.2.	Resiembra de <i>Penicillium</i> en puntos equidistantes	47



4.2.1.	Identificación de <i>Penicillium expansum</i>	77
4.2.2.	Identificación macroscópica y microscópica de <i>Penicillium</i>	78
4.2.2.1.	Identificación de <i>Penicillium spp.</i> de la central de abastos de México	80
4.2.2.2.	Identificación de <i>Penicillium spp.</i> de las Bodegas de Atizapán	87
4.2.2.3.	Identificación de <i>Penicillium spp.</i> del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.	90
4.3.	Detección de patulina en manzanas “Golden Delicious”	100
4.3.1.	Cuantificación de patulina.....	101
5.	Conclusiones.....	105
6.	Recomendaciones	108
7.	Referencias	110
8.	Anexos	117



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción mundial de manzana, periodo 2005 – 2013.....	10
Figura 2. Volumen de producción y rendimiento de manzana en México. Fuente: SIAP SAGARPA y Secretaría de Economía (2014).....	11
Figura 3. Estados productores de manzana, 2009 – 2012.	12
Figura 4. Volumen de producción e importación de manzanas en México.	13
Figura 5. Volumen de manzanas exportadas (2005-2013).	14
Figura 6. <i>Penicillium</i>	19
Figura 7. Conidioforo de <i>Penicillium</i> ; (A) Ubicación de las estructuras; (B) Clasificación de <i>Penicillium</i> de acuerdo al número de ramificaciones.....	20
Figura 8. Características fenotípicas. (A) Colonia fasciculada de <i>Penicillium</i> ; (B) Exudado.	21
Figura 9. <i>Penicillium expansum</i> . (A) colonias en CYA, 7d, 25°C; (B) conidióforo; (C) conidios.....	23
Figura 10. Estructura química de algunas aflatoxinas.....	26
Figura 11. Estructura química de la ocratoxina A.....	26
Figura 12. Estructura química de los tricotecenos.	27
Figura 13. Estructura química de la fumonisina B ₁ , B ₂ y B ₃	27
Figura 14. Estructura química de la zearalenona.....	28
Figura 15. Ácido penicílico.	28
Figura 16. Cámara de cromatografía.....	38
Figura 17. Relación de la distancia recorrida por el soluto y el eluyente.....	39
Figura 18. Procedimiento para el almacenamiento de manzanas en cámara húmeda	45
Figura 19. Procedimiento para aislar y purificar hongos en PDA	46
Figura 20. Siembra del moho en tres puntos equidistantes.....	47
Figura 21. Coloraciones de la reacción de Ehrlich.	48
Figura 22. Procedimiento de extracción de patulina.	50



Figura 23. Procedimiento para realizar la cromatografía en capa fina.	52
Figura 24. Porcentaje de lotes con síntomas de pudrición en cada centro de distribución frutícola para los distintos tipos de venta a granel y en caja. Central de abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT) y Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.....	56
Figura 25. Escaldado blando en manzana “Golden Delicious”.	61
Figura 26. <i>Gloesporium sp</i> en manzana.....	61
Figura 27. Porcentaje de manzanas que presentaron <i>Penicillium</i> de cada centro de distribución frutícola. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT), Mercado del Carmen (MCA).....	75
Figura 28. Porcentaje de <i>Penicillium</i> presente en los distintos centros de distribución frutícola de acuerdo al tipo de venta. Central de abastos de México (CAM), bodegas de Atizapán (CAT) y Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA).	76
Figura 29. Porcentaje de <i>P. expansum</i> del total de especies de <i>Penicillium</i> en los diferentes centros de distribución. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapan (CAT), Mercado del Carmen (MCA).	77
Figura 30. <i>Penicillium</i> 7 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) conidios; (K) Reacción de Ehrlich.	81
Figura 31. <i>Penicillium</i> 32 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.	83
Figura 32. <i>Penicillium</i> 60 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.	85
Figura 33. <i>Penicillium</i> 81 CAT, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.	88
Figura 34. <i>Penicillium</i> 51 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.	94

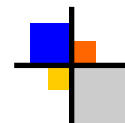


Figura 35. <i>Penicillium</i> 107 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	96
Figura 36. <i>Penicillium</i> 116 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	92
Figura 37. Porcentaje de manzanas que presentaron patulina de acuerdo al tipo de venta de los distintos centros de distribución frutícola. A) Central de abastos de México (CAM), B) bodegas de Atizapán (CAT), C) Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA).	100
Figura 38. Valores promedio de patulina de los diferentes centros de distribución frutícola - en los tipos de venta a granel y en caja mediante cromatografía y espectrofotometría.....	102
Figura 39. Manzana con síntomas de pudrición	103
Figura 40. <i>Penicillium</i> 43 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	117
Figura 41. <i>Penicillium</i> 11 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) --- CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.	119
Figura 42. <i>Penicillium</i> 21 CAT, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	121
Figura 43. <i>Penicillium</i> 14 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	123
Figura 44. <i>Penicillium</i> 61 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	125
Figura 45. <i>Penicillium</i> 85 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	127

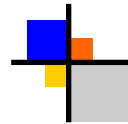
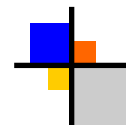


Figura 46. <i>Penicillium</i> 109 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	129
Figura 47. <i>Penicillium</i> 120 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich	131



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales variedades de manzana.....	8
Tabla 2. Composición de la manzana “Golden Delicious”.....	16
Tabla 3. Principales fisiopatías en la manzana “Golden Delicious”.....	17
Tabla 4. Principales enfermedades en la manzana “Golden Delicious”.....	18
Tabla 5. Claves de identificación macroscópica para diferentes medios de cultivo de acuerdo a Pitt y Hocking, y Frisvald y Samson.....	22
Tabla 6. Claves de identificación microscópica de acuerdo a Pitt y Hocking, y Frisvald y Samson.....	23
Tabla 7. Características químicas y físicas de la patulina.....	29
Tabla 8. Límites de dosis LD ₅₀ de la patulina en ratones.....	31
Tabla 9. Productos derivados de manzana elaborados artesanal e industrialmente.....	44
Tabla 10. Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote.....	44
Tabla 11. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, bodega S1 tipo de venta a granel.....	59
Tabla 12. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, bodega S7, tipo de venta en caja.....	62
Tabla 13. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de las bodegas de Atizapán, bodega E, tipo de venta en caja.....	65
Tabla 14. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de las bodegas de Atizapán, bodega M, tipo de venta a granel.....	67
Tabla 15. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de tipo de venta en caja.....	71
Tabla 16. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de tipo de venta a granel.....	73
Tabla 17. Agrupación de las colonias de acuerdo a las características similares en los medios específicos Grupo I y Grupo II; y aislados individuales.....	78
Tabla 18. Identificación de <i>Penicillium</i> de los aislados de cada centro de distribución frutícola. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT), Mercado del Carmen (MCA).....	78
Tabla 19. <i>Penicillium spp.</i> aislados en las manzanas de la Central de Abastos de la Ciudad de México (CAM) en medio PDA.....	80

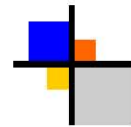


Tabla 20. *Penicillium spp.* aislados en manzanas de las bodegas de Atizapán (CAT) en medio PDA.....87

Tabla 21. *Penicillium spp.* aislados en manzanas comercializadas en el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA) en medio PDA.90



RESUMEN

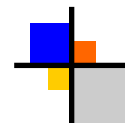
RESUMEN

La micotoxina patulina representa un peligro potencial para la salud, sin embargo en México no existe una reglamentación sobre la incidencia de esta toxina en el alimento. El objetivo de este trabajo fue la detección de patulina en manzana “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, las bodegas de Atizapán y el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México; así como en productos derivados de manzana (mermelada, refresco, jugo, fruta deshidratada y sidra) comerciales y artesanales. Para ello se hizo un muestreo de acuerdo a la procedencia del mercado y el tipo de venta: a granel o en caja y para los productos se obtuvieron muestras en centros comerciales de Cuautitlán Izcalli y de Zacatlán, Puebla. El almacenamiento refrigerado de las manzanas se llevó a cabo durante 56 días, donde el mercado de Carmen de Cuautitlán Izcalli demostró más casos de pudrición (83 %), seguido de las bodegas de Atizapán (20 %) y finalmente la central de abastos de México (13 %).

El porcentaje de manzanas aisladas con *Penicillium spp* fue de 39% para la central de abastos de la Ciudad de México, 36% para el mercado del Carmen y 13% para las bodegas de Atizapán, donde la mayor frecuencia de *Penicillium spp* fue observada en el tipo de venta a granel, misma tendencia que se dio en la determinación de patulina, obteniéndose un 8.6 % de muestras positivas en total. Las especies identificadas fueron *P. expansum*, *P. solitum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* y *P. aethiopicum*, atribuyendo una presencia aproximadamente del 50% para el primero y el 50% para el resto de las especies, por lo que en las manzanas se presentan otro tipo de especies productoras de toxinas que representan un riesgo de salud y económico. Las concentraciones de patulina, determinadas por cromatografía en capa fina, estuvieron en un rango de 1 500 a 30 000 µg/kg y de 6 000 a 90 000 µg/kg para aquellos determinados por espectrofotometría, superando de 100 a 400 veces más los límites permitidos por la FDA y Codex alimentarius de 50 µg/kg. En lo que respecta a los productos derivados de manzana, éstos no presentaron patulina.

Finalmente, la calidad sanitaria de las manzanas no es favorable a largo plazo en los diferentes centros de distribución frutícola. Por lo tanto, si se encuentran bajo condiciones favorables de crecimiento del hongo (humedad y temperatura), aumenta la probabilidad de pudrición y en consecuencia la síntesis de patulina, representando un peligro para los consumidores. Para evitarlo es necesario aplicar alternativas de limpieza y tecnologías en la postcosecha de las manzanas.

INTRODUCCIÓN

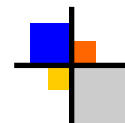


INTRODUCCIÓN

La manzana es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial ya que resiste las más bajas temperaturas. En México la producción de manzana se encuentra claramente concentrada en los estados del norte, en particular Chihuahua el cual aporta más de las dos terceras partes de la producción (SAGARPA-UNIFRUT, 2013). La manzana “Golden Delicious” es un fruto de calibre medio a grueso, su piel es verde amarillenta que vira a amarillo dorado y con lenticelas aparentes de color pardo (Mateo, 2005). Es una fuente discreta de vitamina C y es rica en fibra. Además se le atribuyen extraordinarias propiedades dietéticas debidas, en gran medida, a su contenido en compuestos fitoquímicos, especialmente flavonoides (Gil, 2010), entre su contenido mineral sobresale el potasio (Alimentación sana, 2013). Sin embargo, si la manzana no lleva un adecuado cuidado en la postcosecha es probable que se generen ciertas fisiopatías y enfermedades (INFOAGRO, 2013). La humedad muy alta puede causar susceptibilidad adicional a algunas pudriciones (Hall y Arango, 1968).

El hongo *Penicillium expansum* causa la podredumbre de almacén denominada comúnmente como moho azul cuyas manifestaciones externas típicas son lesiones ligeramente deprimidas que se extienden con rapidez. El tejido podrido tiene una textura aguanosa y una coloración clara (Smith *et al.*, 1988). El patógeno infecta a través de heridas, ocasionadas por insectos o por la incorrecta manipulación de la fruta durante la cosecha. Además, también se producen pudriciones por el contacto directo de frutas contaminadas con frutas sanas (Anguiano, 2012). Cuando la fruta se deteriora, favorece al crecimiento del moho y la elaboración de patulina, la cual es una micotoxina (Anderson, 2005). Normalmente la mayor producción se produce bajo condiciones sub-óptimas y de estrés debido, por ejemplo al agotamiento de los nutrientes principales, por lo que el hongo para sobrevivir, necesita utilizar los metabolitos resultantes (Valle, 2010).

La patulina puede producirse entre 0 y 25 °C, pero no a 31°C, siendo el óptimo a 25 °C (Soriano del Castillo, 2007) y se encuentra en diversas frutas, pero mayormente en manzanas, donde es más susceptible la producción de dicha toxina. Los efectos ocasionados por la micotoxina pueden ser: edema cerebral y edema pulmonar con procesos hemorrágicos y daños capilares en el hígado (Soriano *et al.*, 2002). En Francia, algunos estudios demostraron que entre 30 y 62% de manzanas almacenadas en refrigeración fueron infectadas por *P. expansum*. En Canada y Estados Unidos, la



podredumbre azul es la enfermedad más importante de manzanas almacenadas (Morales *et al.*, 2010).

La patulina pertenece a la corta lista de micotoxinas reguladas en gran variedad de países. En México no existe una reglamentación sobre la incidencia de esta toxina en el alimento. El hongo productor de la micotoxina puede desarrollarse en el interior de la manzana, no siendo evidente su presencia a simple vista, por lo que se ha reportado la contaminación con patulina en jugos y papillas de manzana elaboradas con frutos contaminados (Anguiano, 2012).

Existen varios métodos para determinar patulina como cromatografía en capa fina, espectrómetro de masas, espectrofotometría, cromatografía de gases con espectrómetro de masa y últimamente el método más frecuente es la cromatografía líquida de alta resolución con detección de luz ultravioleta (Moukas *et al.*, 2008).

Por otra parte existen diversos métodos para controlar el crecimiento de *Penicillium*, el más común es el uso de fungicidas, de agentes antagonistas y atmósferas controladas en donde se utilizan altas concentraciones de CO₂ y bajas concentraciones de O₂ en combinación con el almacenamiento en refrigeración para extender el tiempo de vida útil de alimentos frescos. Sin embargo algunos estudios revelan que el *Penicillium expansum* es resistente a altas concentraciones de CO₂ e incluso en concentraciones de 12 % no es completamente inhibido (Morales *et al.*, 2010).



ANTECEDENTES



1. ANTECEDENTES

1.1 MANZANA

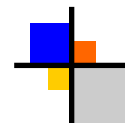
El manzano es una especie silvestre que crece en las partes templadas y se encuentra principalmente en las regiones montañosas poco elevadas (Jines, 1996).

Sobre su posible origen, algunas investigaciones indican que su consumo data de la edad de piedra en la zona centro de Europa. El manzano fue introducido en España por los pueblos del norte de África y durante el proceso de romanización de la península. En el siglo XVI, los conquistadores españoles extendieron el cultivo de la manzana al nuevo mundo y, cien años después, desde Iberoamérica, el manzano emigró a América del norte y posteriormente a África septentrional y Australia. La facilidad de adaptación de este árbol a diferentes climas y suelos, el valor nutritivo de sus frutos y la resistencia a las más bajas temperaturas permiten cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente frío (SAGARPA-UNIFRUT, 2013).

1.1.1. DESCRIPCIÓN

El manzano pertenece a la familia *Rosacea* y a la especie *Pyrus malus L.*; presenta las siguientes características (SAGARPA-UNIFRUT, 2013).

- **Porte:** alcanza como máximo 10 m de altura y tiene una copa globosa. Tronco derecho que normalmente alcanza de 2 a 2.5 m de altura, con corteza cubierta de lenticelas, lisa, adherida, de color ceniciento verdoso sobre los ramos y escamosa y gris parda sobre las partes viejas del árbol y se estima que tiene una vida de unos 60-80 años.
- **Fruto:** son pomos por lo general de forma ovoide, a veces alargada o redonda, que esconden numerosas semillas de color pardo en su interior. Su piel es casi siempre brillante y lisa.
- **Tamaño y peso:** las manzanas más comercializadas son aquellas cuyo calibre va desde 75 milímetros hasta los 85 ó más. Su peso oscila desde 170 hasta 250 gramos.
- **Color:** los diferentes colores de la piel hacen que se diferencien las frutas en cuatro grupos: verdes, rojas, amarillas y bicolors. Todas ellas con sabores, aromas y calidad de su carne diferentes.



- **Sabor:** la pulpa puede ser dura o blanda, pero siempre refrescante y jugosa, y su sabor va desde el muy dulce al muy ácido pasando por toda una mezcla de gustos acidulados y azucarados. La carne es más o menos aromática según la variedad.

1.1.2. VARIEDADES

Existen más de mil variedades de manzanas en todo el mundo, si bien, la gama que nos ofrece el mercado es limitada, ya que tan sólo podemos elegir entre poco más de media docena de variedades, entre las cuales destacan las que se mencionan en la Tabla 1:

Tabla I. Principales variedades de manzana.

VARIEDAD	CARACTERÍSTICAS
 <p>“Golden Delicious”</p>	<p>Variedad de origen americano, una de las más cultivadas en todo el mundo. Su piel es amarilla verdosa con pequeños puntos oscuros que se llaman lenticelas y que son los órganos respiratorios de la fruta. Su forma es redonda y regular. La carne es jugosa, crujiente, dulce y aromática.</p>
 <p>“Rome Beauty”</p>	<p>Fruto grueso de forma esferoidal, su cáscara es bastante gruesa, amarilla verdosa, cerca de 40-60 % de la superficie es de un color intenso. La pulpa es blanca o blanca crema, no muy compacta, medianamente succulenta y de poco dulce, acidez y aroma, es decir, de mediana a escasa característica gustativa.</p>
 <p>“Top red”</p>	<p>Es de color rojo con estrías y tiene una piel brillante. La carne es consistente aunque puede volverse harinosa con el tiempo y tiene un sabor dulce.</p>
 <p>“Red Delicious”</p>	<p>Es una variedad estadounidense que proporciona frutos grandes y alargados, de piel color rojo brillante. Su pulpa es jugosa, muy blanda de sabor dulce, nada ácido y muy aromático.</p>

Fuente: SAGARPA-UNIFRUT (2013).

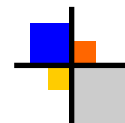
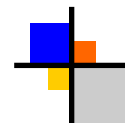


Tabla I. Principales variedades de manzana (continuación).

VARIEDAD	CARACTERÍSTICAS
 “Starking”	<p>Es una variedad de las más conocidas, procede de Estados Unidos, siendo una mutación de la anterior. Su piel es brillante con estrías rojas y verdosas. Su carne es blanca amarillenta y crujiente, de sabor dulce.</p>
 “Royal Gala”	<p>De origen neocelandés tiene la piel con estrías rojas y naranjas sobre un fondo amarillo verdoso. Su forma es muy redondeada y su carne es blanca, crujiente y consistente. Muy aromática y jugosa.</p>
 “Granny Smith”	<p>Procede de Australia y es fácil de reconocer porque tiene la piel de color verde intenso con algunos puntitos blancos. Es muy redonda y de carne blanca muy crujiente y jugosa con sabor ligeramente ácido.</p>
 “Golden Supreme”	<p>Es de color verde con tonalidades rosadas y de forma globosa. Su carne es crujiente y jugosa es algo ácida y poco aromática.</p>
 “Reineta gris de Canadá”	<p>Variedad francesa de gran tamaño y forma achatada. Su piel es gruesa y rugosa, de color amarillo oxidado o grisáceo y su pulpa tiene un aspecto viscoso, es jugosa y con sabor azucarado, con un agradable punto ácido.</p>
 “Mcintosh”	<p>Es una fruta de tamaño mediano y forma redonda. El color de su piel está formado por una combinación de dos tonos de rojo, o un rojo y un verde. Su crujiente y jugosa pulpa resulta linealmente ácida.</p>

Fuente: SAGARPA-UNIFRUT (2013).



1.1.2.1. Principales variedades explotadas en México

En México se producen una gran variedad de manzanas, identificándose el estado de Chihuahua como la entidad en donde se produce mayor cantidad de manzana a nivel nacional (SAGARPA-UNIFRUT, 2013).

En el aspecto de producción comercial, las variedades que mayormente destacan en nuestro país son: 'Golden Delicious', cuya cosecha se lleva a cabo entre los meses de Agosto a Octubre, 'Red Delicious', que tiene su época de cosecha en los meses de Septiembre a Noviembre y 'Rome Beauty'. Adicionalmente se cultiva una amplia gama de manzanas criollas (SAGARPA-UNIFRUT, 2013).

1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

1.2.1. PRODUCCIÓN MUNDIAL

El manzano es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial por proceder de climas muy fríos resiste las más bajas temperaturas, lo que ha permitido cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente fríos, y en particular en todos los de Europa.

De acuerdo a datos recuperados de la FAO (Figura1), China ocupa el primer lugar de la producción mundial con 37 001 590 Ton de producción; le siguen Estados Unidos, Turquía, Polonia e India dentro de los primeros 5 lugares (FAOSTAT, 2013).

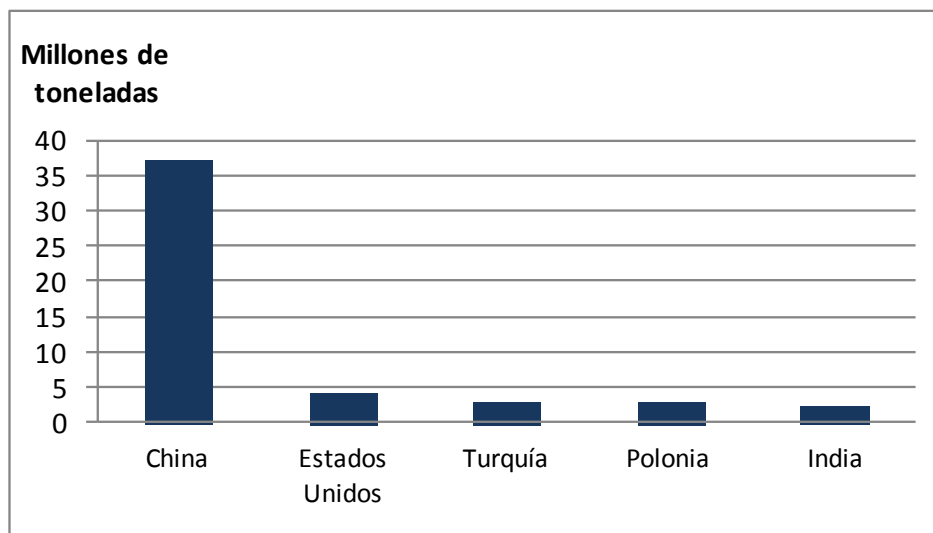
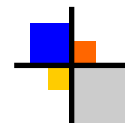


Figura 1. Producción mundial de manzana, periodo 2005 – 2013.

Fuente: FAOSTAT (2013).



1.2.2. PRODUCCIÓN NACIONAL

La producción de manzana en México alcanza cerca de 3 mil millones de pesos anuales y la superficie destinada a este cultivo es de 62 mil hectáreas, principalmente en el norte del país. Hasta 2011, el volumen de producción fue de cerca de 600 mil toneladas, sin embargo en el 2012 se observó una caída de 40% respecto al año anterior, llegando apenas a las 375 mil toneladas, debido a la sequía que predominó en la zona norte y que se reflejó en una caída del rendimiento desde 10 ton/ha en los últimos diez años a 6 ton/ha (Figura 2) (Secretaría de Hacienda y Crédito Público, 2014).

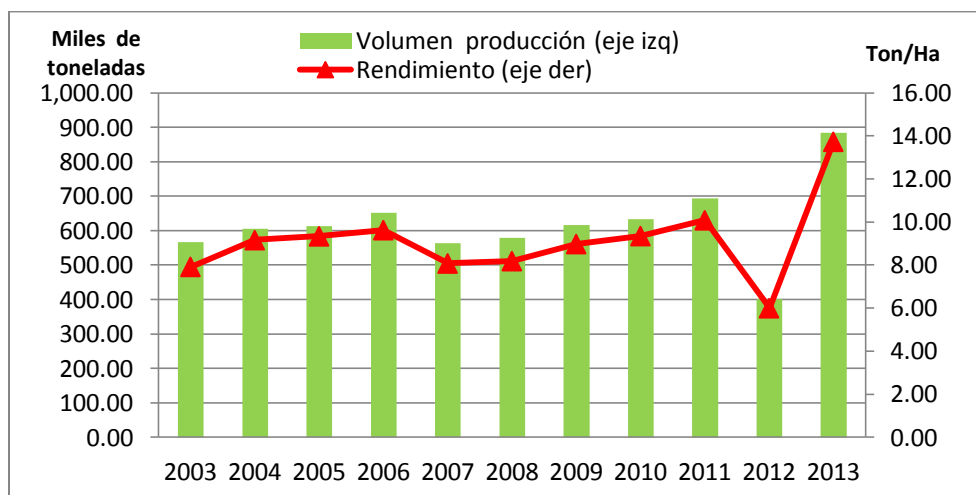


Figura 2. Volumen de producción y rendimiento de manzana en México.
Fuente: SIAP-SAGARPA y Secretaría de Economía (2014).

En el 2013, las mejores condiciones climáticas incentivaron una producción récord que fue de 869 mil toneladas con un rendimiento de 14,5 ton/ha y un valor de producción de 4,265, 295.65 miles de pesos (SAGARPA-SIAP, 2013).

Chihuahua es el mayor productor de manzana del país, entre los años 2009 y 2012 participó en promedio con el 67.4% del volumen y 66.5% del valor generado. Durango, Coahuila y Puebla son también entidades importantes en el cultivo de esta fruta y en conjunto generaron el 25.4 % del volumen y el 26.5 % del valor (Figura 3) (Secretaría de Hacienda y Crédito Público, 2014).

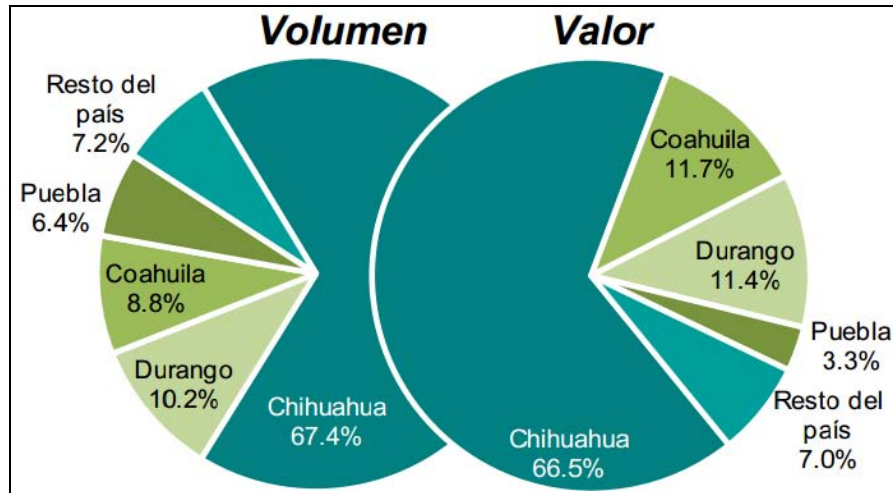
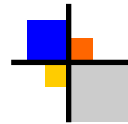


Figura 3. Estados productores de manzana, 2009 – 2012.

Fuente: SAGARPA-SIAP (2013).

El estado de Puebla fue durante mucho tiempo una región con tradición en el cultivo, pero su participación ha tendido a disminuir significativamente con una aportación del 6.4 % del total nacional. La manzana se produce en otros 16 estados, pero con una mínima participación y la producción está orientada fundamentalmente a satisfacer la demanda local, sin tener un impacto importante en los circuitos de comercialización de este producto (SAGARPA-UNIFRUT, 2013).

1.2.3. IMPORTACIÓN

El consumo nacional de manzana presenta un ritmo de crecimiento de 1.5% anual en promedio, muy similar al crecimiento de la población. Lo anterior significa que el consumo por habitante prácticamente se ha mantenido en el mismo nivel del orden de 8 kilogramos por persona, cerca de 800 mil toneladas anuales. Lo que ha registrado cambios importantes en la estructura de la disponibilidad de manzana, con una participación creciente de compras al exterior para complementar la demanda nacional (SAGARPA-UNIFRUT, 2013). Las importaciones en los últimos 10 años han sido en promedio 210 mil toneladas, entre el 21% y 30% del consumo (Figura 4) (Secretaría de Hacienda y Crédito Público, 2014).

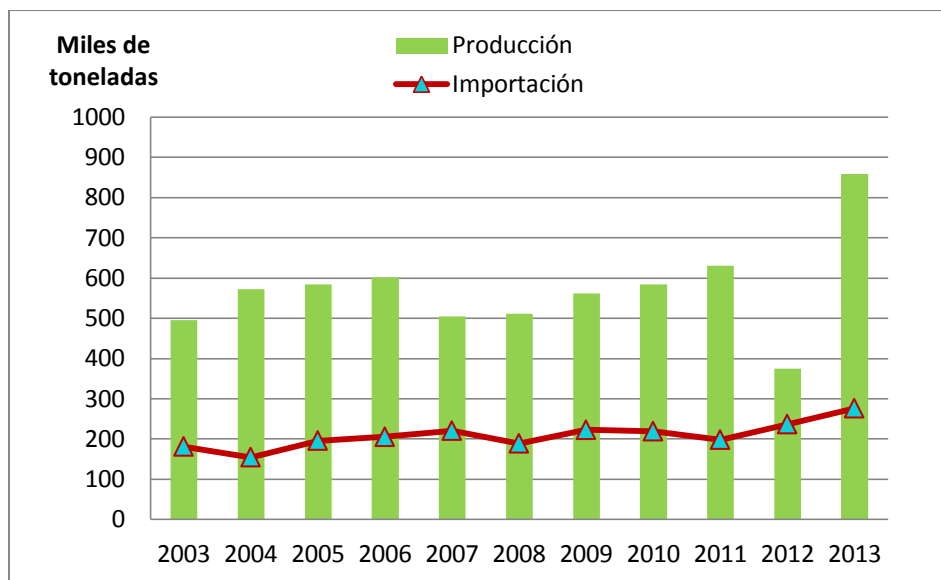
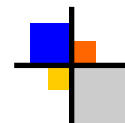


Figura 4. Volumen de producción e importación de manzanas en México.

Fuente: SAGARPA-SIAP (2013).

En 2012 las importaciones se incrementaron un 19% respecto a 2011, pasando de 198 a 236 mil toneladas, como efecto del desabasto generado por la sequía, lo que se tradujo en un incremento en precios (Secretaría de Hacienda y Crédito Público, 2014).

Las compras se realizan principalmente a Estados Unidos, de donde en promedio se adquiere alrededor del 94.3% de las manzanas de importación. Le siguen en importancia Chile (5.2 %), Canadá (0.3%) y Nueva Zelanda (0.2%) (SAGARPA-SIAP, 2013).

1.2.4. EXPORTACIÓN

Los volúmenes de manzana enviados al extranjero han representado menos del 0.5 % de la producción nacional (Comité estatal sistema productor de manzana estado de Chihuahua, 2013). La Figura 5 muestra los volúmenes de manzana exportada en los últimos años de cuerdo al régimen arancelario definitivo. El valor de las exportaciones en el último año ascendió a 958,859 dólares, lo anterior señala que la exportación de manzana mexicana está dirigida a nichos de mercado muy específicos (SAGARPA-SIAP, 2013).

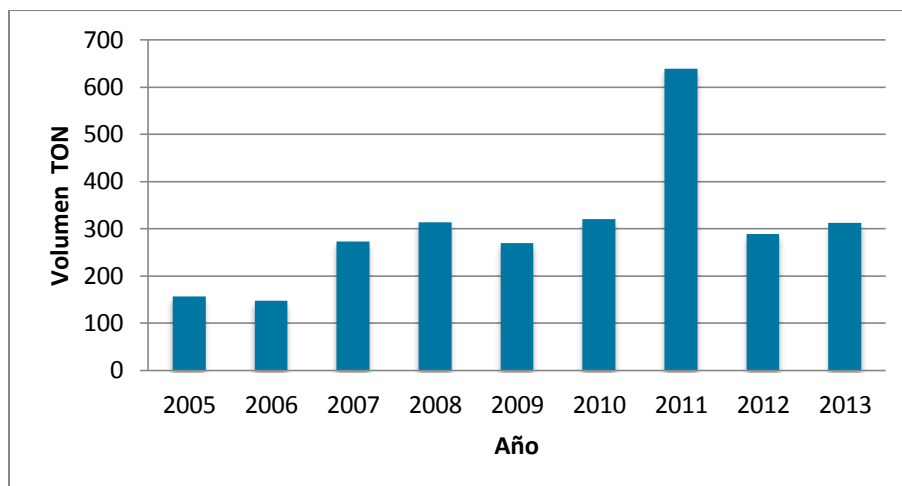
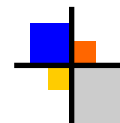


Figura 5. Volumen de manzanas exportadas (2005-2013).

Fuente: SAGARPA-SIAP (2013).

En el caso del comercio internacional del jugo de manzana, México aún mantiene un saldo favorable y un importante dinamismo en su actividad exportadora. Las exportaciones de jugo de manzana se han incrementado de 5.6 miles de toneladas en 1990 a 13.7 miles de toneladas. El crecimiento de la industria de jugos merece darle mayor importancia a la producción y exportación de jugo de manzana a los Estados Unidos, en primer lugar porque es bien recibido por su sabor, en segundo porque la abundancia de manzana de temporal, la hace muy propicia para jugo (Comité estatal sistema productor de manzana estado de Chihuahua, 2013).

Sin embargo, en una reciente alerta emitida por la FDA en Estados Unidos, se identificó la presencia de la micotoxina patulina en jugos derivados de campos mexicanos (FDA, 2012).

1.2.5. PRODUCTOS INDUSTRIALIZADOS DE MANZANA EN MÉXICO

El consumo de manzana en nuestro país es principalmente en fresco (70-75%), mientras que el restante (30-25%) es para uso industrial.

Con respecto al uso industrial, encontramos un número importante de productos que se derivan de la manzana y que sirven de base a otras industrias como la elaboración de jugos, la refresquera o bien la elaboración de alimentos azucarados. En tal caso, podemos enumerar los derivados de la siguiente manera (Comité estatal sistema productor de manzana estado de Chihuahua, 2012):



1. Obtención de ácido málico, empleado en la industria farmacéutica y en la alimentaria como sustituto del ácido cítrico.
2. Producción de jugos concentrados y congelados para la elaboración doméstica de bebidas refrescantes de origen natural al adicionarles agua.
3. Elaboración de pastas de manzana, mermeladas y productos azucarados para uso en hornos de microondas.
4. Fabricación de vinos y aguardientes.

Resulta interesante apuntar que de estos derivados, predomina la industria para la elaboración de jugos concentrados y congelados.

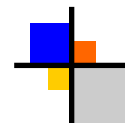
En el caso del eslabón de la industria de transformación se localizan dos grupos, los que se mencionan a continuación (Comité estatal sistema productor de manzana estado de Chihuahua, 2012):

- **Grandes industrias de jugos.**- Por lo general estas industrias producen concentrado de manzana que venden a otras empresas que elaboran refrescos, jugos y demás derivados.
- **Pequeñas industrias de jugos, mermeladas y deshidratados.**- Estas pequeñas industrias que pertenecen a ex productores de manzana y/o personas que viven en la región productora de manzana y que han visto la oportunidad que tienen al darle valor agregado a la manzana transformándola en jugos orgánicos o no orgánicos, mermeladas orgánicas o no orgánicas y orejones o manzana deshidratada.

1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRICIONAL

Por su elevado contenido en agua, la manzana es una fruta muy refrescante. Los azúcares, entre los que destaca la fructosa, son los nutrientes más abundantes y de rápida asimilación en el organismo. Es una fuente discreta de vitamina C y es rica en fibra (2.3%, el 70% es insoluble y el 30% es soluble), el cual mejora el tránsito intestinal. Se le atribuyen extraordinarias propiedades dietéticas debidas, en gran medida, a su contenido en compuestos fitoquímicos, especialmente flavonoides. La manzana se destaca por su alta capacidad antioxidante (Gil, 2010).

La vitamina E, la cual posee acción antioxidante, interviene en la estabilidad de las células sanguíneas como los glóbulos rojos y en la fertilidad. Entre su contenido mineral sobresale el potasio el cual es necesario para la transmisión y generación del impulso



nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula (Alimentación sana, 2013).

La composición de la manzana “Golden Delicious” se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la manzana “Golden Delicious”.

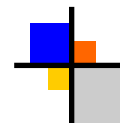
Compuesto	Cantidad por 100 g de porción comestible
Agua (g)	85
Proteína (g)	0.3
Grasa total (g)	Trazas
Hidratos de carbono (g)	10.5
Fibra (g)	2.3
Potasio (mg)	100
Calcio (mg)	5.5
Hierro (mg)	0.56
Vitamina B1 (mg)	0.04
Vitamina B2 (mg)	0.04
Vitamina B6 (mg)	0,04
Folato (µg)	5.8
Vitamina C (mg)	12.4
Vitamina A (µg Eq)	4
Vitamina E (mg)	0.36

Fuente: Mataix (2009).

Las manzanas por ser productos vegetales con un alto contenido nutrimental, cuando se encuentran ante ciertas condiciones ambientales o susceptibilidad a organismos oportunistas, pueden representar pérdidas postcosecha para los productores.

1.4. PÉRDIDAS POSTCOSECHA

Las pérdidas postcosecha en productos perecederos como la manzana, se ha reportado que pueden llegar hasta el 50% de la cosecha en países en desarrollo y que aún con el uso de tecnologías avanzadas de conservación y manejo, las pérdidas son considerables (Eckert y Ogowa, 1985). En México, existen casas emparadoras que han adoptado sistemas que minimicen riesgos de contaminación química, física o biológica, tales como



las buenas prácticas agrícolas y de manufactura. Las buenas prácticas agrícolas se aplican en la etapa de producción (terreno, siembra, riego, plaguicidas y pesticidas, fertilización, cosecha, manejo, transporte campo-empaque e higiene de los trabajadores), mientras que las buenas prácticas de manufactura se aplican en la segunda etapa del proceso (recepción, lavado, enfriamiento, almacenamiento, transporte, empaque-comprador, mantenimiento de las instalaciones y sanidad de los trabajadores)(Martínez, 2015). Estos sistemas representan un extenso plan de trabajo riguroso que al ser mal empleado o en su defecto la nula aplicación de estas medidas, permite que se generen ciertas fisiopatías y enfermedades en los frutos como se describe en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Principales fisiopatías en la manzana “Golden Delicious”.

FISIOPATÍA	DESCRIPCIÓN
Arrugamiento 	Las manzanas “Golden Delicious” son particularmente susceptibles a la pérdida de agua. Esta disminución puede ser tan alta como del 3 al 6%.
Magulladuras 	Pueden ser excesivas, especialmente en “Golden Delicious” donde el daño por golpes es más evidente
Picado Amargo 	Manchas pardas hundidas en la piel, especialmente en la parte calicinal. Este desorden está relacionado con una baja concentración de calcio en la manzana
Escaldado superficial 	Es el pardeamiento de la piel que se desarrolla en almacenamiento refrigerado. La susceptibilidad de “Golden Delicious” es baja.
Daño por Atmósfera Controlada 	Niveles de O ₂ inferiores al 1% y de CO ₂ superiores al 15% pueden inducir sabores extraños debido a metabolismo fermentativo. Otros síntomas incluyen: lesiones pardas parcialmente hundidas en la piel o pardeamiento interno y cavidades.

Fuente: INFOAGRO (2013).

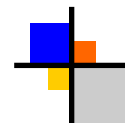





Tabla 4. Principales enfermedades en la manzana “Golden Delicious”.

ENFERMEDAD	DESCRIPCIÓN
<p>Corazón Mohoso</p> 	<p>Causado por varios hongos incluyendo <i>Alternaria sp.</i>, <i>Fusarium sp.</i>, <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>. Las manzanas “Golden Delicious” son particularmente susceptibles debido a la abierta o profunda cavidad del seno. El baño de las manzanas (drenching) puede incrementar la incidencia del corazón mohoso.</p>
<p>Moho azul y Moho Gris</p> 	<p>Las dos más importantes enfermedades de postcosecha de las manzanas “Golden Delicious” son causados por <i>Penicillium expansum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>. Ambos hongos son patógenos de heridas. La sanitización es crítica para el control de estas enfermedades. El baño de las manzanas puede esparcir las esporas de <i>Penicillium</i> y <i>Botrytis</i> a las heridas producidas en la cosecha.</p>
<p>Suberosis o russeting</p> 	<p>Esta enfermedad afecta especialmente a las manzanas “Golden Delicious”, sobre las que se producen unas manchas irregulares de naturaleza suberosa que las desmerece comercialmente. Esta enfermedad es de tipo accidental; ya que la piel del fruto, desde el principio, está defendida de una capa cerosa para proteger al fruto de los agentes exteriores, y si es destruida por productos pesticidas agresivos, el fruto se cubre de otra capa de naturaleza suberosa, que a pesar de no afectar a la pulpa del fruto lo desmerece comercialmente y además reduce su resistencia a la conservación.</p>

Fuente: INFOAGRO (2013).

1.5. HONGOS Y SUS TOXINAS

Todos los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando severas pérdidas económicas al reducir el potencial de producción de los cultivos que atacan (Moreno, 1988).



Las frutas son susceptibles a la pudrición por hongos debido a la actividad de agua, contenido de azúcares, y presencia de ácidos orgánicos que imparten al fruto un pH bajo. Las frutas cuentan con varios mecanismos de defensa efectivos contra los hongos, sin embargo existen algunas especies que son capaces de invadirlas. Algunos hongos son patógenos altamente especializados, los cuales atacan a cierto tipo de frutas mientras que otros tienen una forma más general de invadir el tejido (Jackson y Fadwa, 2008).

Las especies de hongos suelen dividirse en dos grupos (Villacis, 2011):

- **Hongos de campo:** invaden las frutas, granos o semillas mientras el cultivo todavía está en el campo y requieren condiciones de alta humedad (20-21 %). En este grupo están incluidos los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Gibberella* y *Helminthosporium*.
- **Hongos de almacenaje:** invaden las frutas, granos o semillas durante el almacenamiento. Necesitan condiciones de humedad entre 13 y 18%. Incluyen los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Existen géneros de hongos productores de micotoxinas entre los que se destacan el *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* debido a que pueden estar presentes en un gran número de alimentos y son los que más especies toxígenas producen.

1.5.1. *PENICILLIUM*

Es un hongo de crecimiento rápido que forma colonias blancas aterciopeladas inicialmente, las cuales se cubren con las esporas y van tomando diferentes colores según la especie; al final quedan completamente cubiertas de esporas con un aspecto pulverulento (Figura 6). La colonia está constituida por micelio de hifas delgadas septadas (Arias y Piñeros, 2008).



Figura 6. *Penicillium*.

Fuente: Frisvad y Samson (2004).

Predomina en los climas templados y presenta especificidad para colonizar ciertas frutas o vegetales, por ejemplo, el *P. digitatum* y *P. italicum* son hongos de frutas cítricas; mientras que *P. expansum* ataca a las manzanas y el *P. gladioli* ataca al maíz y bulbos (Villacis, 2011).



1.5.1.1. Características del género *Penicillium*

Estas especies están formadas por densas agrupaciones de conidióforos y la mayoría presentan coloraciones verdosas. La textura de la colonia también es una característica importante y depende de la disposición de los conidióforos (Soriano del Castillo, 2007).

La textura puede ser velutinosa, es decir aterciopelada con superficie brillante u opaca y de pelos cortos y finos organizados de manera compacta ó flocosa es decir, algodonosa ó lanosa, densamente aglomerados en pequeños manojos como franela (Ulloa y Hanlin, 2012).

La estructura de reproducción asexual característica del *Penicillium* es un conidióforo formado por un estipe diferenciada que finaliza en un penicilio o pincel. Este pincel puede estar formado por diversas estructuras que reciben nombres distintos según su localización y complejidad (métulas, ramas) y que sustentan en la parte más apical un conjunto de fiálides (Figura 7A).

La forma de este penicilio determina la primera división taxonómica del género en cuatro subgéneros. Para determinar a qué subgénero pertenece un aislamiento, se debe contar el número de puntos de ramificación entre la fiálide (o cadena de conidios) y el estipe (Soriano del Castillo, 2007). En la Figura 7B se esquematizan los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, métulas y fiálides. La serie terverticillata comprende a las especies que tienen tres niveles de ramificaciones (Carrillo, 2013).

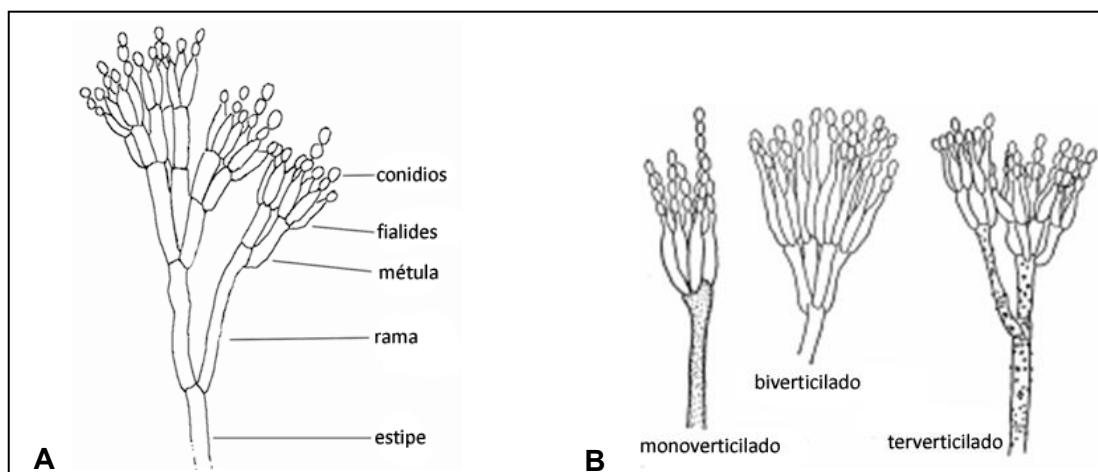
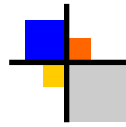


Figura 7. Conidioforo de *Penicillium*; (A) Ubicación de las estructuras; (B) Clasificación de *Penicillium* de acuerdo al número de ramificaciones.

Fuente: Carrillo (2013).



Otras características que se destacan son:

- **Fasciculada:** Esto ocurre cuando los conidióforos están agrupados formando pequeños mechones. Éstos se encuentran sobre todo en los bordes de las colonias. Especies típicas con fasciculación son: *P. expansum* y *P.concentricum* (Figura 8A) (Frisvad y Samson,2004).
- **Exudado:** líquido o fluido que rezume de la hifa acumulándose en gotas o varias sombras de acuerdo a la especie y a las condiciones de crecimiento (Figura 8B) (Ulloa y Hanlin, 2012).

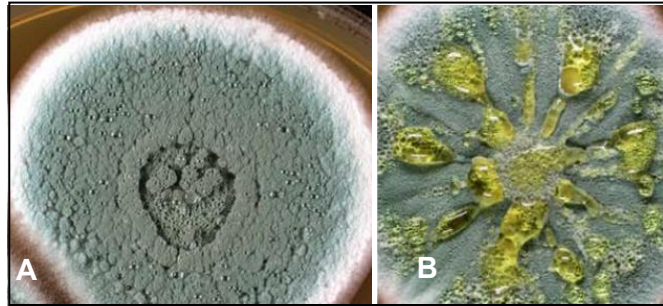


Figura 8. Características fenotípicas. (A) Colonia fasciculada de *Penicillium*; (B) Exudado.

Fuente: Frisvad y Samson (2004).

1.5.2. *PENICILLIUM EXPANSUM*

Es un psicrófilo que crece bien a 0°C, pero que también puede crecer a -2/-3 °C. La temperatura óptima de crecimiento es 25 °C y la máxima de 35°C. Puede producir la toxina patulina entre 0 y 25 °C, pero no a 31°C, siendo el óptimo a 25 °C (Soriano del Castillo, 2007). La mínima actividad de agua para la germinación es 0.82-0.83, tiene bajo requerimiento de oxígeno, debido a esto se encontraron colonias en atmósferas con niveles de oxígeno menores al 2% y hasta un 15% de dióxido de carbono (CO₂) (Funes, 2011).

Las características macroscópicas y microscópicas referentes a *Penicillium expansum* (Tabla 5 y 6), se describen a continuación de acuerdo a Pitt y Hocking, y Frisvad y Samson.

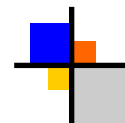


Tabla 5. Claves de identificación macroscópica para diferentes medios de cultivo de acuerdo a Pitt y Hocking (2009), y Frisvald y Samson (2004).

Medios de Cultivo	Características
<p>CYA (Agar Czapeck extracto de levadura) (Pitt y Hocking, 2009)</p>	<p>Diámetro: 30-40 mm. Superficie: ligeramente radial sulcado (provisto de surcos), moderadamente profundo a muy profundo, con superficie típicamente coremial o fasciculada en una o más bandas anulares con bandas adyacentes velutinosas a flocosas (Figura 9A). Conidios: Micelio blanco; producción de conidios moderada, verde opaco. Exudado: claro a naranja café pálido; pigmento soluble café anaranjado cercano a caramelo; Reverso: pálido a café profundo con áreas naranja café.</p>
<p>MEA (Agar extracto de malta) (Pitt y Hocking, 2009)</p>	<p>Diámetro: 20 a 40 mm de diámetro. Superficie: plana, algunos aislados son persistentemente velutinosos, otros al menos parcialmente coremial ó fasciculada. Conidios: producción de conidios usualmente denso de color verde opaco a levemente grisáceo. Pigmento soluble algunas veces producido con color café anaranjado cercano a caramelo. Reverso: pálido ó en presencia del pigmento soluble naranja café.</p>
<p>G25N (Agar Czapeck glicerol al 25%) (Pitt y Hocking, 2009)</p>	<p>Diámetro: 17-22 mm. Superficie: radialmente sulcado denso. Velutinosa a granular; pigmento soluble algunas veces producido color café rojizo. Reverso: pálido, café opaco a café rojizo</p>
<p>CYA (Agar Czapeck extracto de levadura) (Frisvald y Samson, 2004)</p>	<p>Diámetro: 16-34 mm Superficie: Flocosa a débilmente fasciculada. Conidios: Color de los conidios verde azulado a verde Exudado: Gotas copiosas y claras Reverso: Color crema a amarillo con centro café, naranja-café o café oscuro. Color difuso marrón.</p>



Tabla 6. Claves de identificación microscópica de acuerdo a Pitt y Hocking (2009), y Frisvald y Samson (2004).

Pitt y Hocking (2009)	Frisvald y Samson (2004)
<p>Estipes: miden de 200-500 μm de longitud con paredes lisas.</p> <p>Conidióforos: típicamente terverticilados, muy poco común biverticilados.</p> <p>Fiálides: compactas, ampuliformes casi cilíndricas, 8-11 μm de longitud con colula corta.</p> <p>Conidios: elipsoidales de 3.0-3.5 μm con paredes lisas y cadenas irregulares</p>	<p>Estipes: de paredes lisas, ocasionalmente rugosas en la parte baja de la estipe (200-500 μm x 3-4 μm)</p> <p>Conidióforos: terverticilados, elementos adpresos, nacido desde el subsuelo e hifas aéreas.</p> <p>Fiálides: cilíndricas estrechándose a una colula distinta (8-12 μm x 2.5-3.2 μm). Métula cilíndrica (11-15 μm x 3.4 μm). Ramas cilíndricas (15-25 μm x 3-4 μm).</p> <p>Conidios: elipsoidales de paredes lisas (3-3.5 μm x 2.5-3 μm). (Frisvad y Samson,2004).</p>

La figura 9 muestra las colonias de *Penicillium expansum* en medio CYA con 7 días de crecimiento a 25 °C, así como la apariencia del conidióforo y sus conidios.

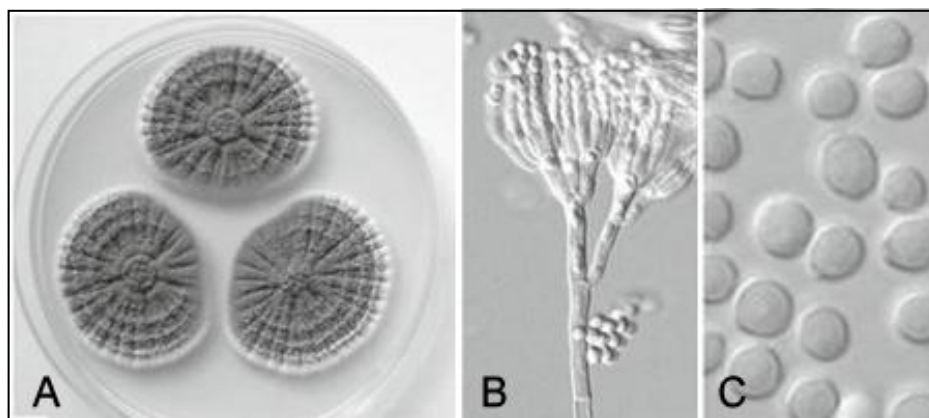


Figura 9. *Penicillium expansum*. (A) colonias en CYA, 7d, 25°C; (B) conidióforo; (C) conidios.

Fuente: Pitt y Hocking (2009).



1.5.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CONTAMINACIÓN DE MANZANAS CON *PENICILLIUM EXPANSUM*.

Algunas investigaciones muestran que la variedad de cultivares de manzanas difieren en la susceptibilidad de ser contaminados por *Penicillium expansum*. Cada cultivar tiene características físicoquímicas específicas, espesor de la piel y firmeza, pH y niveles de azúcar (Jackson y Fadwa, 2008). El pH de las frutas varía de <2.5 a 5 y estos valores son tolerables a muchas especies fúngicas y muy pocas para las bacterias (Fernández *et al.*, 2010). Otros factores que influyen en la invasión de tejidos por hongos es la microflora de la manzanas respecto a su punto geográfico, condiciones climáticas, tratamiento de pesticidas o fungicidas, presencia competitiva de microorganismos, tratamientos pre-cosecha y postcosecha (Jackson y Fadwa, 2008).

Se cree que el estado de madurez del fruto es uno de los principales factores que determinan la susceptibilidad al daño mecánico y en consecuencia la pudrición azul durante el almacenamiento postcosecha. Las frutas comienzan a ser altamente susceptibles a la invasión por hongos durante la madurez, ya que el pH del tejido aumenta así como los sólidos solubles, las capas de la piel se ablandan y las barreras de defensa se debilitan. Factores como temperatura de incubación, tamaño de la lesión en la piel de la fruta son puntos de suma importancia para la contaminación por hongos (Jackson y Fadwa, 2008).

Para reducir los cambios bioquímicos indeseables, las manzanas deben cosecharse no muy maduras para asegurar que puedan ser almacenados por varios meses.

Estudios indican que las magulladuras, pinchazos en la piel, aumenta la probabilidad de pudrición. Un manejo cuidadoso de la fruta durante la cosecha y cuidado durante el transporte de la fruta de la huerta a la casa empacadora previene lesiones en la fruta. Ya que la lluvia permite la contaminación por hongos, la fruta debe ser cosechada en condiciones de baja humedad y rápidamente ser almacenadas a baja temperatura. La fruta que ha caído de los árboles debe ser descartada y no ser comercializada o usada en la industria. Pueden tener lesiones o daños en la piel constituyendo un punto de contaminación de esporas de *P. expansum*. Éstas se encuentran en la tierra, en la superficie de las plantas, en el aire y pueden ser transferidas a tanques receptores y canales de agua en casas empacadoras contaminando de esta manera la fruta. Por esta razón uno de los mejores métodos para controlar el *P. expansum* en manzanas, es mediante el desarrollo de prácticas sanitarias durante la cosecha (Jackson y Fadwa, 2008).



El género *Penicillium* es un género diverso cuyas especies juegan roles muy importantes como descomponedores de material orgánico causando pudriciones destructivas en la industria alimentaria donde producen un gran rango de micotoxinas.

1.5.4. MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por numerosas especies fúngicas (Valle, 2010). Los metabolitos secundarios son compuestos que no son indispensables para el desarrollo o crecimiento de los hongos y son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario (Martínez y Anadón, 2012). Normalmente la mayor producción se produce bajo condiciones sub-óptimas y de estrés debido, por ejemplo al agotamiento de los nutrientes principales, por lo que el hongo para sobrevivir, necesita utilizar los metabolitos resultantes. Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia previa del desarrollo del moho (Valle, 2010). Las toxinas son específicas, cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores (Villacis, 2011).

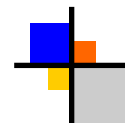
Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas ($P.M < 700$) y suelen formarse al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Villacis, 2011).

1.5.5. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS

Existen aproximadamente de 300 a 400 micotoxinas producidas por hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria* y *Stachybotrys* entre las cuales destacan las siguientes (Trucksess y Díaz Amigo, 2011):

1. Aflatoxinas

Producidas mayoritariamente por hongos del género *Aspergillus*. Se clasifican en B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, Q₁, P₁ y aflatoxicoles encontradas generalmente en cereales, oleaginosas y secreciones (leche y orina) (Cole, 1981). Químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona, comunes a todas ellas (Figura 10). Las aflatoxinas del grupo M son derivados hidroxilados de los dos grupos anteriores. La AFB₁ es el carcinógeno natural más potente que se conoce y suele ser el



principal producto por cepas toxigénicas (Soriano del Castillo, 2007). El principal órgano afectado por la ingesta de estas toxinas es el hígado (Cole, 1981).

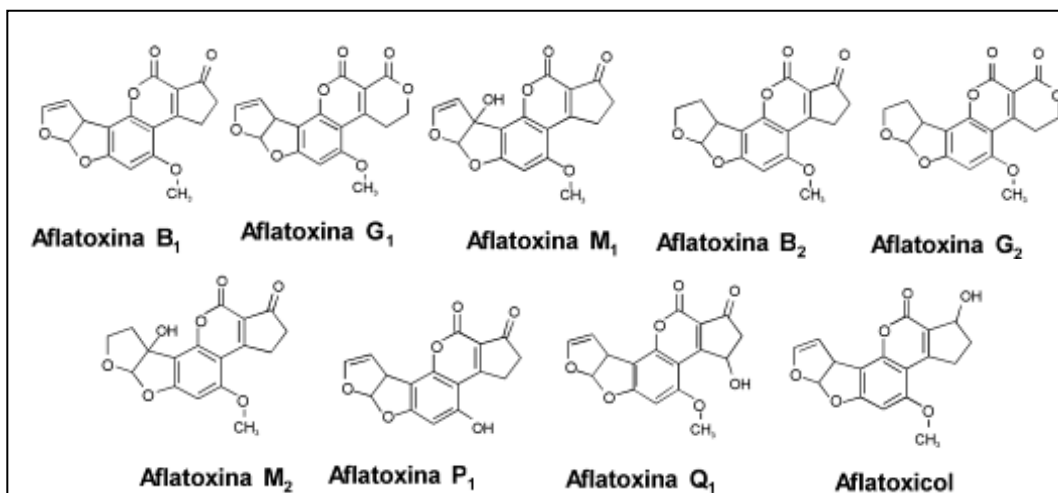


Figura 10. Estructura química de algunas aflatoxinas.

Fuente: Soriano del Castillo (2007).

2. Ocratoxinas

Son metabolitos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Cole, 1981). El grupo está compuesto por ocratoxina A, B y C y sus respectivos metil y etil ésteres, sin embargo la ocratoxina A es la más común, la cual está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de *L*-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 11) (Soriano del Castillo, 2007). Se pueden encontrar en cereales, café, cacao, frutos secos, uvas, jengibre, regaliz, vino y embutidos de puerco (Trucksess y Díaz Amigo, 2011). Los principales órganos afectados por su ingesta son el hígado y los riñones (Cole, 1981).

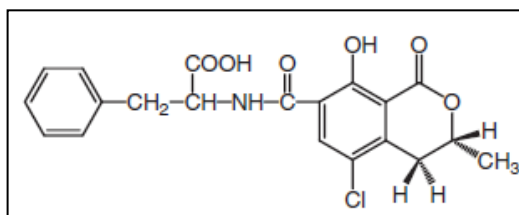
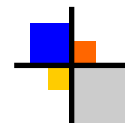


Figura 11. Estructura química de la ocratoxina A.

Fuente: Trucksess y Díaz Amigo (2011).

3. Tricotecenos

Los tricotecenos son una familia de sesquiterpenoides, producidos por numerosas especies del género *Fusarium* y otros géneros fúngicos relacionados (*Stachybrotrys*,



Trichoderma, *Trichothecium* y *Verrucaria*). La mayoría posee un núcleo tetraciclo con doble ligadura en el C-9,10 y un anillo epoxi en C-12,13 (Soriano del Castillo, 2007).

Los tricotecenos de *Fusarium* son alcoholes relativamente simples y ésteres de cadena corta; se ha propuesto una clasificación en cuatro grupos: A,B,C y D (Figura 12). Por su incidencia natural y asociación con micotoxicosis en seres humanos y animales, los grupos A y B son los de mayor significancia (Sierra, 2004). Se les puede encontrar naturalmente en el trigo y otros cereales. Tienen una alta actividad insecticida y causan problemas en la piel, tracto digestivo, sistema nervioso y cardiaco (Cole, 1981).

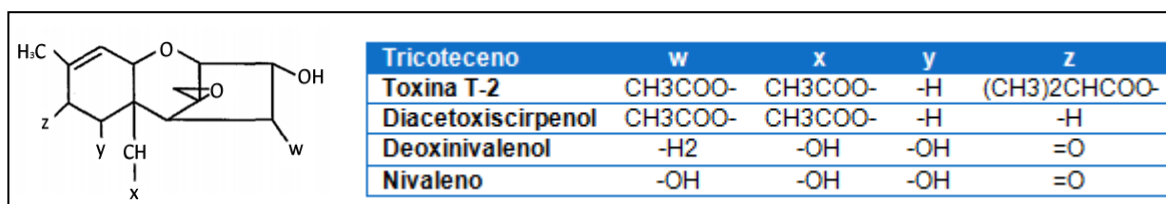


Figura 12. Estructura química de los tricotecenos.

Fuente: Sierra (2004).

4. Fumonisin

Está presente en el maíz, aunque también se ha encontrado en el sorgo y el arroz. Son producidas por hongos del género *Fusarium* y existen 15 tipos de fumonisinas, agrupadas en cuatro categorías. Las más conocidas con la FB₁, FB₂ y FB₃ (Figura 13), de las cuales la FB₁ es la más tóxica y representa aproximadamente 70% de la fumonisina total (Torres y López, 2010). La toxina FB₁ es un diéster de propano-1-2-3-ácido tricarbóxico y 2-amino-12-16-dimetil,3,5,10,14,15-pentahidroxiicosano, donde los grupos hidroxilos de los C-14 y C-15 están esterificados con el grupo carboxilo terminal de los ácidos tricarbóxico. Los principales síndromes que producen son neurotóxicos, nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral, hepatotóxicos y lesiones cardiacas (Cole, 1981).

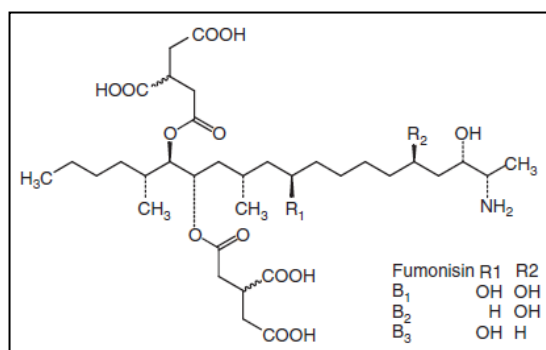
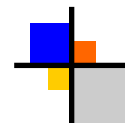


Figura 13. Estructura química de la fumonisina B₁, B₂ y B₃.

Fuente: Trucksess y Díaz Amigo (2011).



5. Zearalenona

Está presente en los granos, especialmente en el maíz y muestra una fuerte actividad estrogénica y anabólica en animales. Es un metabolito asociado con varias especies del género *Fusarium* (Cole, 1981). La molécula de ZEA es 3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16-dihidroxy-3-metil-2-benzoxacicotetradecin-7 (8H)-diona (Figura 14).

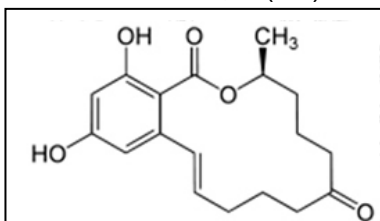


Figura 14. Estructura química de la zearalenona.

Fuente: Trucksess y Díaz Amigo (2011).

6. Lactonas tóxicas

Se clasifican en **patulina**, ascladiol y ácido penicílico (Figura 15). Se encuentran generalmente en los frutos como las uvas, manzanas y peras y se han demostrado efectos carcinogénicos sobre algunos animales (Cole, 1981).

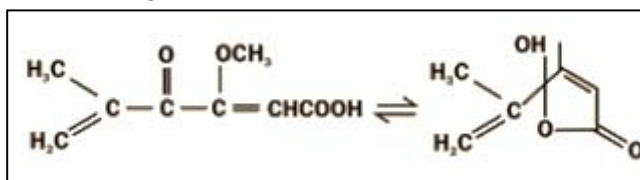
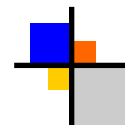


Figura 15. Ácido penicílico.

Fuente: Soriano del Castillo (2007).

1.6. PATULINA

Micotoxina que se encuentra en los cereales utilizados en la alimentación animal y en diversas frutas, pero mayormente en manzanas, donde es más susceptible a la producción de dicha micotoxina ya que contiene azúcares: fructosa, glucosa, sacarosa constituyentes principales de la fuente de carbono necesaria para el desenvolvimiento del hongo así como ácido málico importante para el aumento de la estabilidad química de la patulina. Esta micotoxina puede afectar a distintas variedades de manzana siempre y cuando encuentre la temperatura y humedad adecuada (Soriano *et al.*, 2002). El rango de temperatura para la producción de patulina es de 0 a 24 °C y actividad de agua mínima de 0.99. (Fernández *et al.*, 2010).



Las características principales de la micotoxina se resumen en la siguiente tabla.

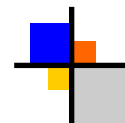
Tabla 7. Características químicas y físicas de la patulina.

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
El nombre químico	4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona
Fórmula química	C ₇ H ₆ O ₄ <div style="text-align: center;"> </div>
PM	154.12 (g/mol)
Descripción	Es una lactona heterociclica insaturada, en forma de sólido blanco cristalino
Punto de fusión	105–108 °C
Máximo de absorción	276 nm
Estabilidad	Estable frente a la temperatura especialmente a pH ácido
Sensible	Sensible a la acción redox de los sulfitos y del ácido ascórbico. Pierde su actividad biológica en medios alcalinos
Solubilidad	Soluble en agua, alcohol, acetona, etil acetato y cloroformo. Poco soluble en éter y benceno.

Fuente: Valle (2010).

La patulina es producida por más de 60 especies de hongos abarcando unos 30 géneros. Incluidos entre ellos *Penicillium expansum* (*P. leucopus*), *P. patulum* (*P. urticae*, *P. griseofulvum*), *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. clavigerum*, *P. coprobium*, *P. claviforme*, *Paecilomyces spp.*, *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *Byssochlamys nivea*, *B. fulva*, *Aspergillus giganteus*, *A. terreus*, y *A. clavatus* (Valle, 2010).

La patulina puede encontrarse en peras, berries, mangos, albaricoque y tomates. En estudios de capacidad toxicogénica con *P. expansum*, *P. urticae* y *B. nivea*, se observó producción de patulina en duraznos, piñas, plátanos, fresas, melones, pepinos y zanahorias entre las frutas y vegetales, como así también en cebada inoculada con *Aspegillus clavatus* (Funes, 2011).

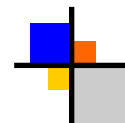


1.6.1. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PATULINA EN MANZANA

El aislado específico de *P. expansum* puede ser un importante factor en su patogenicidad y su habilidad para sintetizar patulina en la fruta. Estudios sobre la contaminación de manzanas por patulina demostraron que diferentes aislados de *P. expansum* producen niveles de patulina en un rango de 2 a 100 µg/g (Barkai-Golan, 2008).

En un estudio se encontraron grandes diferencias entre aislados de *P. expansum* en términos de la producción de la toxina y crecimiento del hongo en sidras de manzana. La variación genética es la principal causa de estas diferencias, pero factores ambientales como la temperatura, pH, así como el tiempo de almacenamiento pueden contribuir al crecimiento fúngico y la producción de patulina. El rango mínimo para la producción de patulina de *P. expansum* es de 1 a 4 °C dependiendo de la variedad de la manzana. Los niveles de patulina en manzanas Macintosh almacenadas a 4 °C fueron susceptiblemente más bajas que aquellas almacenadas a 15 °C o 24 °C (Barkai-Golan, 2008). Pese a lo anterior, en otros estudios realizados en diferentes aislados de *P. expansum*, se encontró que algunos de ellos aumentaron su nivel de producción de patulina al disminuir la temperatura a 4°C y solo unos cuantos la redujeron al llegar a 1°C. Por esa razón es recomendable almacenar las manzanas a 1°C para evitar el crecimiento del hongo y por consiguiente mitigar la formación de patulina durante el almacenamiento (Baert *et al.*, 2007).

Existen varias características intrínsecas de la manzana que demostraron que afecta el crecimiento de *P. expansum* y la producción de patulina. En un estudio se demostró que en la primera fase de crecimiento de *P. expansum* exhibe un incremento exponencial en la producción de patulina y la velocidad de crecimiento mejora mientras que el pH disminuye. Se cree que el hongo por si solo acidifica el medio mediante la producción de metabolitos secundarios y ácidos orgánicos que bajan el valor de pH en un punto en donde la patulina es estable (pH<3.5). Otro factor es la firmeza de la fruta. Unos estudios demostraron que la contaminación por patulina y el contenido de ésta producida en manzanas inoculadas es inversamente proporcional a la firmeza del cultivar. De igual forma el método de almacenamiento influye en la producción de la micotoxina, como el caso del almacenamiento en atmósferas controladas. Se encontró que el almacenamiento de manzanas “Golden Delicious” en 2-8 % CO₂ y 2-3 % O₂ evita el crecimiento de *P. expansum* y la acumulación de patulina. Y que jugos hechos de manzanas almacenadas



bajo atmósfera controlada contenían menor patulina (por debajo de 500 $\mu\text{g/L}$) que aquellas manzanas almacenadas al aire libre (2000-3000 $\mu\text{g/L}$) (Barkai-Golan, 2008).

1.6.2. TOXICIDAD Y LÍMITES TOLERABLES

Durante la década del cuarenta, se estudió la patulina como posible antibiótico debido a su capacidad antimicrobiana, posteriormente estudios en animales le sumaron actividad toxicológica y se clasificó como micotoxina (Funes, 2011).

La patulina tiene efectos mutagénicos, genotóxicos, inmunotóxicos y neurotóxicos en roedores (los LD_{50} se muestran en la Tabla 8) y efectos teratogénicos en gallinas. Los valores de LD_{50} para ratones dependen de la vía de administración (Palmgren y Ciegler, 1983).

Tabla 8. Límites de dosis LD_{50} de la patulina en ratones.

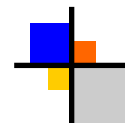
VÍA DE ADMINISTRACIÓN	LD_{50}
inyección subcutánea	8 a 15 mg/kg
inyección intravenosa	16-25 mg/kg
inyección intraperitoneal	6-30 mg/kg
Oral	35-48 mg/kg

Fuente: Palmgren y Ciegler (1983).

Los ratones presentaron síntomas como edema, hinchazón y descoloración en el área de la inyección subcutánea además de presentar dificultad respiratoria. El ratón murió precedido de convulsiones cuando fue inyectado por vía intravenosa. El edema pulmonar y la hemorragia fueron los principales padecimientos. Además pueden ocurrir problemas en hígado, riñón, pulmones y bazo (Palmgren y Ciegler, 1983)

En estudios realizados por Lovett en 1972, después de un día de ayuno, se agregaron distintas dosis de patulina en alimentos para gallos White Leghorn, dando como resultado un LD_{50} de 170 mg/kg de alimento (Funes, 2011).

Los resultados de ensayos de toxicidad en la reproducción y teratogenicidad en ratones, ratas y embriones de pollo, indican que la patulina posee efecto teratogénico. En estudios con huevos de gallina se observaron efectos embriotóxicos cuando se inyectó en la cámara de aire de dichos huevos, niveles de 2.35-68.7 $\mu\text{g/huevo}$, dependiendo de la edad de los embriones. Se observaron además efectos teratogénicos cuando los niveles fueron de 1 a 2 $\mu\text{g/huevo}$. Estos estudios evidenciaron una amplia variedad de efectos, predominando patas aplastadas y rotaciones anómalas en las alas (Funes, 2011).



Sobre los efectos genotóxicos, en diferentes estudios, se demostró que la patulina produce daños a nivel de cromosoma en mamíferos. También se ha reportado que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (Funes, 2011).

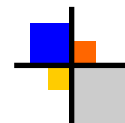
La agencia internacional de investigación sobre el cáncer en su revisión 40 concluyó que no podría hacerse una evaluación de la carcinogenicidad para los seres humanos ya que no había pruebas suficientes en animales de experimentación y la clasificó como agente del grupo 3. Los agentes incluidos en este grupo no pueden ser clasificados como sustancias cancerígenas en humanos (IARC, 1986). Por otro lado, el Comité del Reino Unido sobre la mutagenicidad de las sustancias químicas en los alimentos ha clasificado la patulina como mutagénica (Shephard y Leggott, 2000).

La exposición de patulina por alimentos infectados puede resultar en una severa toxicosis. Entre los efectos agudos incluye náusea, vómito, y otros padecimientos gastrointestinales incluyendo daño de riñón (Barkai-Golan, 2008).

Últimamente, oficiales de salud pública se confrontan a un severo problema: las micotoxinas y particularmente toxinas cancerígenas deben de ser excluidas de alimentos tan rápido como sea posible. Al menos 99 países, no incluido México, tienen regulaciones de la micotoxina en los alimentos. Aproximadamente 160 diferentes regulaciones existen para patulina en 50 países. Donde la patulina no sólo se regula para productos de manzana sino en berries, pasta de tomate, champiñones, vegetales (en lata) bebidas fermentadas, alimento para bebé, mermeladas, confituras y jarabes (Barkai-Golan, 2008). Los límites tolerables de patulina según la FDA son 50 µg/L en productos como jugos de fruta (Soriano *et al.*, 2002). La Unión Europea en su diario Oficial de la comunidad europea ha establecido 50 µg/kg de patulina como nivel máximo permitido en jugos, 25 µg/kg para alimentos sólidos de manzana y 10 µg/kg en alimento para bebé (Morales *et al.*, 2008). Reino Unido establece un límite de 50 ppb de patulina, y la OMS/FAO establecen un consumo semanal tolerable de 0.4 µg/kg de peso corporal (Elhariry *et al.*, 2011, Soriano *et al.*, 2002).

1.6.3. PRINCIPALES EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS

En general, se le da el nombre de micotoxicosis a las enfermedades de que se originan por la ingestión de las micotoxinas, aunque los efectos que producen son de muy diversa naturaleza. Algunas son carcinógenas y otras pueden afectar el funcionamiento de órganos específicos como el hígado (hepatotóxicas) o los riñones (nefrotóxicas) o producir otro tipo de daños (Gil, 2010).



La patulina es muy tóxica para células vegetales y animales y puede reaccionar con grupos terminales sulfhidrilos y polipéptidos presentes en los alimentos.

La síntesis de ARN se inhibe y se ha demostrado que produce rupturas en enlaces dobles y sencillos del ADN de *Escherichia coli*. Un estudio reciente revela la capacidad que tiene para causar daños oxidativos al ADN de células humanas. También puede inhibir la actividad de numerosas enzimas, principalmente como consecuencia de su fuerte afinidad por los grupos sulfhidrilo y tiene un efecto inhibitorio en la ATP-asa, fosfatasa alcalina, aldolasa y la actividad de la hexoquinasa (Barkai-Golan, 2008).

Los efectos de la patulina dan lugar a lesiones congestivas que pueden afectar al pulmón, riñón y bazo de los seres humanos (Anderson, 2005). Los efectos ocasionados por la micotoxina pueden ser: edema cerebral y pulmonar con procesos hemorrágicos y daños capilares en el hígado (Soriano *et al.*, 2002).

1.6.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PATULINA

Su posible actividad carcinógena es debida al doble enlace en la posición 4 de la molécula de lactona. Este compuesto altera la síntesis de ARN, ADN y proteínas debido a la inhibición de la enzima: farsenil-proteína transferasa, lactato deshidrogenasa, ARN polimerasa y aldolasa muscular (Soriano *et al.*, 2002). La patulina también causa rompimiento en los cromosomas en huevos de salamandra y células poliploides en leucocitos humanos (Palmgren y Ciegler, 1983).

La patulina inhibe la respiración aeróbica en un 80% en el tejido cerebral de los conejillos de indias y 50 % en el tejido del riñón. Esta inhibición resulta a su vez la inhibición del transporte activo en el mecanismo de la membrana, el cual depende de ATP-asas (Palmgren y Ciegler, 1983).

Esta micotoxina también afecta la permeabilidad de las membranas y reduce la actividad de la adenosina trifosfatasa (Soriano *et al.*, 2002). El sitio exacto donde actúa la patulina en la respiración no es clara. Probablemente ocurra en las reacciones respiratorias precedentes de la cadena de transporte de electrones (Scott, 1974).

En otros estudios se ha encontrado que los fibroblastos de los ratones son altamente sensibles, donde la multiplicación celular fue inhibida a concentraciones menores de 1 µg/ml de patulina. La patulina específicamente afecta la división celular (Scott, 1974).



1.6.5. DETOXIFICACIÓN

En la literatura, se han reportado varios estudios sobre el metabolismo, distribución y excreción de la patulina administrada oralmente en ratas. A los 7 días, el 40 % de la dosis (3 mg/kg) fue excretada por la orina y 50% en las heces. De 1- 2% fue expirado como CO₂ y el resto quedó en el animal. La mayoría fue excretada en la orina las primeras 24 horas y en las heces durante las primeras 48 horas. En los tejidos blandos y en las células de la sangre se retuvo por 7 días después del tratamiento (Palmgren y Ciegler, 1983). La mayor retención se encontró en eritrocitos y órganos ricos en sangre como el bazo, el riñón, el pulmón y el hígado. La patulina fue degradada rápidamente después de la adsorción en el tracto gastrointestinal y probablemente la toxicidad se presentó sólo a nivel local (Funes, 2011).

1.6.6. MÉTODOS DE CONTROL DE LA MICOTOXINA

La podredumbre azul es una de las enfermedades más comunes del almacenamiento de manzanas. Por lo que los tratamientos de control químico y biológico no han cesado.

El control químico se ha utilizado durante largos periodos. El uso intensivo y exclusivo de benzimidazoles ha causado una resistencia en muchas casas emparadoras. Desde el descubrimiento de la resistencia al tiabendazol (TBZ) por los aislados de *P. expansum*, ha llevado a una búsqueda de controles alternativos. El uso de sustancias químicas para el control del deterioro en la postcosecha ha sido restringido debido a su carcinogenicidad alta y agudos residuos tóxicos, largo periodo de degradación, contaminación ambiental y efectos en la comida de los humanos. Aun así se debe de enfatizar que los residuos de pesticidas no son tan tóxicos como las micotoxinas. A pesar de ello, el uso de pesticidas sigue siendo el más implementado, mientras que los procesos biológicos representan un pequeño sector para el control de la enfermedad en el mercado (Marín *et al.*, 2008).

Se han utilizado procesos físicos en el procesamiento de las manzanas en combinaciones con procesos químicos, por ejemplo, el escaldado es usualmente utilizado en la postcosecha con el antioxidante difenilamina (DPA, por sus siglas en inglés). Posteriormente las manzanas son tratadas con fluidioxonil (3-5 mL/L). De esta manera se ha diseminado más la enfermedad que en las manzanas tratadas únicamente con fluidioxonil. Algunas pruebas *in vivo* presentan al molibdato de amonio como un fungicida potencial por su uso contra la podredumbre azul y gris a 20 °C donde se ha observado reduce los diámetros de la lesión del *P. expansum* en un 84%. Cuando las manzanas son



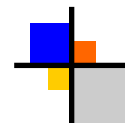
tratadas con molibdato de amonio son almacenadas a 1°C por tres meses. Su nivel de control es similar o mejor que el fungicida imazalil (Marín *et al.*, 2008).

Dentro de los controles biológicos, se encuentra el uso de agentes antagonistas, (generalmente microorganismos aislados de la superficie de la fruta), que compiten por los nutrientes contra el patógeno. Este procedimiento es considerado amigable para el ambiente. Estos organismos son conocidos como agentes de biocontrol o BCA, por sus siglas en inglés. Principalmente se tratan de bacterias y levaduras. Se demostró por pruebas *in vitro* que la levadura *Candida sake*, la cual puede aislarse de manzanas y de sus hojas, es un agente de biocontrol efectivo contra los principales patógenos en la manzana (Morales *et al.*, 2010). Por otro lado la bacteria *Rahnella aquantilis* se utilizó para el control poscosecha causado por *P. expansum* y *Botrytis cinerea*, se reportó una reducción del 30 y 97% respectivamente, en manzanas podridas. Otro método muy común es el empleo de atmósferas controladas en donde se utilizan altas concentraciones de CO₂ y bajas concentraciones de O₂ en combinación con el almacenamiento en refrigeración para extender el tiempo de vida útil de alimentos frescos. Sin embargo algunos estudios revelan que el *P. expansum* es resistente a altas concentraciones de CO₂ e incluso en concentraciones de 12 % no es completamente inhibido (Morales *et al.*, 2010).

En México las manzanas se almacenan en refrigeradores, de los cuales el 55% corresponde a refrigeración bajo sistema de atmosfera convencional, es decir, la manzana solo se puede almacenar hasta 4 meses, y el 45% bajo el sistema de atmósfera controlada, es decir, la manzana se puede almacenar hasta por un periodo de 13 meses, dichos sistemas son aplicados a las principales casas productoras de manzanas (SAGARPA-UNIFRUT, 2013)

Se han utilizado alternativas antifúngicas, donde se reemplazan los fungicidas sintéticos por productos naturales (particularmente de origen vegetal) los cuales no son tóxicos y con acción específica. Algunos componentes utilizados son acetaldehído, benzaldehído, hexanal, ácido acético, glicosinolatos, propilos, fusapirona y dioxifusapirona, quitosán, aceites esenciales, principios activos de algunas plantas y extractos de plantas para el control del hongo (Marín *et al.*, 2008).

Para el desarrollo de estas alternativas antifúngicas, es necesario apoyarse de los diferentes metodos para determinar la patulina.

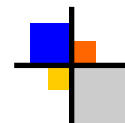


1.6.7. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA PATULINA

La determinación de la patulina requiere de métodos apropiados para su análisis. Muchos métodos se han desarrollado para evaluar patulina en zumo de manzana. A pesar de ello, se continúan optimizando los métodos para que sean más sencillos, económicos, con límites de detección inferiores y de mayor reproducibilidad. No existen ensayos con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) para determinar patulina. Por tanto, los métodos convencionales para el pretratamiento de muestras como extracción líquido-líquido y una posterior separación por cromatografía son los métodos más ampliamente utilizados (Valle, 2010). La cromatografía es un procedimiento de separación que se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles: estacionaria y móvil. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación (Rouessac y Rouessac, 2000).

Existen varias técnicas instrumentales de confirmación para el análisis de patulina las cuales se enlistan a continuación:

- **Cromatografía en capa fina.**-La Cromatografía en capa fina (TLC) fue el primer método usado para la determinación de patulina en jugo de manzana. Este método involucra la extracción con acetato de etilo y purificación en una placa que contiene sílica gel. La detección es observada por revelación de una solución de 3-Metil-2-Benzotiazolinona hidrazona hidroclicorhidrica monohidrato (MBTH), lográndose obtener límites de detección de 20 µg/ L (Shephard y Leggot., 2000)
- **Electroforesis capilar.**-Es una técnica de separación moderna que consiste en la introducción de tensoactivos como sodio dodecil sulfato (SDS) a una solución acuosa, en donde las micelas formadas en la solución constituyen la fase seudo estacionaria. El sistema de separación con electroforesis capilar es similar a una columna de partición de cromatografía líquida, excepto por la fase estacionaria que está moviéndose a una velocidad más lenta que la fase móvil. El mecanismo de separación depende de la diferencia de coeficientes de distribución de los analitos entre la fase acuosa y la fase seudo estacionaria. La ventaja que presenta en relación con la cromatografía líquida es que se puede cambiar la composición de la fase estacionaria cambiando la composición de las micelas del buffer. Otra ventaja es que requiere pequeños volúmenes de muestra, en el orden de 0,1 a 10 nL (Villacis, 2011).



- **Cromatografía de gases.**-Esta técnica es utilizada para el análisis de alrededor del 60% de las micotoxinas, el detector más sensible es el de captura de electrones y generalmente se utiliza la técnica acoplada a un espectrómetro de masas. La ventaja es que se requiere cantidades pequeñas de muestra y los límites de detección y cuantificación son mucho menores (Villacis, 2011). La aplicación de esta técnica a jugos de manzanas, cuya extracción se realizó con etil acetato y purificados en una columna de sílica gel, tiene un límite de detección de 10 $\mu\text{g/L}$ (Shephard y Leggot., 2000).
- **Cromatografía líquida.**-Debido a la polaridad de la molécula de patulina y su característica de absorción de luz ultravioleta, son muy utilizados los métodos analíticos basados en cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa conectado a un detector ultravioleta. Estos métodos han ofrecido buenos resultados para la separación y la cuantificación de patulina simultáneamente con un detector ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm. La espectrometría de masas y arreglo de diodos también han sido utilizados como complemento para la detección UV. La patulina es una molécula de bajo peso molecular y alta polaridad, y puede ser removida de las columnas de fase reversa usando una fase móvil con alto porcentaje de agua. Las fases móviles que se utilizan en la mayoría de los análisis son mezclas de acetonitrilo y agua en proporciones diferentes, aunque también son consideradas mezclas de agua-etanol y ácido acético, agua-metanol. Se trabaja en condiciones isocráticas (Villacis, 2011)

1.7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla. La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cámara de cromatografía cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil) (Figura 16). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente (Pyetrzyk y Clyde, 1979).

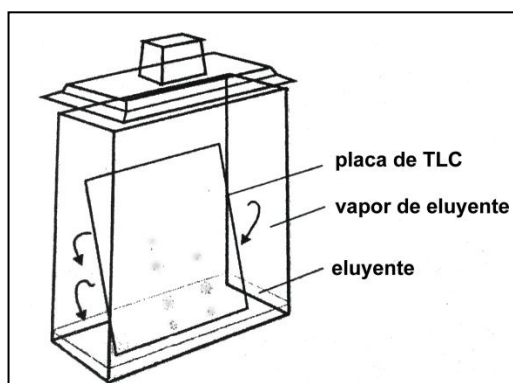
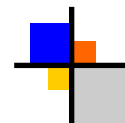


Figura 16. Cámara de cromatografía.

Fuente: Rouessac y Rouessac (2000).

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son Silica Gel (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. La alúmina se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). La Silica Gel, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. La retención se puede explicar en base a la polaridad que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil (Pyetrzyk y Clyde, 1979).

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cámara de desarrollo, temperatura, etc.) (Figura 17).

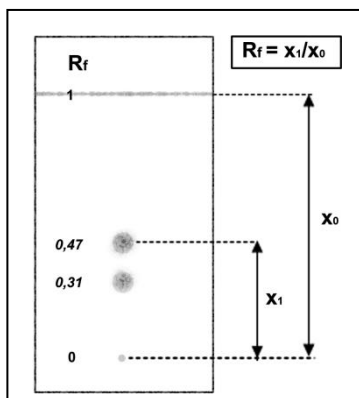
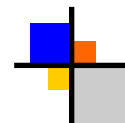


Figura 17. Relación de la distancia recorrida por el soluto y el eluyente.

Fuente: Rouessac y Rouessac (2000).

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto (Pyetrzyk y Clyde, 1979).

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Penicillium* y el contenido de patulina en manzanas frescas y procesadas comercializadas en tres puntos de venta de la ciudad de México y área metropolitana para evaluar su calidad sanitaria.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1. OBJETIVO PARTICULAR 1

Detectar la presencia del género *Penicillium spp.* en manzana “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, Bodegas de Atizapán y mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, mediante aislamiento e identificación macroscópica y microscópica del hongo, para determinar la calidad del producto fresco.

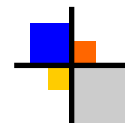
2.2.2. OBJETIVO PARTICULAR 2

Determinar la presencia y el contenido de patulina en manzana “Golden Delicious”, a través del método de cromatografía en capa fina para evaluar su cumplimiento con las normas internacionales establecidas.

2.2.3. OBJETIVO PARTICULAR 3

Determinar la presencia y contenido de patulina en productos derivados de la manzana elaborados artesanalmente e industrialmente (sidra, refresco, jugo, mermelada, deshidratados), a través del método de cromatografía en capa fina para evaluar su cumplimiento con las normas internacionales establecidas.

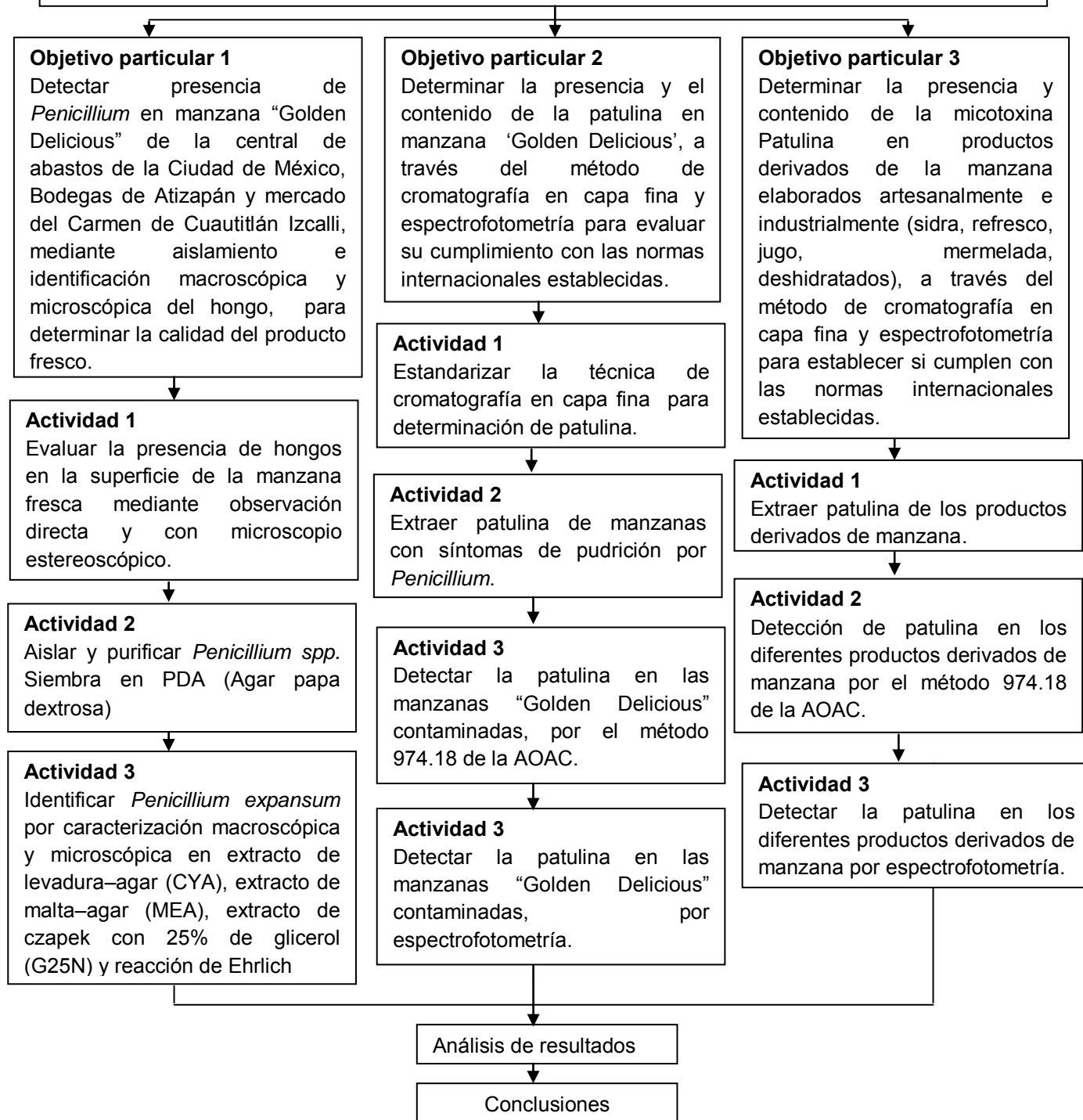
MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CUADRO METODOLÓGICO

Objetivo general: Determinar la presencia de *Penicillium spp.* y el contenido de patulina en manzanas frescas y procesadas comercializadas en tres puntos de venta de la ciudad de México y área metropolitana para evaluar su calidad sanitaria.





3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Manzanas de la variedad “Golden Delicious”, de tipo de venta a granel y en caja, fueron seleccionadas al azar de la central de abastos de la Ciudad de México (bodegas S1 y S7), Bodegas de Atizapán (E y M) y mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.

Asimismo, los productos derivados de manzana: jugo, mermelada, fruta deshidratada y sidra de origen artesanal se adquirieron en Zacatlán, Puebla; y los productos comerciales, en centros comerciales en Cuautitlán Izcalli (Tabla 9).

Tabla 9. Productos derivados de manzana elaborados artesanal e industrialmente.



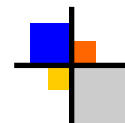
3.3. MUESTREO

El muestreo se realizó basándose en los lineamientos de la Directiva Europea DIRECTIVA 2003/78/CE por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios.

El número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote se indica en la Tabla 10.

Tabla 10. Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote

Peso del lote (kg)	Número mínimo de muestras elementales
<50	3
50 a 500	5
>500	10



El número de muestras elementales fue de 12 lotes de cinco unidades para el tipo de venta a granel y una caja de cada centro de distribución frutícola dando un total de 360 manzanas (con 120 unidades de cada centro: 60 a granel y 60 en caja).

3.4. ALMACENAMIENTO DE MANZANAS “GOLDEN DELICIOUS”

Los frutos fueron almacenados por 56 días en cámara húmeda en condiciones de refrigeración (5°C) y fueron evaluadas visualmente cada tercer día.

El propósito de la cámara húmeda fue crear las condiciones favorables de humedad para el desarrollo rápido de hongos o bacterias que pueden estar involucradas en la producción de síntomas de enfermedad, pero cuya presencia no es perceptible en el momento de la primera observación (French y Hebert, 1980).

Para establecer las condiciones de humedad se creó una cámara húmeda, utilizando agua destilada previamente esterilizada a 121°C por 20 min, la cual se dejó enfriar y se rocío en bolsas de polietileno. Las manzanas se marcaron enumerando cada unidad del 1 al 120 para cada procedencia, posteriormente se introdujeron en las bolsas de polietileno y se cerraron para ser almacenadas en una cámara de refrigeración (Figura 18).



Figura 18. Procedimiento para el almacenamiento de manzanas en cámara húmeda

3.5. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN LA SUPERFICIE DE LA MANZANA

Las técnicas para la identificación de mohos se encaminan, principalmente, al estudio de la morfología, tanto macroscópica como microscópica. Para ello, se realiza una resiembra sobre un medio de identificación adecuado y, después de su incubación en estufa de cultivo, se procede a la observación macro y microscópica de diversos parámetros (Pascual y Calderon, 2000).



3.5.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO DE LA MANZANA

3.5.1.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) se utilizó para llevar a cabo los procedimientos de crecimiento y aislamiento. Para ello se preparó el medio con una infusión de papa natural, previamente lavada y picada en pequeños trozos, de las cuales se obtuvieron 500 g, y se hirvieron en 500 mL de agua destilada durante 30 min. Una vez cumplido ese tiempo, se filtró a través de una manta de cielo y se tomó 150 mL de la infusión, al cual se le adicionó 5 g de dextrosa BD Dioxon y 3.75 g de agar bacteriológico BD Dioxon. Después se complementó el volumen hasta 250 mL y se agitó hasta homogeneizar totalmente calentándolo hasta ebullición. Finalmente se esterilizó en una autoclave Presto a 121 °C y 20 lb de presión por 20 min.

3.5.1.2. Siembra del hongo en agar-papa-dextrosa

Para la siembra de los hongos se realizó una previa observación en la superficie del fruto, así como en el pedúnculo para encontrar esporas o cuerpos fructíferos fúngicos. Una vez ubicadas las esporas sobre la superficie, se recolectaron con la punta de una aguja estéril y se sembraron en el medio. Posteriormente se incubó a 25 °C por 5 días para permitir el desarrollo de las colonias. Finalmente se resembró en placas para purificar los aislamientos (Figura 19).

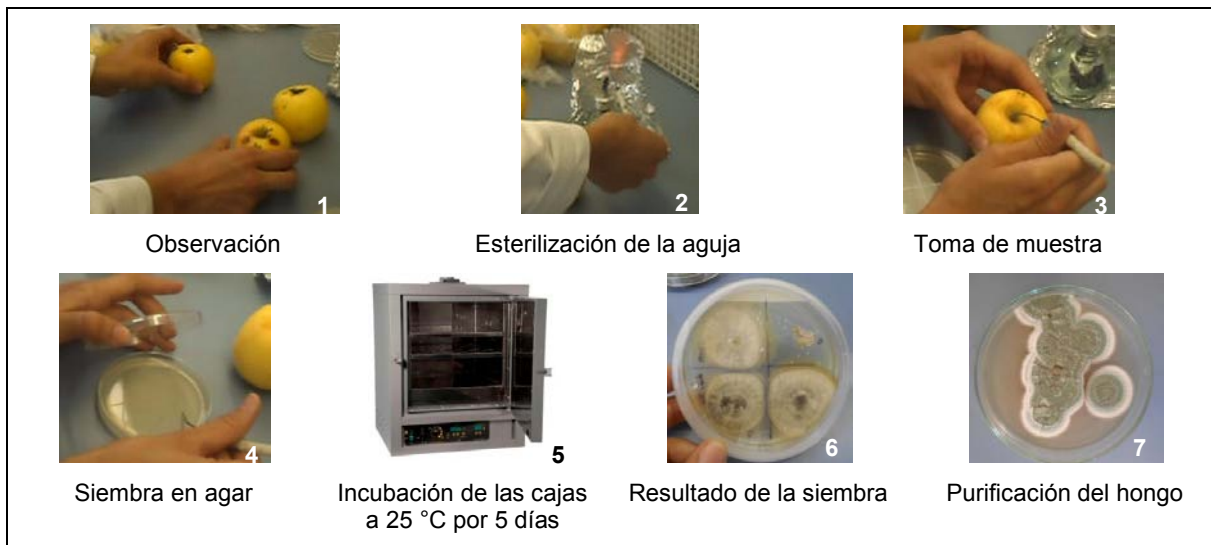
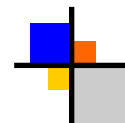


Figura 19. Procedimiento para aislar y purificar hongos en PDA



3.5.2. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA

Para la observación macroscópica se tomaron en cuenta diversos parámetros: grado de crecimiento y aspecto de las colonias (forma, textura superficial, color anverso y reverso), características de las hifas, formación y tipo de exudado principalmente.

3.5.2.1. Preparación de medios de cultivo específicos

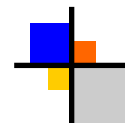
Los medios de cultivo y temperaturas de incubación que se utilizaron para identificar *Penicillium* son: agar Czapeck extracto de levadura Dibico (Czapeck Yeast Extract Agar, CYA) a 25 °C, agar-extracto de malta DB Bioxon al 2% (Malt Yeat Agar, MEA) a 25 °C y concentrado de Czapeck Dibico-Glicerol Reaquimex al 25% a 25 °C. Por lo general, los medios de cultivo se prepararon resuspendiendo en agua destilada el medio deshidratado; posteriormente se homogeneizaron calentando hasta disolver los grumos. Finalmente se esterilizó en una autoclave Presto a 121 °C por 20 min.

3.5.2.2. Resiembra de *Penicillium* en puntos equidistantes

La identificación de *Penicillium* requiere la siembra del moho en tres puntos equidistantes (triángulo equilátero) en placa de agar de medios específicos. Para ello se preparó una suspensión de esporas en un tubo eppendorf de capacidad de 1.5 mL, en donde se colocó 1 mL de agua estéril con Tween 80 al 0.1 % y una muestra de esporas del aislamiento fúngico. Después se agitó la mezcla en un vórtex MaxiMix II. Se tomaron 2 μ L de la suspensión de esporas y se colocó en tres puntos de la superficie del agar (Figura 20). Las cajas se colocaron en una estufa de cultivo E-41 convección por gravedad por 7 días a 25 °C y se observaron sus características morfológicas macroscópicas empleando el microscopio estereoscópico Velab VE-51 con ayuda de las claves de Samson y Frisvald (2004) y Pitt y Hocking (2009).



Figura 20. Siembra del moho en tres puntos equidistantes.



3.5.3. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

Para la observación microscópica, se llevó a cabo una tinción. Para ello se tomó una parte de la superficie de la colonia con una aguja de disección estéril y se sumergió la muestra en una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos, con la ayuda de otra aguja o de un asa microbiológica se extendió el preparado y se cubrió con un cubreobjetos; para luego ser observada al microscopio óptico empleando el objetivo 40X. Se utilizaron las claves de Pitt y Hocking (2009) y Frisvald y Samson (2004) para la identificación.

3.5.4. REACCIÓN DE EHRLICH

La reacción de Ehrlich sirve para identificar especies del género *Penicillium*. Los aislados son examinados con el reactivo de Ehrlich mediante el método de papel filtro para observar la producción de ácido ciclopiazónico y otros alcaloides presentes en éstos (Frisvad & Samson, 2004). La preparación del reactivo consistió en agregar 2 g de 4-dimetilaminobenzaldehído en 85 mL de metanol al 96% y 15 mL de HCl 10 N. A partir de una colonia en CYA (incubada de 5 a 9 días a 25 °C, sin embargo algunos requieren 14 días de incubación). Del centro de la colonia se tomó una muestra circular de 4 mm. Una pieza de 1 cm de diámetro de papel filtro (Whatman No. 1) es colocada, húmeda con el reactivo, en la parte del micelio (Figura 21). Si un anillo violeta aparece después de 2 a 6 min, la colonia tiene ácido ciclopiazónico o alcaloides relacionados. La reacción después de 7 a 10 min se observa débilmente. Después de 10 min el anillo violeta desaparece. Algunos aislados presentan anillos de rosas a rojos o amarillos.

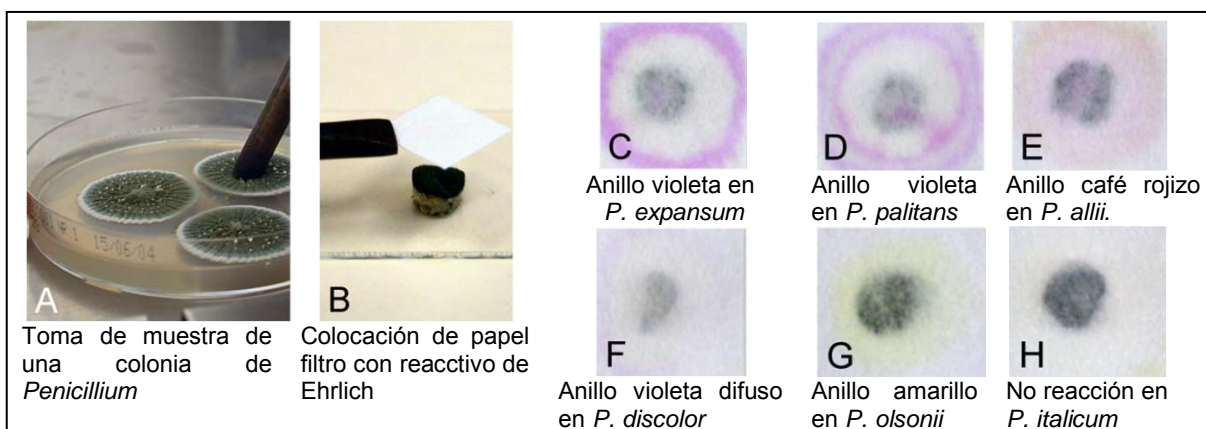
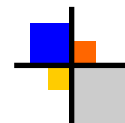


Figura 21. Coloraciones de la reacción de Ehrlich.

Fuente: Frisvad & Samson (2004).



3.6. DETECCIÓN DE PATULINA

3.6.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Durante la experimentación se prepararon muestras para la extracción de patulina. Tanto para el producto fresco como para el producto procesado elaborado artesanal e industrialmente.

3.6.1.2. Preparación de la muestra del producto en fresco

Se tomaron manzanas con síntomas de pudrición. Cada muestra representa una manzana la cual se licuó con 50 mL de agua destilada. El puré que se obtuvo se filtró a través de papel filtro Whatman no. 1 y se mezcló para homogeneizar.

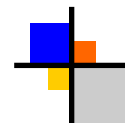
3.6.1.3. Preparación de la muestra para los productos procesados elaborados industrial y artesanalmente

Los productos que se estudiaron fueron: jugo de manzana, sidra, manzana deshidratada y mermelada. Para los productos líquidos como el jugo y la sidra, la muestra se tomó directamente de la botella asegurándose de mezclarlo bien antes de abrirlo, a excepción de la sidra donde fue necesario desgasificar, para ello la muestra se licuó y se dejó destapado por un periodo de tiempo, repitiendo estos pasos hasta que la bebida quedó completamente sin gas.

Para la manzana deshidratada, se tomaron 30 g de muestra y se licuó con 80 mL de agua destilada y el puré obtenido se filtró con papel Whatman no. 1. Por otra parte la mermelada se licuó con 50 mL de agua e inmediatamente se realizó la extracción.

3.6.2. EXTRACCIÓN DE PATULINA

Las muestras previamente preparadas se emplearon 20 mL de cada una y se extrajeron con 60 mL de acetato de etilo (Sigma-Aldrich para HPLC) en un embudo de separación. Éstos se mezclaron vigorosamente por 1 min. Una vez que se separaron las fases, se retiró la fase más densa, recuperando únicamente la fase superior, la cual se le agregó 8 g de Na_2SO_4 (JT Baker) y se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente el líquido pasó a través de un filtro de microfibra de vidrio (Vicam, 1.5 μm) y se realizó un lavado del Na_2SO_4 , adicionando 10 mL de acetato de etilo. La muestra se evaporó con un rotavapor (marca Heidolph Laborota 4002/4003) hasta un volumen menor de 5 mL (evitando que se evapore hasta sequedad) a 55 °C al vacío. A continuación se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 40 °C con un evaporador (marca TurboVap LV). La toxina se



resuspendió en 5 mL de alcohol etílico absoluto (J.T. Baker, grado analítico) agitando por un minuto en un vórtex (marca MaxiMix II). Las muestras se almacenaron en congelación (-20 °C) en viales forrados con papel aluminio para evitar su exposición a la luz para su siguiente uso (Figura 22).

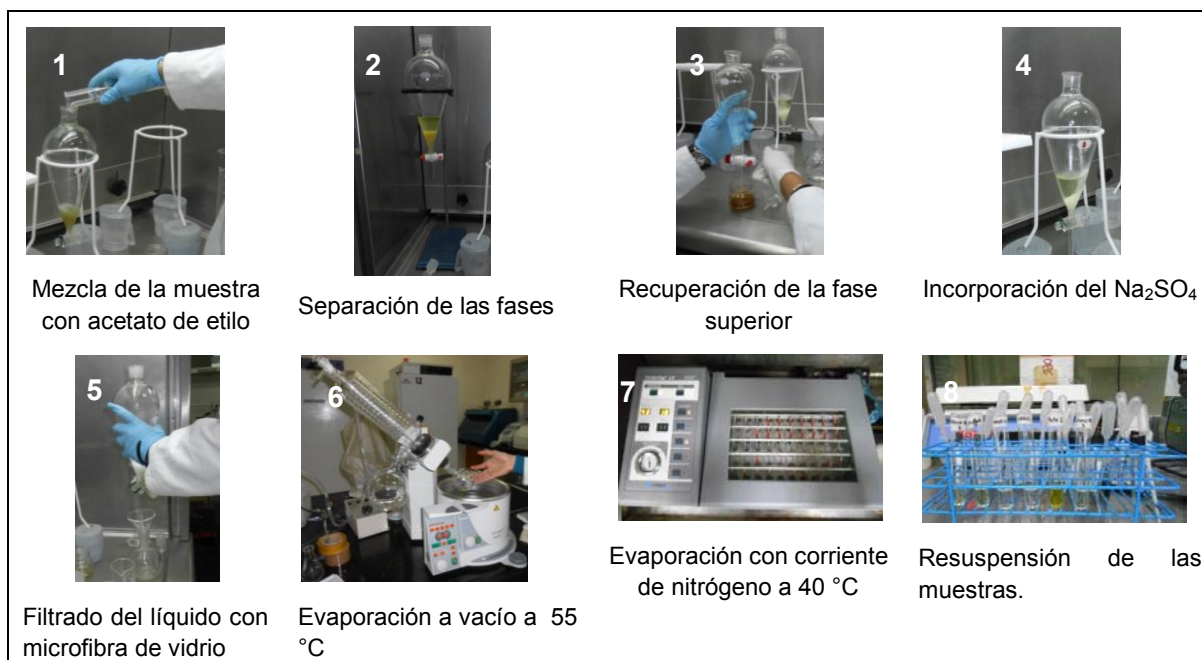


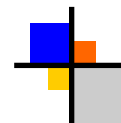
Figura 22. Procedimiento de extracción de patulina.

3.6.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC) es un método sensible, de bajo costo, sencillo y versátil. La separación de los constituyentes de la muestra se realizaron empleando una placa de Silica Gel 60 con un grosor de 200 µm marca Merck y como sistema de desarrollo se empleó una fase móvil de tolueno-acetato de etilo 90%-ácido fórmico (5+4+1). La técnica está basada de acuerdo al método oficial de la AOAC (Official Method 974.18. Patulin in Apple juice).

3.6.3.1. Preparación de la solución estándar

Se empleó un estándar de referencia de patulina cristalino puro comercial marca Sigma-Aldrich de 10 mg. Primero se preparó una solución de 2 mg/mL, resuspendiéndola en 5 mL de CHCl₃. Posteriormente se tomó 0.5 mL de esta solución madre y se aforó con 10 mL de CHCl₃ para tener una solución stock con una concentración de 100 µg/mL, la cual



se empleó como estándar. Ésta se almacenó en congelación (- 20 °C) en un vial envuelto en papel aluminio para evitar su exposición a la luz hasta su posterior uso.

3.6.3.2. Preparación del revelador solución 3-Metil-2-Benzotiazolinona hidrazona hidrociorhidrica monohidrato (MBTH)

Se disolvió 0.5 g de MBTH-HCl-H₂O en 100 mL de agua. Se almacenó en una cámara de refrigeración marca Ojeda a 5 °C y se preparó solución cada tercer día de uso.

3.6.3.3. Aplicación de las muestras

Se dibujo una línea a 4 cm del borde inferior y superior en la placa. Se colocaron las 2 muestras de la extracción de patulina ,con un cm de distancia entre ellas, aplicando 5 µL y 10 µL sobre la línea y 1, 3, 5, 7 y 10 µL de estándar, por medio de un capilar. Posteriormente se colocaron 5 µL del estándar sobre uno de los puntos de 5 µL de la muestra de patulina (Figura 23.1).

3.6.3.4. Desarrollo de las placas

La placa se introdujo en una cámara de desarrollo con una fase móvil de tolueno-acetato de etilo 90%-acido fórmico (5+4+1).

La fase móvil migró a través de la fase estacionaria, separando los constituyentes debido a la diferencia de polaridad. Cuando el frente del disolvente alcanzó la distancia de 4 cm del borde superior de la placa, se retiró la placa de la cámara de desarrollo y se dejó evaporar el eluyente adherido a la placa (Figura. 23.2).

3.6.3.5. Revelado postcromatográfico

Cuando la muestra no es visible en el cromatograma, es necesario el uso de un revelador que permite la visualización de los compuestos bajo una lámpara de luz ultravioleta (254 nm). Para ello se empleo el revelador MBTH al 0.5% que se roció en la placa y posteriormente se sometió al calor durante 15 min a 130 °C en un secador convectivo marca Quincy Lab (Figura 23.3 y 23.4). Una vez cumplido ese tiempo se examinó la placa. La patulina apareció como una mancha amarilla a luz visible y como una mancha amarilla fluorescente bajo luz ultravioleta con un *R_f* de 0.5.

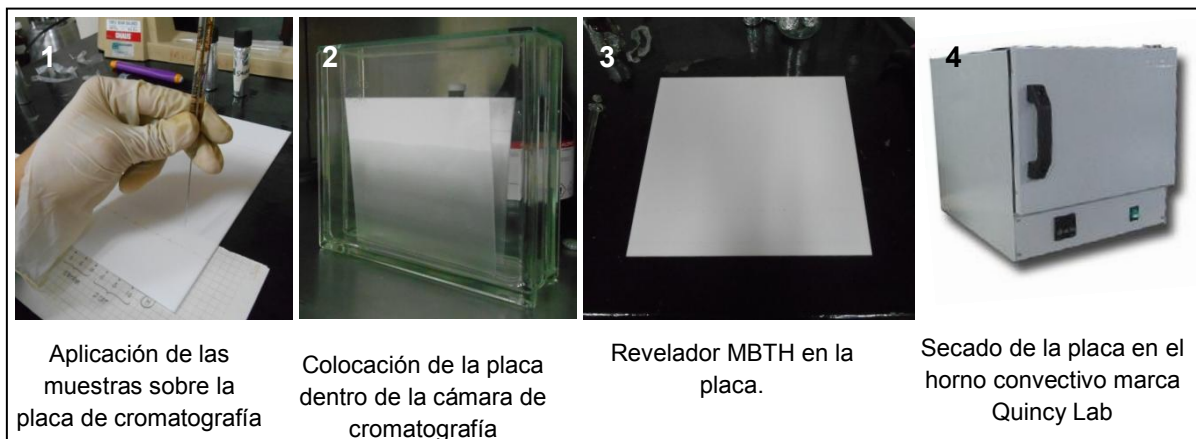
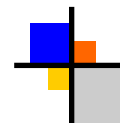


Figura 23. Procedimiento para realizar la cromatografía en capa fina.

En el sistema de cromatografía de capa fina se emplea el R_f que se define como factor de retención, correspondiente a su migración relativa en relación con el disolvente (Rouessac y Rouessac, 2000):

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por el frente del disolvente}} = \frac{x}{x_0}$$

3.6.3.6. Interpretación y cálculo

Después del revelado de la placa, el cromatograma debe ser interpretado para establecer si la micotoxina de interés está presente o no en la muestra. La mancha de la micotoxina procedente del extracto puede ser localizada con ayuda de los estándares co-desarrollados. Las manchas de las presuntas toxinas deberán coincidir con los estándares de referencia en el valor de R_f obtenido y el matiz (color). En caso necesario se hace una interpolación. El cálculo de la concentración de micotoxinas en la muestra se hace aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu g}{kg} = \frac{S \times Y \times V}{X \times W}$$

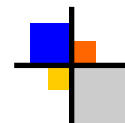
En el cual

S= μL del patrón de micotoxina igual a la incógnita

Y= concentración del patrón de micotoxina en $\mu\text{g}/\text{mL}$

V= μL de dilución final del extracto de la muestra

X= μL de extracto de la muestra que dan una intensidad



3.6.4. ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría es un método de análisis cuantitativo que se basa en la capacidad de las sustancias de adsorber luz, a una longitud de onda (λ) determinada, en proporción directa a la cantidad de materia presente. Al incidir un haz de luz (L_i) en determinada longitud de onda (λ) sobre una muestra, parte de esta luz es absorbida y la otra es reflejada o transmitida (L_t). La cantidad de luz absorbida por la muestra es directamente proporcional a la concentración de la muestra y a la longitud del cuerpo atravesado por el haz (ancho de la cámara de desarrollo) (Quesada, 2007).

3.6.4.1. Espectrofotómetro

Por medio del espectrofotómetro (Thermospectrnic, Genesis UV), se determinó la longitud de onda (λ) óptima de absorción de la patulina. El espectro de absorción de una sustancia se obtiene realizando un barrido en todo el espectro visible y ultravioleta. Posteriormente se graficó la absorbancia vs la longitud de onda, y se encontró la longitud de onda que corresponde con el punto máximo de absorción de la patulina; éste es el valor de longitud de onda con el que se trabajó en el análisis cuantitativo de patulina en las muestras.

3.6.4.2. Curva de calibración

La solución estándar de referencia a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ fue utilizada para hacer la curva estándar con cinco puntos a una longitud de onda de 300 nm. Al representar gráficamente estos valores (Abs. vs concentración), se obtuvo una curva de calibración.

A partir de la curva de calibración, es posible conocer la concentración de una muestra desconocida; para ello, se midió la absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda y, con base en ese valor, se interpoló la concentración.

3.6.4.3. Interpretación y cálculo

El cálculo para la concentración de patulina se realiza de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{mg}{g} = \frac{X \times V_C \times V_E}{V_A \times P} * FD$$

Donde

X= concentración en $\mu\text{g/mL}$ que se obtiene de la curva de calibración

V_C =Volumen de la celda (mL)

V_E =Volumen del extracto (mL)



V_A =Volumen de la alícuota (mL)

P= peso de la muestra (g)

FD= factor de dilución

3.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados fueron tratados con un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Duncan aplicando un nivel de significancia del 5% utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ALMACENAMIENTO DE LAS MANZANAS EN CÁMARA HÚMEDA

El almacenamiento a bajas temperaturas resulta beneficioso porque la respiración y el metabolismo se reducen (Agustí, 2010). Además, la conservación en frío normal de la manzana “Golden Delicious” se extiende hasta cuatro meses (Mateo, 2005).

En esta experimentación se realizó una observación periódica de las manzanas durante su almacenamiento refrigerado y se observó si presentaban pudrición. La figura 24 presenta los porcentajes de los lotes con síntomas de pudrición para los distintos centros de distribución frutícola para el tipo de venta a granel y en caja.

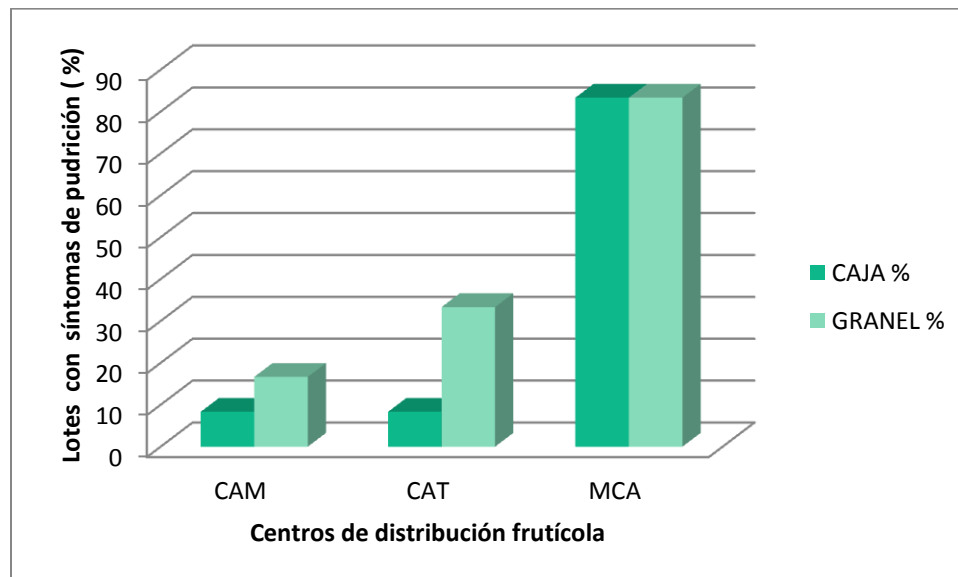
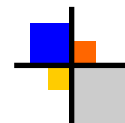


Figura 24. Porcentaje de lotes con síntomas de pudrición en cada centro de distribución frutícola para los distintos tipos de venta a granel y en caja. Central de abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT) y Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.

Como se puede observar en el gráfico , el mayor número de lotes con casos de pudrición es para el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA) con un 83% en ambos tipos de venta, seguido de las Bodegas de Atizapán (CAT) con un 33% y 8% para el tipo de venta en granel y en caja respectivamente y por último se encuentra la Central de Abastos de la Ciudad de México (CAM) con un 25% para el tipo de venta a granel y 8% para el tipo de venta en caja. También se puede apreciar la tendencia que tiene el tipo de venta en caja,

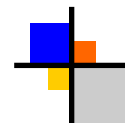


con menor número de casos de pudrición a comparación del tipo de venta a granel, excluyendo el mercado del Carmen, cuyo caso fue similar para ambos tipos de venta. Los empaques para las manzanas son principalmente cajas de cartón de 18 a 20 kg, las cuales contienen bandejas que pueden ser de cartoncillo, plástico o poliestireno expandido donde se colocan los frutos para una mejor distribución. El empaque brinda protección contra la manipulación mecánica y el colapso de los frutos entre ellos (SAGARPA-UNIFRUT, 2014). Debido a eso, las manzanas en este tipo de venta no presentaron daños mecánicos a comparación del tipo de venta a granel.

En lo que respecta a las vías de contaminación, la presencia de los síntomas de pudrición se debe al acceso del hongo por cavidades naturales tales como el pedúnculo ó el cáliz; ó por lesiones superficiales como resultado de la manipulación postcosecha. Una vez que ha penetrado al fruto, el crecimiento del hongo es favorable. Por consiguiente es importante destacar que la Central de Abastos de la Ciudad de México presentó contaminación por pedúnculo en las manzanas a granel, mientras que en el tipo de venta en caja se le atribuye a una pudrición ajena a la provocada por *Penicillium*. En lo respecta a las Bodegas de Atizapán, el 50% de los casos de pudrición fue por contaminación a través del pedúnculo y el resto por lesiones superficiales en el tipo de venta a granel, mientras que en caja, el total de casos fue por pedúnculo. Finalmente para el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, los casos de contaminación se dieron por lesiones superficiales.

De acuerdo a los resultados que aquí se presentan, se observa que las lesiones son mayores cuando el centro de distribución se vuelve más local, indicando que los mercados locales sufren de mayores manejos inadecuados durante su transporte, manipulación y almacenamiento y por consiguiente hay mayor número de casos con síntomas de podredumbre.

A continuación se describe el almacenamiento de cada centro a detalle con su respectivo seguimiento fotográfico.



4.1.1. CENTRAL DE ABASTOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

La tabla 11 presenta el seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la ciudad de México durante 56 días de almacenamiento refrigerado (5 °C) para los tipos de venta a granel de la bodega S1. Las imágenes que se presentan fueron frutos que se evaluaron cada 9 días durante todo el periodo de almacenamiento.

La mayoría de las manzanas a granel mostraron rastros de esporas en su morfología, generalmente en el pedúnculo y en la cavidad inferior de la manzana o cáliz, ya que son áreas donde se facilita la acumulación de tierra. Conjuntamente, las manzanas mostraron lesiones superficiales, conocidas como “golpes de sol” las cuales son quemaduras en la piel de los frutos como consecuencia de daños foto-oxidativos en la epidermis provocados por un exceso de luz. Las lesiones en ocasiones están rodeadas por un halo de color rojizo y a pesar de que son de consistencia seca y dura, los tejidos alterados pueden verse afectados por podredumbres como lo señala Viñas *et al.*, (2013). Algunas manzanas de los lotes 4, 5 y 6 de tipo de venta a granel, muestran golpes de sol adquiridos seguramente durante la cosecha, sin embargo a pesar de ello, a los 52 días los frutos aún no presentaban síntomas de podredumbre azul.

Por otro lado, se presentaron dos casos de pudrición en manzanas en lotes distintos (lote 2 y 12). El padecimiento inició con crecimiento micelar en el pedúnculo del fruto, ya que el moho coloniza los pedúnculos, particularmente los que son gruesos y carnosos (Kader, 2002), seguido de invasión interna, donde el tejido alrededor de esta zona muestra una textura aguanosa y clara. Síntoma que fue incrementando progresivamente cubriendo la superficie de la manzana más del 50% del tejido aunado con crecimiento masivo del hongo, como se puede observar en las imágenes de los últimos días de almacenamiento del lote 2.



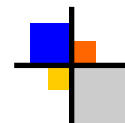
Tabla 11. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, bodega S1 tipo de venta a granel.

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 1						
C A J A 2						
C A J A 3						
C A J A 4						
C A J A 5						
C A J A 6						



Tabla 11. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, bodega S1, tipo de venta a granel (continuación).

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 7						
C A J A 8						
C A J A 9						
C A J A 10						
C A J A 11						
C A J A 12						



La tabla 12 muestra el seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México de la bodega S7 de tipo de venta en caja. Las manzanas en este tipo de venta, al igual que en las de granel, mostraron rastros de esporas en su morfología alojadas en las mismas zonas. No obstante, estas manzanas no tenían las mismas lesiones de golpe de sol, ni cualquier otro tipo de lesión superficial. Por lo que su calidad visual era mejor. En el lote 9, se presentaron manzanas con manchas café oscuro que invadía la parte superior del fruto, cerca del pedúnculo. Posteriormente el padecimiento fue en aumento hasta los 52 días, donde ya abarcaba el 100% de la manzana, sin embargo, estos síntomas no correspondían con los de la podredumbre azul, ya que no había rastros de *Penicillium spp* por ningún lado aún con el avance del padecimiento. Además la zona café presentó un color más oscuro con respecto a los síntomas característicos de la enfermedad de podredumbre azul. Por otro lado, las manzanas presentaron otro padecimiento, como el “escaldado blando”, el cual se caracteriza por un oscurecimiento en la epidermis de la zona ecuatorial del fruto, en forma de manchas con bordes bien definidos y consistencia flácida (Figura 25). Es una alteración propia de manzanas y como variedades sensibles destacan “Golden Delicious”. Éste se puede considerar como una forma de daño por frío y ocurre al someter a la variedad a temperaturas inferiores a las que normalmente soporta o frutos con grado de madurez avanzado al iniciarse la conservación frigorífica (Viñas *et al.*, 2013).



Figura 25. Escaldado blando en manzana “Golden Delicious”.

Fuente: Viñas *et al.*, (2013).

Otra posibilidad es que la manzana haya sido atacada por *Gloesporium s.p.*, el cual es resistente al frío (Plank, 2005) y cuyos síntomas incluyen manchas color marrón, en torno a las lenticelas (Figura 26) (Fomesa, 2014).



Figura 26. *Gloesporium sp* en manzana.

Fuente: Viñas *et al.*, (2013).

Dado que no hay una causa certera de las manchas, posiblemente se trató de un deterioro combinado donde los daños por frío hayan dado cabida a una contaminación fúngica ajena a la invasión por *Penicillium spp*. En general, se observó que los frutos de la central de abastos de México, presentaron un número bajo de padecimientos causados por *Penicillium spp*. Durante este tiempo de almacenamiento y bajo las condiciones establecidas, se tardó 25 días en presentar los primeros síntomas en manzanas a granel y hasta 43 para manzanas en caja.



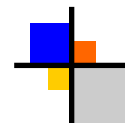
Tabla 12. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, bodega S7, tipo de venta en caja.

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 1						
C A J A 2						
C A J A 3						
C A J A 4						
C A J A 5						
C A J A 6						



Tabla 12. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de la central de abastos de la Ciudad de México, bodega S7, tipo de venta en caja (continuación).

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 7						
C A J A 8						
C A J A 9						
C A J A 10						
C A J A 11						
C A J A 12						



4.1.2. BODEGAS DE ATIZAPÁN

La tabla 13 presenta el seguimiento fotográfico de las manzanas “Golden Delicious” de tipo de venta en caja del almacén E de las bodegas de Atizapán durante 56 días de almacenamiento refrigerado. Las imágenes corresponden a los frutos evaluados cada 9 días durante el almacenamiento refrigerado. La tabla 14 presenta el seguimiento fotográfico de las manzanas “Golden Delicious” de tipo de venta a granel de la bodega M. Las manzanas presentaron colonias verde azules (*Penicillium*) y grises (*Alternaria*) en el pedúnculo y en la cavidad inferior como se mencionó en la central de abastos de la ciudad de México, en ambos tipos de venta.

En general, se presentaron 5 casos de pudrición para las manzanas a granel y un caso de pudrición para el tipo de venta en caja. Los síntomas de pudrición para el último se presentaron a los 43 días, mientras que en las manzanas a granel, hubo presencia de pudrición a los 7 días (en 3 manzanas) y alrededor de los 43-52 días (en 2 manzanas). Manzanas de los lotes 2 y 5, de tipo de venta a granel, presentaron lesiones superficiales; las cuales permitieron la contaminación fúngica mientras que los lotes 10 y 11 del tipo de venta a granel y el lote 10 del tipo de venta en caja presentaron invasión en el pedúnculo como se mencionó anteriormente en la central de abastos de la Ciudad de México.

Esto indica que el tiempo en que aparecieron los síntomas depende, del maltrato que hayan obtenido durante su manipulación antes de ser adquiridas y de las condiciones climáticas. Pese a que las manzanas “Golden Delicious” presentan en general, buena aptitud al transporte y manipulación, en zonas cálidas la piel del fruto se vuelve sensible a las manipulaciones (Mateo, 2005). Conjuntamente, el almacenamiento de frutos durante semanas y aún meses, puede acarrear pérdidas importantes debidas al decaimiento de aquellos si no se tratan con inhibidores eficaces del crecimiento de microorganismos y no se almacenan en un ambiente desfavorable para su desarrollo (Agustí, 2010). El almacenamiento en estas bodegas se mantiene a temperatura ambiente, por lo que se pueden atribuir casos en que las manzanas presentaron pudrición a los 7 días principalmente por factores mecánicos y climáticos. No obstante, los síntomas de pudrición entre los 43-52 días en torno al pedúnculo, se le atribuye a una invasión progresiva del moho en esta zona como oportunista a la madurez de la manzana. Y en el caso de las manzanas que presentaron pudrición al estar en contacto con otras previamente deterioradas, la pudrición se benefició ya que la atmósfera de éstas suele estar cargadas de esporas del hongo y los frutos pueden verse contaminados al llegar a ellas (Agustí, 2010).



Tabla 13. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de las bodegas de Atizapán, bodega E, tipo de venta en caja.

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 1						
C A J A 2						
C A J A 3						
C A J A 4						
C A J A 5						
C A J A 6						



Tabla 13. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de las bodegas de Atizapán, bodega E, tipo de venta en caja (continuación).

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 7						
C A J A 8						
C A J A 9						
C A J A 10						
C A J A 11						
C A J A 12						



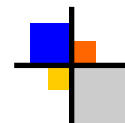
Tabla 14. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de las bodegas de Atizapán, bodega M, tipo de venta a granel.

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 1						
C A J A 2						
C A J A 3						
C A J A 4						
C A J A 5						
C A J A 6						



Tabla 14. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” de las bodegas de Atizapán, bodega M, tipo de venta a granel (continuación).

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 7						
C A J A 8						
C A J A 9						
C A J A 10						
C A J A 11						
C A J A 12						



4.1.3. MERCADO DEL CARMEN DE CUAUTITLÁN IZCALLI

La tabla 15 presenta el seguimiento fotográfico de las manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli de tipo de venta en caja durante 56 días de almacenamiento refrigerado con fracción de 9 días entre cada fotografía presentada.

Las manzanas del mercado del Carmen mostraron distintos tiempos de pudrición, los cuales se dieron principalmente los primeros 7 días y entre los 34 y 52 días de almacenamiento.

La mayoría de las manzanas con punto de venta en caja, presentaban heridas superficiales pequeñas en las paredes laterales o en la parte baja de la manzana, daños que posteriormente se agravaron debido al crecimiento del hongo. En casos menos frecuentes se presentaron manchas sobre la epidermis de la manzana posiblemente por algún tipo de cambio fisiológico.

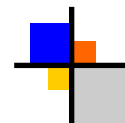
En lo que respecta a las manzanas de tipo de venta a granel, se puede observar el seguimiento fotográfico de las manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli durante un almacenamiento refrigerado por 56 días en la tabla 16. Los daños que presentaron las manzanas fueron muy similares a las descritas en el tipo de venta en caja.

En general, podemos observar que el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, presentó diversos casos de padecimientos por *Penicillium* después de 56 días de almacenamiento independientemente del tipo de venta, es decir, tras haber analizado 24 lotes, únicamente 4 fueron libres de padecimientos donde dos le correspondieron al tipo de venta a granel (los lotes 6 y 7) y dos al tipo de venta en caja (2 y 9).

Con respecto a las manzanas de tipo de venta en caja, los lotes 1, 4, 5, 7, 10, 11 y 12 presentaron los primeros síntomas de pudrición a los 7 días de almacenamiento y los lotes 3, 6 y 8 los presentaron a los 16 días.

Por otra parte, las manzanas de tipo de venta a granel, los lotes 2, 5 y 12 presentaron síntomas de pudrición a los 7 días, mientras que los lotes 1, 4 y 8 lo hicieron a los 16 días y los lotes 3, 9, 10 y 11 a los 34 y 52 días.

Con estos resultados podemos observar que independientemente del tipo de venta de las manzanas, el número de padecimientos fue igual para ambos casos lo que demuestra la manipulación negligente del producto fresco como causa de magulladuras internas que dan lugar a un deterioro fisiológico anormal o hendiduras y lesiones que atraviesan o raspan el recubrimiento exterior del producto ofreciendo puntos de entrada para los mohos y bacterias causantes de la descomposición; estas condiciones aumentan la



pérdida de agua por la zona dañada lo que causan un aumento del ritmo de respiración y por, consiguiente, de la producción de calor (FAO, 1993). Bajo estas condiciones el tiempo de deterioro se incrementa, por esa razón el número de casos en que las manzanas ya presentaban síntomas de pudrición; como tejidos aguanosos de color claro entorno a las heridas; se dieron dentro de los primeros 7 y 16 días.

También se observó que las manzanas que estaban infectadas por *Penicillium spp*, contaminaron a las demás después de un periodo de tiempo. Las bacterias y hongos necrotróficos producen enzimas que digieren los tejidos del hospedante, antes de utilizarlos como fuente de alimento. La acción de estas enzimas resulta en una maceración del tejido, la cual es característica de las pudriciones blandas (Arauz, 1998), el contenido de humedad y la consistencia blanda de las frutas las hace más vulnerables a las lesiones mecánicas (FAO, 1993) facilitando las deformaciones de los tejidos y la pérdida de humedad de los frutos, y por consiguiente la contaminación. Prácticamente, las condiciones climáticas y mecánicas durante su venta fueron las principales razones de la pudrición del fruto, como se explicó en las bodegas de Atizapán.

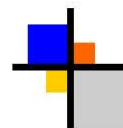


Tabla 15. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de tipo de venta en caja.

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 1						
C A J A 2						
C A J A 3						
C A J A 4						
C A J A 5						
C A J A 6						



Tabla 15. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de tipo de venta en caja (continuación).

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 7						
C A J A 8						
C A J A 9						
C A J A 10						
C A J A 11						
C A J A 12						

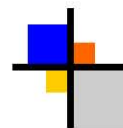


Tabla 16. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de tipo de venta a granel.

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 1						
C A J A 2						
C A J A 3						
C A J A 4						
C A J A 5						
C A J A 6						



Tabla 16. Seguimiento fotográfico de manzanas “Golden Delicious” del mercado del Carmen de tipo de venta a granel (continuación).

	7 días	16 días	25 días	34 días	43 días	52 días
C A J A 7						
C A J A 8						
C A J A 9						
C A J A 10						
C A J A 11						
C A J A 12						



4.2. IDENTIFICACIÓN DE *PENICILLIUM*

La figura 27 ilustra el porcentaje total de manzanas “Golden Delicious” que presentaron *Penicillium spp* en la superficie del fruto de cada centro de distribución frutícola; central de abastos de México (CAM), bodegas de Atizapán (CAT) y Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA); también se presenta el porcentaje de manzanas sanas, es decir que no presentan contaminación de *Penicillium spp*.

El análisis estadístico indicó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la procedencia de las manzanas con *Penicillium*. Tomando en cuenta que el número total de manzanas analizadas corresponden a 360 unidades, los centros de distribución frutícola que presentaron mayor presencia de *Penicillium spp* fueron la central de abastos de México con 14% de las manzanas aisladas y en el mercado del Carmen con 12%, los cuales no registraron diferencia significativa entre ambos de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan; por el contrario el valor mínimo de presencia de *Penicillium spp* fue en las bodegas de Atizapán con 4%, presentando una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los dos anteriores.

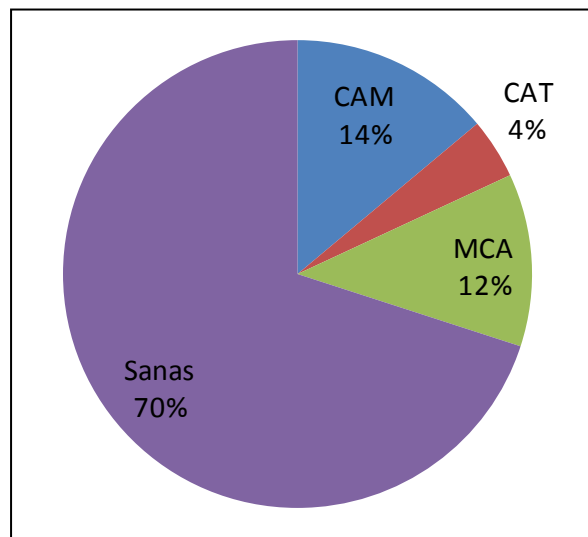
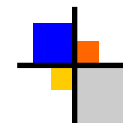


Figura 27. Porcentaje de manzanas que presentaron *Penicillium* de cada centro de distribución frutícola. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT), Mercado del Carmen (MCA).



La figura 28 muestra los porcentajes de manzana para el tipo de venta en caja y granel de cada centro de distribución.

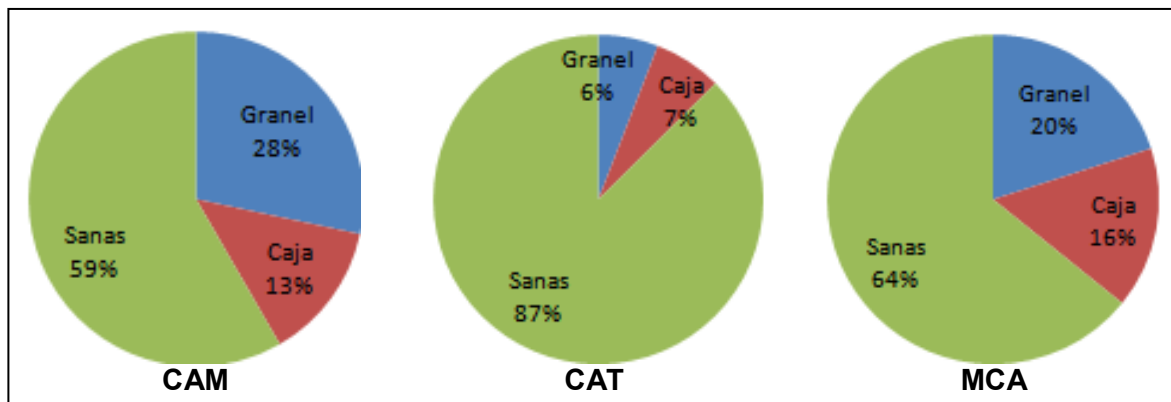


Figura 28. Porcentaje de *Penicillium* presente en los distintos centros de distribución frutícola de acuerdo al tipo de venta. Central de abastos de México (CAM), bodegas de Atizapán (CAT) y Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA).

Como se puede observar el tipo de venta también presenta una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), donde las manzanas en caja tuvieron menor presencia del hongo a comparación del tipo de venta a granel para la central de abastos de la Ciudad de México y el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, cuyos porcentajes para la venta en granel son de 28% y 20% respectivamente contra valores del 13% y 16% para el tipo de venta en caja, teniendo una diferencia entre ambos alrededor de la mitad de los valores del tipo de venta a granel. Por el contrario, las bodegas de Atizapán presentaron mayor presencia en el tipo de venta en caja del 7% contra un 6% a granel. Se puede observar que dichos porcentajes son muy bajos, donde la diferencia entre ambos es prácticamente de una unidad.

La aparición de esporas en los frutos se debe a muchas circunstancias, desde la cosecha hasta el almacenamiento de los frutos. A diferencia de las plantas de procesamiento industrial en donde se conducen rigurosos planes sanitarios, en la preparación para el mercado en fresco normalmente se presenta poca atención a la higiene de las instalaciones, particularmente si el lugar para el acondicionamiento y empaque es de construcción precaria (López, 2003).

Como se puede observar las manzanas de los tres centros de distribución frutícola presentaron *Penicillium spp.*; sin embargo, el porcentaje de su presencia varió de



acuerdo a la central. No obstante que generalmente la contaminación por *Penicillium* proviene del campo (Jackson y Fadwa, 2008), la diferencia en los porcentajes de manzanas contaminadas pueden atribuirse a condiciones de manejo postcosecha. Donde los principales factores son las prácticas higiénicas en sus bodegas y la manipulación mecánica. También se observó que las manzanas de tipo de venta a granel tiene mayor casos de presencia de *Penicillium spp.*, debido a la constante exposición que tienen los frutos al ambiente en donde la interacción con las personas, animales y condiciones climáticas se presentan todos los días.

4.2.1. IDENTIFICACIÓN DE *PENICILLIUM EXPANSUM*

La figura 29 muestra los porcentajes de *P. expansum* (representada por las barras rojas) respecto a la presencia de otras especies de *Penicillium spp.* en los distintos centros de distribución frutícola (barras azules), los cuales se identificaron como se describirá mas adelante. Cabe destacar que el porcentaje de *P. expansum* esta alrededor del 50% del total de *Penicillium* detectado en cada centro. Esto indica que existen otras especies contaminantes en las manzanas.

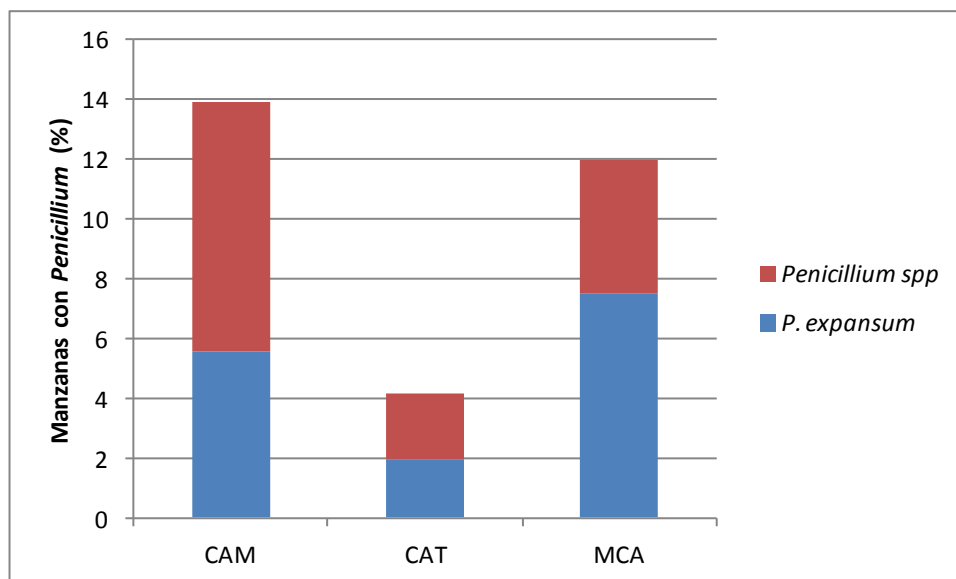
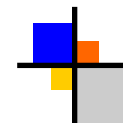


Figura 29. Porcentaje de *P. expansum* del total de especies de *Penicillium* en los diferentes centros de distribución. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapan (CAT), Mercado del Carmen (MCA).



4.2.2. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE *PENICILLIUM*

Cepas de *Penicillium spp.* se aislaron de los centros de distribución frutícola, de las 107 cepas aisladas se seleccionaron aquellas cuyas manzanas presentaron patulina tras haber sido incubadas para favorecer el desarrollo del hongo, reduciendo la muestra a 22 colonias, de las cuales, 5 corresponden a la Central de Abastos de México, 5 de las bodegas de Atizapán y 12 del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.

Las colonias se sembraron en medios específicos, de acuerdo a lo que se describe en la metodología, de las cuales varias de ellas conservaban características macroscópicas similares. Por lo tanto, para su identificación microscópica se clasificaron en grupos similares y en muestras individuales (sin agrupar) reduciendo la muestra a 15 colonias (Tabla 17). La identificación de estas 15 colonias se presentan en este trabajo.

Tabla 17. Agrupación de las colonias de acuerdo a las características similares en los medios específicos Grupo I y Grupo II; y aislados individuales, los cuales no tienen similitud macroscópica entre ellos.

Grupo I	1 CAT, 71 CAT, 81 CAT, 108 CAT, 103 MCA, 119 MCA
Grupo II	11 CAM, 43 CAM, 79, MCA, 102 MCA
Aislados individuales	7 CAM, 32, CAM, 60 MCA, 21 CAT, 51 MCA, 14 MCA, 61 MCA, 120 MCA, 109 MCA, 85 MCA, 107 MCA, 116 MCA

La tabla 18 presenta una tabla resumen de las colonias identificadas durante la experimentación.

Tabla 18. Identificación de *Penicillium* de los aislados de cada centro de distribución frutícola. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT), Mercado del Carmen (MCA).

Aislado	<i>Penicillium</i> identificado
7 CAM	<i>P.expansum</i>
11 CAM	<i>P.expansum</i>

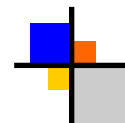
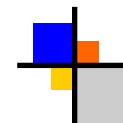


Tabla 18. Identificación de *Penicillium* de los aislados de cada centro de distribución frutícola. Central de Abastos de México (CAM), Bodegas de Atizapán (CAT), Mercado del Carmen (MCA) (continuación).

Aislado	<i>Penicillium</i> identificado
32 CAM	<i>P. brevicompactum</i>
14 MCA	<i>P. expansum</i>
51 MCA	<i>P. chysogenum</i>
61 MCA	<i>P. expansum</i>
85 MCA	<i>P. expansum</i>
107 MCA	<i>P. aethiopicum</i>
109 MCA	<i>P. expansum</i>
116 MCA	<i>P. expansum</i>
120 MCA	<i>P. expansum</i>
43 CAM	<i>P. expansum</i>
60 CAM	<i>P. solitum</i>
21 CAT	<i>P. expansum</i>
81 CAT	<i>P. expansum</i>

A continuación se muestran las fichas de identificación de cada colonia que representa cada especie identificada, describiendo las características macroscópicas, microscópicas y la reacción de Ehrlich con sus respectivas fotos, de cada centro de distribución frutícola. Dado que la especie *Penicillium expansum* fue identificada en diversos aislados, únicamente en este apartado se mostrarán uno de cada centro de distribución frutícola. Los aislados que se identificaron como otra especie ajena a *P. expansum*, se describirán

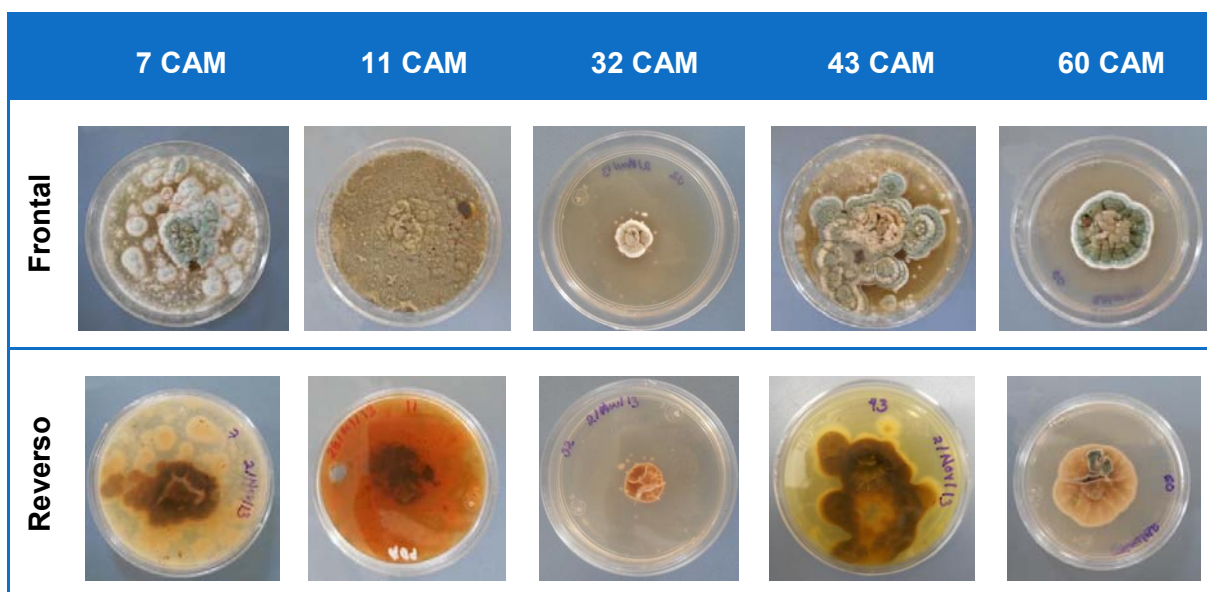


de igual modo en el apartado correspondiente al centro de distribución frutícola del cual fue aislado. Los demás aislados se encuentran en la sección de Anexos.

4.2.2.1. Identificación de *Penicillium* spp. de la central de abastos de México

La tabla 19, muestra los hongos aislados en PDA de los frutos a las manzanas a las cuales se les detectó patulina provenientes de la central de abastos de la Ciudad de México.

Tabla 19. *Penicillium* spp. aislados en las manzanas de la Central de Abastos de la Ciudad de México (CAM) en medio PDA.



Las 5 colonias que se presentan en la tabla 19, se identificaron macroscópicamente y microscópicamente.

La figura 30 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 7 CAM correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel, la cual fue identificada como *P. expansum*, como se apreció en la tabla 18.

Por otro lado, la figura 31 muestra el aislado 32 CAM, correspondiente a las manzanas a granel, el cual se identificó como *P. brevicompactum* y la figura 32 muestra el aislado 60 CAM, correspondiente al tipo de venta a granel, identificada como *P. solitum*.

Los aislados 11 CAM y 43 CAM se pueden observar más a detalle en la sección de anexos.

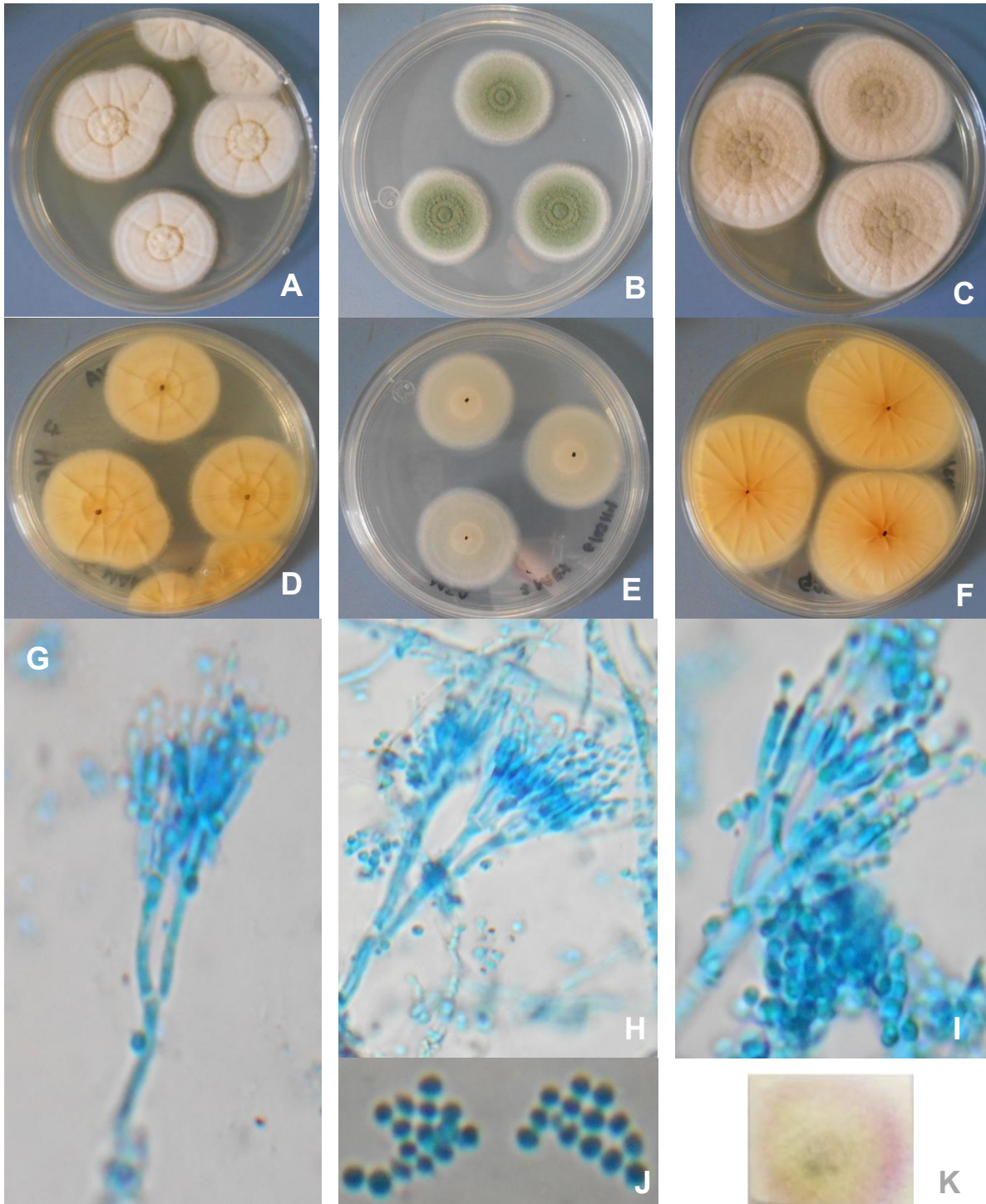
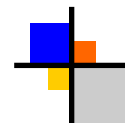


Figura 30. *Penicillium* 7 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.66 cm, radialmente sulcado, superficie velutinosa con secciones fasciculadas preferentemente en el centro de la colonia; presenta bandas anulares con un anillo profundo en el centro. Micelio y conidios blancos; exudado copioso amarillo claro. Reverso pálido color crema claro con áreas café claro.
- El diámetro en MEA es 3.14 cm, superficie velutinosa con secciones fasciculadas formando bandas anulares. Color de los conidios verde opaco; reverso pálido con centro color crema.
- El diámetro en G25N es de 4.61 cm, radialmente sulcado denso. Superficie velutinosa a granular ligero; presenta bandas anulares sutiles. Color de los conidios café claro concentrándose en el centro. Reverso pálido, color crema con naranja difuso en el centro de las colonias.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos mayormente terveticilados, con presencia de tetraverticilados y biverticilados; elementos adpresos con colula delgada ligeramente larga. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares con presencia de elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo ligeramente violeta (Figura 2 K).

Como se puede observar este aislado corresponde con la mayoría de las características descritas a excepción del predominio de conidios circulares y su color en CYA en el anverso y reverso, a pesar de ello, la aparición del anillo violeta en la colonia, permite definir esta especie como *P. expansum*

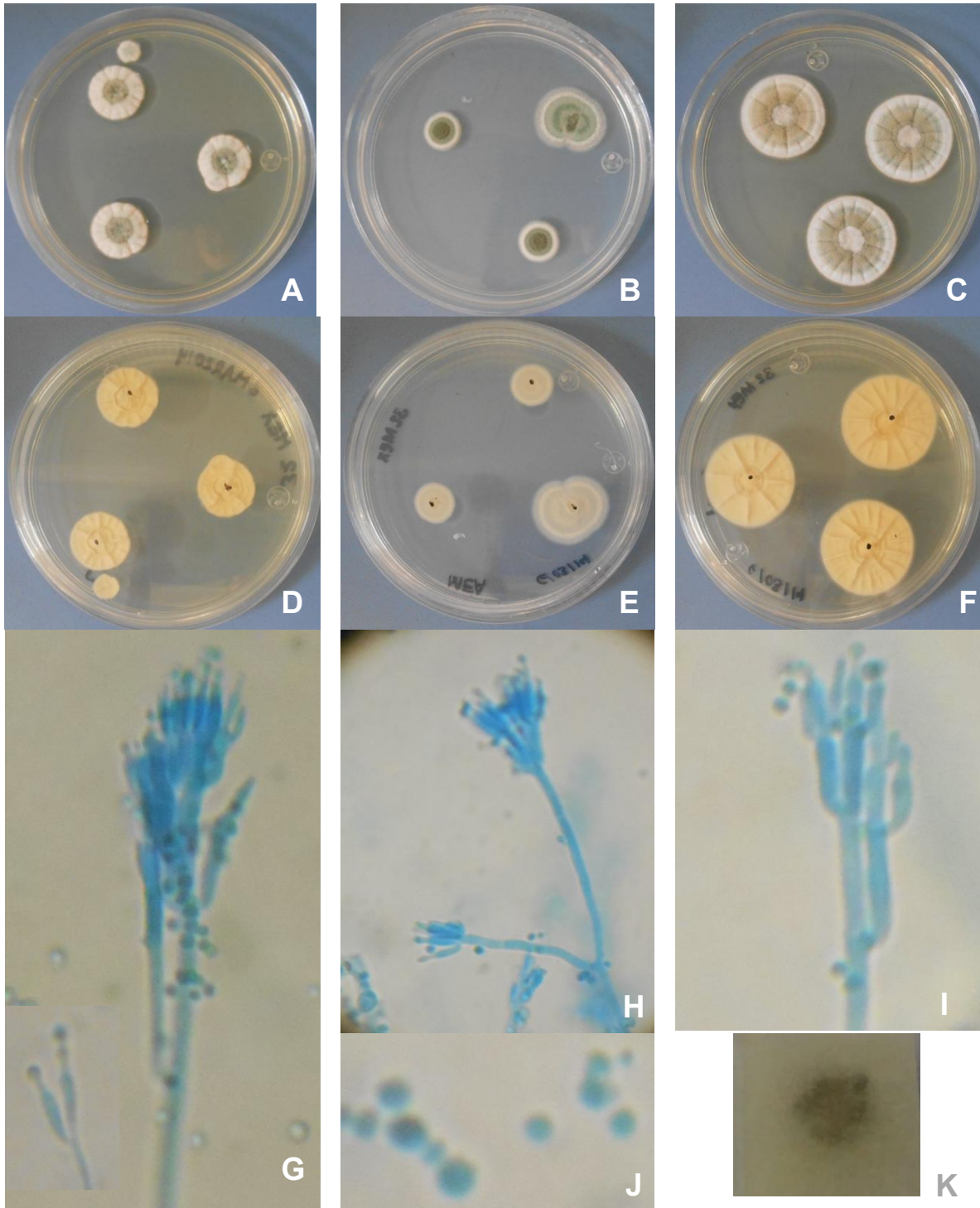
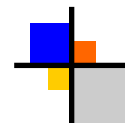


Figura 31. *Penicillium 32 CAM*, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 1.81 cm, superficie de la colonia predominantemente velutinoso radialmente sulcado. Micelio blanco con esporas de color verde opaco en el centro de la colonia. Reverso pálido color crema.
- El diámetro en MEA es 1.31 cm, superficie velutinoso. El color de los conidios son verde oscuro; reverso pálido blanquecino.
- El diámetro en G25N es de 2.87 cm, superficie velutinoso. El color de los conidios son varios, del centro hacia afuera: blanco, café claro, azul, y finalmente blanco en los límites de la colonia. Reverso pálido color crema.

Características microscópicas

Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados; elementos adpresos con ramificaciones asimétricas y ramas en algunas ocasiones alejados del eje, fiálides cilíndricas con colula ancha ligeramente larga. Conidios de superficie lisa predominantemente circulares seguidos de elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo muy ligero color amarillo claro.

Como se puede observar, las características macroscópicas de las colonias así como el resultado de la reacción de Ehrlich, demuestran que este aislado corresponde a otra especie ajena a *P. expansum*. Por el crecimiento de las colonias reducidas y los conidióforos terverticilados de manera compacta; indican que se trate de *P. brevicompactum*. Además se ha reportado que esta especie se comporta como un patógeno débil causante de pudrición en el almacenamiento de manzana entre otros frutos (Pitt y Hocking, 2009).

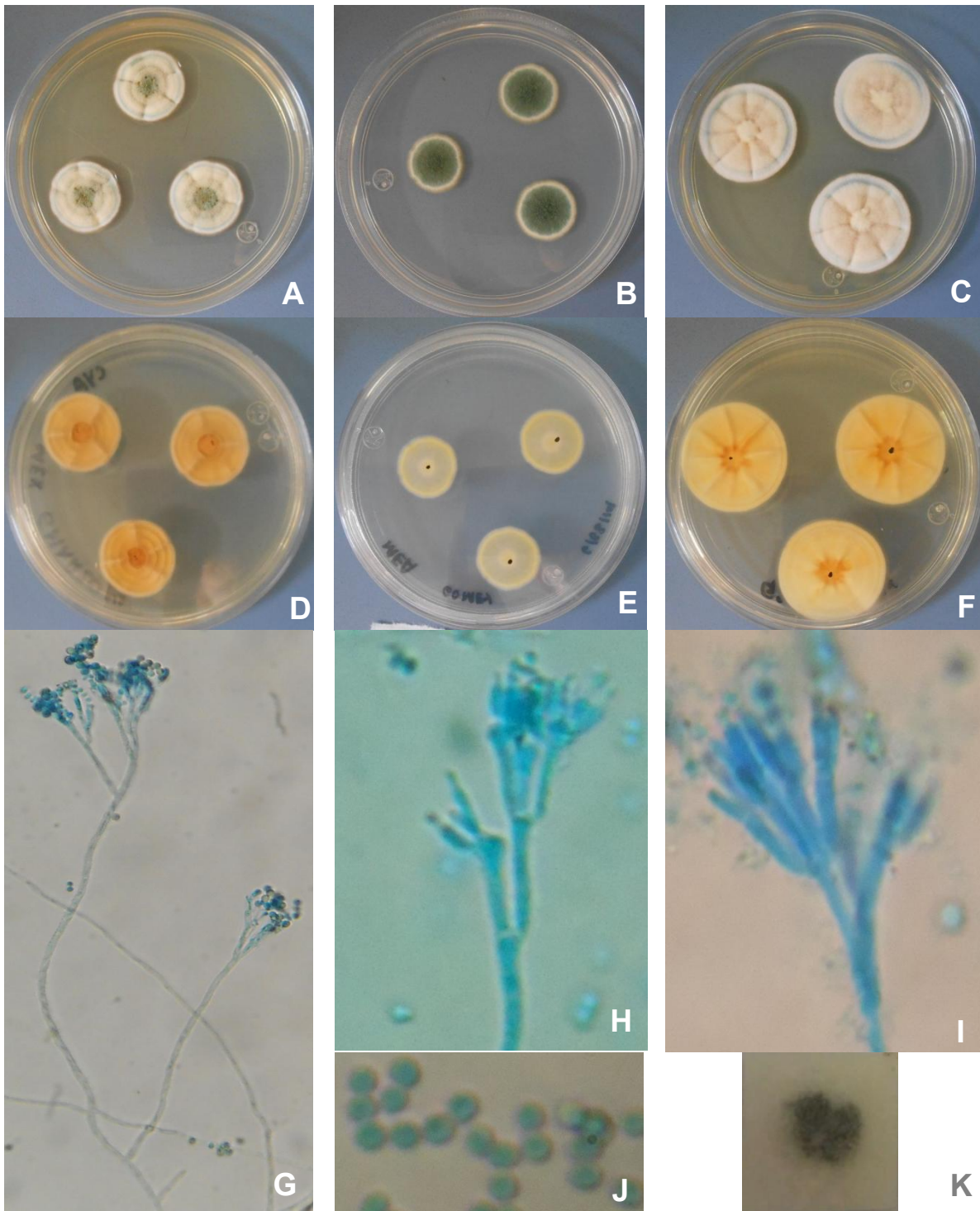
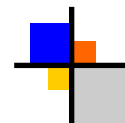


Figura 32. *Penicillium* 60 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 2.52 cm, radialmente sulcado, con superficie velutinoso a flocosa ligeramente con bandas anulares moderadamente profundas. Micelio blanco, color de los conidios verde en el centro, presenta un anillo azul cercano a la orilla de la colonia seguido de un anillo blanco. Exudado amarillo y reverso crema con el centro café oscuro.
- El diámetro en MEA es 2.06 cm, superficie velutinoso. Color de los conidios verde bandera con orilla blanca y contorno amarillo tenue; reverso pálido con orilla y centro amarillo difuso.
- El diámetro en G25N es de 3.27 cm, radialmente sulcado profundo con superficies adyacentes velutinosas a flocosas; al menos una banda anular en el centro. Micelio blanco, color de los conidios azul oscuro en la orilla de la colonia. Reverso pálido, color crema con secciones amarillas a naranja café difusas preferentemente en el centro.

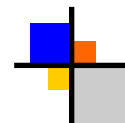
Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados, con presencia de biverticilados y tetraverticilados. Elementos asimétricos con fialides cilíndricas de colula ancha y larga. Conidios de superficie lisa predominantemente elipsoidales con presencia de circulares.

Reacción de Ehrlich

La muestra no presentó reacción.

Ninguna de las características macroscópicas del aislado corresponden con *P. expansum*, no obstante, corresponden a *P. solitum*, ya que las características microscópicas y los diámetros de crecimiento descritos están dentro del rango, además de que la reacción de Ehrlich demostró su correspondencia a dicha especie. Cabe señalar que *P. solitum* se reconoce por ser un patógeno de frutas pomáceas (Pitt y Hocking, 2009).



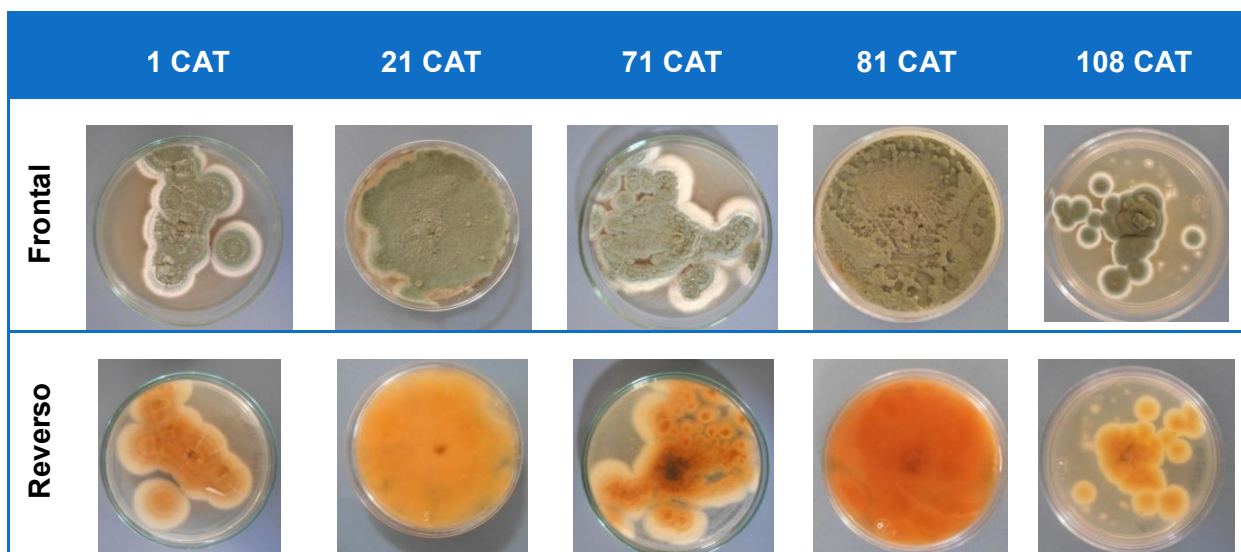
4.2.2.2. Identificación de *Penicillium* spp. de las Bodegas de Atizapán

La tabla 20 muestra los hongos aislados en PDA de los frutos a los cuales se les detectó patulina provenientes de las bodegas de Atizapán.

De acuerdo a la tabla 17, se agruparon los aislados 1 CAT , 108 CAT , 71 CAT y 81 CAT por semejanza macroscópica entre ellos. En el presente trabajo se identificaron únicamente las especies 21 CAT y 81 CAT.

Dado que la especie 81 CAT fue identificada como *P. expansum*, los demás aislados correspondientes a esta agrupación también lo son.

Tabla 20. *Penicillium* spp. aislados en manzanas de las bodegas de Atizapán (CAT) en medio PDA.



El aislado 81 CAT, correspondiente de las manzanas del tipo de venta a granel se presenta en la figura 33. El aislado 21 CAT se encuentra en el apartado de anexos.

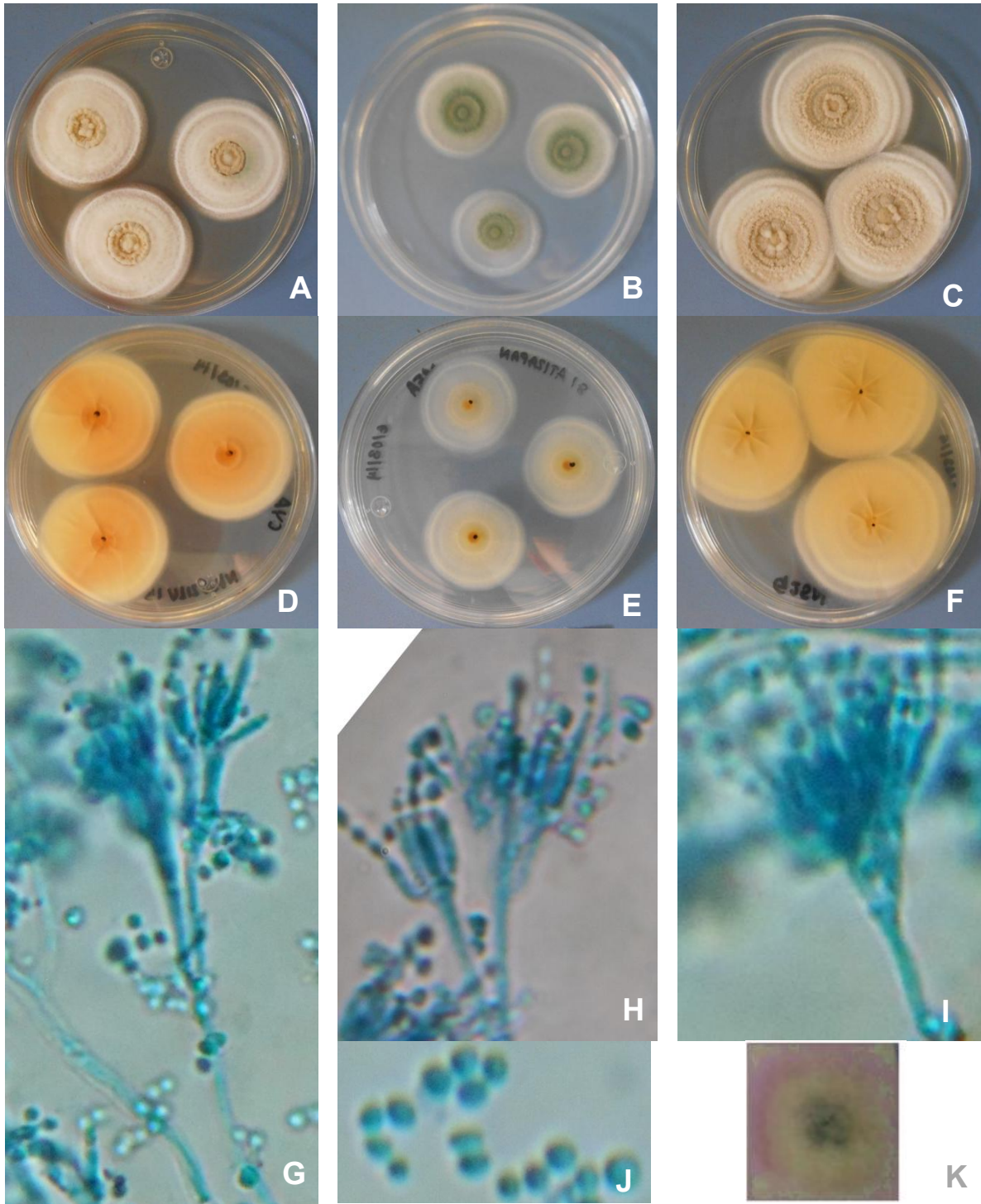
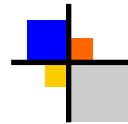
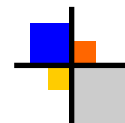


Figura 33. *Penicillium* 81 CAT, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.93 cm, colonia con el centro fasciculado seguido de superficie flocosa, presenta bandas anulares. Micelio y conidios blanco; exudado amarillo claro. Reverso pálido color crema con áreas difusas naranja.
- El diámetro en MEA es 2.99 cm, superficie flocosa a velutinosa formando bandas anulares. Color de los conidios verde opaco únicamente en el centro de la colonia; reverso pálido con un punto café amarillento en el centro.
- El diámetro en G25N es de 4.42 cm, radialmente sulcado en el centro, superficie velutinosa a flocosa formando bandas anulares, con secciones fasciculadas en el centro de la colonia, la cual le otorga la característica granular. Color de los conidios café claro en el centro de la colonia. Reverso crema con un punto de amarillo difuso más fuerte en el centro.

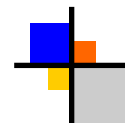
Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente biverticilados, con presencia de terverticilados. Elementos adpresos con fialides cilíndricas de colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente elipsoidales con presencia de circulares.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo color violeta.


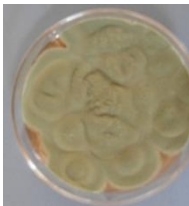

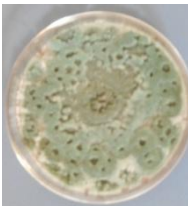



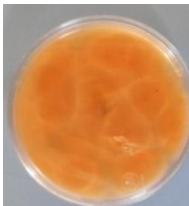

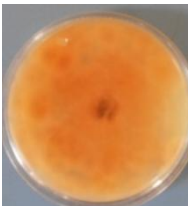

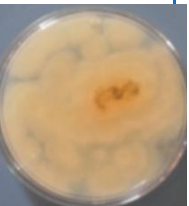
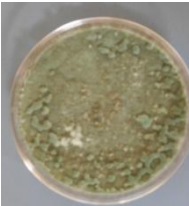




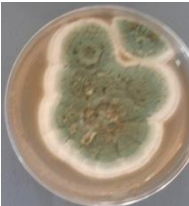
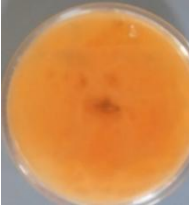

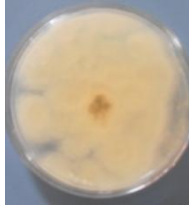

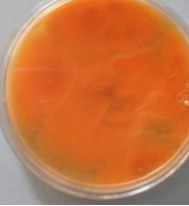
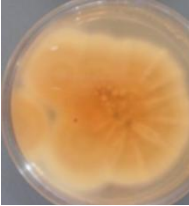
El aislado presenta características macroscópicas y microscópicas correspondientes a las claves. A excepción del color de los conidios en CYA como se presenta en la mayoría de los aislados. Además el color violeta de la reacción del Ehrlich es notoria por lo tanto se determina que se trata de *P. expansum*.

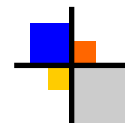


4.2.2.3. Identificación de *Penicillium* spp. del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.

La tabla 21 muestra los hongos aislados en PDA de las manzanas a las que se les detectó patulina provenientes del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli.

Tabla 21. *Penicillium* spp. aislados en manzanas comercializadas en el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA) en medio PDA.

	14 MCA	51 MCA	61 MCA	79 MCA	85 MCA	102 MCA
Frontal						
Reverso						
	103 MCA	107 MCA	109 MCA	116 MCA	119 MCA	120 MCA
Frontal						
Reverso						



Tal como se observó en la tabla 17. El aislado 79 MCA se agrupó con los aislados 43 CAM, 11 CAM y 102 MCA. Por otro lado el aislado 103 MCA se agrupó con el aislado 119 MCA y a su vez con el 81 CAT entre otros, los cuales corresponden a *Penicillium expansum* en ambas agrupaciones. Por lo tanto las fichas de los hongos 79 MCA, 102 MCA, 103 MCA y 119 MCA no se encuentran presentes en este trabajo ya que conservan su similitud con los demás aislados que fueron analizados.

La figura 34 presenta el aislado 116 MCA, correspondiente a las manzanas en el tipo de venta a granel, el cual fue identificado como *P. expansum*.

Por otro lado en la figura 35 se presenta el aislado 51 MCA, correspondiente a las manzanas de tipo de venta en caja y en la figura 36 se muestra el aislado 107 MCA correspondiente de las manzanas del tipo de venta a granel. Dichos aislados fueron identificados como *P. chrysogenum* y *P.aethiopicum* respectivamente.

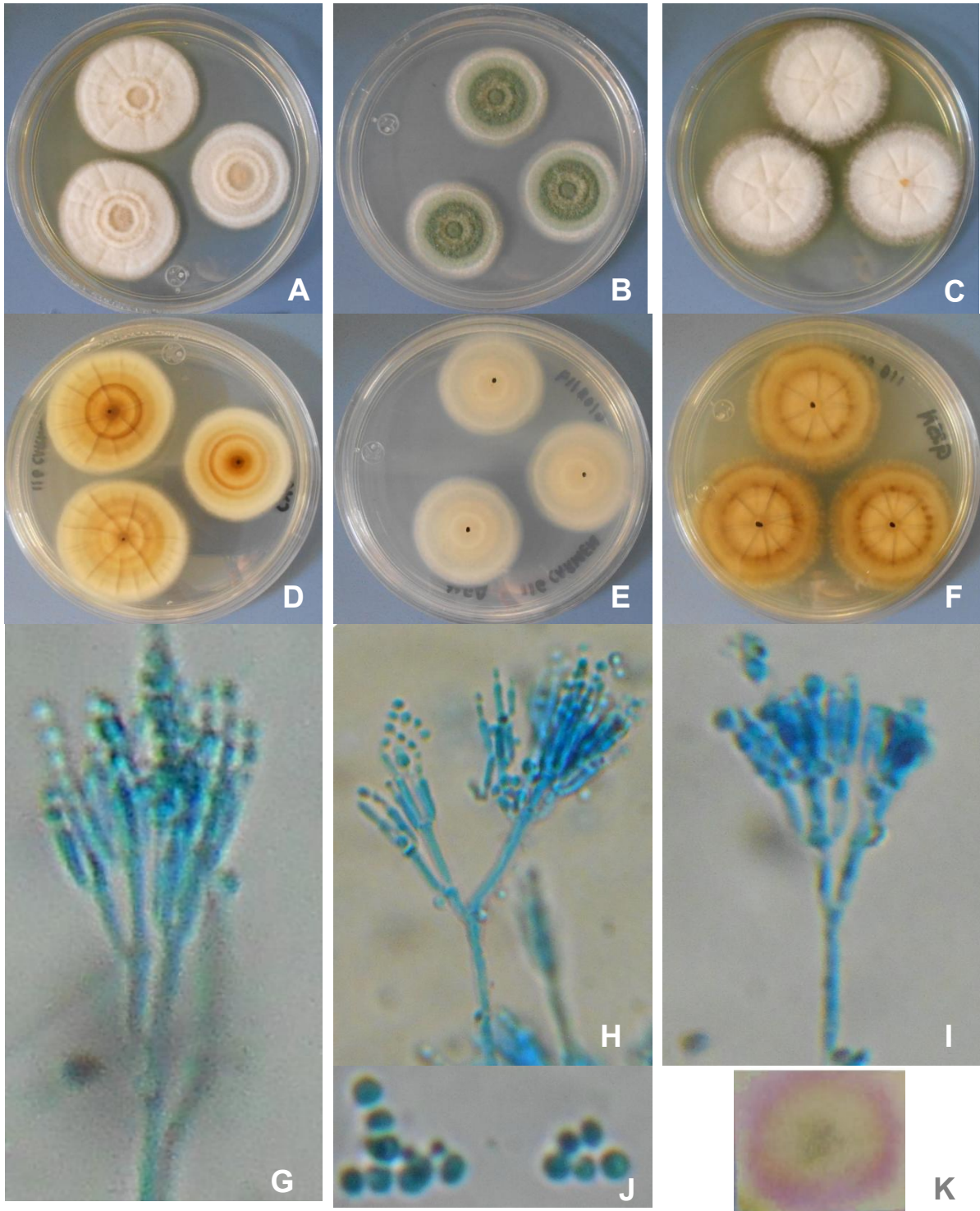
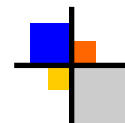


Figura 34. *Penicillium* 116 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.74 cm, radialmente sulcada, con superficie flocosa a velutinosa formando bandas anulares. Micelio y conidios blancos. Reverso color crema pálido con áreas café.
- El diámetro en MEA es 2.99 cm, superficie velutinosa a flocosas con formación de bandas anulares. Color de los conidios verde opaco con orilla blanca; reverso blanquecino con el centro color crema claro.
- El diámetro en G25N es de 4.26 cm, radialmente sulcado ligeramente superficie velutinosa a flocosa en la orilla de la colonia, formando un banda anular ligera. Micelio blanco. Reverso café claro con áreas más oscuras de café.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados, con presencia de biverticilados y tetraverticilados. Fialides de superficie lisa con colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares seguidos de elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo violeta.

Este aislado resalta de los demás ya que el reverso del medio es de un color muy distinto a los demás aislados, no obstante dicha característica esta dentro de la descripción. Además cuenta con predominio en las estructuras terverticiladas y la forma de los conidios esferoidales tiene un gran predominio si no es que en su totalidad. Por otra parte podemos observar que la reacción de Ehrlich presentó un anillo violeta muy pronunciado, por lo que indica de que se trata de *P. expansum*.

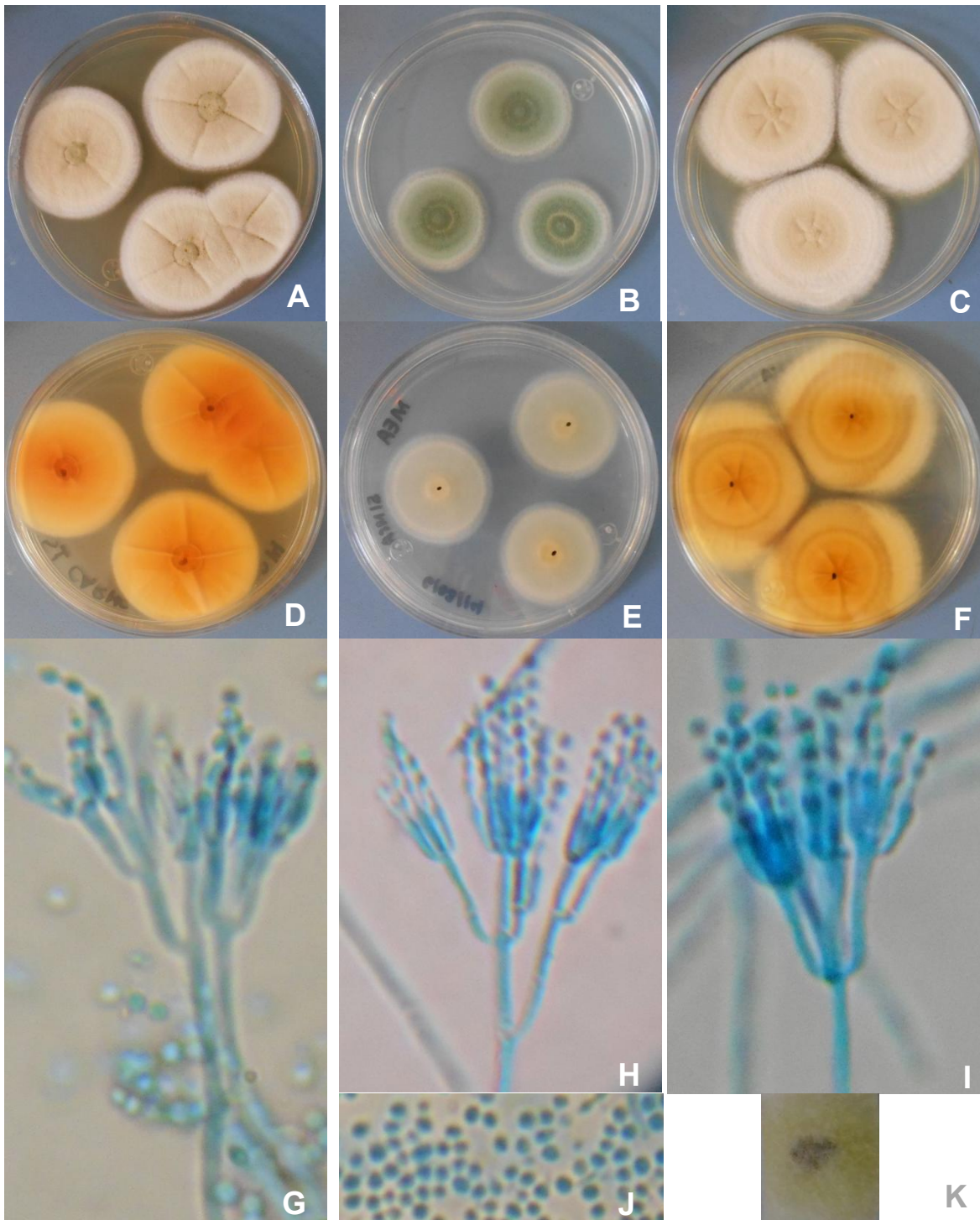
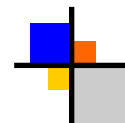


Figura 35. *Penicillium* 51 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 4.31 cm, radialmente sulcado profundo, superficie velutinosa con orilla y centro flocoso. Micelio blanco con conidios color café pálido en el centro de la colonia. Reverso pálido color crema con áreas difusas de naranja y exudado pálido café claro.
- El diámetro en MEA es 3.12 cm, superficie velutinosa a flocosa formando una banda anular ligera. Color de los conidios verde opaco; reverso pálido blanquecino con un punto color crema en el centro.
- El diámetro en G25N es de 4.80 cm, radialmente sulcado corto limitándose en el centro de la colonia, superficie velutinosa con orilla flocosa ligeramente. Color de los conidios café claro. Reverso pálido, color crema con áreas amarillas café.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados y tetraverticilados. Filaides cilíndricas con colula delgada y ligeramente larga. Conidios de superficie lisa, predominantemente elipsoidales sobre circulares.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó color amarillo difuso sin un anillo definido.

El aislado presentó una respuesta negativa en cuanto a *P. expansum*, sin embargo, el tamaño de las colonias, la reacción de Ehrlich color amarillo, los colores de los reversos de cada medio y la presencia de tetraverticilados indican que se trate de *P. chrysogenum*. Esta especie ocupa un alto rango de hábitats.

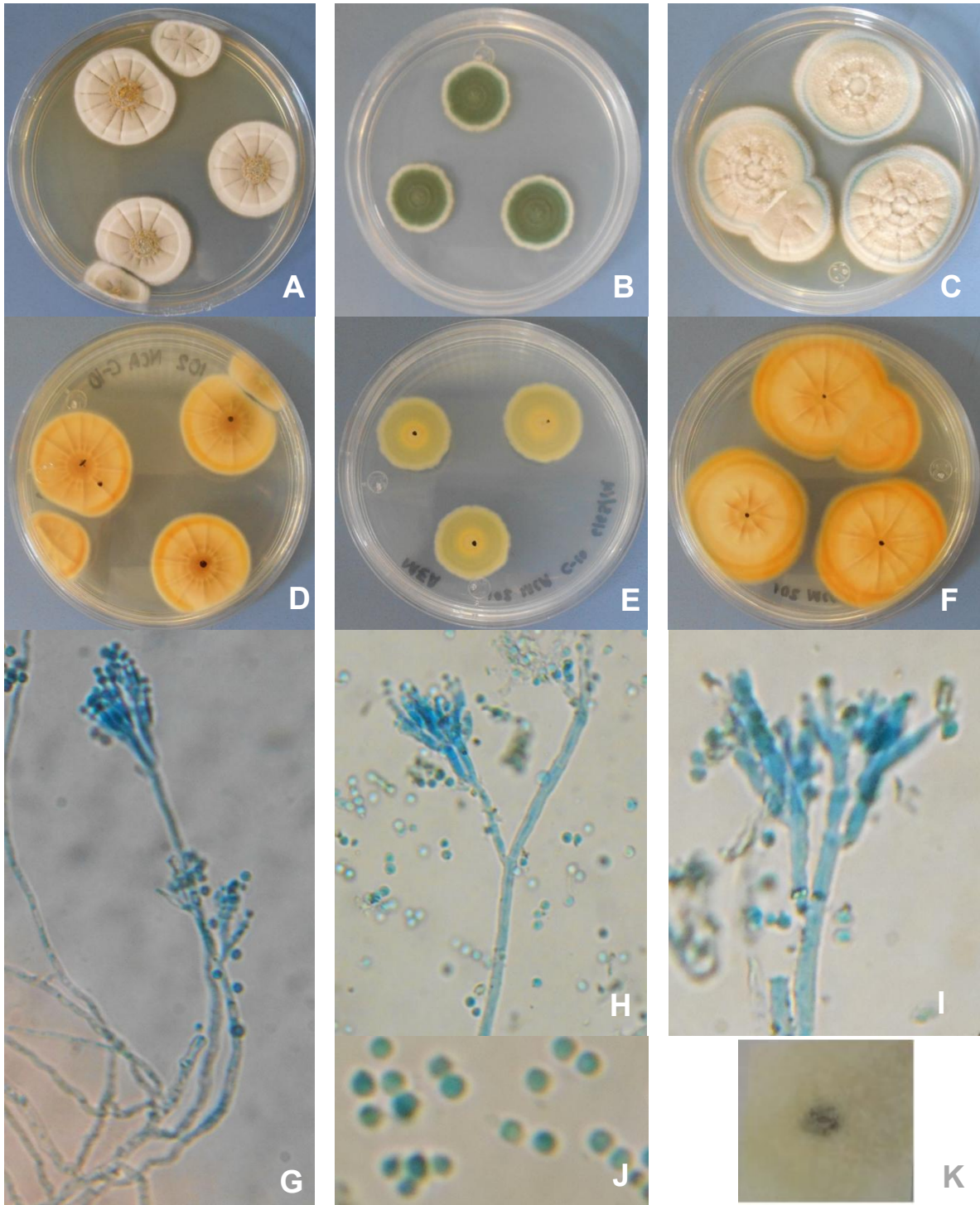
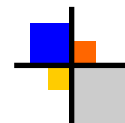


Figura 36. *Penicillium 107* MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.16 cm, radialmente sulcado, con superficie velutinosamente, fasciculada en algunas secciones preferentemente en el centro. Micelio blanco con conidios café claro en el centro de la colonia, exudado amarillo claro. Reverso pálido color crema con naranja brillante en la orilla.
- El diámetro en MEA es 2.4 cm, superficie velutinosamente. Color de los conidios verde opaco con orilla blanca; reverso amarillo opaco.
- El diámetro en G25N es de 4.19 cm, sulcado radialmente, superficie predominantemente flocosa con formación de bandas anulares, fasciculada en la parte central de la colonia otorgándole la característica granular. Micelio blanco, conidios color café claro en el centro de la colonia y orilla azulada. Reverso color pálido con orilla naranja.

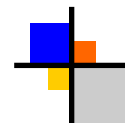
Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados. Fialides cilíndricas de superficie lisa con colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares sobre los elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un resultado negativo.

Este aislado demostró grandes diferencias macroscópicas con los demás aislados. Dado que los reversos de las colonias son amarillo brillantes y tiene predominio sobre las estructuras terverticiladas, además de que la reacción de Ehrlich fue negativo. La identificación es probable que se tratase de *P. aethiopicum*, sin embargo dicha especie, no se ha reportado en manzanas. Se ha reportado que tiene un parecido a *P. chrysogenum* en velocidades de crecimiento; a *P. expansum* en producir colonia fasciculadas y en ambas especies en producir conidioforos con paredes lisas en las estipes.



Los géneros *Aspergillus* o *Penicillium* son los de mayor importancia económica como causante de pudrición en los alimentos. Sin embargo, el género *Penicillium* es de los más diversos en términos de número de especies y con un amplio rango de hábitats para su desarrollo. Además, respecto a su taxonomía, es muy compleja ya que cuenta con numerosas especies, cuyas diferencias aparentes entre ellas son muy pequeñas (Pitt y Hocking, 2009).

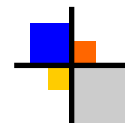
Los aislados que se describieron anteriormente mostraron características macroscópicas y microscópicas muy similares; sin embargo, entre cada uno de ellos se observó alguna diferencia en cuanto a la textura o diámetro de crecimiento de las colonias, así como la coloración del anverso y reverso de éstas. Por mencionar un ejemplo, se pueden notar coloraciones desde pálidas con secciones naranjas hasta reversos café profundo, donde en ambos casos están dentro de la descripción de las claves de acuerdo a Pitt y Hocking (2009).

Del mismo modo, todos los aislados mostraron predominio hacia las estructuras terventiciladas, en su mayoría presencia de exudado amarillo en la colonia de CYA y presencia de conidios esferoidales y elipsoidales con distintos predominios.

La reacción de Ehrlich ayudaron a que se observaran respuestas positivas con anillos intensos a anillos ligeros y negativos. Los resultados positivos que mostraron un anillo intenso correspondió al 116 MCA, posteriormente se encontró el aislado 81 CAT y 43 CAM con un anillo más tenue. Finalmente los aislados que mostraron resultados negativos corresponden a 32 CAM, 60 CAM, 51 MCA y 107 MCA. Los aislados de la sección de Anexos presentan en algunos de sus casos aislados con estructuras tetraventiciladas. A pesar de que su presencia indicaría una especie contraria a *P. expansum*.

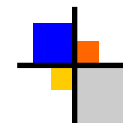
De acuerdo al banco de micología, Tzean y Chiu (1994), indica que *P. expansum* también contiene estructuras tetraventiciladas. Cabe mencionar que el género *Penicillium* tiene una plasticidad fenotípica muy variable. Además existen muchas controversias entre las subespecies por lo que se debe considerar la idea neodarwiniana donde las colonias y razas se van convirtiendo en nuevas especies por separación y selección geográfica (Frisvad y Samson, 2004).

En cuanto a los aislados cuya coloración fue tenue en la reacción de Ehrlich, sus demás características indican que se podría tratar de *P. expansum*. Por lo tanto, se puede concluir que se obtuvieron distintos aislados de la misma especie que presentan características particulares. Pero aún así pertenecer a la misma especie. La principal



razón de dichas diferencias se sustenta en la procedencia de cada aislado, cuyas características ambientales y geográficas son muy distintas de las demás.

En situaciones muy variables como la que aquí se presenta, es necesario acudir a otras pruebas que permitan reducir dicha variabilidad como análisis a extrolitos y la siembra a medios específicos bajo diferentes temperaturas de incubación. La técnica más empleada recientemente es mediante identificación molecular. A pesar de que solo se reporten tres especies comunes en las manzanas las cuales corresponden a *P. expansum*, *P. crustosum* y *P. solitum*, en esta experimentación se ha demostrado que pueden haber otro tipo de especies de *Penicillium* que independientemente de que se traten de *P. expansum* o no, pueden ser productoras de toxinas. Tal es el caso de *P. chrysogenum*, el cual produce roquefortina C y ácido ciclopiazónico, *P. brevicompactum* que produce ácido micofenólico (Rundberget *et al*, 2004) y *P. aethiopicum* el cual produce griseofulvina y viridicatumtoxina. En cuanto estas especies mencionadas, existe una fuerte probabilidad de que se hayan identificado de acuerdo a las figuras mostradas anteriormente. Como se puede observar corresponden a especies productoras de toxinas, dando cabida a la propensa contaminación de las manzanas por toxinas de igual o mayor peligro potencial. Siendo necesario, por lo tanto, la implementación de buenas prácticas agrícolas y de manufactura, la aplicación de tecnologías nobles y económicas para evitar el crecimiento de estos hongos o en su defecto la combinación de ambas soluciones.



4.3. DETECCIÓN DE PATULINA EN MANZANAS “GOLDEN DELICIOUS”

La figura 37 presenta el porcentaje de manzanas contaminadas y libres de patulina de acuerdo al tipo de venta a granel y en caja de los distintos centros de distribución frutícola.

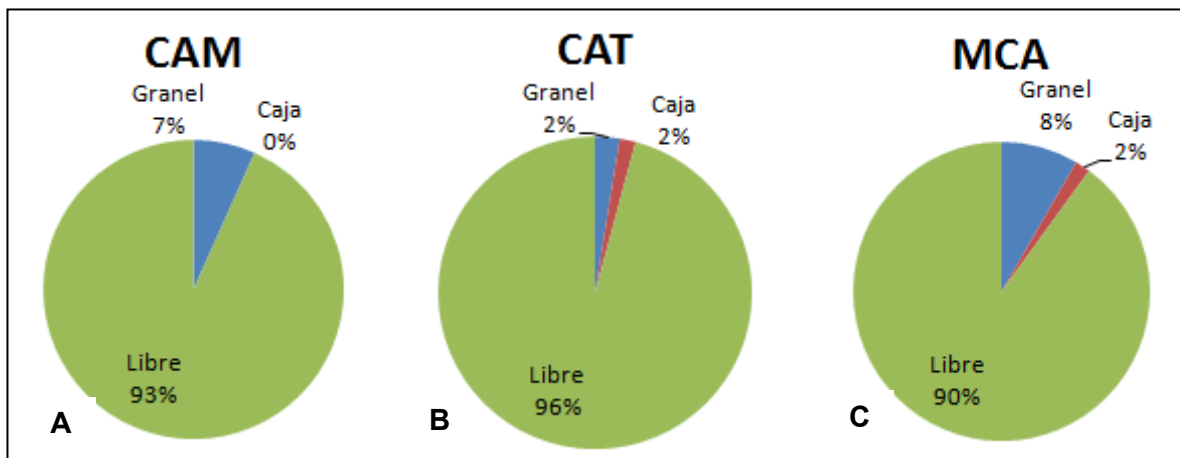
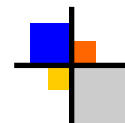


Figura 37. Porcentaje de manzanas que presentaron patulina de acuerdo al tipo de venta de los distintos centros de distribución frutícola. A) Central de abastos de México (CAM), B) bodegas de Atizapán (CAT), C) Mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli (MCA).

El análisis estadístico indicó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la procedencia y el tipo de venta. Considerando que la determinación de patulina se realizó en las manzanas tras haber cumplido el almacenamiento de 56 días hasta 90 días; se identificó que todos los centros de distribución frutícola tuvieron mayor presencia de patulina en el tipo de venta a granel, donde el mercado del Carmen tuvo mayor cantidad de manzanas contaminadas por patulina presentando un 10%, seguido de la Central de abastos de México con 7% y finalmente las bodegas de Atizapán con 4% respecto a su centro de distribución. Cabe mencionar que la central de abastos de la Ciudad de México no presentó manzanas contaminadas por patulina en el tipo de venta en caja a diferencia de las demás centrales.

Es necesario destacar que el almacenamiento de las manzanas a nivel comercial puede cumplir hasta 4 meses (Mateo, 2005) para condiciones frías normales sin el apoyo de otras tecnologías como atmósferas controladas. A lo largo de este proyecto se almacenaron durante el tiempo suficiente dentro de lo que se estipula comercialmente hasta que la manzana presentará una contaminación tal que estaba deformando la firmeza de los frutos.



El destacado número de manzanas que presentaron patulina en el tipo de venta a granel sobre las manzanas en caja, así como la presencia de patulina en los centros, se debe desde un principio a las condiciones del fruto y su susceptibilidad a la contaminación por el hongo como se explicó anteriormente en el almacenamiento de las manzanas. Además, tal como se reportó en los estudios de Elhariry *et al.* (2011) donde aisló *Penicillium* en manzanas con apariencia sana y con marcas de pudrición, la patulina fue detectada en todas las manzanas que presentaron algún tipo de pudrición. Esto indica que las manzanas que presenten *Penicillium* aumenta la probabilidad de que se genere patulina. En la presente experimentación se observó que hay una relación en la presencia de patulina con la presencia del hongo, donde el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli y la central de abastos de la ciudad de México presentaron mayor cantidad de *Penicillium* que las bodegas de Atizapán, dicha tendencia se observó en la presencia de patulina, sin embargo también es necesario destacar que los porcentajes de *Penicillium* fueron mayores que los de patulina. Esto podría indicar que la presencia de especies productoras de patulina no necesariamente implica la producción de esta micotoxina en manzanas como lo menciona Elhariry *et al.*, 2011 en trabajos de este fruto. Por esa razón, aunque conserva la misma tendencia, los porcentajes de *Penicillium* no fueron precisamente los mismos que los de patulina. Aunado a lo anterior cabe destacar que la producción de la toxina se debe a diversos factores; se ha demostrado que las condiciones de estrés ambientales tales como la infestación por insectos, sequía, susceptibilidad de los cultivos, daños mecánicos, deficiencias nutricionales, cambios climáticos, lluvias o humedad pueden proveer la producción de micotoxinas (Fernández *et al.*, 2010).

4.3.1. CUANTIFICACIÓN DE PATULINA

Las micotoxinas son químicamente estables durante el almacenamiento e industrialización, aún cuando han sido procesadas a altas temperaturas (Fernández *et al.*, 2010). La figura 38 muestra las concentraciones de patulina promedio determinadas por cromatografía en capa fina y por espectrofotometría de las diferentes centrales, así como el tipo de venta en granel y caja.

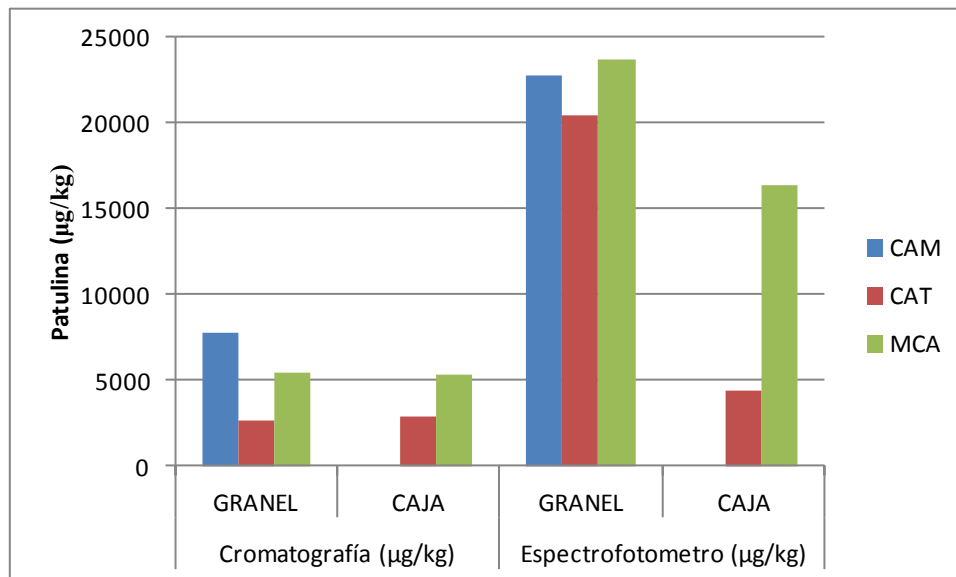
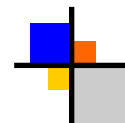


Figura 38. Valores promedio de patulina de los diferentes centros de distribución frutícola en los tipos de venta a granel y en caja mediante cromatografía y espectrofotometría.

Como se puede observar en la gráfica y como se ha ido discutiendo anteriormente, la síntesis de patulina ha sido mayor en las manzanas del tipo de venta a granel a comparación del tipo de venta en caja, lo que demuestra la influencia que el empaque ofrece como protección de los frutos. Las concentraciones determinadas por cromatografía en capa fina se encuentran en un rango de 1 000 a 27 000 µg/kg mientras que aquellas determinadas por espectrofotometría se encuentran entre 6 000 a 90 000 µg/kg. La diferencia entre estos valores es debido al origen de la técnica y su grado de detección de la micotoxina. Ya que la importancia del presente trabajo radica en la presencia de patulina, podemos observar que efectivamente durante el almacenamiento de las manzanas hubo una síntesis de ésta y que las concentraciones adquiridas superaron los niveles recomendados para el consumo humano en productos de manzana. Gran número de países regulan la patulina en un rango entre 20 y 50 µg/l (Shephard y Leggot., 2000). Por lo tanto, ante dichos límites, los valores determinados en esta experimentación lo superaron de 100 a 400 veces más.

Este panorama no quiere expresar que exista venta de manzanas en fresco en condiciones de pudrición, si no es un escenario drástico de que lo que puede suceder cuando se permiten las condiciones favorables (limpieza de las cámaras, temperatura de almacenamiento, manejo mecánico, humedad) para que se produzca la podredumbre y



hasta qué concentraciones se pueden llegar a alcanzar. Como se describió al principio, la patulina es soluble en agua, por consiguiente, las manzanas se pueden contaminar unas a otras cuando se almacenan deterioradas con frutos sanos, y si estos cuentan con lesiones los riesgos son aún mayores.

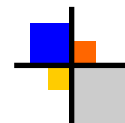
Entre las frutas y hortalizas contaminadas, solamente las manzanas pueden presentar concentraciones muy elevadas de patulina y su concentración está en función del grado de pudrición (Comisión de Codex Alimentarius, 1999), por esta razón las manzanas que se evaluaron alcanzaron concentraciones elevadas y variables dado que presentaron estados de pudrición severos al ser analizados como se puede observar en la figura 39. Por otra parte de acuerdo a los resultados reportados por Shephard y Leggot (2000) respecto a la incidencia de micotoxinas en frutas y sus productos procesados señaló que la incidencia de patulina en manzanas con áreas de pudrición se encuentra en un rango de 2 a 113 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por consiguiente los resultados reportados en esta experimentación se encuentran dentro de este rango.

En lo que respecta a los productos comerciales de manzana, no presentaron patulina. Sin embargo, cabe resaltar que la técnica de cromatografía en capa fina tiene un límite de detección de 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ por lo que cabe la probabilidad de que existan o no concentraciones menores a este límite. Por otra parte muchos de los productos comerciales, no parten de jugos directos de manzanas y en vez de ello de concentrados los cuales pasan por una serie de procesos que garanticen la inocuidad de la materia prima. No obstante para pequeños productores es necesario tomar estos parámetros para poder ofrecer productos amigables para los consumidores.



Figura 39. Manzana con síntomas de pudrición

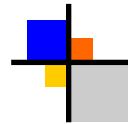
CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

De acuerdo a lo que se discutió anteriormente se puede concluir lo siguiente:

1. Durante el almacenamiento, las manzanas procedentes del mercado de Carmen de Cuautitlán Izcalli mostraron 82% casos de pudrición, seguido del 20 % en las bodegas de Atizapán y finalmente 13 % de las manzanas de la central de abastos de México. El principal punto de contaminación fue por heridas superficiales en la epidermis de la manzana a causa del maltrato postcosecha y por invasión en pedúnculo, disminuyendo su calidad sanitaria y en consecuencia el tiempo de comercialización.
2. El tipo de venta que presentó los mayores casos de pudrición, así como presencia de *Penicillium spp.* y de patulina en las manzanas fue la comercialización a granel con respecto a la venta en caja.
3. Las frutas procedentes de la central de abastos de la Ciudad de México y el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli presentaron el 39 y 36% de *Penicillium spp.* en la superficie de los frutos respectivamente a diferencia de las Bodegas de Atizapán con un 13 %.
4. La especie *Penicillium expansum* representó aproximadamente el 50% del *Penicillium spp.* detectado en las manzanas almacenadas. Se identificó la especie en diferentes aislados, encontrando ciertas diferencias entre ellos, por lo que presentaron características particulares como son el predominio de la forma de los conidios, la cantidad de exudado, variación en la textura de las colonias etc.
5. Las especies *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. aethiopicum* y *P. solitum*, se identificaron en las manzanas almacenadas. Estas especies son también productoras de toxinas, aumentando el riesgo para los consumidores.
6. Pese que las manzanas tuvieron la presencia de *P. expansum*, la síntesis de patulina se dió en un porcentaje alrededor del 50% menor al del hongo. El mercado del Carmen tuvo un 10 % de manzanas contaminadas por patulina, seguido de la



Central de abastos de México (7%) y finalmente las bodegas de Atizapán con (4%) bajo las condiciones de la investigación. La cuantificación de patulina de las manzanas alcanzó valores de 100 a 400 veces más el límite asignado por las organizaciones internacionales, sin embargo la síntesis de esta toxina es multifactorial y no únicamente del almacenamiento.

7. Los productos artesanales y comerciales analizados no presentaron patulina.

8. La calidad sanitaria de las manzanas no es favorable a largo plazo debido a la presencia de hongos y lesiones en los frutos en todos los centros de distribución. El mercado del Carmen fue el centro que presentaba en mayor cantidad estos padecimientos. Esto representa que la probabilidad de pudrición y en consecuencia la síntesis de patulina pueda ser mayor y representar un peligro para los consumidores. Para evitarlo es necesario aplicar alternativas de limpieza y tecnologías en la postcosecha de las manzanas.

RECOMENDACIONES



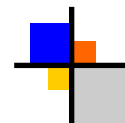
6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda lo siguiente:

1. La detección de *Penicillium expansum* y la producción de patulina en otras variedades comerciales de manzana.
2. Acudir a otras pruebas que ayuden la identificación de especies de alta variabilidad morfológica como análisis a extrolitos e identificación molecular.
3. Estudiar otros hongos productores de toxinas que se presenten en manzanas.
4. Realizar un muestreo de productos comerciales y artesanales en más zonas de la república, principalmente en las productoras.
5. Aplicación de sistemas de calidad o tecnologías alternativas para disminuir la contaminación del hongo y por consiguiente disminuir la producción de la toxina como limpieza en las bodegas y manejo de las temperaturas o la aplicación de recubrimientos comestibles con la aplicación de algún agente antifúngico.
6. Realizar la detección de patulina por otras técnicas analíticas como HPLC.

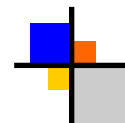


REFERENCIAS



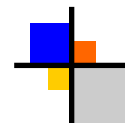
7. REFERENCIAS

1. Alimentación sana (2013). La manzana: Propiedades y características. Fecha de consulta: 13 de Septiembre de 2013. Disponible en: www.alimentación-sana.com.ar
2. Anderson, P. M. (2005). Enfermedades de origen alimentario. España: Díaz de Santos.
3. Anguiano, C. J. (2012). Contaminación por hongos filamentosos en manzana: amenaza para la salud y la economía. *Cienciacierta*. No.31 Julio-Septiembre 2012.
4. Agustí, M. (2010). *Fruticultura* (Segunda edición). España: Mundi-prensa.
5. Arauz, C. L. (1998). *Fitopatología. Un enfoque agroecológico*. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
6. Arias, C. E. L. y Piñeros, E. P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz verde. Tesis profesional. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
7. Baert, K., Devlieghere, F., Heidi, F., Oosterlinck, M., Morshed, A. M., Rajkovic, A., y otros (2007). Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 170-181.
8. Barkai-Golan, R. (2008). *Penicillium* Mycotoxins. En: Barkai-Golan R., y Nachman P., *Mycotoxins in Fruits and vegetables*. Estados Unidos: Elsevier, pp. 153-183.
9. Carrillo, L. (2013). Los hongos de los alimentos y forrajes. Fecha de consulta: 1 de Noviembre de 2013. Disponible en: unicencia.ambientalex.info/infoCT/Honaliforpen.pdf
10. Cole, R. J. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. United States of America: Academia Press Inc.
11. Comisión del Codex Alimentarius. (1999). Documento de síntesis relativo a la patulina. Fecha de consulta: 4 de Julio del 2014. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac31/fa99_16s.pdf
12. Comité estatal sistema productor de manzana estado de Chihuahua, A. (2013). Plan rector. Sistema de producto manzana. Fecha de consulta: 17 de Septiembre de 2013. Disponible en: http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP_CNPS_MANZANA/PLAN%20RE

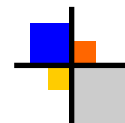


CTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/
PR MANZANA NACIONAL 2012.pdf

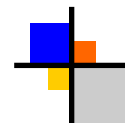
13. DIRECTIVA 2003/78/CE DE LA COMISIÓN. Por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial de contenido de patulina en los productos alimenticios. Diario oficial de la Unión Europea.
14. Eckert, J.W., y Ogawa, J.M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annu.Rev. Phytopathology*, 23: 421-454.
15. Elhariry, H., Bahobia, I. A., y Gherbawy, Y. (2011). Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 941-946.
16. FAO. (1993). Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos. (Vol. II). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
17. FAOSTAT (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fecha de consulta: 7 de Septiembre de 2013. Disponible en: faostat.fao.org
18. Fernández C. M., Mansilla, M. L, Tadeo J.L.(2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1: 113-122.
19. French, E. R., y Hebert, T. T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. Colombia: Instituto interamericano de ciencias agrícolas.
20. Frisvad, J., y Samson, R. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of the food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol*, 49: 1-173.
21. FDA (2012). Import Alert 20-06. Fecha de consulta: 13 de Septiembre del 2013. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_57.html
22. Fomesa. Enfermedades de la fruta de pepita hongos latentes. Fecha de consulta: 4 de Julio del 2014. Disponible en: http://www.fomesa.net/Calidad/Factores/F_03_11_2_2.htm
23. Funes, G. J. (2011). Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el procesamiento de alimentos. Tesis doctoral. Argentina: Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
24. Gil, A. (2010). Tratado de nutrición. Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.



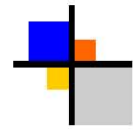
25. Hall W. C. y Arango S.F. (1968). Equipo para procesamiento de equipos agrícolas. Perú: Instituto Interamericano de ciencias agrícolas de la OEA.
26. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1986). Patulin. En: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans, pp. 83-98.
27. INFOAGRO (2013). El cultivo de la manzana (3a parte). Fecha de consulta: 7 de Septiembre de 2013. Disponible en: www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana3.htm
28. Jackson, L. S., y Fadwa, A.T. (2008). Factors affecting mycotoxin production in fruits. En: Barkai-Golan R., y Nachman P., Mycotoxins in Fruits and vegetables. Estados Unidos: Elsevier, pp. 75-104.
29. Jines, A. (1996). Frigoconservación de cuatro variedades de manzana. En PROCIANDINO, Manejo pre y post-cosecha de frutales y hortalizas para exportación. Ecuador: INIAP, pp. 46-47.
30. Kader, A. A. (2002). Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas (Tercera edición). Estados Unidos: División de agricultura y recursos naturales.
31. López, C. A. (2003). Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
32. Marín, S., Ramos, A. J., y Sanchis, V. (2008). Chemical control of mycotoxigenic fungi. En: Barkai-Golan R. y Nachman P., Mycotoxins in fruits and vegetables. Estados Unidos: Elsevier, pp. 279-326.
33. Martínez, L. M., y Anadón, A. (2012). Micotoxinas. España: Diaz de Santos.
34. Martínez, T. J. J. (2015). Inocuidad y buenas prácticas agrícolas y de manejo en la producción de manzana, durazno y otras hortalizas o frutas para consumo en fresco. Fecha de consulta: 23 de Enero del 2015. Disponible en: <http://www.unifrut.com.mx/archivos/simposiums/simposium/2006/v4.pdf>
35. Mataix, J. V. (2009). Tabla de alimentos (Quinta edición). España: Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos. Universidad de Granada.
36. Mateo, B. J. (2005). Prontuario de agricultura. España: Mundi-Prensa.
37. Morales, H., Marín, S., Obea, L., Patiño, B., Doménech, M., Ramos, A., y Sanchis V. (2008). Ecophysiological characterization of *Penicillium expansum* population in lleida (Spain). International Journal of Food Microbiology, 122: 243-252.



38. Morales, H., Marin, S., Ramos, A. J., y Sanchis, V. (2010). Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin acumulation: review. *Food Control*, 21: 953-962.
39. Moreno, M. E. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
40. Moukas, A., Panagiotopoulou, V., y Panagiota, M. (2008). Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food chemistry*, 109: 860-867.
41. Palgrem M. S. y Ciegler A. (1983). Toxicity and carcinogenicity of fungal lactones: patulin and penicillic acid. En: *Handbook of natural toxins*. Estados Unidos: Marcel Dekker Inc pp. 325-335.
42. Pascual, A. M., y Calderon, y. P. (2000). Microbiología Alimentaría. Metodología analítica para alimentos y bebidas. España: Diaz de Santos.
43. Pitt, J. I., y Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3rd edition). Estados Unidos: Springer.
44. Plank, R. (2005). El empleo del frío en la industria de la Alimentación. España: Reverté.
45. Pyetrzyk, D. y Clyde F. (1979). Química analítica (Segunda edición). México: Interamericana.
46. Quesada, M. S. (2007). Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
47. Rouessac, F. y Rouessac, A. (2000). Análisis Químico. España: Mc-GrawHill.
48. Rundberget, T., Skaar, I., y Arne, F. (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *International Journal of Food and Microbiology*, 90: 181-188.
49. SAGARPA-SIAP (2013). Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Cierre de producción agrícola por cultivo. Fecha de consulta: 7 de Septiembre de 2013. Disponible en: www.siap.gob.mx
50. SAGARPA-UNIFRUT (2013). Estudio de infraestructura logística para la manzana y durazno del Estado de Chihuahua. Fecha de consulta: 7 de Septiembre de 2013. Disponible en: www.sagarpa.org.mx
51. Scott, P. M. (1974). Patulin . En: *Purchase I.F.H., Mycotoxins*. Holanda : Elsevier scientific publishing company, pp. 383-399



52. Secretaría de Hacienda y Crédito Público (2014). Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. Fecha de consulta: 10 de Septiembre de 2014. Disponible en: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Manzana%20\(abr%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Manzana%20(abr%202014).pdf)
53. Shephard, G. S. y Leggott, N. L. (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of chromatography*, 882: 17-22.
54. Sierra, R. A. (2004). Estudio de la contaminación por micotoxinas en maíz (*Zea mays*) de tres variedades cosechadas en el estado de Jalisco. Tesis de maestría. México: Universidad de Guadalajara.
55. Smith, I., J., Dunez., R.A, L., D.H., Phillips., y S A. Archer (1988). Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa. España.
56. Soriano del Castillo, J. M. (2007). Micotoxinas en alimentos. España: Díaz de Santos.
57. Soriano, M., Bejar, V., y Bonilla, P. (2002). Frecuencia de hongos anemófilos productores de micotoxinas en algunos mercados de Lima, detección de Patulina en manzanas en descomposición. *Ciencia e Investigación*, 2: 36-45.
58. Torres, S. L., y López, C. L. (2010). Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud Pública de México*, 52(5): 461- 467.
59. Trucksess, M., y Díaz Amigo, C. (2011). *Mycotoxins in Foods*. Estados Unidos: Elsevier.
60. Tzean, SS y Chiu S.C. (1994). Mycobank, *Penicillium expansum*. Fecha de consulta: 20 de Julio del 2014. Disponible en: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802260021.
61. Ulloa, M., y Hanlin, R. T. (2012). *Illustrated Dictionary of Micology*. Estados Unidos: The American Phytopathological Society.
62. Valle, A. F. (2010). Evaluación del peligro potencial y real de la presencia de ocratoxina A, tricotecenos B y “Golden Delicious” en trigo y manzana mediante técnicas microbiológicas y cromatográficas. Tesis doctoral. España: Universidad de Valencia.
63. Villacis, R. C. (2011). Determinación del contenido de “Golden Delicious” en manzanas, jugos y néctares de manzana, por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa. Tesis de licenciatura. Ecuador: Pontificia Universidad Católica de Ecuador.



-
64. Viñas, A. M., Recasens, I., Usall, J., y Graell, J. (2013). Poscosecha de pera, manzana y melocotón. España: Mundi-Prensa.



ANEXOS



8. ANEXOS

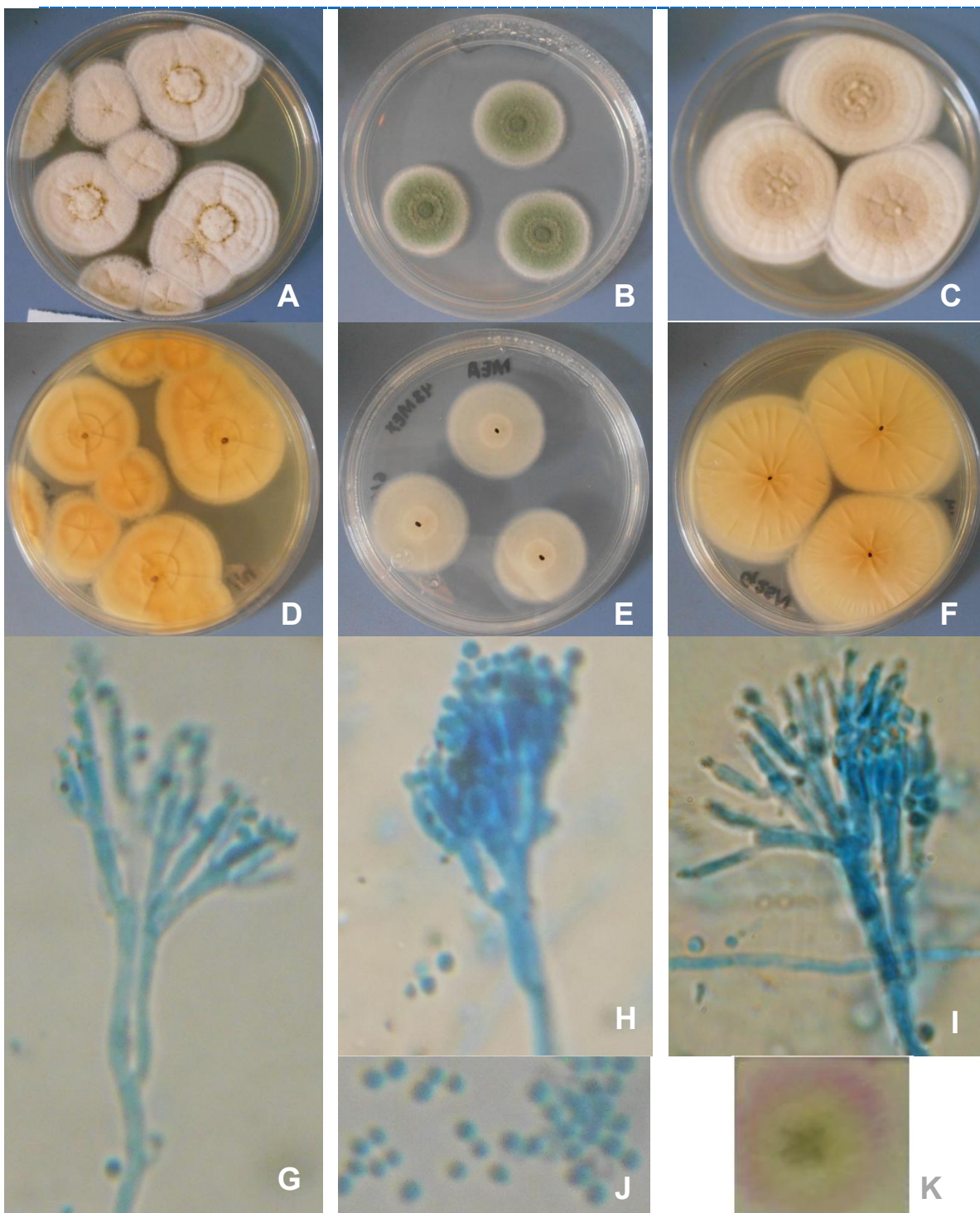
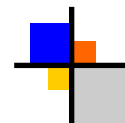


Figura 40. *Penicillium* 43 CAM, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



La figura 40 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 43 de la central de abastos de la ciudad de México, correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel. Las características macroscópicas y microscópicas se describen a continuación.

Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.62 cm, radialmente sulcado con superficies adyacentes flocosas y velutinosas; centro fasciculado. Micelio blanco con conidios blancos y bandas anulares moderadamente profundas; exudado amarillo a café. Reverso color crema con áreas café claro.
- El diámetro en MEA es 2.99 cm con superficie velutinosa y algunas secciones fasciculadas formando al menos una banda anular. Color de los conidios verde; reverso pálido con centro color crema claro.
- El diámetro en G25N es de 4.79 cm, radialmente sulcado con superficies adyacentes velutinosas a flocosas y secciones fasciculadas en el centro, presenta bandas anulares ligeras. Color de los conidios café claro en el centro de la colonia. Reverso pálido, color crema con centro difuso naranja a café.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados. Elementos adpresos en algunos casos con fialides cortas de colula ancha y ligeramente larga. Conidios de superficie lisa predominantemente elipsoidales con presencia de circulares.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo difuso color violeta.

Dado que el aislado cuenta con la mayoría de las características macroscópicas, microscópicas y la reacción de Ehrlich da un anillo violeta, esta muestra corresponde a *P. expansum*.

La figura 41 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 11 de la central de abastos de la ciudad de México, correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel.

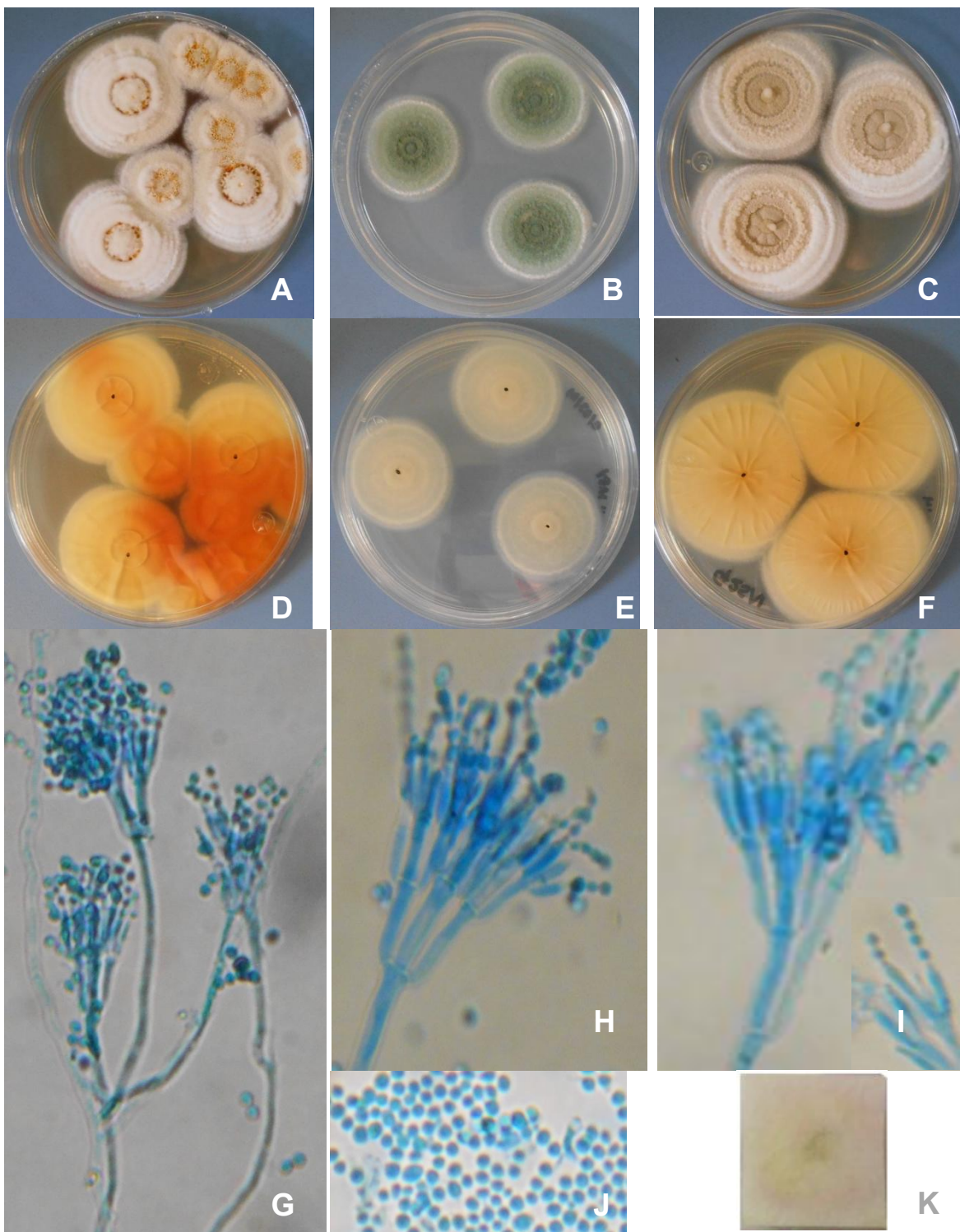
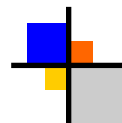
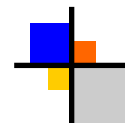


Figura 41. *Penicillium 11 CAM*, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 4.27 cm, radialmente sulcado ligero, el cual es más notorio en el reverso de la colonia, superficie flocosa con secciones velutinosas formando bandas anulares ligeras. Micelio y conidios blancos con exudado copioso color amarillo a café. Reverso pálido color crema con áreas naranja café.
- El diámetro en MEA es 3.38 cm, con superficie velutinoso y fasciculada en el centro de la colonia formando bandas anulares. Color de los conidios verde opaco; reverso pálido blanquecino con centro color crema.
- El diámetro en G25N es de 4.77 cm, radialmente sulcado en el centro de la colonia y color de los conidios café en esta zona, superficie flocosa con secciones fasciculadas formando anillos, superficie de la colonia velutinoso en el centro a granular. Reverso pálido, color crema con café rojizo difuso en el centro.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados y tetraverticilados; fiálides con colula delgada y ligeramente larga. Conidios de superficie lisa, circulares y elipsoidales, ligeramente predominante hacia los circulares.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo muy ligero color violeta claro.

El aislado presentó características citadas en las claves de *P. expansum*. A pesar de que la coloración con el reactivo de Ehrlich no es intenso, este aislado cumple con las características de *P. expansum*.

La figura 42 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 21 de las bodegas de Atizapán, correspondiente a las manzanas del tipo de venta en caja.

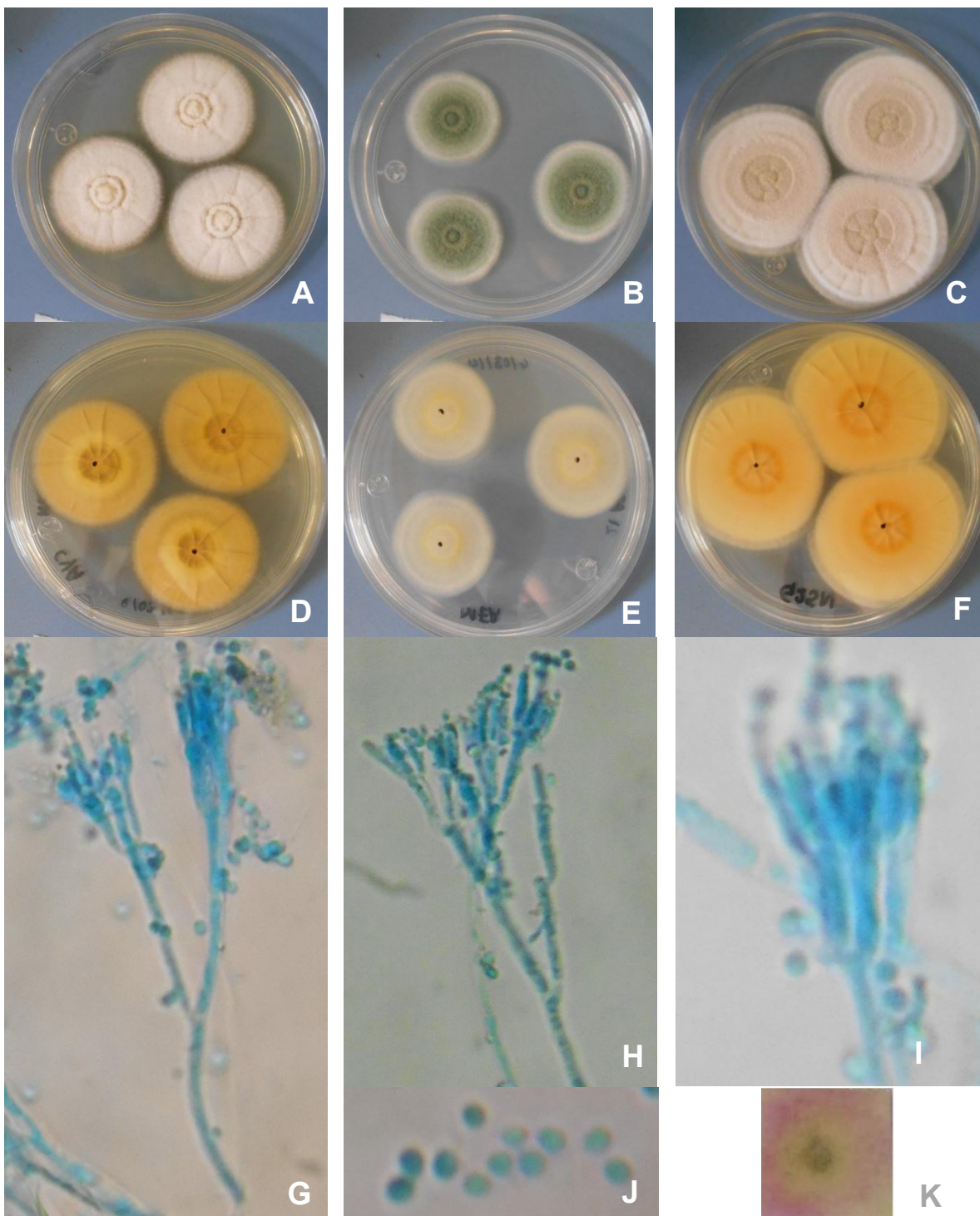
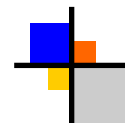


Figura 42. *Penicillium* 21 CAT, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.86 cm, radialmente sulcado ligero, superficie flocosa, con secciones fasciculadas en el centro, a velutinoso en las orillas. Micelio blanco con conidios blancos y dos bandas anulares profundas. Poco exudado amarillo. Reverso amarillo con café difuso formando un anillo amarillo claro en el centro.
- El diámetro en MEA es 3.28 cm, superficie velutinosa con una banda anular en el centro. Color de los conidios verde opaco; reverso pálido con una halo amarillo en el centro de la colonia.
- El diámetro en G25N es de 4.63 cm, radialmente sulcado, superficie velutinosa a flocosa presentando bandas anulares. Ligeramente granular. Color de los conidios café claro en el centro de la colonia con orillas blancas. Reverso amarillo pálido con un halo amarillo fuerte en el centro.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados y tetraverticilados. Fialides cilíndricas con colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente elipsoidales con presencia de circulares.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo violeta fuerte.

La mayoría de las características macroscópicas y microscópicas, así como la reacción de Ehrlich corresponden a *P. expansum*

La figura 43 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 14 del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, correspondiente a las manzanas del tipo de venta en caja.

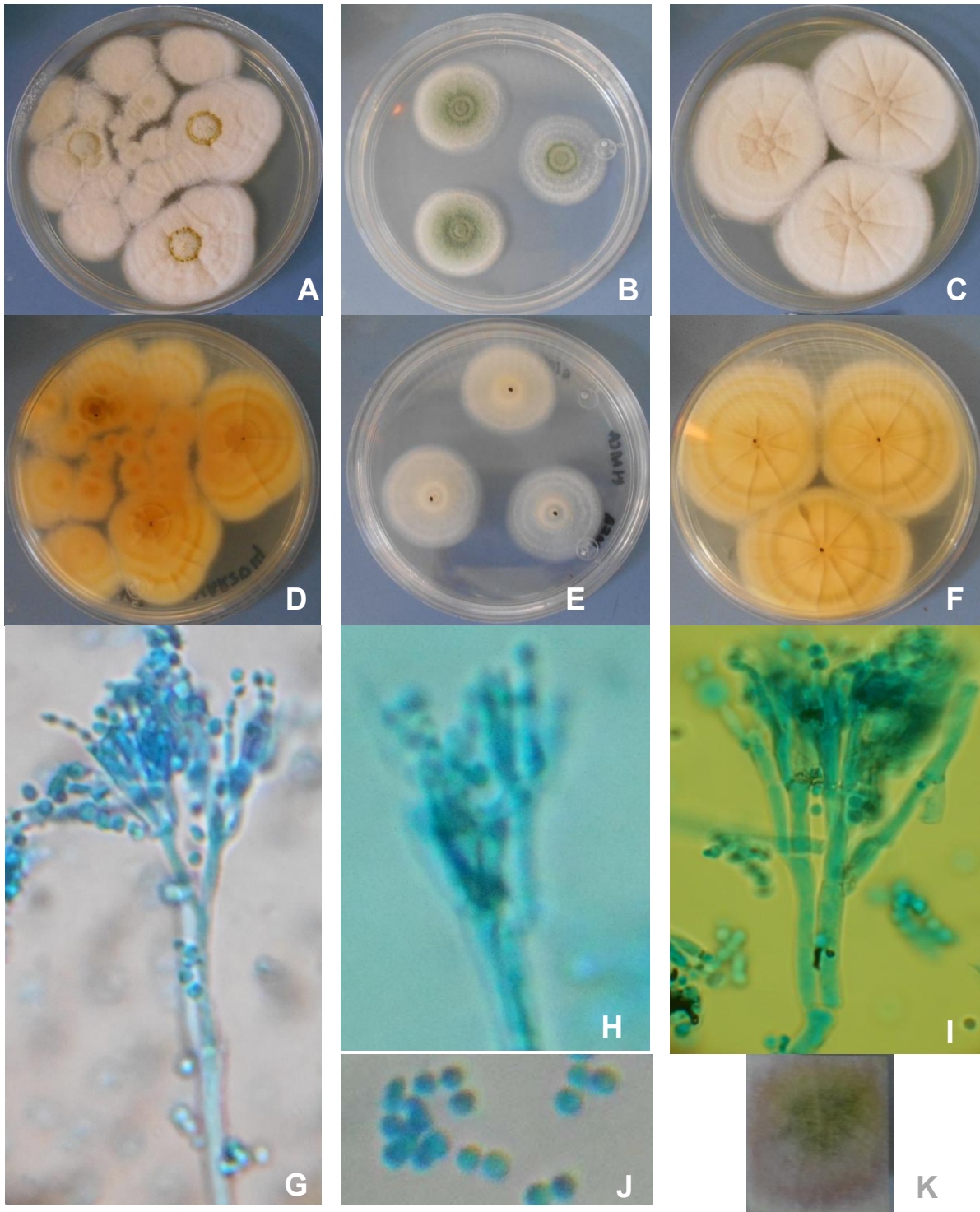
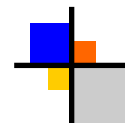


Figura 43. *Penicillium* 14 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.85 cm, radialmente sulcado ligero el cual se aprecia en el reverso de la colonia, superficie velutinosa formando bandas anulares sutiles. Micelio y conidios blanco; exudado copioso amarillo a café claro. Reverso pálido color crema con áreas difusas amarillo a café formando anillos.
- El diámetro en MEA es 2.82 cm, superficie velutinosa a ligeramente flocosa formando al menos una banda anular. Color de los conidios verde opaco; reverso pálido.
- El diámetro en G25N es de 4.68 cm, radialmente sulcado, superficie velutinosa con orilla flocosa, presentando bandas anulares ligeras. Color de los conidios café claro en el centro de la colonia. Reverso pálido, color crema con anillos difusos café.

Características microscópicas

- Superficie de las estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de estructuras biverticilados. Fialides cilíndricas de colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares sobre los elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo tenue violeta.

Las muestras presentaron muchas características macroscópicas y microscópicas de acuerdo a lo que se describe en las claves, indicando que se trate de *P. expansum*.

La figura 44 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 61 del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel.

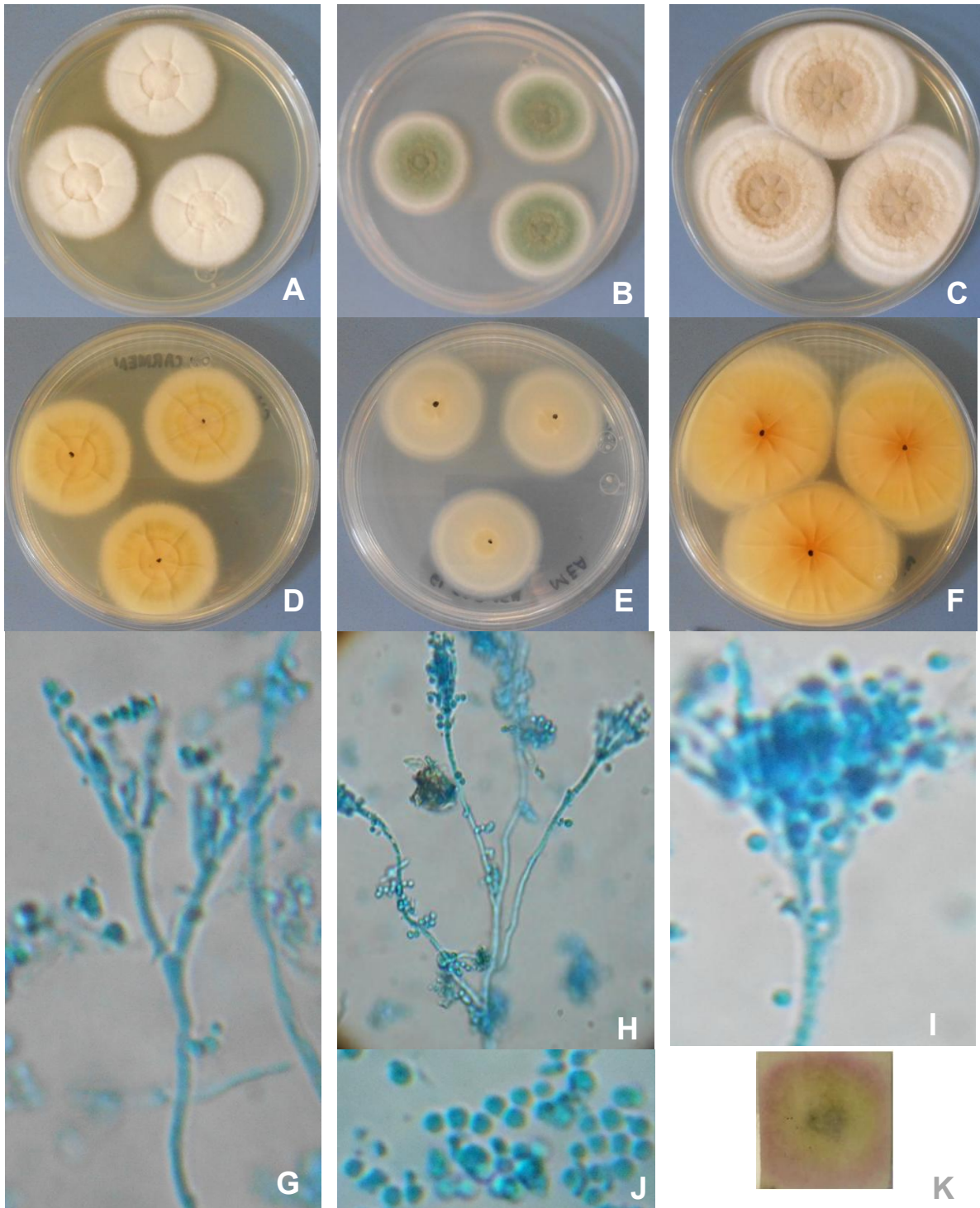
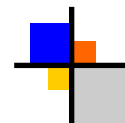


Figura 44. *Penicillium* 61 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.8 cm, radialmente sulcado, superficie velutinoso predominantemente, formando una banda anular. Micelio y conidios blancos. Reverso color amarillo pálido con áreas con tonos más fuertes de amarillo.
- El diámetro en MEA es 3.33 cm, superficie velutinoso y secciones fasciculadas formando al menos dos bandas anulares. Color de los conidios verde opaco con orilla blanca; reverso pálido con un punto color crema en el centro.
- El diámetro en G25N es de 4.73 cm, radialmente sulcado, superficie velutinoso y flocosa presentando bandas anulares con áreas fasciculadas otorgando la característica granular. Color de los conidios café claro en el centro de la colonia. Reverso pálido, color crema y café rojizo en el centro de la colonia.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforo predominantemente terveticilados con presencia de biveticilados. Filoides cilíndricas con colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares seguidos de elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo difuso color violeta.

El aislado presenta varias características macroscópicas y microscópicas, además la reacción de Ehrlich presentó una coloración violeta. Cabe resaltar que a pesar de ello, no presentó exudado en CYA, la cual es una característica distintiva de este aislado. Por lo tanto esta especie se determinaría como *P.expansum*, sin embargo sería necesario profundizar su identificación.

La figura 45 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 85 del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel.

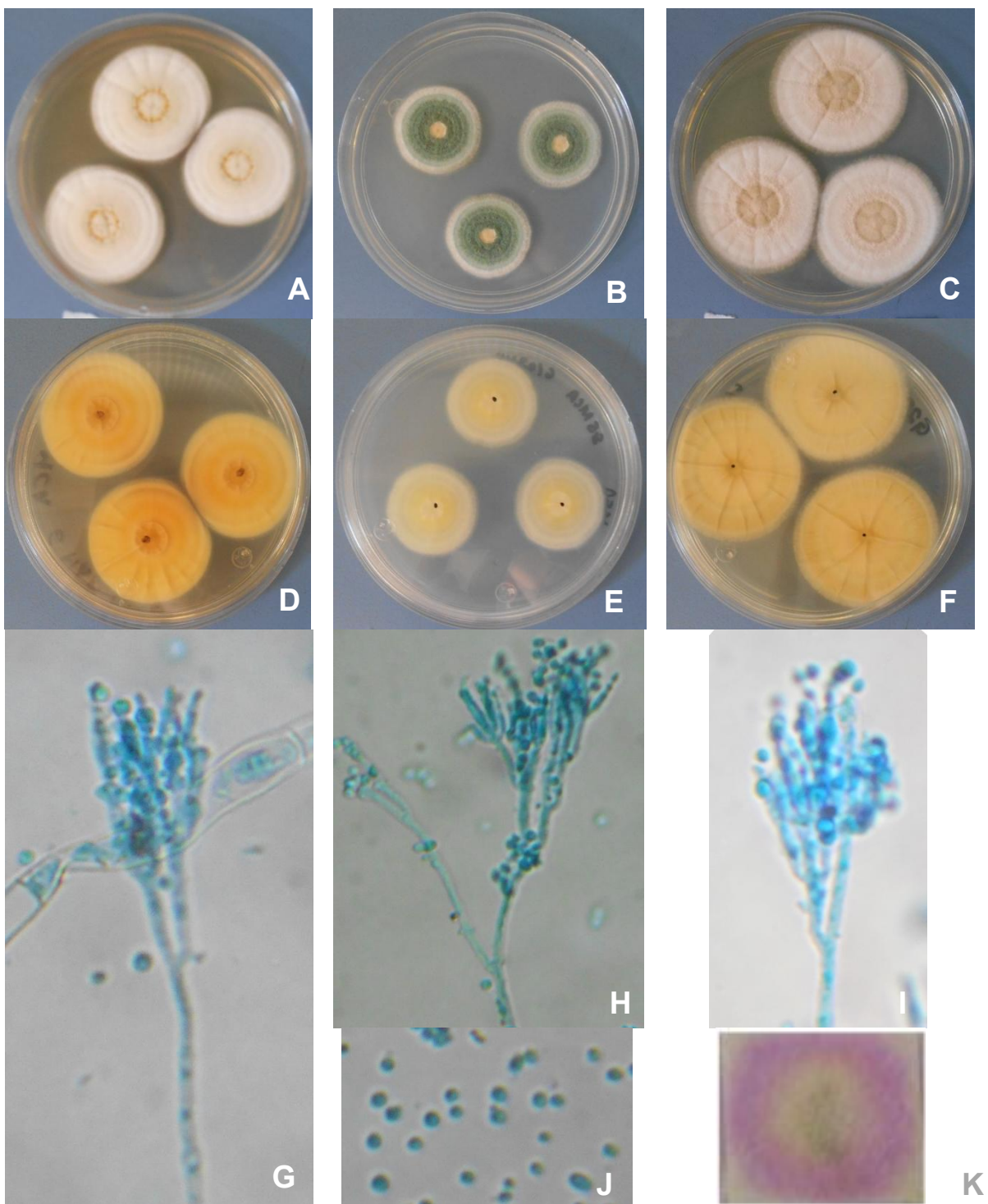
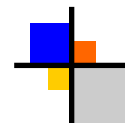


Figura 45. *Penicillium* 85 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.86 cm, radialmente sulcado ligero, con superficie predominantemente flocosa formando bandas anulares ligeras. Micelio y conidios blancos, exudado amarillo claro. Reverso pálido color crema con áreas amarillo oscuro a café.
- El diámetro en MEA es 2.4 cm, superficie velutinosa, en el centro de la colonia, a flocosa con secciones ligeramente fasciculadas presentando bandas anulares. Color de los conidios amarillo en el centro, seguido de verde opaco y un anillo azul opaco anterior a la orilla blanquecina de la colonia; reverso color crema claro con un anillo amarillo difuso en el centro de la colonia.
- El diámetro en G25N es de 4.4 cm, sulcado radialmente, superficie velutinosa a flocosa formado una banda anular y finalmente velutinosa; fasciculada posteriormente a la primera banda anular otorgando características granulares. Micelio blanco, conidios color café claro en el centro. Reverso pálido, color crema a café claro.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados con presencia de biverticilados y tetraverticilados. Elementos adpresos con filides cilíndricas de colula delgada y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares seguidos de elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo color violeta profundo.

Este aislado presentó diversas peculiaridades que salen de las claves utilizadas, sin embargo en otras no. Aunado a esto, la reacción de Ehrlich dio un anillo violeta profundo por lo tanto este aislado se determinó como *P. expansum*.

La figura 46 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 109 del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel.

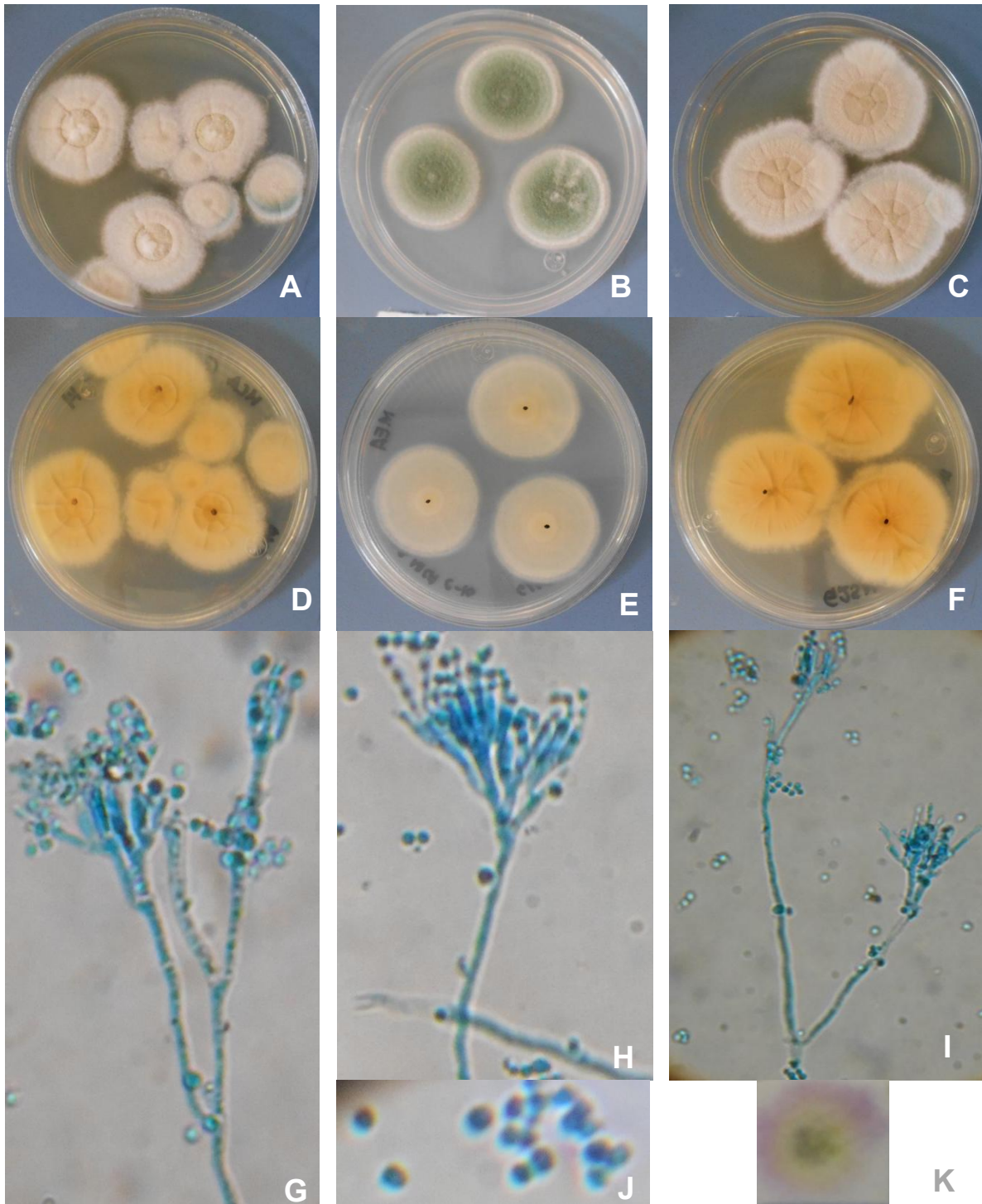
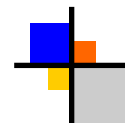


Figura 46. *Penicillium* 109 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.91 cm, radialmente sulcado con superficie flocosa a velutinosa formando una banda anular, fasciculada preferentemente en el centro. Micelio y conidio blanco; exudado amarillo claro. Reverso color crema pálido con áreas amarillo café.
- El diámetro en MEA es 3.27 cm, superficie velutinosa. Color de los conidios verde opaco con orilla blanca; reverso blanquecino con el centro color crema claro.
- El diámetro en G25N es de 3.71 cm, sulcado radialmente profundo, superficie velutinosa a flocosa formando al menos una banda anular. Micelio blanco, conidios color café claro en el centro de la colonia. Reverso color crema con áreas amarillo café.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terveticilados y con presencia de biveticilados. Fialides cilíndricas de superficie lisa con colula ancha y corta. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares sobre los elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo violeta.

Dado que cuenta con la mayoría de las característica descritas y por el resultado de la reacción de Ehrlich, se determinó esta especie como *P. expansum*

La figura 47 muestra imágenes del hongo aislado de la manzana 120 del mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, correspondiente a las manzanas del tipo de venta a granel.

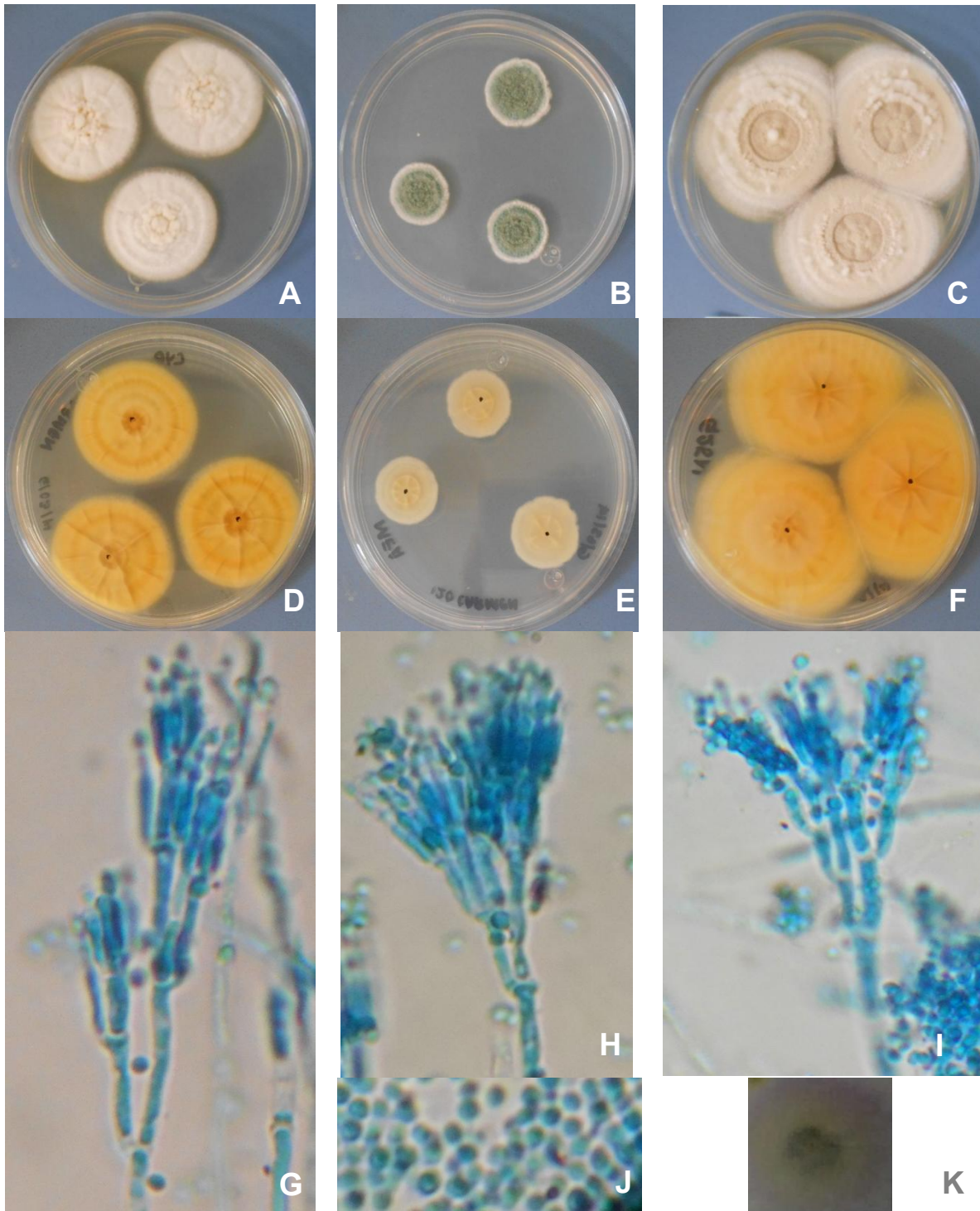
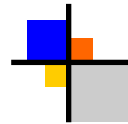
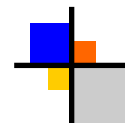


Figura 47. *Penicillium* 120 MCA, colonias a los 7 días en distintos medios de cultivo. (A) CYA; (B) MEA; (C) G25N; (D-F) Reverso en (D) CYA; (E) MEA; (F) G25N; (G-I) Conidióforos; (J) Conidios; (K) Reacción de Ehrlich.



Características macroscópicas

- El diámetro de la colonia en CYA es 3.65 cm, radialmente sulcado ligero, con superficie predominantemente flocosa a velutinosa formando bandas anulares, fasciculada en algunas secciones preferentemente en el centro. Exudado amarillo en una de las colonias. Micelio y conidios blancos. Reverso color amarillo con anillos difusos amarillo café.
- El diámetro en MEA es de 2.22 cm, superficie velutinosa con secciones fasciculadas. Color de los conidios verde opaco con orilla blanca; reverso color crema claro con el centro con un tono más encendido.
- El diámetro en G25N es de 4.87 cm, radialmente sulcado corto concentrándose en el centro, superficie velutinosa en el centro a flocosa en el resto de la colonia, formación ligera de bandas anulares. Micelio blanco con conidios café claro. Reverso amarillo claro con reverso café claro.

Características microscópicas

- Superficie de los estipes lisa, conidióforos predominantemente terverticilados, con presencia de biverticilados y tetraverticilados. Fialides cilíndricas de superficie lisa con colula delgada ligeramente larga. Conidios de superficie lisa, predominantemente circulares sobre elipsoidales.

Reacción de Ehrlich

La muestra presentó un anillo difuso color violeta.

Este aislado es similar a los demás. Cuenta con ciertas características macroscópicas y microscópicas que corresponden con las claves. Cabe resaltar que el predominio de conidios esféricos es mayor que los elipsoidales, siendo una característica no correspondiente a las descripciones. A pesar de ello en la reacción de Ehrlich resaltó un anillo violeta indicando que se trate de *P. expansum*.