



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Recubrimiento de limones (*Citrus aurantifolia*) con quitosán y aceite esencial de naranja para alargar su vida útil.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A**

**MAYRA BEATRIZ MALDONADO HERNÁNDEZ**

**ASESORA: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

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: **Tesis y Trabajo Profesional**

Recubrimiento de limones (*Citrus aurantifolia*) con quitosán y aceite esencial de naranja para alargar su vida útil.

Que presenta la pasante: **Mayra Beatriz Maldonado Hernández**  
Con número de cuenta: **408045364** 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 18 de Mayo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
<b>2do. SUPLENTE</b>	I.A. Ana María Soto Bautista	

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

IHM/cga\*

## **DEDICATORIA**

A mi asesora y amiga

Dra. Susana Patricia Miranda Castro

A mis padres

Beatriz Hernández González

Abundio Maldonado Hernández

A mi hermana

Claudia Gabriela Maldonado Hernández

A mi abuelita

Leonor González Serrano

A mi novio

César Omar Martínez Tonda

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme la oportunidad de ser parte de su comunidad y formarme como profesionista, un orgullo para mi haber pertenecido a la máxima casa de estudios.

A mi asesora de tesis, Dra. Susana Patricia Miranda Castro una persona a la que admiro como persona y como profesionista, gracias por brindarme todo su apoyo, gracias por ser parte de esta recta final, me enorgullece haber trabajado a su lado, gracias por lo que compartió conmigo.

A mis padres, guerreros incansables que con su amor y apoyo me han impulsado a culminar esta etapa, gracias por siempre dar lo mejor de si para nosotras, gracias por estar ahí en las buenas y en las malas , por brindarme su mano después de cualquier tropiezo ayudándome y guiándome para continuar y siempre ser mejor cada día. Los amo!!!

A mi hermana un ejemplo para mí, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, te agradezco la motivación recibida, gracias por los lindos momentos que hemos vivido, te quiero mucho, me enorgullece poder llamarte hermana.

A Omar, gracias por enseñarme que no hay limitante alguna cuando uno se propone algo, gracias amor por tu apoyo incondicional, por todos los bellos momentos que me has brindado, gracias por ser partícipe de este maratón siempre echándome porras y nunca abandonándome, gracias por todas enseñanzas brindadas, gracias por hacerme más ambiciosa en cuánto a la adquisición de conocimientos, me siento una mujer afortunada de tenerte a mi lado, hemos logrado una unidad, por eso y más gracias amor, te amo.

A mis abuelos un ejemplo de vida, un agradecimiento especial a mi abuelita Leonor por ser una mujer admirable, tan buena y bondadosa, siempre dispuesta a apoyar y a ayudar a los demás de manera incondicional.

A mis tíos y primos por siempre creer en mí, y estar conmigo en las buenas y en las malas, y ser un apoyo a lo largo de mi vida, gracias por todo.

A Mariana Jiménez Galicia por ser más que una compañera y amiga, por estar de manera incondicional en todo momento, gracias por todos los bellos momentos que hemos vivido te quiero mucho, gracias por formar parte de mi vida personal y de mi formación académica, sin duda mejor equipo no pude encontrar.

A mis sinodales gracias por haber formado parte de mi formación profesional y por guiarme en este último paso para culminar mi carrera y por sus contribuciones para la mejora de este proyecto. Gracias Dr. José Francisco Montiel Sosa, Dra. Susana Patricia Miranda Castro, M. en C. Tais Nopal Guerrero, M. en C. María Guadalupe Amaya León e I.A Ana María Soto Bautista, mi admiración y agradecimiento para cada uno de ellos.

Un agradecimiento especial al proyecto PAPIME PE203211. Innovación y fortalecimiento de la enseñanza teórica práctica de la biotecnología para asignaturas terminales de las ciencias biológicas.

Gracias a cada uno de los profesores y compañeros que participaron en mi formación académica, gracias por cada enseñanza brindada, por cada conocimiento adquirido, gracias a todos por ser parte de este capítulo de mi vida.

A dios gracias por permitirme culminar con esta etapa.

“En la vida hay algo peor que el fracaso: el no haber intentado nada”

Franklin D. Roosevelt.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
Capítulo 1. Antecedentes	
1.1 Generalidades del limón.	4
_1.1.1 Definición y clasificación del limón.	4
_1.1.2 Importancia	5
_1.1.3 Producción del limón	6
_1.1.4 Calidad del limón	8
_1.1.5 Daños que puede sufrir el limón	8
_1.1.6 Posibles hongos en el limón	9
_1.1.7 Tratamientos para evitar hongos	10
1.2 Generalidades de los Polisacáridos	14
_1.2.1 Estructura y características	14
_1.2.2 Obtención	14
_1.2.3 Quitosán	15
_1.2.4 Aplicaciones del Quitosán	15
_1.2.5 Quitosán como recubrimiento de alimentos	17
_1.2.6 Funciones antibacterianas y fungicidas del quitosán en alimentos	18
1.3 Generalidades de los aceites esenciales	19
_1.3.1 Propiedades de los aceites esenciales	20
_1.3.2 Aceites esenciales como recubrimientos de alimentos	22
Capítulo 2. Metodología Experimental	
2.1 Definición de .	24
2.2 Cuadro Metodológico.	25
2.3 Materiales y Métodos	26
_2.3.1 Actividades Preliminares	26
_2.3.2 Objetivo Particular 1	34
__2.3.2.1 Aislación de los hongos patógenos	34
__2.3.2.2 Purificación de los hongos patógenos	34
__2.3.2.3 Identificación de los hongos patógenos	36
_2.3.4 Objetivo Particular 3	38

__2.3.4.1 Recubrimiento de limones con quitosán al 0.5% y el aceite esencial elegido	38
__2.3.4.2 Pruebas de Calidad de recubrimiento elegido	39
Capítulo 3.. Resultados y Discusión	
3.1 Obtención del quitosán	44
__3.1.1 Caracterización	44
3.2 Objetivo Particular 2	47
3.3 Objetivo 3	54
__3.3.1 Color	55
__3.3.2 Determinación del Ph	56
__3.3.3 Cantidad de jugo	56
__3.3.4 Determinación de acidez	57
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE LIMÓN EN MÉXICO _____	8
FIGURA 2. HONGOS QUE PUEDEN LLEGAR A PRESENTAR LOS LIMONES. _____	10
FIGURA 3. APLICADOR DE CASCADA PARA CONTROL QUÍMICO FUENTE: _____	12
FIGURA 4. APLICACIÓN DE LA QUITINA Y EL QUITOSÁN EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS ____	16
FIGURA 5. APLICACIÓN DE LA QUITINA Y EL QUITOSÁN EN LA AGRICULTURA. _____	17
FIGURA 6. QUITOSÁN COMO RECUBRIMIENTO DE ALIMENTOS. _____	18
FIGURA 7. ACEITES ESENCIALES. _____	19
FIGURA 8. CUADRO METODOLÓGICO _____	25
FIGURA 9. PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSÁN _____	26
FIGURA 10. QUITOSÁN OBTENIDO. _____	26
FIGURA 11. ALMACENAMIENTO DEL QUITOSÁN _____	27
FIGURA 12. DETERMINACIÓN DE GRADO DE DESACETILACIÓN DE QUITOSÁN POR TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA. _____	28
FIGURA 13. DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DEL QUITOSÁN POR VISCOSIMETRÍA.	30
.FIGURA 14. FILTRACIÓN DE SOLUCIONES. _____	31
FIGURA 15. MONTAJE DEL VISCOSÍMETRO. _____	31

FIGURA 16. VISCOSÍMETRO DE OSTWALD. _____	32
FIGURA 17. <i>PENICILLIUM ITALICUM</i> EN LIMÓN. _____	35
FIGURA 18. <i>PENICILLIUM DIGITATUM</i> EN LIMÓN (1) Y <i>ALTERNARIA CITRI</i> (2). _____	35
FIGURA 19. RECUBRIMIENTO DE LIMONES CON SOLUCIÓN DE QUITOSÁN Y ACEITE ESENCIAL. _____	39
FIGURA 20. ESCALA PANTONE DE LA COLORACIÓN DEL LIMÓN. _____	40
FIGURA 21. COLORACIÓN DE LOS LIMONES _____	40
FIGURA 22. BOLSA MARCADA CON EL NÚMERO 1 ES QUITINA Y BOLSA MARCADA CON EL NÚMERO 2 ES QUITOSÁN _____	44
FIGURA 23. CURVA DE VALORACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN. _____	45
FIGURA 24. GRÁFICO PARA LA OBTENCIÓN DE LA VISCOSIDAD INTRÍNSECA. _____	46
FIGURA 25. GRÁFICO DE LA PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS DE LOS LIMONES RECUBIERTOS CON QUITOSÁN AL 0.5% Y ACEITE ESENCIAL DE NARANJA. _____	54
FIGURA 26. COMPARACIÓN DEL COLOR DE LOS LIMONES UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN CON LA ESCALA PANTONE ESTABLECIDA EN LA NORMA. _____	55

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. VALORES DE PH DE ALGUNAS SOLUCIONES (CONEVYT,2008) _____	4
TABLA 2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS EN DIFERENTES FRUTOS.. _____	13
TABLA 3. LOS ACEITES ESENCIALES CON EFECTO FUNGICIDA CONTRA ALGUNAS ESPECIES DE HONGOS POSTCOSECHA IMPORTANTES EN LA PRODUCCIÓN HORTOFRUTÍCOLA. _____	20
TABLA 4. CANTIDAD DE ÁCIDO ACÉTICO UTILIZADO EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSÁN. _____	37
TABLA 5. INHIBICIÓN DE <i>ALTERNARIA CITRI</i> CON QUITOSÁN A DIFERENTES CONCENTRACIONES. _____	47
TABLA 6. INHIBICIÓN DE <i>PENICILLIUM DIGITATUM</i> CON QUITOSÁN A DIFERENTES CONCENTRACIONES. _____	47
TABLA 7. CRECIMIENTO DE <i>PENICILLIUM ITALICUM</i> CON QUITOSÁN A DIFERENTES CONCENTRACIONES. _____	47
TABLA 8. PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS DE LOS LIMONES RECUBIERTOS CON QUITOSÁN A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (2000 PPM). _____	48
TABLA 9. PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS DE LOS LIMONES RECUBIERTOS CON QUITOSÁN A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (2000 PPM). _____	50
TABLA 10. PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS DE LOS LIMONES RECUBIERTOS CON QUITOSÁN A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (2000 PPM). _____	52
TABLA 11. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA PÉRDIDA DE PESO DEL LIMÓN CONTROL (SIN TRATAMIENTO) Y DE LOS LIMONES RECUBIERTOS CON LA FORMULACIÓN ELEGIDA. _____	54
TABLA 12. VALORES DE PH DEL LIMÓN CON EL RECUBRIMIENTO ELEGIDO. _____	56

TABLA 13. RESULTADOS DE LA CANTIDAD DE JUGO CONTENIDA EN LOS LIMONES  
RECUBIERTOS CON LA FORMULACIÓN ELEGIDA. \_\_\_\_\_ 56

TABLA 14. PORCENTAJE DE ÁCIDO CÍTRICO CONTENIDO EN LOS LIMONES RECUBIERTOS  
CON LA FORMULACIÓN ELEGIDA. \_\_\_\_\_ 57

## INTRODUCCIÓN

España, Argentina y México son los exportadores de limón más importantes. España y Argentina dominan el mercado mundial de exportaciones de limones frescos. La FAO ubica a México como el segundo productor de limón y como el tercer exportador a nivel mundial.

Aproximadamente el 20 por ciento de la producción fresca de limón en México se exporta, los principales destinos para las exportaciones son Estados Unidos, Países Bajos, Reino Unido, Canadá y Japón, mientras que más de la mitad de la producción industrial se comercializa. Argentina e Italia son los principales proveedores de zumos de limón en el mercado mundial (FAO, 2004). Las importaciones de limones y limas representan aproximadamente el 27 por ciento del consumo mundial.

Pese a la gran producción de limones también hay muchas pérdidas, se ha reportado que durante el manejo postcosecha de los productos vegetales se pueden estimar pérdidas hasta del 40% del total cosechado, estas varían entre productos, áreas de producción y época del año. De las principales razones que generan estas pérdidas está la incidencia de enfermedades causadas principalmente por hongos de diversos géneros (Mármol, 2011).

Las tendencias actuales de la industria alimentaria van encaminadas hacia la obtención de alimentos más sanos y seguros, de acuerdo con los principios de sostenibilidad y respeto al medio ambiente. Sin embargo, para el tratamiento postcosecha de la podredumbre de los cítricos se utilizan mayoritariamente productos químicos de síntesis fundamentalmente por la facilidad de aplicación y bajo costo (Vargas, et al. 2007). El uso masivo y, en ocasiones poco controlado, de estos productos genera una serie de problemas medioambientales y sanitarios. Así pues, el empleo de agentes antimicrobianos de origen natural para la conservación de frutas y hortalizas en fresco resulta especialmente interesante. El quitosán ha demostrado tener actividad contra un amplio espectro de patógenos, la cual puede ser manifestada de dos formas: por inhibición del crecimiento de patógenos y por la inducción de resistencia sistémica a infección de patógenos.

A partir de su descubrimiento, el quitosán ha tenido diversas aplicaciones entre ellas la formación de películas, siendo empleadas de manera exitosa como recubrimiento de alimentos (Ali, 2012).

Existen numerosos reportes que mencionan significativas reducciones de pudriciones postcosecha en numerosas frutas y hortalizas, cuando fueron tratadas con diferentes dosis de quitosán antes del almacenamiento, retardando el inicio y el proceso de infección

(Bautista, 2005) (Salvador A. 2003). Se ha observado que los aceites esenciales al igual que el quitosán tienen acción antibacteriana y antifúngica utilizando estos como recubrimiento de alimentos para alargar su vida útil (Kim, 1995).

Debido a lo anterior como hipótesis de este trabajo se tiene que al combinar el quitosán con el aceite esencial de naranja se logrará alargar la vida útil de los limones.

# **CAPÍTULO I.**

## **ANTECEDENTES**

## 1.1 Generalidades del limón.

### 1.1.1 Definición y clasificación del limón.

El limonero es un árbol frutal de la familia de las Rutáceas que tiende a desarrollar un porte cónico, pudiendo alcanzar unos 4 o 5 metros de altura. La madera es dura y amarilla y se emplea en ebanistería. Las ramas son espinosas en muchas de las variedades. Tiene hojas perennes, ovales u oblongas, dentadas, aromáticas y de color verde intenso. Es de crecimiento rápido. Es un árbol de hoja perenne muy conocido por sus frutos ovoides, su corteza es lisa, con ramas flexuosas y espinosas, hojas canáceas, ovales-oblongas, aserradas en los bordes; sus flores son blancas, solitarias o en pareja. Los frutos denominados linones son variables en su forma y grosor según las variedades, su corteza es rica en aceites y esencias muy aromáticas y la pulpa es ácida y perfumada.

El pH del limón es de 2, como se muestra en la tabla 1.

Escala de concentraciones pH	
pH	Soluciones que típicamente tienen este pH
pH=0	ácido de bacteria
pH=1	ácido estomacal
pH=2	jugo de limón, vinagre
pH=3	toronja, jugo de naranja, gaseosas
pH=4	jugo de tomate, lluvia ácida
pH=5	café negro, agua de lluvia
pH=6	orina, saliva
pH=7	agua "pura"
pH=8	agua de mar
pH=9	bicarbonato
pH=10	leche de magnesia
pH=11	amoníaco
pH=12	agua jabonosa, cloro
pH=13	limpiador de hornos
pH=14	limpiado líquido de drenajes

**Tabla 1.** Valores de pH de algunas soluciones (CONEVyT,2008)

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural e hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre. Procede de Asia Menor, traído a Europa por los árabes.

Las flores tienen una corola formada por 5 pétalos. Son de color rosa oscuro antes de abrirse y blancas cuando se abren, desprendiendo un perfume muy agradable. La mayoría de los limoneros tiene varias floraciones al año, por lo que coinciden a la vez las flores con los frutos verdes y maduros.

### 1.1.2 Importancia

El limón es un cítrico de suma importancia que nos ayuda a la elaboración de productos industriales y también tiene muchos beneficios medicinales mostrados a continuación:

- El limón es bueno para enfermedades del hígado y de la vesícula biliar ya que estimula las secreciones biliares, es eficaz porque ayuda a digerir los alimentos grasos. Una cucharada sopera de aceite de oliva virgen con un chorrito de limón en ayunas tienen un efecto sorprendente sobre hígado y vesícula.
- Ideal para combatir la hipertensión arterial ya que contiene un elevado nivel de potasio y un bajo contenido en sodio. Si hay que evitar la sal, el limón puede servir para aderezar carnes, pescados y ensaladas.
- Es rico en vitamina C, tiene efecto refrescante y la capacidad depurativa del hígado lo hacen muy conveniente ante una fiebre o proceso gripal, además esta riqueza de vitamina C y bioflavonoides es ideal para fortalecer los capilares y evitarla tendencia a alergias, hematomas y venitas en forma de araña, también es antihemorrágico y recomendable para evitar el escorbuto.
- Mejora las afecciones de garganta (anginas, faringitis, etc.). Los diabéticos se beneficiarían en gran manera bebiendo agua con un chorrito de limón, lo cual depura, remineraliza y estimula al Páncreas y al Hígado.
- Se prohíbe el uso en personas reumáticas ya que se considera muy ácido pero realmente tiende a eliminar la acidez del organismo ya que estos ácidos son metabolizados durante la digestión para producir carbonato potásico. Eso favorece

precisamente la neutralización del exceso de ácidos en el organismo, pudiendo aliviar los dolores reumáticos y artríticos.

- Puede ser de gran ayuda en algunas congestiones y dolores de cabeza si van relacionados con el hígado; por ejemplo cuando sobrevienen tras una comida grasa o copiosa.
- En el sistema *Genito - urinario* como diurético y en la Piel y las *mucosas* como antifúngico y antibacteriano.
- Digestivas: que ayuda a expulsar gases y propiedades laxantes. Se recomienda para el tratamiento de cólicos producidos por mala digestión, estreñimiento o dolor de cabeza causado por digestiones difíciles y prolongadas.
- Ayuda a mantener sano el cabello. Es bueno disolverlo en agua para enjuagar los cabellos y mantenerlos brillosos y desgrasados.

## Usos industriales

- El limón es ampliamente utilizado en la elaboración de licores, perfumes, dulces y confituras, también es empleado para purificar el agua que no es potable adicionándoles algunas gotas de su jugo a un vaso de agua (EcuRed, 2014).

### 1.1.3 Producción del limón

La producción y el consumo mundiales de cítricos han registrado un fuerte crecimiento desde mediados de los años 80's. La producción de naranjas, tangerinas, limones y limas ha aumentado rápidamente, y aún más los productos cítricos elaborados, gracias a las mejoras introducidas en el transporte y en el empaquetado que han reducido los costos y mejorado la calidad (FAO, 2010).

México es el principal productor de limón en el mundo con más de 86,000 hectáreas plantadas y un volumen de producción anual superior a 1 millón 121 mil toneladas. De acuerdo a la superficie, le sigue en importancia la India y Perú con 30,000 y 17,500 hectáreas respectivamente.

Los principales estados productores son *Colima*, Michoacán, Oaxaca y Guerrero, localizados en las costas del Pacífico Mexicano. Colima produce aproximadamente el 45% de la producción nacional.

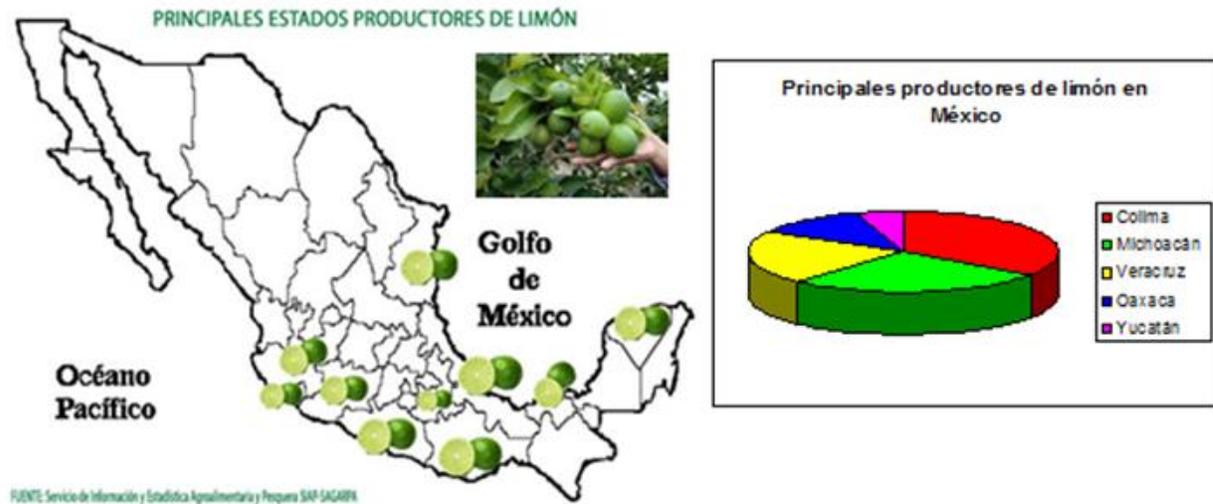
De la fruta cosechada, aproximadamente el 40% se destina para consumo en fresco y el 60% a la industria, para la obtención de aceite esencial, jugo concentrado y pectinas. De estos derivados, el más importante es el aceite esencial destilado el cual tiene mercado de exportación principalmente a los Estados Unidos (Costos-Producción del limón, 2011)

Los limones y las limas se producen principalmente para el mercado de productos frescos, y el zumo de limones y limas se utiliza primordialmente para dar sabor a las bebidas. Los limones se producen generalmente en climas templados, como en el oeste de los Estados Unidos, España, Italia y Argentina, pero también se adaptan a climas más secos, como los de Egipto y el Irán. Por otra parte, las limas son muy sensibles a los climas fríos y se producen exclusivamente en climas tropicales. Los productores principales son México y el Brasil.

## **Comercio**

España, Argentina y México son los exportadores más importantes. España y Argentina dominan el mercado mundial de exportaciones de limones frescos. México es con mucho el principal exportador de limas frescas. Aproximadamente el 20 por ciento de la producción fresca se exporta, mientras que más de la mitad de la producción elaborada se comercializa. Argentina e Italia son los principales proveedores de zumos de limón en el mercado mundial (FAO, 2004).

Las importaciones de limones y limas representan en México aproximadamente el 27 por ciento del consumo mundial.



Colima : 525,802.75 toneladas, Michoacán : 407,784.16 toneladas, Veracruz : 318,047.59 toneladas,  
Oaxaca : 181,906.34 toneladas, y Yucatán: 75,627.28 toneladas.

**Figura 1.** Representación gráfica de los principales estados productores de limón en México (SAGARPA y SIAP, 2005).

### 1.1.4 Calidad del limón

La calidad del limón se puede observar mediante las siguientes características.

- Limones enteros, firmes, consistentes al tacto con la forma y color.
- Homogéneos en variedad y tamaño.
- Limpios libres de cualquier olor, sabor, humedad o material extraño.
- Libres de daños, enfermedades, magulladuras, cortes, cicatrices, insectos o cualquier daño ocasionado por éstos.
- El pedúnculo deberá ser cortado de raíz.

### 1.1.5 Daños que puede sufrir el limón

Los limones pueden sufrir daños por enfermedades y plagas, muchas las enfermedades que afectan a los cítricos en todo el mundo y se les puede agrupar según el agente causal en:

Criptogámicas, son causadas por hongos; virósicas, se han constituido en el peligro más grave que afronta la industria citrícola ya que no existe ninguna forma de control químico.

Una plaga que ataca al limón es el **ácaro de las maravillas**. Suele aparecer allí donde existe una humedad ambiental alta y resulta muy difícil de observar a simple vista. Este ácaro se alimenta de las yemas, lo que provoca que éstas mueran y no se desarrollen nuevas hojas, o bien, que en éstas aparezcan deformaciones. Lo mismo sucede con los frutos, ya que también ataca a las flores, donde muchas de ellas acaban abortando, o bien, desarrollando frutos con intensas deformaciones, lo que provoca que no puedan consumirse.

Otra plaga es el **minador de los cítricos**. Insecto que ataca principalmente a las hojas jóvenes del Limonero, cuyo ataque se caracteriza por la forma de alimentarse de las larvas, las cuales, van formando una especie de galería a lo largo de toda la hoja, rompiendo con ello la cutícula de éstas. A consecuencia de ello, la hoja acaba por enrollarse y secarse.

Otro tipo de daño en el limón es por magulladuras y mal manejo del producto.

#### 1.1.6 Posibles hongos en el limón

- Podredumbre gris de las flores. Se observa manchas de color grisáceo, ya sea en los pétalos antes de haberse iniciado la fructificación, o bien en los pétalos o base de los frutos; la capa grisácea llega a cubrir totalmente los tejidos invadido ocasionando que se marchiten de las flores y la caída de los frutos recién formados. Su agente causal es el hongo *Botrytis cinerea deb* (parásito).

Los siguientes hongos provocan la pudrición del fruto.

- **Pudrición negra.** Difícil de diagnosticar, pues el ataque del hongo es interno (*Alternaria citri*).
- **Pudrición parda.** Inicia con una ligera decoloración; presenta varias tonalidades: Oliva, pardo y finalmente color castaño.
- **Moho azul.** Tanto en campo como en frutos almacenados, se transmite por contacto (*Penicillium italicum*)
- **Moho verde.** Requiere de herida o lesión para su infección (*Penicillium digitatum*)



**Figura 2.** Hongos que pueden llegar a presentar los limones.

### 1.1.7 Tratamientos para evitar hongos

Una alternativa con potencial viable para la conservación de frutas y vegetales frescos es la utilización de recubrimientos comestibles multicomponentes, los cuales pueden elaborarse con ingredientes básicos adecuados al producto para brindarle la protección de barrera deseada y además, sirven como vehículos para incorporar aditivos específicos que refuerzan su funcionalidad tales como antioxidantes, colorantes y antimicrobianos, que en el caso de estos últimos se evitaría el crecimiento de microorganismos patógenos en la superficie de los productos vegetales.

Para disminuir el problema de contaminación de las frutas con hongos, es indispensable desinfectar periódicamente las instalaciones del centro de selección y empaque. Para reducir la concentración de esporas en el aire se recomienda eliminar frecuentemente las frutas podridas, limpiar el área de recepción de la fruta, ya que a su arribo a la estación los envases y las frutas pueden contener tierra, y ventilar las instalaciones al final de la jornada. La desinfección cotidiana debe incluir los equipos y materiales utilizados en el centro de selección y empaque. La desinfección puede realizarse utilizando agua limpia a presión, de preferencia caliente. Para los equipos se puede utilizar hipoclorito de sodio al 2 %, amonio cuaternario al 2 % o formaldehído al 1 o 2 %. El cloro activo destruye por contacto la mayoría de las esporas de los hongos y el amonio cuaternario es efectivo en contra de las bacterias y algunos hongos. Las instalaciones deben desinfectarse periódicamente, para evitar problemas de contaminación, vaporizando formaldehído o formol a una dosis de 10 g/metro

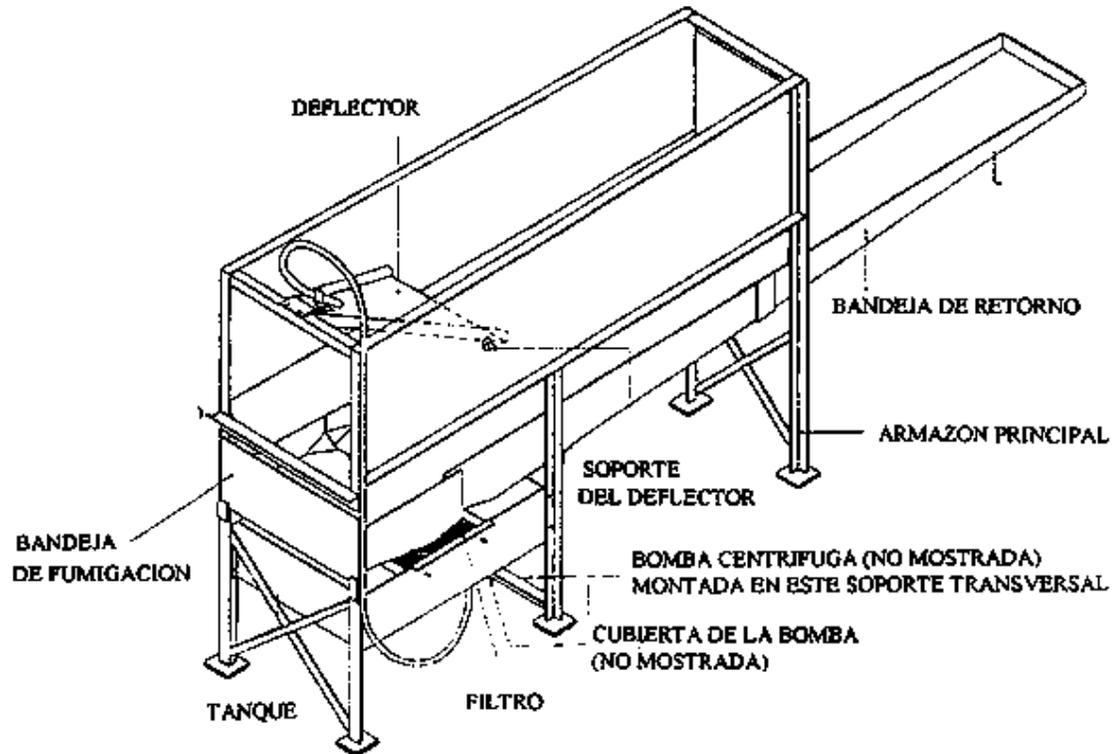
cúbico. Para que el tratamiento sea eficaz, el centro de selección y empaque debe hermetizarse y permanecer cerrado durante 24 horas. Después del tratamiento es necesario ventilar el local durante 48 horas. Cuando no es posible hermetizar, la desinfección se puede llevar a cabo pulverizando formol al 2 %, aunque su eficacia es menor comparativamente a la vaporización. Además de las instalaciones, también deben desinfectarse periódicamente los envases utilizados para la recolección de la fruta cosechada.

#### **a) Control químico**

El lavado del producto con agua clorada puede prevenir el deterioro ocasionado por bacterias, hongos y levaduras. Compuestos químicos como el hipoclorito cálcico (en polvo) y el hipoclorito sódico (líquido) son baratos y fáciles de conseguir. La eficacia del tratamiento disminuye si la materia orgánica contamina el agua de lavado.

Cuando la fruta se empaca para la exportación, los fungicidas se aplican frecuentemente para cumplir los requerimientos de los reglamentos internacionales y para reducir el deterioro durante el transporte.

El "aplicador en cascada" se desarrolló para aplicar los fungicidas uniforme y eficazmente, usando una cortina de líquido para remojar la fruta. La fruta colocada en una bandeja plástica horadada, se introduce sobre una banda transportadora de rodillo dentro del aplicador; en el interior, un deflector en forma de ventilador sencillo crea una cortina de líquido fungicida. La fruta pasa por debajo de la cortina donde se remoja. Seguidamente la fruta sale del aplicador para drenar en una bandeja de retorno inclinada. El tanque retiene hasta 50 litros de solución de fungicida y una bomba se instala a nivel de la salida del tanque. Un filtro se ajusta a la parte superior del tanque para eliminar la materia extraña del flujo de retorno del fungicida, desde la caja del aplicador y la bandeja de retorno.



**Figura 3.** Aplicador de cascada para control químico Fuente: (Nat'l Institute of Agricultural Engineering, 1974). Bulletin No. 6. Silsoe, Bedfordshire, England.

### b) Tratamientos térmicos

Los tratamientos postcosecha, con agua caliente o aire caliente forzado se pueden aplicar para aniquilar o inactivar microorganismos patógenos y por ello pueden ser usados como métodos para el control de la podredumbre de frutas y hortalizas frescas. La siguiente tabla proporciona algunos ejemplos:

<b>Mercancía</b>	<b>Patógenos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Posibles daños</b>
<b>Manzana</b>	<i>Gloesporium sp.</i> <i>Penicillium expansum</i>	45	10	Reducción de la vida útil
<b>Pomelo</b>	<i>Phytophthora citrophthora</i>	48	3	
<b>Judía verde</b>	<i>Pythium butleri</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	52	0.5	
<b>Limón</b>	<i>Penicillium digitatum</i> <i>Phytophthora sp.</i>	52	5-10	
<b>Mango</b>	<i>Collectotrichum gloesporioides</i>	52	S	No controla la putrefacción del pedúnculo
<b>Melón</b>	Diversas hongos	57-63	0.5	
<b>Naranja</b>	<i>Diplodia sp.</i> <i>Phomopsis sp.</i> <i>Phytophthora sp.</i>	53	5	Deficiente desverdizado
<b>Papaya</b>	Diversas hongos	48	20	
<b>Melocotón</b>	<i>Monolinia fruticola</i> <i>Rizhopus stolonifer</i>	52	2.5	Daños en la piel
<b>Pimiento</b>	<i>Erwina sp.</i>	52	1.5	Ligero moteado

**Tabla 2.** Tratamientos térmicos para el control de patógenos en diferentes frutos. Fuente: Manual de prácticas de manejo postcosecha de los productos hortofrutícolas a pequeña escala, (Universidad de California, 1995).

Los cítricos son afectados por una cantidad considerable de enfermedades, las cuales en su mayoría son causadas por hongos fitopatógenos (Sampaio- Passos, 2005). A nivel mundial, las pérdidas postcosecha se estiman alrededor del 50% de la producción total y la mayoría de éstas se deben a enfermedades causadas por hongos y bacterias (El Ghaouth, 1997). En frutos en postcosecha, las pérdidas por enfermedades pueden ser del 5 al 20% en países desarrollados y hasta del 50% en países en desarrollo por cuestiones de infraestructura (Janisiewicz y Korsten, 2002). Éste trabajo se hizo con la finalidad de

hallar una alternativa viable para evitar esas pérdidas. Existen alternativas para evitar pérdidas postcosecha como lo son los recubrimientos de alimentos. Se emplean distintos biopolímeros para el recubrimiento sin embargo el quitosán ha demostrado en varios estudios ser un aliado para combatir hongos siendo eficaz e inocuo para los alimentos y para nosotros los consumidores.

## **1.2 Generalidades de los Polisacáridos**

### **1.2.1 Estructura y características**

La quitina (del griego tunic, envoltura) se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y, después de la celulosa (materia base del papel), es el segundo polisacárido en abundancia. Sus fuentes principales son el exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, algas, etc. Sin embargo, la producción industrial de este biomaterial prácticamente se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos (camarones, langostas, cangrejos y krill) debido a la facilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras de estas especies. (Lárez, 2006).

Posee una estructura lineal de alto peso molecular constituida por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -D (1,4). Es altamente insoluble y presenta baja reactividad. La desacetilación parcial de quitina da lugar al quitosán.

### **1.2.2 Obtención**

La obtención de la quitina es con base a la patente número 293022 “Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosano” (Miranda, 2011).

El uso creciente de la quitina, así como de sus derivados, ha sido motivado al hecho de que al contrario de los derivados del petróleo, ésta se obtiene de los subproductos de las industrias pesqueras, fuente naturalmente renovable, no tóxica y no alergénica; además, antimicrobiana y biodegradable.

La quitina es altamente insoluble en agua, propiedad esta que limita sus aplicaciones; se disuelve rápidamente en ácidos concentrados, en algunos fluoroalcoholes y soluciones al 5% de cloruro de litio, lo que la hace poco práctica para su aplicación y presenta baja reactividad. Otras propiedades relevantes de este biopolímero son su alto peso molecular y su estructura porosa favoreciendo una elevada absorción de agua.

### 1.2.3 Quitosán

El quitosán es la forma N-desacetilada de la quitina, es una modificación de la quitina y posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad. Se obtiene al sustituir los grupos acetamido de esta por grupos amino, al tratar la quitina con álcalis fuertes. Se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable (Mármol, 2011).

### 1.2.4 Aplicaciones del Quitosán

Las aplicaciones de la quitina y quitosán son muy amplias, existiendo sectores en los que su utilización es habitual y conocida, y otros en los que constituye actualmente una interesante vía de investigación. A continuación se muestran algunas de las aplicaciones de estos biopolímeros.

**1. Industria de alimentos y bebidas:** En la industria alimentaria la quitina y el quitosán tienen usos como aditivos en los alimentos (espesantes, gelificantes y emulsificantes), como recubrimientos protectores comestibles (Hernández, 2009).

También es utilizado como clarificadores en industrias de bebidas (agua, vino, zumo de manzana y zanahoria) sin afectar el color.

En bebidas como los vinos blancos el oscurecimiento es probablemente uno de los mayores problemas en su comercialización. Este suele ir acompañado de alteraciones en otros caracteres organolépticos además del color, tales como el aroma y el sabor que provocan rechazo del consumidor. Numerosos estudios han identificado la reactividad química de los compuestos fenólicos como la principal causa de las alteraciones.

**2. Tratamiento de aguas:** es una de las áreas de mayor importancia ya que tanto la quitina como el quitosán son materiales ambientalmente amigables, entre los principales usos en esta área se tiene: como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta

alcalinidad; como floculante para remoción de partículas coloidales sólidas y aceites, y para la captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas.



**Figura 4.** Aplicación de la quitina y el quitosán en el tratamiento de aguas (fundacionunam.org.mx).

**3. En la agricultura.** La quitina y sus derivados son efectivos en el control de enfermedades y plagas vegetales. Sus mecanismos de acción están vinculados a su estructura química. Pueden actuar sobre el organismo patógeno, o inducir mecanismos defensivos en las plantas, contra varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha. La adición de quitina y sus derivados al suelo, favorece el crecimiento y la actividad de muchos organismos quitinolíticos, por un efecto sinérgico. Estos constituyen controles biológicos y enemigos naturales de muchos agentes causales de enfermedades y plagas vegetales. Además, favorecen el crecimiento y desarrollo de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, tales como las micorrizas o especies del género *Rhizobium*. A su vez, incrementan la población y la actividad microbiana en el suelo, lo que mejora la disposición de nutrientes y sus propiedades. Como reguladores del crecimiento, aceleran la germinación de las semillas, el vigor de las plantas, y el rendimiento agrícola. Por tanto, por su gran potencial de aplicación en la agricultura, se augura que se utilizarán con una mayor extensión, principalmente como sustitutos de los actuales plaguicidas químicos o como reguladores del crecimiento de las plantas.



**Figura 5.** Aplicación de la quitina y el quitosán en la agricultura.

### 1.2.5 Quitosán como recubrimiento de alimentos

En cuanto a los recubrimientos comestibles, las películas con quitosán son resistentes, duraderas y flexibles, con propiedades mecánicas similares a polímeros comerciales de fuerzas medias. La acción de quitina-quitosán como protector de alimentos frente a microorganismos como bacterias, levaduras y hongo (Zhang y Quantick, 1997; Chien, 2007).

Siendo esto así, el quitosán es una alternativa viable para el recubrimiento de limones con la finalidad de lograr disminuir pérdidas debido a que se ha reportado que durante el manejo postcosecha de los productos vegetales se pueden estimar pérdidas hasta del 40% del total cosechado, estas varían entre productos, áreas de producción y época del año. De las principales razones que generan estas pérdidas está la incidencia de enfermedades causadas principalmente por hongos de diversos géneros (Aular, 2006; Hernández, 2002; El Ghaouth, 1992; Meng., 2008; Sánchez, 2008).



**Figura 6.** Quitosán como recubrimiento de alimentos.

### 1.2.6 Funciones antibacterianas y fungicidas del quitosán en alimentos

Los hongos fitopatógenos generan pérdidas económicas, son controlados frecuentemente por fungicidas sintéticos, los cuales presentan un efecto negativo en la biosfera y provoca el desarrollo de cepas fúngicas resistentes. Actualmente, se buscan alternativas ecológicas para el control de plagas y enfermedades. El quitosán constituye una alternativa para controlar enfermedades postcosecha.

El quitosán es un compuesto que presenta características biofuncionales, por lo que podría ser una alternativa viable para sustituir los métodos de control de microorganismos tradicionales además, puede utilizarse sin problemas para elaborar recubrimientos comestibles (González, 2005).

Incorporación de aditivos en los recubrimientos. Los recubrimientos se pueden utilizar como vehículo de aditivos, los cuales pueden proporcionar al producto vegetal funciones más específicas como una actividad antimicrobiana, para evitar o reducir el crecimiento de microorganismos en su superficie (Rodríguez, 2005). Sin embargo, se ha observado que se requiere de aplicaciones pequeñas para que sus atributos de calidad no se vean afectados (Min y Krotcha, 2005). Dentro de los agentes antimicrobianos incorporados a los

recubrimientos vegetales pueden considerarse a los aceites esenciales (Assis y Pessoa, 2004; Rodríguez, 2005; Rojas, 2006).

### 1.3 Generalidades de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; puede ser para a la polinización o para repeler a los insectos nocivos. Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas. Las esencias son mezclas complejas en cuya composición se encuentran los hidrocarburos como terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y compuestos fenólicos, los cuales son los responsables del aroma que caracteriza a los aceites esenciales (Bakkali, 2008).

Los aceites esenciales se encuentran en abundancia en el reino vegetal y se pueden localizar en diferentes partes de la planta por ejemplo: en hojas como albahaca (*Ocimum basilicum* L.), mejorana (*Origanum majorana* L.), menta (*Mentha rotundifolia* L.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), en raíces de cálamo (*Acorus calamos* L.), valeriana (*Valeriana officinalis* L.), en la corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), cedro (*Cedrela odorata* L.), sándalo (*Santalum album* linn.), en flores como el jazmín (*Jasminum officinale* L.) y en la rosa (*Rosa* sp.). En cáscara de algunas frutas como el limón, mandarina, naranja (*Citrus sinensis* L.) y en frutos de anís (*Pimpinella anisum* L.), cardamomo (*Elettaria cardamomum* L.), eneldo (*Anethum graveolens* L.) e hinojo (*Foeniculum vulgare* Miller.) (Ronquillo, 2007).



**Figura 7.** Aceites esenciales.

### 1.3.1 Propiedades de los aceites esenciales

Una de las propiedades de los aceites esenciales es la actividad antifúngica, ésta se asocia al contenido de fenoles monoterpenos especialmente el de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) y clavo (*Eugenia Caryophyllata* Thunb). Su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma del patógeno y su modo de acción parece estar estrechamente relacionado con la solubilidad de cada compuesto (Ronquillo, 2007). Se ha reportado toxicidad en humanos por la utilización de los aceites esenciales puros o en altas concentraciones, ocasionando desde irritaciones en la piel hasta cáncer. Sin embargo, la utilización de aceites en concentraciones mínimas no genera alteraciones en el organismo, siendo además productos considerados como GRAS (Bakkali., 2008; Pepeljnjak, 2003; Zacchino, 2003).

Está claro que los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas, sin embargo su mecanismo de acción aún no está definido. Algunos autores mencionan que un posible mecanismo de acción de los aceites sobre el crecimiento de los hongos es debido a los constituyentes con alta hidrofobicidad presentes en la célula, lo que ocasiona trastornos en la permeabilidad y en el transporte de iones y de otros compuestos, así como en la separación de componentes lipídicos de la membrana celular y la mitocondria (Quintana, 2010).

Los aceites esenciales han mostrado una actividad fungicida contra patógenos postcosecha en un amplio intervalo de hongos como se muestra en la tabla 3 (Daferera, 2000).

Patógeno	Aceite	Concentración	Resultados	Referencias
<i>Alternaria citri</i>	Thymus vulgaris L.	250 mg L <sup>-1</sup>	Inhibición del crecimiento micelial	Arras y Usai, 2001
<i>Botrytis cinérea</i>	Cymbopogon martini Rox Zyzygiun aromaticum L.	7800 mg L <sup>-1</sup>	Inhibición de la germinación	Wilson, 1997
<i>Penicillium digitatum</i> <i>P. italicum</i> <i>P. citrinum</i>	T. vulgaris L., C. sinensis L. Poncirus trifoliata L.	250, 275, 246 mg L <sup>-1</sup>	Inhibición del crecimiento micelial	Arras y Usai, 2001 Caccioni et. al., 2005
<i>Fusarium graminearum</i>	Anethum graveolens Christm Citrus aurantifolia Christm	6 mg L <sup>-1</sup> 300 mg L <sup>-1</sup>	Inhibición del crecimiento micelial	Singh et al., 2005 Mishra y Dubey, 1994
<i>Aspergillus Flavus</i> <i>A. niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Mentha viridis L. Ageratum conyzoides L. Rosmarinus officinales L.	300 mg L <sup>-1</sup>	Retarda el crecimiento	Yang y Clausen, 2007

**Tabla 3.** Los aceites esenciales con efecto fungicida contra algunas especies de hongos postcosecha importantes en la producción hortofrutícola.

La actividad bactericida de los aceites esenciales ha sido reportada por varios autores. Esta actividad podría estar relacionada a la respectiva composición de aceites volátiles de cada planta, a la configuración estructural de los componentes constituyentes de los aceites, a sus grupos funcionales y a posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes (Dorman y Deans, 2000).

En la tabla 3 podemos apreciar que el aceite esencial de *T. vulgaris* L. (aceite esencial de tomillo), *C. sinensis* (aceite esencial de naranja) tienen efecto fungicida para los hongos que atacan al limón, y también se incluyó en este proyecto el aceite esencial de limón (*Citrus limonum*) que cuenta de igual manera con propiedades antifúngicas.

### **Aceite esencial de tomillo**

El **tomillo**, cuyo nombre científico es *Thymus vulgaris*, es una planta muy familiar que crece de manera silvestre por muchos rincones de nuestra geografía y del Mediterráneo en general. El aceite esencial de tomillo, que se extrae a partir de sus hojas y tiene un olor herbal y fresco, es una sustancia extremadamente concentrada que nos puede servir en numerosas ocasiones para tratar distintas dolencias y afecciones de la piel, así como otros asuntos relacionados con la salud.

### **Aceite esencial de limón y naranja.**

El aceite esencial de limón y naranja contiene más del 90 % de d-limoneno, componente mayoritario en su composición normal y además, en menor proporción poseen una gran cantidad de terpenos (Weiss, 1997).

Los aceites esenciales de cítricos son insolubles en agua, pero se hacen más solubles cuando se emplean en bajas concentraciones usando alcohol como disolvente.

De la naranja, no solamente se aprovechan los jugos alimenticios, sino que de la cáscara de la naranja se pueden obtener aceites que se utilizan como aromatizantes en diferentes industrias. Su aceite esencial es uno de los ingredientes básicos en las industrias de perfumería, alimentos, agronómica y farmacéutica

### 1.3.2 Aceites esenciales como recubrimientos de alimentos

Los recubrimientos se pueden utilizar como vehículo de aditivos, los cuales pueden proporcionar al producto vegetal funciones más específicas como una actividad antimicrobiana, para evitar o reducir el crecimiento de microorganismos en su superficie (Rodríguez, 2005). Sin embargo, se ha observado que se requiere de aplicaciones pequeñas para que sus atributos de calidad no se vean afectados (Min y Krochta, 2005). Dentro de los agentes antimicrobianos incorporados a los recubrimientos vegetales pueden considerarse a los aceites esenciales (Assis y Pessoa, 2004; Rodríguez., 2005; Rojas, 2006).

En la actualidad, varios autores han utilizado los aceites esenciales como aditivos en las formulaciones de sus recubrimientos. La incorporación de agentes antimicrobiales como es el caso de los aceites esenciales (anís, cárdamo y tomillo) en películas, cubiertas o empaques, se ha probado en varios productos alimenticios como carne y productos de panadería, inhibiendo el desarrollo de hongos, bacterias y levaduras (Cagri., 2004; Plotto, 2003; Bosquez–Molina, 2010).

# **CAPITULO II.**

# **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## 2.1 Definición de Objetivos

### Objetivo General

Evaluar un recubrimiento a base de quitosán y aceite esencial de naranja en limón agrio a través de pruebas de calidad, para alargar su vida útil.

### Objetivos Particulares

1. Aislamiento de los principales hongos que provocan la pudrición del limón mexicano (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Alternaria citri*) a partir de frutos dañados utilizando distintos medios de cultivo.
2. Evaluar el crecimiento de los hongos aislados del limón *in vitro* e *in vivo* con diferentes concentraciones de quitosán y aceites esenciales a una concentración dada para formular el recubrimiento que permita la protección del fruto.
3. Evaluar la calidad del limón recubierto con quitosán y aceite esencial elegido mediante parámetros de calidad (color, acidez titulable, cantidad de jugo, pH y pérdida de peso) para conocer su tiempo de vida útil.

2.2 Cuadro Metodológico.

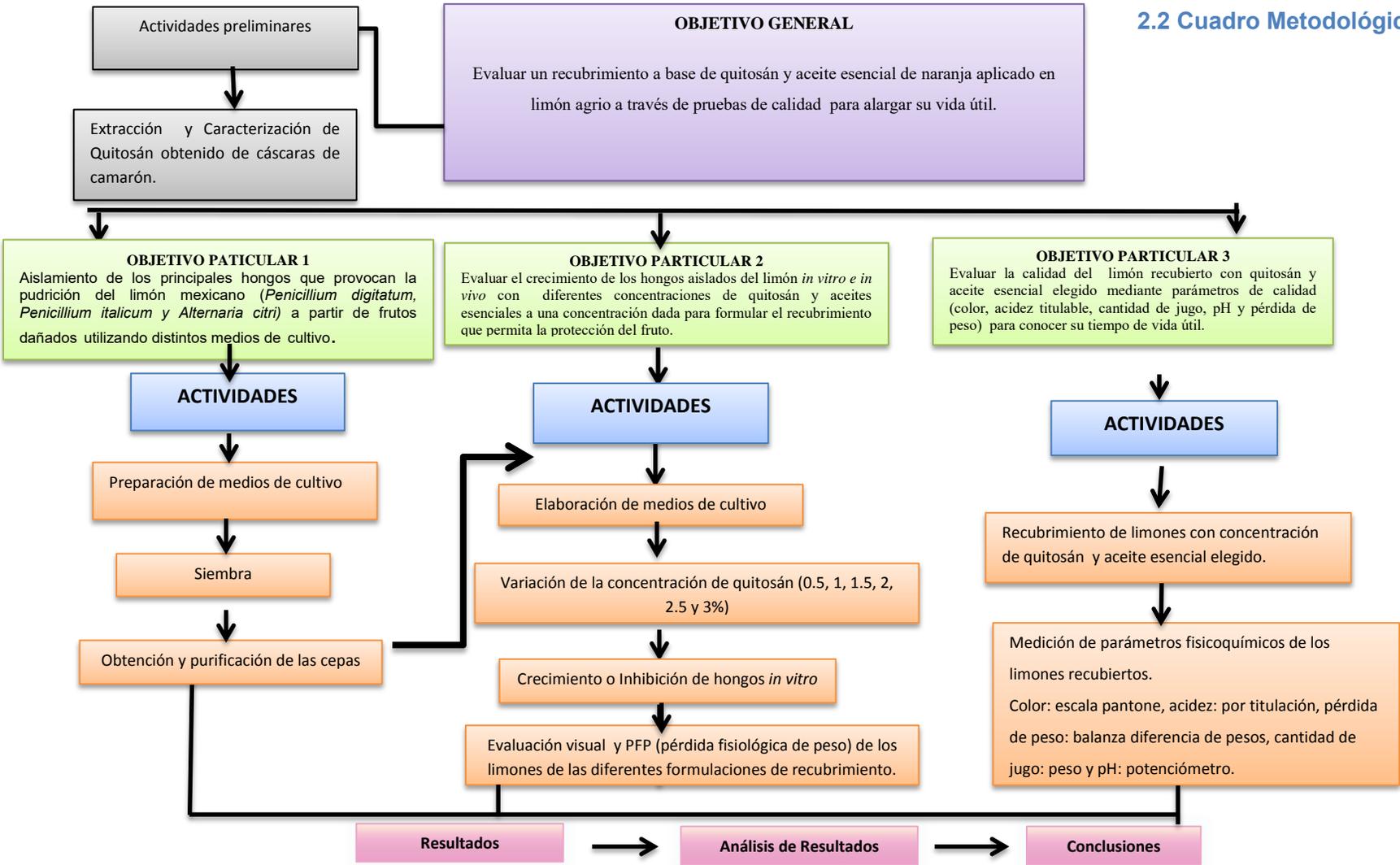


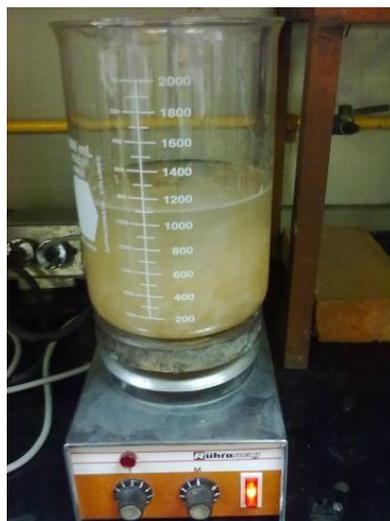
Figura 8. Cuadro Metodológico

## 2.3 Materiales y Métodos

### 2.3.1 Actividades Preliminares

#### Obtención del quitosán

Dicha obtención se llevó a cabo de acuerdo a la Patente Mexicana No. 293022 “Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosano”. La figura 9 es una muestra representativa del proceso de obtención del quitosán.



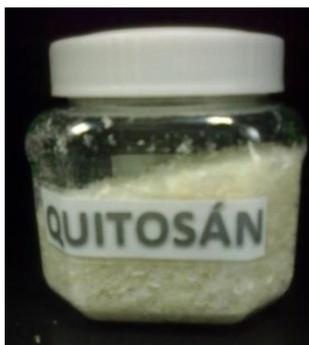
**Figura 9.** Proceso para la obtención de quitosán

Una vez realizado el procedimiento establecido en la patente 293022, se obtiene el quitosán, el cual tiene un aspecto como el que se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Quitosán obtenido.

Una vez obtenido el quitosán, se almacenó en un frasco a temperatura ambiente.



**Figura 11.** Almacenamiento del quitosán

### **Caracterización de quitosán**

#### **Determinación del grado de desacetilación**

- El grado de desacetilación del quitosán obtenido se determinó según la técnica de titulación potenciométrica de los grupos aminos descrita en el manual de caracterización del quitosán del Laboratorio de Biotecnología (Hidalgo & Miranda, 2013)

#### **Materiales y Equipo:**

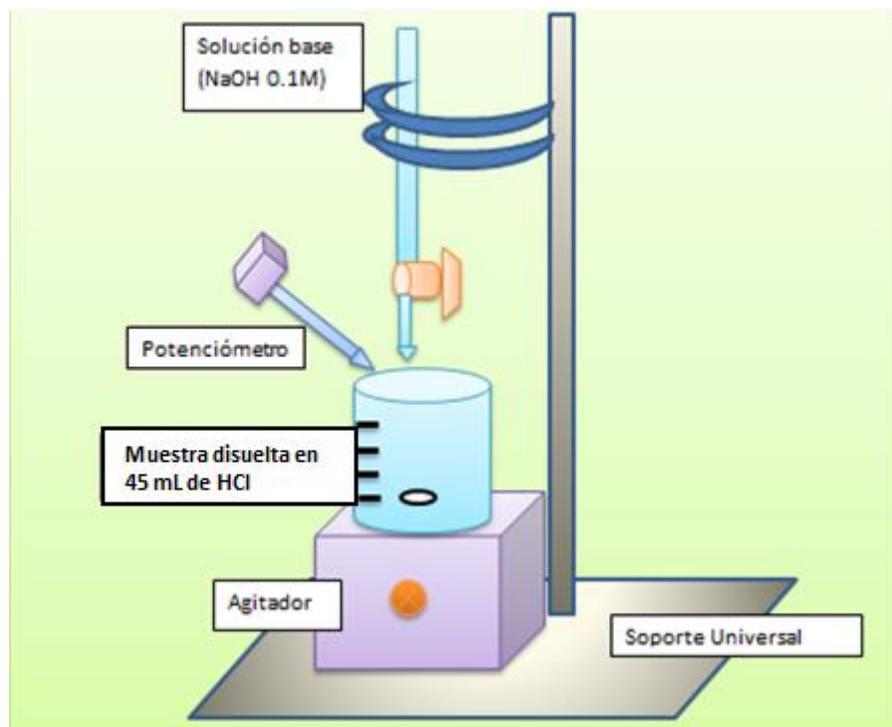
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Parrilla con agitación
- Potenciómetro modelo 5997-20, marca HORIZON ECOLOGY CO, con escala de pH de 0-14 y rango de temperatura de 0 a 100°C
- Bureta de 25 mL
- Soporte universal
- Piseta
- Probeta graduada de 50 mL

Reactivos: ácido clorhídrico 0.2 M, hidróxido de sodio 0.1M y solución buffer (pH=7)

Procedimiento:

1. Se secaron aproximadamente 0.4 gramos de quitosán a 105 °C en el horno.
2. Se calibró el potenciómetro con una solución buffer estandarizada para asegurar una lectura confiable.

3. En una balanza analítica se pesaron en un vaso de precipitados de 100 mL 0.3 gramos del quitosán que previamente se puso a secar, se midieron 45 mililitros de HCl 0.2M en una probeta graduada de 50mL.
4. Se vertieron los 45 mL De HCl 0.2 M en el vaso en el que se encontraba el quitosán, se colocó una mosca y se puso el vaso sobre la parrilla y se encendió el agitador para disolver el quitosán en el HCl.
5. Se montó la bureta graduada de 25 ml en un soporte universal y se vertió el NaOH como en la figura 12.



**Figura 12.** Determinación de grado de desacetilación de quitosán por titulación potenciométrica.

Se valoró la solución de quitosán/HCL adicionando NaOH 0.1 M. Se midió el cambio de pH después de cada mililitro de NaOH 0.1 M añadido hasta llegar a un pH de 11. La adición se realizó de manera lenta y con agitación para asegurar la homogeneización de la solución. (Se realizaron 3 réplicas).

Una vez obtenidos los datos se construyó una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido. Dicha curva presenta dos puntos de inflexión, cuya diferencia corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio requerido para neutralizar los grupos aminos protonados del quitosán, lo que permite determinar el porcentaje de grupos amino de la muestra, y en consecuencia, el grado de desacetilación del quitosán.

Secuencia de cálculo para la obtención del grado de desacetilación:

6. Obtención del volumen gastado en litros

$$V_p = \frac{\text{Punto de inflexión 2 (mL)} - \text{Punto de inflexión 1 (mL)}}{2000}$$

Dónde:

V<sub>p</sub>= Volumen promedio gastado en L

7. Cálculo de la masa equivalente del quitosán

$$Meq = \frac{m (g)}{[NaOH] * V_p}$$

Dónde:

Meq= es la masa en equivalentes

m= es la masa del quitosán en gramos

[NaOH]= es la concentración de NaOH en molaridad

V<sub>p</sub>= volumen promedio gastado en L

8. Cálculo del grado de Acetilación y Grado de Desacetilación

$$\%GA = \left( \frac{203}{Meq + 42} \right) 100$$

$$\%GD = 100 - GA$$

## Determinación del Peso molecular del Quitosán

La ecuación de Mark-Houwink-Sakurada proporciona una dependencia entre la viscosidad intrínseca de un polímero y su peso molecular. Es por ello, que se puede utilizar la técnica viscosimétrica, para determinar el peso molecular promedio viscosimétrico de muestras de un polímero como el quitosán.

Técnica: Viscosimetría capilar (Rinaudo et al., 1993)

### Materiales y equipo:

- Equipo montado como se muestra en la figura 13
- Viscosímetro Ostwald
- Cronómetro
- Papel filtro
- Embudo
- Propipeta



**Figura 13.** Determinación de peso molecular del quitosán por viscosimetría.

1. Se preparó una solución buffer a pH de 4.6 con acetato de sodio 0.2M y ácido acético 0.3M.

2. Se prepararon 5 disoluciones de quitosán en la solución buffer, las concentraciones de las disoluciones fueron [0.002], [0.0008], [0.00064], [0.0004] y [0.0002] (g/mL).
3. Se filtraron las disoluciones para eliminar la presencia de cualquier partícula que genere problemas al pasar a través del viscosímetro Ostwald.



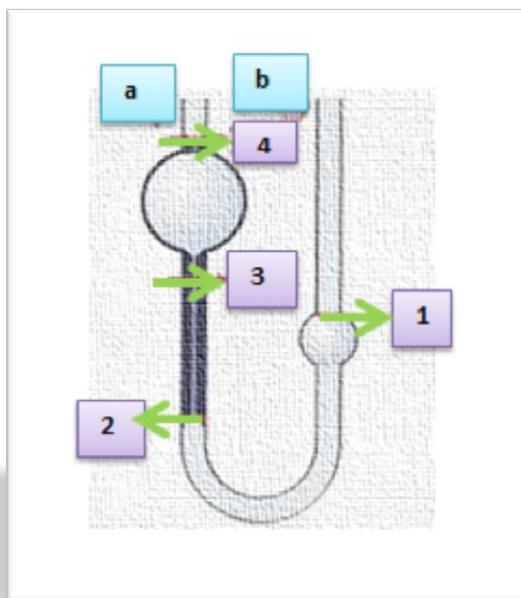
**Figura 14.** Filtración de soluciones.

1. Se colocó el viscosímetro de la manera mostrada en la figura 15, manteniendo una temperatura de 25°C con ayuda del baño térmico.



**Figura 15.** Montaje del viscosímetro.

2. Se adicionaron 4 mililitros de la solución buffer en el viscosímetro de Ostwald de manera que se cubrió desde el punto 1 al punto 2 del viscosímetro como se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Viscosímetro de Ostwald.

6. Con ayuda de una propipeta se succionó del lado (a) del viscosímetro de manera que la solución buffer sobrepasara el punto 4.
7. Se eliminó la succión y, con ayuda del cronómetro, se contó el tiempo que tarda el fluido en pasar desde el punto 4 al punto 3. Se realizaron 3 repeticiones y se obtuvo un promedio.
8. Se repitieron los puntos 4, 5, 6 y 7 para todas las disoluciones de quitosán, limpiando con cuidado el viscosímetro antes de cada prueba.

Secuencia de cálculo para la obtención del peso molecular:

- 1) Determinación de la viscosidad relativa:

$$\eta_{rel} = \frac{t_m}{t_o}$$

Dónde:  $t_m$ = Tiempo de caída de la solución de quitosán (min)  $t_o$ = Tiempo de caída de la solución de referencia o buffer (min).

1) Determinación de la viscosidad específica:

$$\eta_{\text{específica}} = \eta_{\text{rel}} - 1$$

2) Calcular viscosidad reducida:

$$\eta_{\text{reducida}} = \frac{\eta_{\text{específica}}}{c}$$

Dónde: C= Concentración de quitosán (g/dL)

3) Obtención de la viscosidad intrínseca. Se realizó una gráfica para representar la viscosidad reducida en función de la concentración del quitosán y se obtuvo una ecuación para tendencia lineal, en donde la ordenada al origen corresponde al valor de la viscosidad intrínseca.

4) Cálculo de peso molecular del quitosán. Por medio de la viscosidad intrínseca se puede conocer el peso molecular promedio viscosimétrico  $K\bar{M}_v$  utilizando la ecuación de Mark Houwink Sakurada:

$$[\eta] = K\bar{M}_v^a$$

Donde K y a son constantes típicas que dependen del solvente empleado (solución buffer), el polímero y la temperatura y que han sido determinados experimentalmente por diversos autores. En este caso, para la solución buffer empleada (ácido acético 0.3M/acetato de sodio 0.2M) los valores de las constantes son  $K= 76 \times 10^{-5}$  dL/g y  $a= 0.76$  (Rinaudo, 1993).

Expresada en forma logarítmica la ecuación de Mark Houwink Sakurada queda de la siguiente forma:

$$\log[\eta] = \log K + a \log \bar{M}_v$$

Despejando el peso molecular promedio viscosimétrico:

$$\bar{M}_v = 10^{(\log \eta - \log k)/a}$$

## 2.3.2 Objetivo Particular 1

### 2.3.2.1 Aislación de los hongos patógenos

**Objetivo particular No. 1:** Aislamiento de los principales hongos que provocan la pudrición del limón mexicano (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Alternaria citri*) a partir de frutos dañados utilizando distintos medios de cultivo.

**Actividades: Preparación de medios de cultivo.**

Los medios que se utilizaron en el presente proyecto fueron:

Agar papa-dextrosa. Para éste agar se utilizaron como base (**250 gramos**) de papas que se lavaron, se pelaron y se cortaron para después ponerse con agua hasta punto de ebullición y trascurridos **45 minutos**, se mezclaron 1 litro de la infusión con agar y dextrosa **20 gramos** (Seifert 2000).

Agar Saboraoud. Se utilizó el medio comercial, utilizando **250 gramos** de agar para 1 litro de solución.

#### **Aislamiento y pruebas *in vitro* de hongos de pudrición del limón**

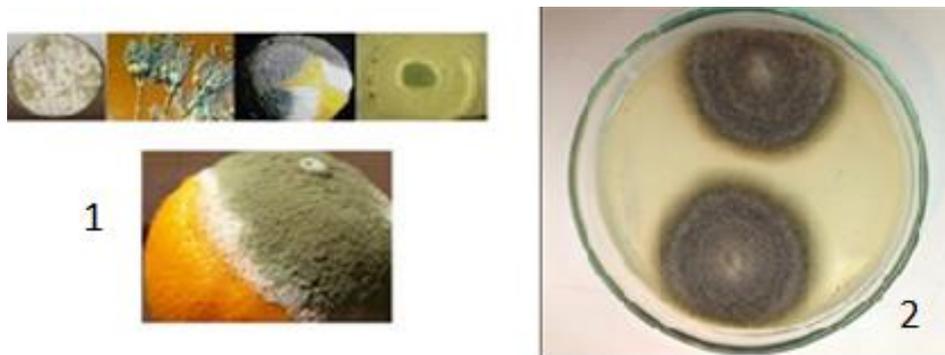
Con el objetivo de comprobar la acción antifúngica del quitosán para inhibir el crecimiento del *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Alternaria citri*, primeramente se hizo el aislamiento de los mismos partiendo de limones enfermos o que presentaron padecimiento causado por hongos.

### 2.3.2.2 Purificación de los hongos patógenos

En el caso del *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Alternaria citri* se tomaron esporas de los limones infectados y se sembraron en los distintos medios de cultivo. Se hicieron resiembras tomando muestras de los medios sembrados con anterioridad hasta obtener colonias puras de cada moho debido a que se presentaron crecimiento de más de un moho en los medios de cultivo (los medios de cultivo empleados fue el de PDA (papa-dextrosa) y Saboraoud (medio de cultivo comercial)).



**Figura 17.** *Penicillium italicum* en limón.



**Figura 18.** *Penicillium digitatum* en limón (1) y *Alternaria citri* (2).

De las siembras en los diferentes agares (PDA y Saboraud), se observó que el PDA (papa-dextrosa) es el que resulta más efectivo para el crecimiento y el aislamiento de los mohos que dañan al limón.

### 2.3.2.3 Identificación de los hongos patógenos

Después de aislar los distintos mohos, se procedió a su identificación para comprobar que realmente fueran las tres especies objeto de estudio.

Una vez obtenidas las cepas puras de los tres mohos, se procedió a la elaboración de microcultivos a partir de ellas, cortando cuadrados de PDA (agar papa dextrosa) y sembrando esporas, que se colocaron en portaobjetos y se pusieron en cajas petri con cierta cantidad de agua para que los microorganismos tuvieran las condiciones adecuadas de humedad para reproducirse.

Cuando se obtuvo crecimiento en los microcultivos, se observaron al microscopio para su observación, pero no fue posible distinguir todas sus estructuras hasta que se llegó a cierta etapa de crecimiento.

En la práctica, también fue posible distinguir las estructuras de los microorganismos utilizando cinta adhesiva transparente y azul de algodón como medio de tinción.

### 2.3.3 Objetivo Particular 2

#### 2.3.3.1 Pruebas de inhibición de crecimiento con quitosán

Cajas con agar papa-dextrosa

Cajas con agar papa-dextrosa y quitosán a diferentes concentraciones de quitosán (concentraciones de 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3%).

Modo de preparación:

Para 500 mL de agar de cada concentración: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3%.

De las cuales 250 mL es de PDA en polvo, utilizando el doble de la cantidad que cuando se prepara agar sencillo y 250 mL de dispersión de quitosán con 1% de ácido acético glacial, posteriormente se ajustó el pH de ésta dispersión con NaOH diluido.

### 2.3.3.2 Formulación del Recubrimiento

#### Concentración

Se buscó la concentración de quitosán ideal para evitar la rápida pudrición en el limón, la cantidad de aceite esencial es con base a la teoría 2000 ppm (Bejarano, 2009).

Para buscar la concentración ideal se pensó en utilizar la mínima cantidad de quitosán que inhibiera el crecimiento de los principales hongos patógenos del limón., así que se elaboraron concentraciones de 0.5%, 1%, 1.5%, 2% y 2.5% y 3%.

El quitosán es un biopolímero soluble en un medio acuoso ácido como es el caso de soluciones diluidas de ácido acético (Ravi, 2004). Así que se utilizó ácido acético para realizar las soluciones, con la finalidad de utilizar la menor cantidad posible de ácido acético para las disoluciones se fue colocando gota a gota el ácido acético, como se muestra en la tabla 4.

CONCENTRACIÓN (%)	CANTIDAD DE ÁCIDO ACÉTICO (mL.)
0.5	0.15
1	0.25
1.5	0.35
2	0.45
2.5	0.55
3	0.65

**Tabla 4.** Cantidad de ácido acético utilizado en las diferentes concentraciones de quitosán.

Se realizaron pruebas con diversos aceites esenciales, se emplearon aceites que con base a la literatura ayudan a inhibir el crecimiento de los hongos que atacan al limón (**aceite esencial de tomillo, limón y naranja**) (Ramos, 2010).

Es importante hacer mención que se utilizaron limones con diferente grado de maduración, en la escala pantone los limones maduros empleados contaban con un color amarillo PANTONE 379 como el que se muestra en la figura 20, los limones de maduración intermedia eran de una coloración alimonado PANTONE 364 y los limones verdes mostraron una coloración verde PANTONE 357. Los limones utilizados son del tipo denominado limón mexicano, el origen de los limones fue del Estado de Michoacán, segundo estado con mayor producción en México, adquiridos en un mercado. Fueron utilizados 9 limones por

formulación (3 verdes, 3 de maduración intermedia y 3 maduros), el cambio de coloración se analizó visualmente y también se evaluó la pérdida de peso, realizando un pesaje diario.

Para el recubrimiento se colocó en un recipiente la solución de quitosán (100mL) con los diferentes aceites esenciales (tomillo, naranja y limón) cada uno por separado, se elaboró una rejilla con palitos plásticos para colocar los limones sumergirlos y poder realizar el recubrimiento como se muestra en la figura 19, se realizó una observación diaria y un pesaje por lo que se eligió al aceite esencial de naranja ya que se observaron buenos resultados.

### **2.3.4 Objetivo Particular 3**

#### **2.3.4.1 Recubrimiento de limones con quitosán al 0.5% y el aceite esencial elegido**

Se prepararon 100 mL de solución de quitosán al 0.5% con aceite esencial de naranja que fue el aceite esencial elegido a 2000 ppm.

Para el recubrimiento se colocó en un recipiente la solución de quitosán (100mL) con aceite esencial elegido (naranja), se elaboró una rejilla con palitos plásticos para colocar los limones, sumergirlos y poder realizar el recubrimiento como se muestra en la figura 19. Una vez recubiertos se dejaron secar, es importante señalar que a lo largo de la experimentación los limones se dejaron en un mismo lugar a temperatura ambiente (20 °C +/- 1°) y 46 humedad relativa (<http://clima.inifap.gob.mx>), consultado el 25 de septiembre de 2014.



**Figura 19.** Recubrimiento de limones con solución de quitosán y aceite esencial.

#### 2.3.4.2 Pruebas de Calidad de recubrimiento elegido

Las pruebas se realizaron a los limones recubiertos con la formulación elegida (quitosán al 0.5% y aceite esencial de naranja 200 ppm).

##### **Color**

Esta prueba se llevará a cabo con la escala pantone como lo marca la norma NMX-FF-087-SCFI-2001

El limón debió presentar coloración uniforme, pasando del verde al amarillo conforme avanza su grado de maduración como se muestra en la figura 20.



**Figura 20.** Escala pantone de la coloración del limón.



**Figura 21.** Coloración de los limones

### **Determinación de pH**

Se basó en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro) con base a la norma (NMX-F-317-S-1978).

### **Acidez**

En alimentos el grado de acidez indica el contenido en ácidos libres. Se determinó mediante una valoración (volumetría) con un reactivo básico. El resultado se expresa como el % del ácido predominante en el material.

Se realizó una titulación ácido-base con un álcali estandarizado, los resultados se expresan como el equivalente en masa de ácido cítrico en base a la norma NMX-F-102-S-1978.

Se exprimieron los limones para obtener 5mL De jugo, posteriormente de filtraron. Se transfirió la muestra a un matraz volumétrico de 50mL Y se agregó agua destilada hasta el aforo y se mezcló perfectamente.

$$C_{VI} = C_{VT}$$

CI= Concentración del álcali empleado (0.1N).

VI= Volumen de la alícuota.

VT= Volumen gastado de NaOH.

CT= Concentración Total

$$CT = \frac{VI * CI}{VT}$$

Posteriormente se obtuvo la concentración de ácido cítrico de la solución.

$$\text{Concentración de ácido cítrico} = \frac{CT * VT}{3(\text{Volumen de la alícuota})}$$

Una vez obtenida la concentración de ácido cítrico se multiplicó por los valores de la dilución empleada en la experimentación.

(Concentración de ácido cítrico) \* (50/5), ya que la dilución fue 5/50

Posterior a ello se calculó la densidad del ácido cítrico.

Se calculó la  $\rho$  del ácido cítrico, pesando 5mL.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

m= masa de ácido cítrico (4.97 gramos).

v= volumen (5mL).

Posteriormente se realizó la siguiente ecuación para obtener el % de ácido cítrico.

$$\% \text{ de ácido cítrico} = \frac{(\text{Concentración del ácido cítrico}) * (\text{peso molecular del ácido cítrico})}{(\text{Volumen de la alícuota}) * (\rho)}$$

### **PFP (pérdida fisiológica del peso) por diferencia de pesos en un intervalo de tiempo determinado**

Se basa en la pérdida de peso dividiendo el cambio de peso durante el almacenamiento en función del peso original de un grupo de limones (Kim, 2005).

### **Cantidad de jugo**

#### Relación Cáscara + fibra y Jugo

Según la Organización Internacional de Normas (International Standards Organization) ha establecido el contenido mínimo de jugo para las frutas cítricas como: limones 25%, naranja 30%, mandarina 33%. El porcentaje de jugo es el de mayor importancia en estos frutos.

La manera en que se determinó es pesando los limones siendo este el peso total (100%) posteriormente se exprimió el limón viendo que cantidad en gramos quedo de la cáscara+ fibra y se le resta al peso total. Posteriormente por regla de 3 se obtiene el porcentaje equivalente a la cantidad de jugo obtenida.

# **CAPÍTULO III.**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 Obtención del quitosán

Se obtuvieron 950 gramos de caparazones molidos, los cuales se sometieron a un proceso para obtención de quitosán con base a la Patente Mexicana No. 293022. Después de llevar a cabo dicho proceso se obtuvieron 229.6 gramos de quitosán, lo cual representa un rendimiento de 24.16% con respecto al total de caparazones molidos. Posteriormente se realizó la caracterización de dicho quitosán el cual fue utilizado en la elaboración de un recubrimiento para alargar la vida útil de los limones.

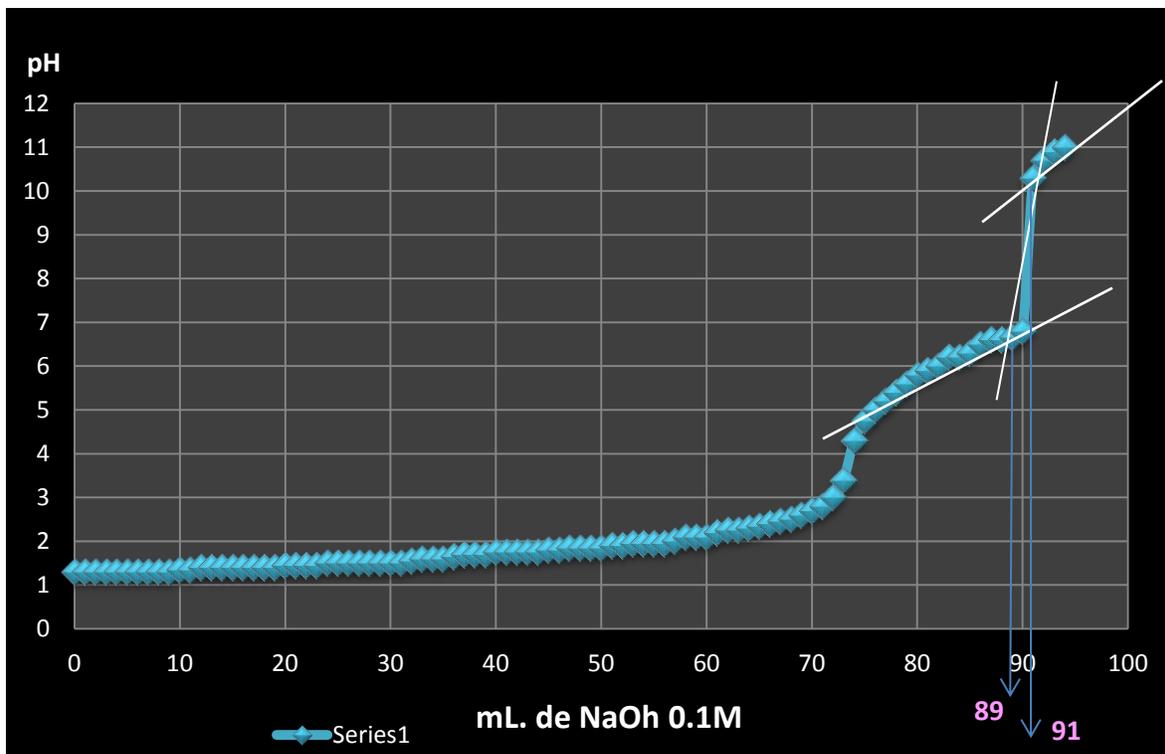


**Figura 22.** Bolsa marcada con el número 1 es quitina y bolsa marcada con el número 2 es quitosán

#### 3.1.1 Caracterización

##### Grado de desacetilación

Se realizaron tres repeticiones en la titulación de la solución de quitosán con NaOH 0.1M, por lo que se obtuvieron tres gráficos de pH contra los mL de NaOH como se muestra en la figura 22, de cada uno se obtuvo el % de desacetilación.



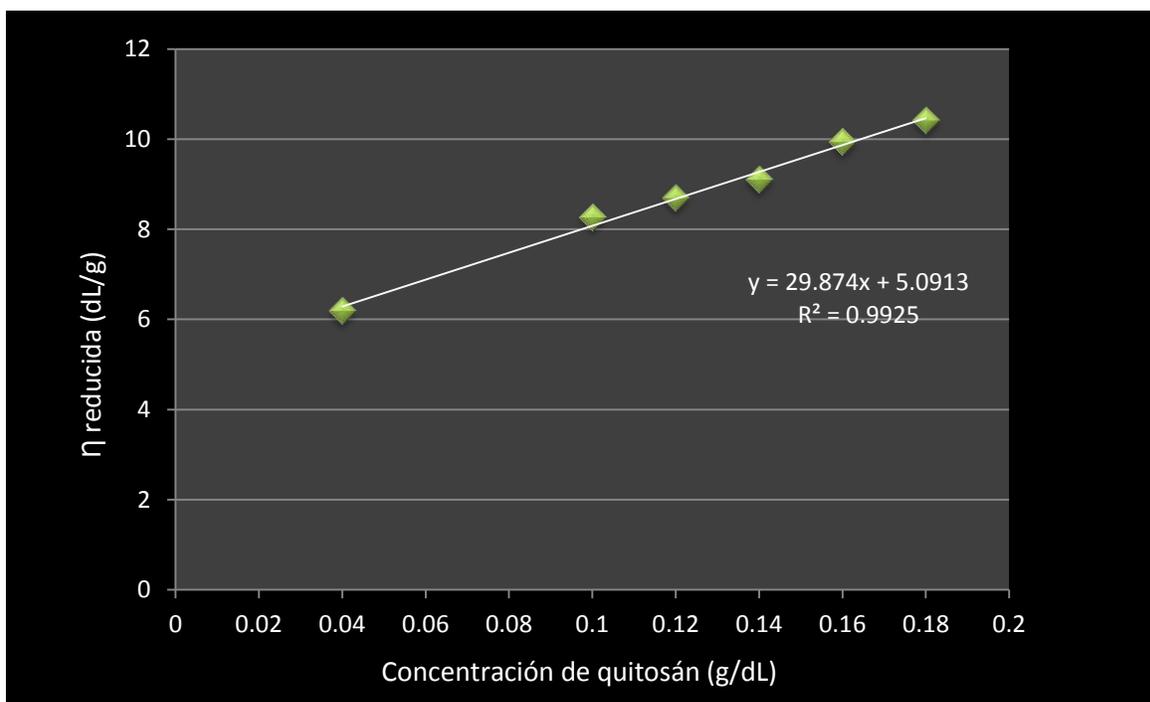
**Figura 23.** Curva de valoración para la obtención del grado de desacetilación.

En la figura 22 se puede observar la curva de valoración del quitosán. Se pueden ver los 2 puntos de inflexión obtenidos 89 y 91 mL respectivamente, posteriormente dichos datos obtenidos se sustituyeron en la ecuación de la página 29, obteniendo un grado de desacetilación de **93.35%** siendo un quitosán de alto grado de desacetilación, lo que indica que el quitosán obtenido es altamente soluble en soluciones ácidas. Aunque no existen trabajos experimentales para la relación existente entre el grado de desacetilación y la solubilidad del quitosán, en la práctica se sabe que a partir del 60% de desacetilación se considera quitosán soluble en medio ácido.

La obtención de quitosán soluble en ácidos diluidos (generalmente con un grado de desacetilación de más de 70%) constituye un criterio de la calidad del proceso de obtención del quitosán, por lo que el quitosán obtenido es de alta calidad.

### Peso molecular viscosimétrico promedio

La gráfica para la obtención de la viscosidad intrínseca (parámetro b) se muestra a continuación.



**Figura 24.** Gráfico para la obtención de la viscosidad intrínseca.

Como puede observarse de la ecuación de la recta obtenida:

$y = 29.874x + 5.0913$  con un  $R^2 = 0.9925$  y con los valores de  $K = 0.00076$  y  $a = 0.76$  obtenidos de la literatura (Mohammad, 2007), se sustituyen en la ecuación de peso molecular viscosimétrico promedio .

El resultado de **peso molecular fue 108 kDa**

El valor obtenido se encontró dentro del rango reportado (100–600 kDa) de acuerdo con las condiciones experimentales en las que se trabajó (Kasaai, 2007).

### 3.2 Objetivo Particular 2

**Crecimiento o inhibición de hongos patógenos que atacan al limón (*Alternaria citri*, *Aspergillus digitatum* y *Aspergillus italicum*) con quitosán a diferentes concentraciones**

Peso molecular g/mol	Concentración de quitosán en el medio de cultivo (%)					
	0.5	1	1.5	2	2.5	3
108,000	-	-	-	-	-	-

**Tabla 5.** Inhibición de *Alternaria citri* con quitosán a diferentes concentraciones.

En la tabla 5 se muestran los resultados de inhibición o crecimiento de *alternaria citri* como se muestra no hubo presencia de *Alternaria citri* en ninguna de las concentraciones de quitosán utilizadas.

Peso molecular g/mol	Concentración de quitosán en el medio de cultivo (%)					
	0.5	1	1.5	2	2.5	3
108,000	+	+	+	+	+	+

**Tabla 6.** Inhibición de *Penicillium digitatum* con quitosán a diferentes concentraciones.

Caso contrario pasó con el *Penicillium digitatum* ya que hubo presencia de éste en las concentraciones de quitosán utilizadas como se muestra en la tabla 6.

Peso molecular g/mol	Concentración de quitosán en el medio de cultivo (%)					
	0.5	1	1.5	2	2.5	3
108,000	+	+	+	+	+	-

**Tabla 7.** Crecimiento de *Penicillium italicum* con quitosán a diferentes concentraciones.

El quitosán a las concentraciones utilizadas logró inhibir el crecimiento de *Penicillium digitatum*, como se muestra en la tabla 7.

Al ver que el quitosán por sí sólo no permitió la inhibición del *Penicillium digitatum* se le adicionó diversos aceites esenciales a las formulaciones elaboradas.

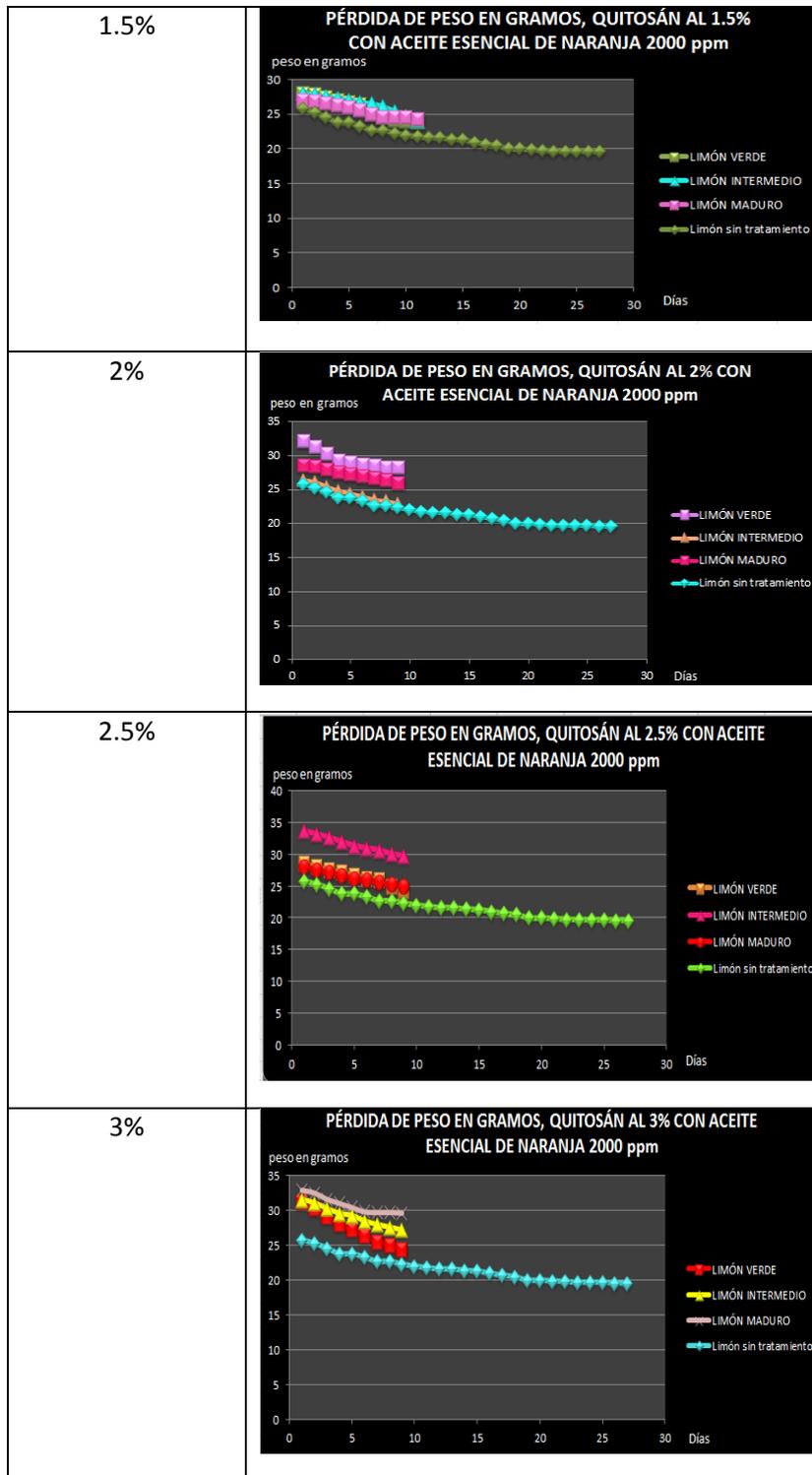
### Gráficos de pérdida de peso con diferentes formulaciones de quitosán con aceites esenciales

Se determinó la pérdida de peso de limones control, es decir sin tratamiento, bajo las mismas condiciones de almacenamiento. También se visualizó el cambio de coloración.

**Tabla 8.** Pérdida de peso en gramos de los limones recubiertos con quitosán a diferentes concentraciones y aceite esencial de naranja (2000 ppm).

Concentraciones de quitosán con aceite de naranja 2000 ppm.	Gráficos de pérdidas de peso en gramos de los limones.
0.5%	<p style="text-align: center;"><b>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 0.5% CON ACEITE ESENCIAL DE NARANJA 2000 ppm</b></p>
1%	<p style="text-align: center;"><b>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 1% CON ACEITE ESENCIAL DE NARANJA 2000 ppm</b></p>

Continuación de la tabla 8



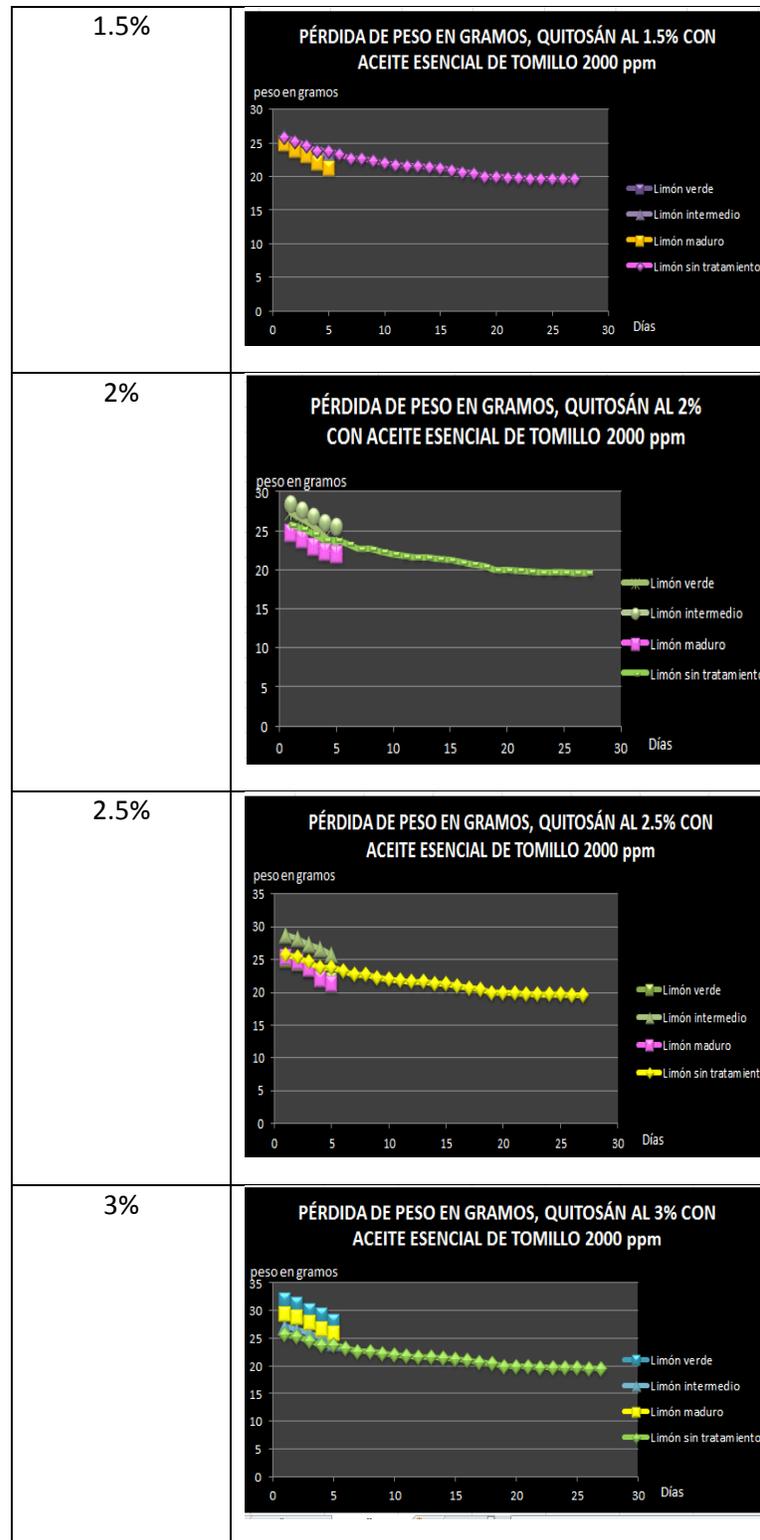
Cómo se puede ver en la tabla anterior la pérdida de peso en los limones con recubrimiento de quitosán al 0.5% con aceite de naranja 2000 ppm a excepción del limón verde tuvieron una pérdida menor de peso que la muestra control, es importante hacer énfasis en que la

duración de los limones sin tratamiento es de 9 días ya que comenzaban a tener coloraciones indeseables, pero los limones recubiertos al 0.5% tuvieron una vida útil de 27 días manteniéndose en perfecto estado sin coloraciones indeseables, de igual manera el control fue pesado a lo largo del mismo tiempo. A partir de la concentración de 1.5% los limones comenzaron a presentar manchas al octavo día, siendo a estas concentraciones más baja su vida útil en comparación al limón sin tratamiento.

**Tabla 9.** Pérdida de peso en gramos de los limones recubiertos con quitosán a diferentes concentraciones y aceite esencial de tomillo (2000 ppm).

Concentraciones de quitosán con aceite de tomillo 2000 ppm.	Gráficos de pérdidas de peso en gramos de los limones.
0.5%	<p>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 0.5% CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO 2000 ppm</p>
1%	<p>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 1% CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO 2000 ppm</p>

Continuación de la tabla 9



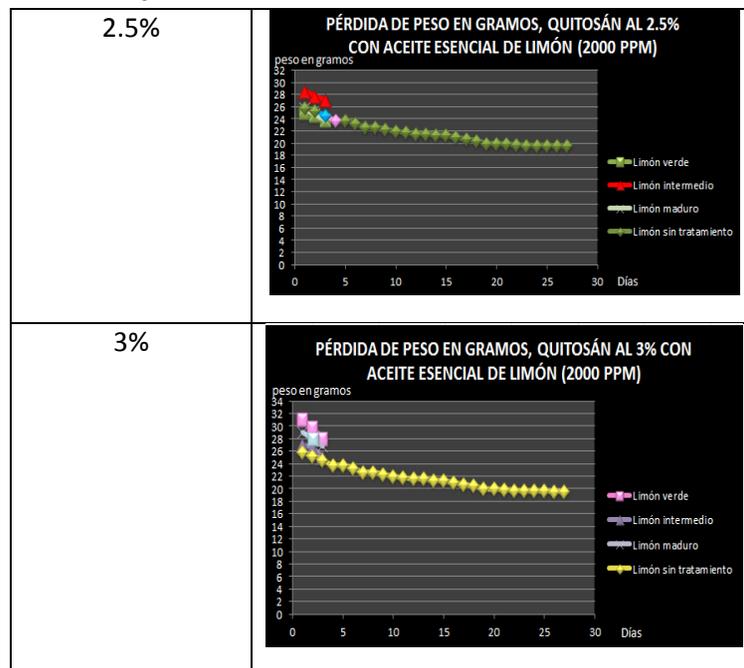
En la tabla 9 muestra una pérdida de peso similar en las concentraciones de 0.5% y 1%, a partir de 1.5% la pérdida de peso es mayor en los limones recubiertos, la vida útil de estos

limones fue muy corta ya que al segundo día comenzaron a presentar manchitas pardas, siendo estas indeseables dentro de los parámetros de calidad.

**Tabla 10.** Pérdida de peso en gramos de los limones recubiertos con quitosán a diferentes concentraciones y aceite esencial de limón (2000 ppm).

Concentraciones de quitosán con aceite de limón 2000 ppm.	Gráficos de pérdidas de peso en gramos de los limones.
0.5%	<p>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 0.5% CON ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (2000 PPM)</p>
1%	<p>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 1% CON ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (2000 PPM)</p>
1.5%	<p>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 1.5% CON ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (2000 PPM)</p>
2%	<p>PÉRDIDA DE PESO EN GRAMOS, QUITOSÁN AL 2% CON ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (2000 PPM)</p>

Continuación de la tabla 10



Cómo se observa en la tabla 10 la tendencia de pérdida de peso con base en la muestra control es similar sin embargo a partir de la concentración 1.5% la pérdida es mayor que nuestro control, en las imágenes podemos ver como se observan coloraciones no deseadas en los limones influyendo en los parámetros de calidad siendo indeseables con base a la norma, es importante señalar que al finalizar el primer día las manchitas aparecían.

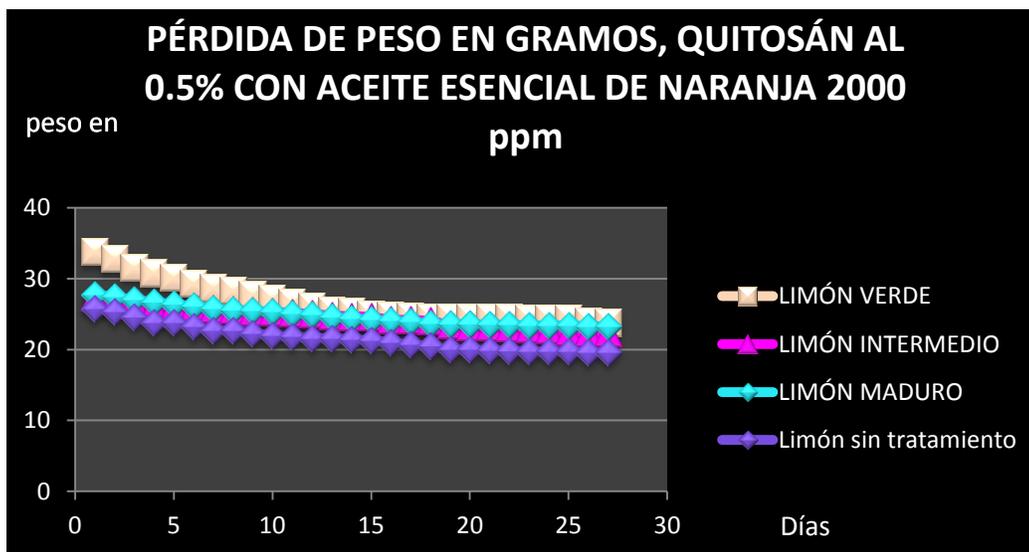
Los recubrimientos de quitosano tienen la característica de ser muy permeables a la humedad, lo cual debilita su utilización como barrera en frutos frescos y cortados. Pero la adición de un compuesto hidrofóbico podría mejorar la aplicación y función sobre estos tipos de alimentos. Los aceites esenciales sobre un modelo de matriz de quitosano podría dar esta característica que se necesita para un adecuado funcionamiento de barrera sobre los alimentos con contenido de humedad alto. Además, las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales podrían proteger a los alimentos contra ataque oxidativo y microbiológico que en sumatoria deterioran la calidad de los alimentos (Ponce et al, 2008).

Los resultados de las tablas anteriores lo demuestran, ya que el aceite de naranja junto con el quitosán crearon una barrera que funcionó para evitar la presencia de los hongos que

atacan al limón, además de que logró alargar de manera considerable la vida útil del limón ya que sin tratamiento su vida útil fue de 9 días y con el recubrimiento de quitosán al 0.5% con aceite esencial de naranja (2000 ppm) se lograron resultados favorables.

Por lo que después de ver estos resultados se elige como formulación quitosán al 0.5% con aceite esencial de naranja (2000ppm).

### 3.3 Objetivo 3



**Figura 25.** Gráfico de la pérdida de peso en gramos de los limones recubiertos con quitosán al 0.5% y aceite esencial de naranja.

Con base a los resultados anteriores mostrados en la figura 25 de la pérdida de peso del control (limones sin tratamiento) y a una concentración de 0.5% de quitosán con aceite esencial de naranja(2000 ppm), se realizó un análisis estadístico ANOVA (Empleando la herramienta de Excel). Obteniendo los siguientes resultados.

Grupos	Varianza	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Columna 1 Control	3.40626781	29.6458696	6.2255E-14	2.691978638
Columna 2 Verde	8.64336182			
Columna 3 Intermedio	2.20464387			
Columna 4 Maduro	1.94806268			

**Tabla 11.** Análisis de varianza de la pérdida de peso del limón control (sin tratamiento) y de los limones recubiertos con la formulación elegida.

Con base a los resultados obtenidos anteriormente en el análisis de varianza se puede observar que hay diferencia significativa ya que el valor F está por encima del valor crítico F, determinando así que el hecho de recubrir o no al limón representa una gran diferencia significativa en cuanto a la pérdida de peso.

### 3.3.1 Color



**Figura 26.** Comparación del color de los limones utilizados en la experimentación con la escala pantone establecida en la norma.

Con base a la norma NMX-FF-087-SCFI-2001 la coloración de los limones fue la adecuada apegándose y cumpliendo con esta norma, los limones maduros empleados contaban con un color amarillo PANTONE 379 como el que se muestra en la imagen anterior, los limones de maduración intermedia eran de una coloración alimonado PANTONE 364 y los limones verdes mostraron una coloración verde PANTONE 357. El recubrimiento empleado pudo crear una barrera que impidió el cambio de color por la presencia de los hongos patógenos que atacan al limón.

### 3.3.2 Determinación del Ph

Los Resultados obtenidos son los siguientes, se realizaron pruebas a tres limones de la misma maduración sacando un promedio.

Limón	pH
Limón Verde	2.45
Limón Intermedio	2.4
Limón Maduro	2.3

**Tabla 12.** Valores de pH del limón con el recubrimiento elegido.

La medición se realizó con un potenciómetro cómo lo indica la norma mexicana (NMX - F – 317), y se obtuvieron valores de pH adecuados con base a la teoría (CONEVyT, 2008), la cual indica que el valor del pH del limón es de 2-2.8 por lo que se muestra que el uso del recubrimiento no afectó este parámetro

### 3.3.3 Cantidad de jugo

**Relación Cáscara + fibra y Jugo.** Según la Organización Internacional de Normas (Internacional Standards Organization) ha establecido el contenido mínimo de jugo para las frutas cítricas como: Limones 25 %, Naranja 30 %, mandarina 33 % , la cantidad de jugo es el de mayor importancia en estos frutos.

Limones	Peso en gramos	Peso en gramos de la cáscara + fibra	% de jugo.
Verde	23.8	15	32.77%
Intermedio	22.4	14.3	33.48%
Maduro	23.3	13.9	36.90%

**Tabla 13.** Resultados de la cantidad de jugo contenida en los limones recubiertos con la formulación elegida.

Los resultados obtenidos que muestra la tabla 13 nos indica que la cantidad de jugo de los limones es la adecuada ya que con base a la norma la cantidad mínima de jugo que debe tener el limón es el 25% en base a su peso.

### 3.3.4 Determinación de acidez

Se sustituyeron los datos en las ecuaciones de las páginas 40 y 41 para la obtención del porcentaje de ácido cítrico de los limones recubiertos con la formulación elegida (quitosán al 0.5% y aceite esencial de naranja 2000 ppm).

#### Resultados obtenidos de ácido cítrico

Madurez	% de ácido cítrico contenido en limón
Verde	6.43
Intermedio	6.43
Maduro	6.43

**Tabla 14.** Porcentaje de ácido cítrico contenido en los limones recubiertos con la formulación elegida.

Los valores obtenidos de porcentaje de ácido cítrico repostados en la tabla 14 se encuentran dentro de los valores establecidos en la teoría que indican que el porcentaje de ácido cítrico en un limón debe encontrarse en un rango de 5-7% (Landaverde, 1943), pudiendo así comprobar que el uso del recubrimiento a base de quitosán y aceite esencial de naranja no influyó en este parámetro de calidad.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron 229.6 gramos de quitosán, lo cual representa un rendimiento de 24.16% con respecto al total de caparazones molidos.

Con base a los resultados en la caracterización del quitosán nos indica que el proceso con el que se llevó a cabo logra parámetros de calidad altos ya que el grado de desacetilación mayor del 70% se considera de alta calidad.

El valor peso molecular promedio del quitosán fue de 108 kDa.

Se lograron aislar, purificar e identificar a los hongos patógenos que atacan al limón (*Alternaria citri*, *Aspergillus digitatum* y *Aspergillus italicum*) En cuanto a las pruebas de inhibición, el quitosán sólo, no pudo inhibir al *Penicillium digitatum*, sin embargo la mezcla quitosán 0.5% y 2000ppm de aceite esencial de naranja como agente antimicrobiano se logró inhibir de esta manera a éste último.

El recubrimiento elegido (quitosán 0.5% y 2000 ppm de aceite esencial de naranja logró mantener los parámetros de calidad, aumentando la vida útil del limón 18 días más, la pérdida de peso del control fue de 24.03% y fue menor en el limón recubierto con la formulación elegida 16.19%. La acidez, el pH, color y cantidad de jugo no se vieron afectados con el recubrimiento, cumpliendo éstos los estándares de las normas.

Los limones que tuvieron una mayor vida útil fueron los limones maduros, en general en los 3 tipos de limones con esta concentración fue con la que tuvieron mayor vida útil sin embargo con el limón verde e intermedio se pudo observar que el recubrimiento detenía el proceso de maduración y siempre permanecían verdes con el color inicial, es importante hacer mención que la pérdida de peso fue menor que en las demás concentraciones. Es alentador que la mayor vida útil se haya visto con una concentración tan baja ya que de esta manera el costo-beneficio será bueno y esto será una alternativa viable para evitar pérdidas monetarias en la agricultura mexicana, además es de suma importancia hacer mención que el recubrimiento empleado aparte de alargar la vida útil del limón no modificó ningún parámetro de calidad medido, conservando así su calidad.

El uso combinado de quitosán y aceites esenciales puede ser una alternativa viable para actuar como fungicida y además se reducirán los residuos de sustancias contaminantes empleadas en el control de hongos, logrando así productos más saludables.

## BIBLIOGRAFÍA

Ali, S.M., Ghasemnezhad, M., Bakhshi, D., & Sarinkhani, H.(2012). *Effect of postharvest putrescine application and chitosan coating on maintaining quality of table grape cv. "Shahroidi" during long-term storage. Magazine Journal of Food Processing and Preservation*, 37:999-1007.

A.O.A.C. (1984). Official method of analysis of the association of agricultural chemist. Washington. D.C.

Assis, O., and Pessoa, J. (2004). Scientific note: *Preparation of thin films of chitosan for use as edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits. Brazilian Journal of Food Technology* 7:17–22.

Aular, J. (2006). Consideraciones sobre el manejo postcosecha de frutas en Venezuela. In: Salamanca, G. (Ed.) *Anales del Seminario Hortofrutícola Colombiano y I Congreso Iberoamericano sobre Sistemas de Procesado*. Ibaguè–Tolima: 59–62

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils– A review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446–475.

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez del Valle, M.G., Bozques-Molina, E., & Sánchez-Domínguez, D. (2005). *Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 7:1-6.

Bejarano, R. R. J., & Centeno, B. S. J. (2009). Extracto de Citrus limon para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 57-61.

Bosquez–Molina, E., Bautista–Baños, S., y Morales–López, J. (2009). *Aceites esenciales: bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria*. *Industria Alimentaria* 31:12–24.

Bosquez–Molina, E., Ronquillo–de Jesús, E., Bautista–Baños, S. Verde–Calvo, J.R., and Morales–López, J. (2010). *Evaluation of the inhibitory effect of essential oils against Colletotrichum gloeosporioides and Rhizopus stolonifer in stored papaya fruit and their possible application in coatings*. *Postharvest Biology and Technology*, 57:132–137.

Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection* 67:833–848

Chien, P., Sheu, F., and Yang, F. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal Food Engineering* 78:225–229.

Costos-producción del limón. (2011). Disponible en:

<http://www.campocolima.gob.mx/COSTOSPRODUCCION/LIMON/limon.pdf>

Daferera, D., Ziogas, B., and Polissiou, M. (2000). GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:2576–2581

Dorman, H., and Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308–316.

EcuRed. (2014). Importancia del limón . Disponible en:

<http://www.ecured.cu/index.php/Lim%C3%B3n>

El Ghaouth, A., and Arul, J. (1992). *Antifungal activity of chitosan on post–harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research* 96:769–772.

FAO (2004). *Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas*. Disponible en:

<http://www.fao.org/drocep/007/y5143s/y5143s0z.htm>

FAO (2001). Proyecciones de la producción y consumo mundial de los cítricos para el 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-x6732s/x6732s03.pdf>

González–Aguilar, G., Monroy–García, I., Goycoolea–Valencia, F., Díaz–Cinco, M., y Ayala–Zavala. (2005). *Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada*. Simposium nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados 1:121–133.

Hernández, Q. L. (2009). *Recubrimiento de quitosán sobre mango *Mangifera indica* L. variedad manila*. México: Tesis Ingeniería en Alimentos UNAM.

Hidalgo, J., & Miranda, S. (2013). *Caracterización del quitosán: grado de desacetilación y peso molecular, Manual*. Cuautitlán Izcalli, México: UNAM

INIFAP (2014). Reporte Estación, disponible en: <http://clima.inifap.gob.mx>

Kim, J., Marshall, R.M., & Wei C.(1995). Antibacterial Activity of some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2839-2845.

Kim, Ki Myong et al.(2005). Effect of modified atmosphere packaging on the shelf-life of coated, whole and sliced mushrooms. *LWT*, pp 364-371.

Landaverde, Arnulfo. (1943). El limonero y demás plantas cítricas.México.p.58.

Lárez Velásquez, Cristóbal. (2006). *Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro Avances en Química*. pp. 15-21.

Mármol Z., Paéz G., Rincón M., Araujo K., Aeillo, C., Chandler C., & Guitierrez E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. *Revista Tecnocientífica URU*, 1:53-58.

Meng, X., L. B., Liu, J., and Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 106:501–508.

Min, S., and Krochta, J. (2005). Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Food Microbiology and safety* 70:87–94.

Miranda, C. S., & Lara, S. A. (2011). Patente nº 293022. UNAM México.

Mohammad, R. K. (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakura (MHS) equation viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscosimetric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 477-488.

Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Kustrak D. (2003). Natural antimicrobics from Croatian plants. In: Rai M, Mares D. (eds.). *Plant-derived antimicrobics. Current trends and future prospects*, Hartworth Press, New York. p. 49–79.

Ponce, A. G., S. I. Roula, C. E. del Valle y M. R. Moreira (2008), “Antimicrobial and antioxidant activities of edible coating enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies”, *Postharvest Biology and Technology*. 49:294-300

Plotto, A., Roberts, R., and Roberts, D. (2003). *Evaluation of plant essential oils as natural Postharvest disease control of tomato (Lycopersicon esculentum)*. *Acta Horticulturae* 628:737–745.

Quintana EA, Plascencia M, González GA, Cortez MO. (2010). Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum* *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. *Revista Mexicana de Micología* 32: 59-62

Ramos-García, M.L., Bautista-Baños, s., Barrera-Necha, L., Bozques-Molina, E., Alia-Tejagal, I., & Estrada-Carillo, M. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28:1, 44-57.

Ravi Kumar, M.N.V.; Muzarelli, R.A.A.; Muzarelli,C.; Sashiwa,H.;Domb,A.J.(2004). "Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives". *Chemical Reviews* ,104(12):6017- 6084.

Rinaudo.M. (2006). *Chitin and Chitosan: Properties and applications*. *Prog. Polym.Sci.*,(1): 603 –632.

Rodríguez, S., Albertengo, L., Debbaudt, A., y Argullo, E. (2005). *Uso de quitosano en alimentos In: Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México p. 558.

Rojas, M. (2006). *Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: Una nueva estrategia de conservación*. Universidad de Lleida. España. 76 p.

Ronquillo, E. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales in vitro e in situ*. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Iztapalapa, D. F., México. 46 p.

Salvador, A., Cuquerella, J., & Monterde, A. (2003). Efecto del quitosano aplicado como recubrimiento en mandarinas fortune. México: *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 5:122-127.

Seifert K. (2000). Fuskey. *Fusarium* Interactive Key. Agriculture and Agri-Food Canada. Disponible en: <http://res.agr.ca/brd/fusarium/>

Vargas M., González C., Chiralt A., & Cháfer M. (2007). Estudio preliminar del uso de recubrimientos de quitosano y de microorganismos eficaces en el control postcosecha de la podredumbre azul de naranjas. *Revista técnica de ciencias agropecuarias*. 24(3).

Weiss E A. (1997). *Essential Oil Crops*. Cab International: New York, USA, pp. 417-511.

Zacchino S, Yunes R, Cechinel V, Enriz RD, Kouznetsov V, Ribas JC. (2003). *The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall*. In: Mahendra Rai, Donatella Mares (Eds.) *Plant Derived Antimycotics*, Haworth Press (New York). p. 1-47.

Zhang, D., and Quantick, P. (1997). *Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest store of litchi (Litchi chinensis Sonn. fruit*. *Postharvest Biology and Technology* 12:195–202.

