



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE
CARBOXIMETILCELULOSA Y SANGRE DE
DRAGO PARA CONTROLAR *Penicillium expansum*
Y PRODUCCIÓN DE PATULINA EN MANZANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ERIKA IVONNE PÉREZ ANGEL

ASESORAS: DRA. MA. ANDREA TREJO MÁRQUEZ,

DRA. MARTHA YOLANDA QUEZADA VIAY Y

M. en C. SELENE PASCUAL BUSTAMANTE

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Aplicación de recubrimientos de caboximetilcelulosa y sangre de drago para controlar *Penicillium expansum* y producción de patulina en manzanas.

Que presenta la pasante: **Erika Ivonne Pérez Angel**

Con número de cuenta: **411015938** 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 16 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Carolina Moreno Ramos	
VOCAL	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
SECRETARIO	M. en C. Julieta González Sánchez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Araceli Ulloa Saavedra	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alma Adela Lira Vargas	

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

IHM/cga*

	
	<p>El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT: Desarrollo de envases activos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (IT201513), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.</p>

Dedicatorias



- A mi madre Ma. Divina por su apoyo incondicional, su entrega y apoyo para que siga adelante en mi vida y me permitió culminar este sueño.
- A mi padre Juan por sus enseñanzas, apoyo y lucha que me permitió llegar a esta etapa de mi vida.
- A mis Hermanos Carmen y Jose por siempre estar conmigo y apoyarme, gracias por todos sus consejos.
- A mi sobrino Yanni por enseñarme la inocencia de la vida e iluminar mi vida.
- A toda mi familia y mis amigos por la comprensión y apoyo que me han brindado en todos los momentos de mi vida.

Agradecimientos



A Dios por bendecirme y permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres que siempre me apoyaron y no escatimaron esfuerzos para que siguiera adelante, por enseñarme el valor de la vida y siempre ser agradecido con ella.

A mi hermana Carmen por alentarme a seguir adelante y nunca rendirme, por escucharme y darme tus mejores consejos.

A mi hermano Jose por enseñarme que no existe barreras para lograrlo todo en la vida, por escucharme siempre y darme consejos.

A mi sobrino Yanni por motivarme a seguir adelante para dar lo mejor.

A mi amiga Brenda por siempre estar conmigo, escucharme y darme ánimos para vivir al máximo.

A Gerardo por siempre apoyarme durante toda la carrera por enseñarme a nunca darse por vencido y estar siempre de pie ante cualquier caída, por todo tu amor y cariño.

A la familia Puntos Sánchez por acompañarme durante la carrera y animarme a seguir adelante.

A mis amigos del CBTIS a Abraham, Jaritzi, Naye y Dianita por siempre animarme y estar ahí para cualquier cosa.

A mis amigos universitarios por acompañarme en la carrera, por todo el tiempo que convivimos y me dejaron ser parte de su vida.

En especial a Chucho y Ricardo por siempre hacerme reír, por estar siempre y culminar esta etapa.

A mis amigos “Los Potscosechos” a Chucho, Yatziri, Carlitos, Rocio, Samantha y Walter por su compañerismo, por los buenos momentos que compartimos, por ser auténticos y únicos.

Al proyecto PAPIIT: Desarrollo de envases activos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesados (IT201513), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

A la Dra. Andrea Trejo Márquez por su confianza, apoyo y por compartir su conocimiento para mejorar día a día. Mi sincera admiración y agradecimiento.

A la Dra. Martha Yolanda Quezada Viay por su dedicación y asesoría en el presente proyecto. Muchas gracias por todo su tiempo y enseñanza.

A la M. en C. Selene Pascual Bustamante por sus consejos, apoyo y ser ejemplo de motivación para la elaboración y experimentación de este trabajo.

Para mis profesoras del Taller de Posposecha de productos vegetales y UNIGRAS, mis sinceros agradecimientos.

A mis sinodales Dr. Carolina Moreno Ramos, Dra. Andrea Trejo Márquez, M. en C. Julieta Gonzales Sánchez, M. en C. Araceli Ulloa Saavedra y a la M. en C Alma Adela Lira Vargas , por sus observaciones y correcciones concretas para la elaboración y mejora de este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y sobre todo a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por la formación académica, por permitirme ser parte de esta gran institución y ser egresada de la máxima casa de estudios.

Gracias UNAM.

“Por mi raza hablara el espíritu”
José Vasconcelos (1882-1959).

“Aprende a vivir y sabrás morir bien”
Confucio (551 a.C.-478 a.C.).

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	v
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	xii
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Generalidades de la manzana	1
1.1.1. Origen y taxonomía.....	1
1.1.2. Morfología, características y variedades.....	1
1.1.3. Composición química y valor nutricional.....	3
1.1.4. Importancia económica.....	3
1.1.4.1. Mercado mundial y nacional.....	3
1.1.5. Plagas y Enfermedades.....	8
1.2. Generalidades del hongo <i>Penicillium expansum</i>	10
1.2.1. Características y condiciones óptimas para el crecimiento.....	10
1.3. Micotoxinas.....	11
1.3.1. Definición y clasificación.....	11
1.3.2. Generalidades de Patulina	13
1.3.2.1. Toxicología de la patulina y límites permitidos en alimentos...14	
1.3.2.2. Técnicas de detección de patulina basado en el método cromatográfico.....	16
1.4. Métodos de conservación de manzanas.....	17
1.4.1. Generalidades de recubrimientos comestibles.....	18
1.4.1.1. Definición, funciones y propósitos.....	18
1.4.1.2. Componentes de formación.....	19
1.4.1.3. Compuestos antifúngicos.....	20
1.4.2. Generalidades de extractos vegetales.....	21
1.4.2.1. Definición.....	21
1.4.2.2. Métodos de extracción.....	21
1.4.3. Generalidades de Sangre de drago.....	22
1.4.3.1. Taxonomía, morfología y características.....	22
1.4.3.2. Propiedades medicinales.....	24

1.4.3.3. Composición química de sangre de drago.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	29
3.1. Cuadro metodológico.....	29
3.2. Material biológico.....	31
3.3. Obtención de extractos vegetales.....	31
3.4. Pruebas <i>in vitro</i> de extractos etanólicos de sangre de drago.....	32
3.5. Elaboración películas modelo.....	32
3.6. Pruebas <i>in vitro</i> de películas modelo adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago.....	33
3.7. Aplicación de recubrimientos en manzana <i>Golden delicious</i>	34
3.8. Técnicas analíticas.....	36
3.8.1. Propiedades de película modelo.....	36
3.8.2. Parámetros de calidad de la manzana.....	39
3.8.3. Evaluación de la presencia de patulina en manzanas por el método cromatografía de capa fina.....	43
3.9. Análisis estadísticos.....	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	104
RECOMENDACIONES.....	105
5. REFERENCIAS.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica del manzano.	1
Tabla 2. Composición por 100 g de porción comestible de <i>Golden Delicious</i> .	3
Tabla 3. Micotoxinas en alimentos.	12
Tabla 4. Clasificación de las micotoxinas según la IARC.	12
Tabla 5. Ocurrencia natural de la patulina a nivel mundial.	15
Tabla 6. Métodos de conservación de manzanas.	17
Tabla 7. Recubrimientos por materiales compuestos en manzanas frescas.	19
Tabla 8. Métodos de extracción de los extractos vegetales.	22
Tabla 9. Características de los componentes de sangre de drago.	26
Tabla 10. Formulaciones de película modelo de CMC.	33
Tabla 11. Pruebas empleadas para los parámetros sensoriales de las manzanas.	43
Tabla 12. Tratamiento de aplicación a las manzanas.	43
Tabla 13. Observación visual de pruebas <i>in vitro</i> con <i>Penicillium expansum</i> (120) y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.	59
Tabla 14. Observación visual de pruebas <i>in vitro</i> con <i>Penicillium expansum</i> (119) y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.	60
Tabla 15. Observación visual de pruebas <i>in vitro</i> con <i>Penicillium expansum</i> (103) y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.	61
Tabla 16. Observación visual de pruebas <i>in vitro</i> con <i>Penicillium expansum</i> (120) de películas modelo y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes	

	concentraciones.	66
Tabla 17.	Observación visual de pruebas <i>in vitro</i> con <i>Penicillium expansum</i> (119) de películas modelo y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.	67
Tabla 18.	Observación visual de pruebas <i>in vitro</i> con <i>Penicillium expansum</i> (103) de películas modelo y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.	68
Tabla 19.	Seguimiento fotográfico de las manzanas <i>Golden delicious</i> de manzanas recubiertas con CMC a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	95
Tabla 20.	Apariencia visual de manzanas <i>Golden delicious</i> picadas e inoculados con <i>P. expansum</i> recubiertas a base de CMC y extracto etanólico de sangre de drago.	99
Tabla 21.	Apariencia visual de manzanas <i>Golden delicious</i> golpeadas e inoculados con <i>P. expansum</i> recubiertas a base de CMC y extracto etanólico de sangre de drago.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árbol de manzano.	1
Figura 2. Características principales del árbol del manzano.	1
Figura 3. Características generales de variedades de manzanas más comunes en México.	2
Figura 4. Producción mundial de manzana, periodo 2010-2013.	4
Figura 5. Producción nacional de manzanas del 2010- 2013.	5
Figura 6. Estados productores de manzana 2009- 2012.	5
Figura 7. Porcentaje mensual de producción de manzanas en 2013.	6
Figura 8. Importaciones de México del año 2010-2013.	7
Figura 9. Exportaciones de México del año 2010-2012.	8
Figura 10. Plagas y enfermedades del manzano.	9
Figura 11. Enfermedades postcosecha de la manzana.	9
Figura 12. Manzana infectada de <i>Penicillium expansum</i> .	10
Figura 13. Características de <i>Penicillium expansum</i> en agar CYA.	10
Figura 14. Conidióforos y conidios de <i>Penicillium expansum</i> .	11
Figura 15. Fases de crecimiento fúngico, donde a: Es la localización de las síntesis de micotoxinas.	11
Figura 16. Estructura de la patulina.	13
Figura 17. Principales funciones de los recubrimientos comestibles.	18
Figura 18. Principales aditivos de los recubrimientos comestibles.	20
Figura 19. Morfología de <i>Jatropha dioica</i> .	23
Figura 20. Distribución geográfica de sangre de drago en México.	24
Figura 21. Electroferograma de la identificación de los compuestos del extracto etanólico de sangre de drago (<i>Jatropha spp.</i>).	25
Figura 22. Ramas secas de sangre de drago.	31
Figura 23. Baño de ultrasonido empleado para la obtención de extractos etanólicos.	31
Figura 24. Procedimiento de las Pruebas in vitro: a) Obtención del explante del hongo <i>Penicillium expansum</i> , b) Siembra del mismo en el medio de cultivo, c) Registro diario del	

	crecimiento micelial.	32
Figura 25.	Procedimiento para la elaboración de películas modelo: a) Homogenización de la mezcla de los componentes, b) Vaciado de la mezcla en platos, c) Secado de las películas modelo.	33
Figura 26.	Procedimiento de pruebas in vitro de películas modelo: 1) Elaboración del medio adicionado con película modelo con extracto de sangre de drago, 2) Vaciado en cajas, 3) Colocación del explante en el medio de cultivo, 4) Seguimiento diario del crecimiento micelial.	33
Figura 27.	Diagrama de proceso de aplicación de RC.	34
Figura 28.	Procedimiento de preparación del inóculo: a) Materiales, b) Raspado del hongo con tween 80% para la separación de conidios, c) Cámara de NeuBauer.	35
Figura 29.	Determinación de color en películas modelo por el colorímetro.	36
Figura 30.	Determinación del espesor de las películas modelo por un micrómetro	37
Figura 31.	Desarrollo de la prueba de transparencia de las películas modelo: a) Colocación de la película en la celda de espectrofotómetro, b) Celdas con Películas modelo, c) Espectrofotómetro Thermo Spectronic.	37
Figura 32.	Desarrollo de la permeabilidad de vapor de agua de las películas modelo: a) Celda de permeación con la película modelo y dentro de ella el material desecante, b) Cámara de ambientación, c) Medición de la ganancia de peso de la celda de permeación.	38
Figura 33.	Refractómetro digital para la determinación de sólidos solubles de los frutos.	39
Figura 34.	Determinación de Acidez por titulación de muestra de los frutos.	39
Figura 35.	Potenciómetro para la determinación del pH de los frutos.	40

Figura 36.	Balanza digital para la determinación del peso de los frutos.	40
Figura 37.	Determinación de la firmeza de los frutos por un penetrómetro digital.	41
Figura 38.	Determinación de la respiración de los frutos por un analizador de gases.	41
Figura 39.	Procedimiento para la extracción de la Patulina: 1) Extracción de la fase inferior en el embudo de separación, 2) Adición del sulfato de sodio a la fase superior recuperada, 3) Decantación de la muestra por un filtro de microfibra, 4) Evaporación en rotavapor al vacío, 5) Evaporación final con corriente de nitrógeno.	44
Figura 40.	Procedimiento para el desarrollo de la cromatografía de capa fina: 1) Aplicación de las muestras sobre la placa de cromatografía, 2) Introducción de la placa a la cámara de desarrollo, 3) Aplicación del revelador MBTH en placa, 4) Secado de la placa en horno de convección.	45
Figura 41.	Relación de las distancia para el cálculo del factor de retención (Rf).	46
Figura 42.	Croma de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm.	47
Figura 43.	Tono °Hue de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm.	49
Figura 44.	Luminosidad de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm.	50
Figura 45.	Espesor de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm.	52
Figura 46.	Transparencia de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto	

	etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm.	54
Figura 47.	Permeabilidad de vapor de agua de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm.	55
Figura 48.	Porcentaje de crecimiento micelial de la cepa 120 (A), 119 (B) y 103 (C) de <i>Penicillium expansum</i> a diferentes concentración del extracto etanólico de sangre de drago.	58
Figura 49.	Sólidos solubles de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	72
Figura 50.	Porcentaje de acidez de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	74
Figura 51.	pH de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	76
Figura 52.	Croma de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	79
Figura 53.	Tono °Hue de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	81
Figura 54.	Luminosidad de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	82
Figura 55.	Pérdida de peso de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	84
Figura 56.	Firmeza de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	87

Figura 57. Respiración de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.	89
Figura 58. Análisis sensorial de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm; Donde A: es en el día 0, B: es en el día 18 y C: es el día 30.	92
Figura 59. Índice de severidad de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm inoculadas con el hongo <i>Penicillium expansum</i> . Donde A: son las manzanas picada y B: las manzanas golpeadas.	96
Figura 60. Porcentaje de manzanas que presentaron patulina en manzanas picadas inoculadas con el hongo <i>Penicillium expansum</i> , donde A son manzanas con RC con extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm, B son manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% (RC) y C representa manzanas control.	102



RESUMEN

RESUMEN

Una de las principales enfermedades postcosecha de la manzana es el moho azul causada por *Penicillium expansum*, generando grandes pérdidas y problemas de inocuidad por la producción de la toxina Patulina siendo un riesgo para la salud humana. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de recubrimientos comestibles a base de carboximetilcelulosa (CMC) con extracto de sangre de drago (*Jatropha dioica*) para el control de *Penicillium expansum* e inhibición de la producción de patulina en manzanas *Golden delicious* para evitar problemas de inocuidad durante el almacenamiento de los frutos, para ello la manzana y la planta de sangre de drago fueron adquiridas en la central de abastos de la Ciudad de México. Se realizaron películas modelo a diferentes concentraciones de CMC (0.5, 0.75 y 1%) y extractos etanólicos de sangre de drago (1000, 2000 y 3000 ppm) seleccionando a partir de sus propiedades físicas: color (luminosidad, croma y tono), transparencia, espesor, y de la propiedad de barrera: permeabilidad de vapor de agua. En la caracterización de las diferentes películas, la mejor concentración del extracto de sangre de drago fue a 3000 ppm, con mejores resultados en permeabilidad de vapor de agua y espesores, con valores cercanos a los obtenidos en las películas control. Las pruebas *in vitro* mostraron que las concentraciones de 2000 y 3000 ppm de extracto presentaron una inhibición en el crecimiento micelial de *Penicillium expansum* del 100%, siendo de igual forma para las prueba *in vitro* de las películas modelo, por lo que estas concentraciones se aplicaron al recubrimiento con 0.5% de CMC. Las manzanas seleccionadas fueron lavadas, desinfectadas y sumergidas durante 4 minutos en una solución de 0.5% de CMC, 0.5% de Tween 80, 1% de glicerol y adicionada con extractos etanólicos de sangre de drago por separado a 2000 y 3000 ppm y se almacenaron en contenedores limpios (a 14°C, H.R. de 90%) durante 30 días. Para evaluar el efecto antifúngico de *Penicillium expansum*, los frutos se golpearon y otros se picaron, posteriormente se inocularon con el hongo y se incubaron (24 hrs. a 25°C), evaluando su Índice de severidad y porcentaje de infección cada 6 días. La evaluación de los parámetros de calidad físicos: color y firmeza; y fisicoquímicos: acidez, pH y sólidos solubles, se realizaron cada 6 días, a excepción del parámetro fisiológico (respiración) y pérdida de peso que se evaluaron cada 2 días. Las características sensoriales de las manzanas se evaluaron una vez aplicados los distintos recubrimientos a los días 0, 18 y 30 de almacenamiento. Para la evaluación de la presencia de la toxina patulina se llevó a cabo por la técnica de cromatografía de capa fina una vez finalizado el almacenamiento de 30 días de las manzanas inoculadas con *P. expansum*. La aplicación del recubrimiento de CMC 0.5% adicionado con extractos etanólicos de sangre de drago a 3000 ppm no afectó a los siguientes parámetros: sólidos soluble, acidez, pH, respiración y color

(Croma, Tono Hue y Luminosidad). En la evaluación sensorial los panelistas no se percataron de la aplicación de recubrimientos con extractos de sangre de drago en los frutos, clasificándolos de aceptables a buenos. Los frutos sin recubrimiento presentaron mayor porcentaje de presencia de la toxina patulina con un 80%. Por lo que la aplicación de recubrimientos con extracto de sangre de drago puede ser una alternativa tecnológica para conservar y evitar la producción de patulina del moho azul (*P. expansum*) en manzanas.



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La manzana es una fruta con alto contenido nutricional, su composición es principalmente de agua y carbohidratos sobresaliendo la fructosa, es rica en fibra y vitaminas, es una fuente discreta de vitamina E. (EROSKY CONSUMER, 2008).

Tanto así que es una de las cinco frutas de mayor consumo en México con un consumo de cerca de 800 mil toneladas anuales y el consumo per cápita de 7.2 Kg (SHCP, 2014). Debido a su importancia económica, es relevante el control de sus enfermedades que merman su producción. Entre éstas, destacando el moho azul ocasionado por *Penicillium expansum* como una de las principales enfermedades de postcosecha de la manzana, siendo la causa más grande de pérdidas en manzanas almacenadas ocasionadas por lesiones (Viñas *et al.*, 2006). Esta enfermedad es una preocupación económica para la industria de fruta fresca como también para la de transformación de frutas debido a que el hongo *Penicillium expansum* puede producir la micotoxina patulina y afectar la calidad de los derivados de la manzana (Hernández, 2014).

La Food and Drugs Administration (FDA), (2000) establece límites tolerables de patulina de 50 µg/L en productos como jugo de fruta. La toxicidad que produce esta micotoxina incluye edema pulmonar, edema cerebral y daños en el hígado, así como también llegando a ser de carácter genotóxico, carcinogénico, embriotóxico e inmunotóxico (Puel *et al.*, 2010). Es por eso que para el control de hongos y pudriciones en algunas frutas y hortalizas se utilizan agentes químicos como fungicidas, siendo una práctica común en el control de hongos pero existen actualmente alternativas diferentes como el uso de extractos vegetales (Guédez *et al.*, 2010). Por ello la aplicación del extracto de sangre de drago (*Jatropha dioica*) como agente antifúngico es una propuesta innovadora de la cual no se tienen reportes anteriores aplicadas a *Penicillium expansum*.

Así mismo el crecimiento de la demanda de alimentos más sanos, seguros y obtenidos de forma respetuosa con el medio ambiente, ha llevado a potenciar investigaciones en el ámbito de la industria alimentaria, en este sentido, la tecnología de los recubrimientos comestibles surge como una alternativa prometedora para la mejora de la calidad y conservación de alimentos durante su procesado y/o almacenamiento (Sánchez *et al.*, 2008). Debido a esto el presente trabajo tiene el objetivo de controlar el crecimiento del moho azul en manzanas *Golden delicious* con la aplicación de recubrimiento comestible adicionado con extractos etanólicos de sangre de drago para evitar las pérdidas postcosecha y así alargar su vida útil.



ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de la manzana

1.1.1. Origen y taxonomía



Figura 1. Árbol de manzano.
Fuente: Sidra Asturias, (2014).

La *Malus sieversii* una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia media observada en la Figura 1, esta especie podría haber dado origen a las primeras razas cultivadas de manzano hace 15.000-20.000 años. Es originario de la región suroeste de Asia y la región este de Europa e introducida a Europa por los romanos. En los tiempos de Julio César, un hombre llamado Matios o

Mato consiguió las mejores manzanas gracias a la creación de los injertos dando el nombre de "manzana" a la fruta del manzano que es la modificación de la palabra "Mazana", nombre latino del injertador (INFOAGRO, 2011).

Muchos siglos después cuando llega a Italia el tomate de América le llamará "pomodoro", que significa manzana de oro. Fue así que posteriormente los españoles llevaron el fruto de la manzana a América en la conquista del mismo (CERESPAIN, 2011). La clasificación taxonómica del manzano se presenta en la Tabla 1.

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
Orden:	<i>Rosales</i>
Familia:	<i>Rosaceae</i>
Tribu:	<i>Maleae</i>
Género:	<i>Malus</i>
Especie:	<i>domestica</i>

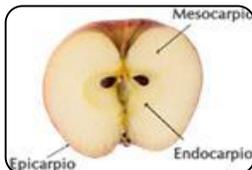
Tabla 1. Clasificación taxonómica del manzano. Fuente: INFOAGRO, (2011).

1.1.2. Morfología, características y variedades

Los árboles de los manzanos presentan un ancho en la base de 1,0 a 4,5 m (Jackson y Palmer, 1999). Su hábito, bajo condiciones naturales varía de una forma redonda de la copa hasta una piramidal. Las características principales se presentan en la Figura 2.



Porte: Alcanza como máximo 10 a 14 m de altura con copa globosa. Las ramas se insertan en ángulo abierto sobre el tallo, de color verde oscuro, a veces tendiendo a negruzco o violáceo.



Fruto: Fruto del manzano, de forma globosa de epicarpio delgado, liso y de color verde claro, amarillo pálido o encarnado, mesocarpio con sabor ácido o ligeramente azucarado, y semillas pequeñas, de color de caoba a pardo brillante.

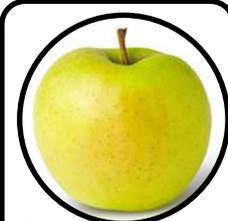
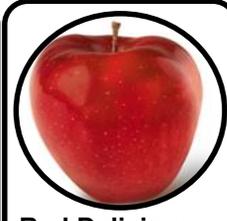
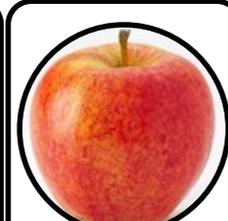
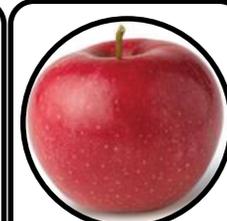
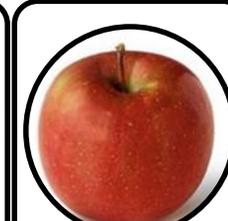
Figura 2. Características principales del árbol del manzano. (Continua) Fuente: INFOAGRO, (2011).

	<p>Hojas: Ovais, cortamente acuminadas, aserradas, con dientes obtusos, blandas, con el haz verde claro y tomentosas.</p>
	<p>Flores: Grandes, casi sentadas o cortamente pedunculadas, se abren unos días antes que las hojas. Son hermafroditas, de color rosa pálido, a veces blancas y en número de 3-6 unidas en corimbo.</p>
	<p>Sistema radicular: Raíz superficial. El árbol tiene una vida de unos 60-80 años.</p>

Figura 2. Características principales del árbol del manzano. Fuente: INFOAGRO, (2011).

La manzana cuenta con más de mil variedades en todo el mundo, si bien la gama que nos ofrece el mercado es limitada, ya que tan solo podemos elegir entre poco más de media docena de variedades, de las cuales destacan *Golden delicious*, *Red delicious*, *Roma*, *Gala*, *Fuji* (UNIFRUT, 2012), sus características generales se observan en la Figura 3.

Las variedades que mayormente destacan en nuestro país por producción comercial son: La *Golden delicious*, cuya cosecha se lleva a cabo entre los meses de agosto a octubre, la *Red delicious* en los meses de septiembre a noviembre y la *Rome Beauty*. Adicionalmente se cultiva una amplia gama de manzanas criollas (UNIFRUT, 2012).

				
<p>Golden Delicious El fruto es grande y de color amarillo dorado. Con la carne blanca amarillenta, fija, jugosa, perfumada y sabrosa.</p>	<p>Red Delicious El fruto de buen tamaño. De color rojo más o menos intenso. Carne azucarada, jugosa, ligeramente acidulada y muy aromática.</p>	<p>Gala El fruto con forma de corazón. Color amarillo-anaranjado con líneas rojas.</p>	<p>Roma Tiene una cáscara suave. Color rojo brillante con una pulpa dulce y ligeramente jugosa.</p>	<p>Fuji Fruto de pulpa firme, crujiente y dulce. Color varía de amarillo-verde con líneas rojas a un color rojo intenso.</p>

Fuente: BOTANICALONLINE, (2004).

Figura 3. Características generales de variedades de manzanas más comunes en México.

1.1.3. Composición química y valor nutricional

Desde el punto de vista nutritivo la manzana es una de las frutas más completas y enriquecedoras en la dieta (Tabla 2). Un 84 a 85% de su composición es agua por lo que resulta muy refrescante e hidratante. Entre los azúcares, la mayor parte se presenta como fructosa y en menor proporción, glucosa y sacarosa, de rápida asimilación en el organismo, son los nutrientes más abundantes después del agua. Es fuente discreta de vitamina E o tocoferol, esta posee acción antioxidante, interviene en la estabilidad de las células sanguíneas como los glóbulos rojos y en la fertilidad. Así también es rica en fibra, que mejora el tránsito intestinal y entre su contenido mineral sobresale el potasio, mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula (EROSKY CONSUMER, 2008).

Tabla 2. Composición por 100 g de porción comestible de *Golden Delicious*.

Agua (g)	84
Hidratos de carbono (g)	10.5
Fibra (g)	2.3
Proteínas (g)	0.3
Grasas (g)	0.4
Calorías	40.6

Fuente: EROSKY CONSUMER, (2008).

1.1.4. Importancia económica

1.1.4.1. Mercado mundial y nacional

En cuanto a la producción mundial de manzanas, China encabeza el primer sitio del 2010 al 2013 con un 32% de la producción mundial total seguida por Estados Unidos con un 4 %, siendo un 88.68% por debajo de China, Turquía y Polonia cada uno el 2 % de la producción mundial, mientras que México está por debajo de China con un 98.33% por lo que nuestra producción a nivel mundial es mínima (Figura 4).

Sólo alrededor de 10.8% de la producción mundial de las manzanas se consiente en los mercados internacionales, ya que los mayores productores, concentran su producción para abastecer la demanda interna de sus países (FAOSTAT, 2014).

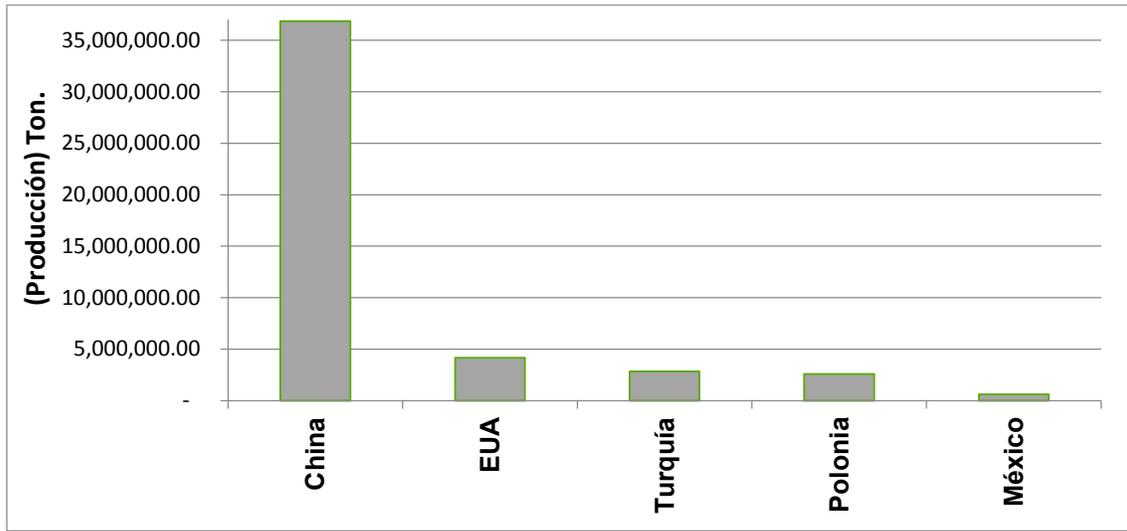


Figura 4. Producción mundial de manzana, periodo 2010-2013. Fuente: FAOSTAT, (2014).

Principales países importadores y exportadores mundiales de manzanas

De acuerdo con cifras del Centro de Comercio Internacional (CCI), el comercio internacional de manzanas experimentó un alza cercana a 10% entre los años 2008 y 2012, alcanzando al final del período un volumen alrededor de 8,2 millones de toneladas (Bravo, 2013).

La Federación Rusa continúa siendo el mayor importador de manzanas a nivel mundial, Alemania es el segundo importador, mientras que El Reino Unido ocupa el tercer lugar, con una participación también muy estable. Algunos mercados no tradicionales muestran un aumento de sus importaciones y están liderando la expansión de los principales mercados consumidores mundiales como México, Indonesia, Arabia Saudita, Bielorrusia y Kazajstán que empiezan a ser relevantes. En el caso de países exportadores de manzana China es el mayor exportador mundial de manzanas frescas con una participación de 12,8% de las exportaciones mundiales. Seguida por países como Polonia, Italia y Estados Unidos, Chile se ubica en el quinto lugar (Bravo, 2013).

MERCADO NACIONAL

La Subdirección de Evaluación de Programas de FIRA, señala que en 2013 la superficie sembrada de manzana en México ascendió a 62561.81 has, con un crecimiento en la producción de 36% en relación a 2011 (SAGARPA, 2014).

Hasta 201, el volumen de producción fue de cerca de 600 mil toneladas, sin embargo, en 2012 se observó una caída del 40% respecto al año anterior (Figura 5), llegando apenas a las 375 mil

toneladas, debido a la sequía que predominó en la zona norte y que se reflejó en una caída del rendimiento desde 10 ton/ha. En 2013, las mejores condiciones climáticas incentivaron una producción récord, que de acuerdo con estimaciones de SAGARPA, fue de 867 mil toneladas y un rendimiento de 14.7 ton/ha (SHCP, 2014). Pero para 2014 México retrocedió 16.4 % con 716865 ton de manzanas (El economista, 2015).

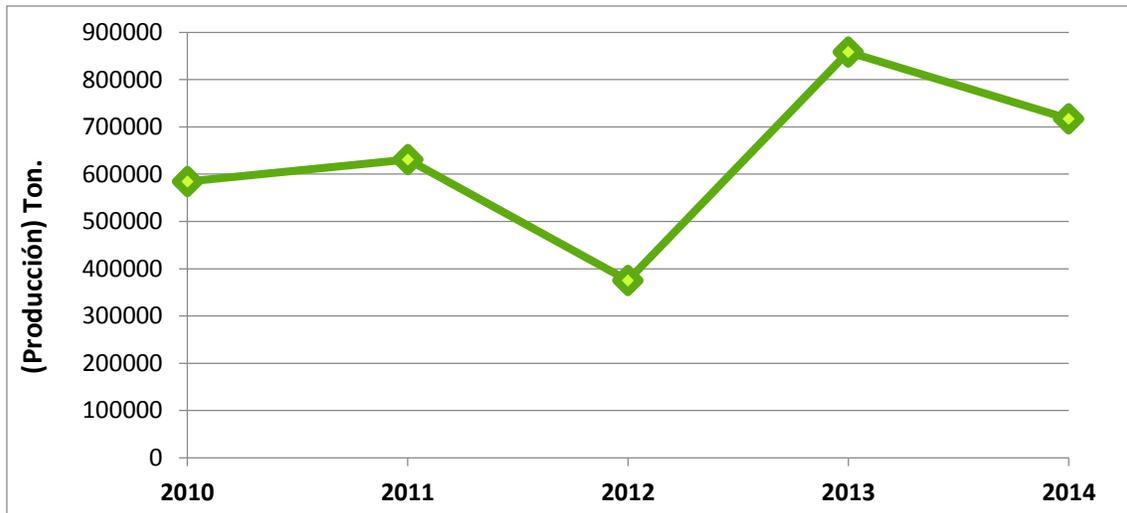


Figura 5. Producción nacional de manzanas del 2010- 2013.

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, (2014).

Producción estatal

La manzana es una de las cinco frutas de mayor consumo en el país. Los principales estados productores son Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Puebla y Querétaro (SAGARPA, 2014).

La producción de manzana en Chihuahua, se ha reducido entre 40 y 50%, por problemas de sequía y heladas tardías, lo que ocasionó un incremento en los precios, información del Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM), en septiembre 2012, en centrales de abasto del país la manzana *Golden delicious* y *Red delicious* mostró un alza en el precio de 33.8 y 20.2%, respecto al mismo mes 2011, al ubicarse en 26,574 y 24,048 pesos por ton., respectivamente (SAGARPA, 2014).

En nuestro país se producen una gran variedad de manzanas, identificándose el Estado de Chihuahua como principal estado productor de manzanas del país, 80% de la producción total (SHCP, 2014).

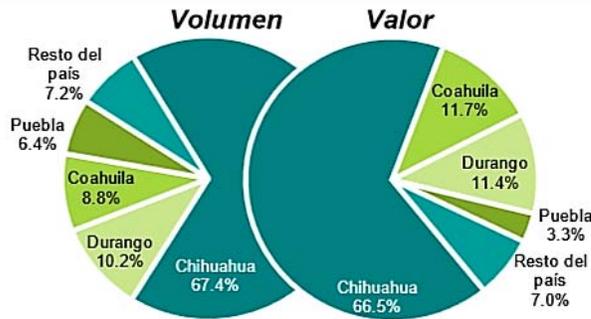


Figura 6. Estados productores de manzana 2009- 2012.

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, (2014).

Chihuahua es el mayor productor de manzana del país, entre los años 2009 y 2012 participó en promedio con el 67.4% del volumen y el 66.5% del valor generado. Durango, Coahuila y Puebla son también entidades importantes en el cultivo de esta fruta y en conjunto generaron el 25.4% del volumen y el 26.5% del valor (Figura 6) [SHCP, 2014].

Producción anual

A pesar de que la manzana es un cultivo Perenne es decir que se cultiva varias veces durante todo el año, la cosecha de manzana se realiza entre mayo y diciembre, sin embargo, el 96% del volumen producido se concentra en tres meses: agosto, septiembre y octubre (SHCP, 2014).

Observando que en el año 2013 la cosecha se dio en los meses de julio hasta principios de noviembre (Figura 7). Siendo septiembre el mes con mayor producción con un porcentaje mensual de 46% del total del año (SAGARPA, 2014).

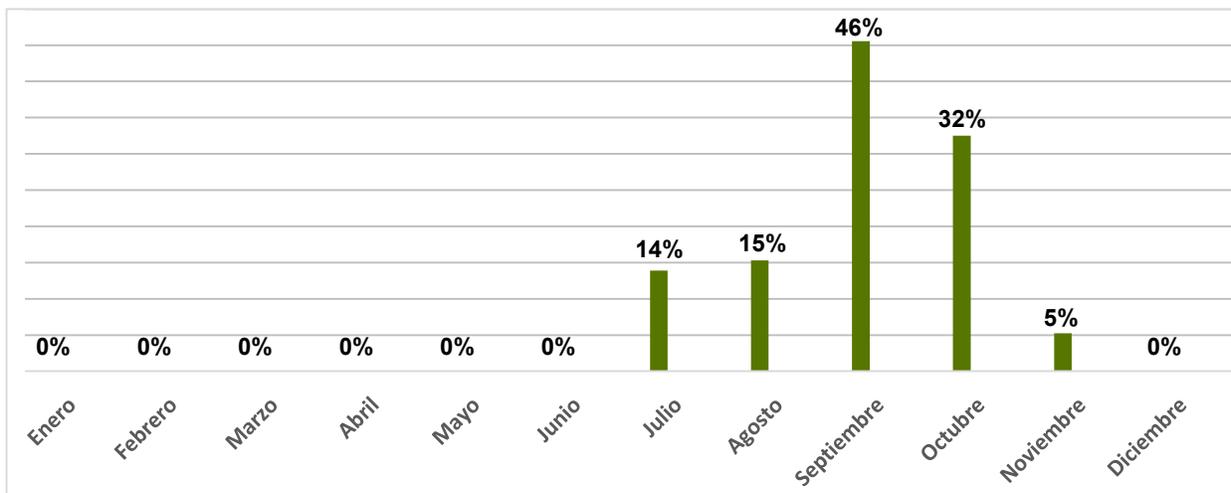


Figura 7. Porcentaje mensual de producción de manzanas en 2013.

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, (2014).

Importaciones

La producción nacional de manzana nos muestra entonces a este cultivo como estratégico a mediano plazo y potencial para la sustitución de importaciones, ya que México requiere adquirir de

otros países fruta para satisfacer su mercado interno. EUA es nuestro primer socio comercial aportando del 94 al 99% de las manzanas importadas, seguido de Chile y Canadá (SIAP, 2011), consolidando a México como el principal destino de las manzanas de los EUA.

Las importaciones en los últimos 10 años han sido en promedio de 210 mil toneladas, entre el 21% y 30% del consumo. En la Figura 8 se muestra del año 2010 al 2013 las importaciones de México, para 2012, las importaciones se incrementaron un 16% respecto al 2011, pasando de 198 a 236 mil toneladas, como efecto del desabasto generado por la sequía, lo que se tradujo en un incremento en precios, en 2013 dada la producción récord, se supondría un mejoramiento del abasto nacional, sin embargo, las importaciones no disminuyeron sino que se incrementaron un 17% respecto a 2012, alcanzándose 275 mil toneladas, lo cual ha ocasionado que este 2014 el mercado se encuentre saturado y los precios desciendan de forma importante. Los productores se han visto imposibilitados para colocar el volumen adicional de producción en vista de la mayor importación y de la baja capacidad para refrigerar la fruta y evitar inundar el mercado (SHCP, 2014).

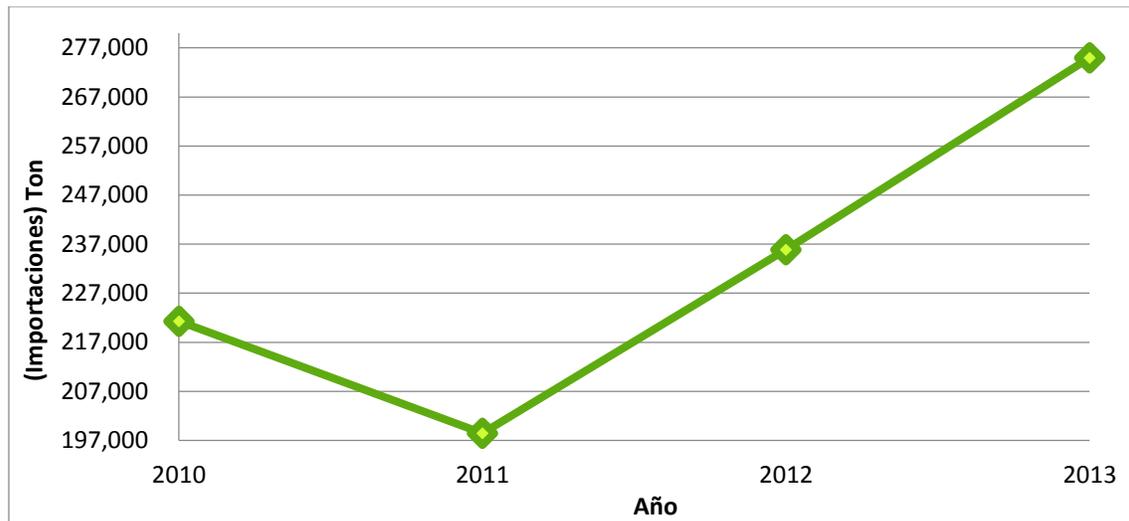


Figura 8. Importaciones de México del año 2010-2013.

Fuente: FAOSTAT, (2014).

Exportaciones

México apenas produce la cantidad necesaria para satisfacer las necesidades internas del consumo del fruto, por lo que sus exportaciones son en pequeñas cantidades, siendo EUA el principal país donde se llega a exportar las manzanas mexicanas (FAOSTA, 2014), en la figura 9 se puede observar que hay un incremento en las exportaciones del 51% del 2010 al 2011, mientras

que del 2011 al 2012 desciende estas importaciones un 57% debido principalmente una sequía que se dio en la zona norte de donde procede la mayoría de la producción de la manzana en México (SHCP, 2014), reduciendo así la producción en México en el año 2012 y por tanto la exportación de la fruta pero para el año 2013 mostro un incremento en las exportaciones de manzanas mexicanas de apenas el 10% con respecto al 2012.

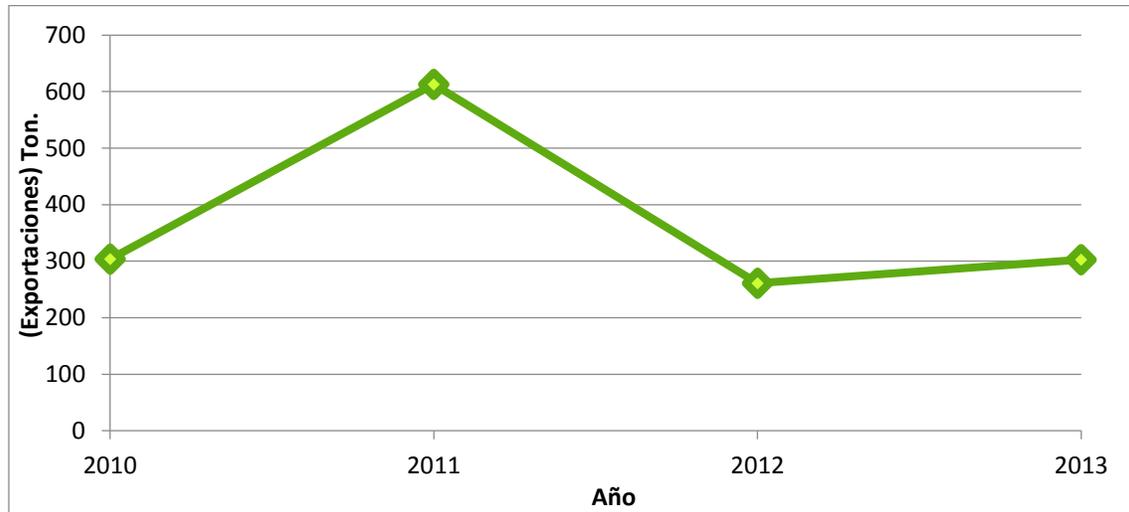


Figura 9. Exportaciones de México del año 2010-2012.

Fuente: FAOSTAT, (2014).

1.1.5. Plagas y Enfermedades

En México la presencia de enfermedades y plagas ocasionada principalmente por microorganismos, otros organismos o deficiencia de un nutriente en el manzano y su fruto genera grandes pérdidas en la producción de la manzana, repercutiendo en la economía del país, por lo que su conocimiento es fundamental para evitar tales pérdidas. Si bien una planta sufren el ataque de una plaga o un agente patógeno, en caso de manzanos y perales en la formación de sus frutos estos resultan especialmente vulnerables debido a su alto contenido en azúcares y agua por ello es necesario implementar barreras o trampas que mantengan a los frutos en plena maduración a salvo de plagas y enfermedades (Greenwood *et al.*, 2009).

Así mismo es importante evitar las amenazas de enfermedades durante la postcosecha de las manzanas, que influye en su mayoría en como son manejados los productos hortofrutícolas, por tanto es necesario entender la naturaleza de los patógenos y fisiología del producto hospedero (Sommer *et al.*, 2011).

A continuación se detalla las plagas y enfermedades más importantes en el cultivo de la manzana (Figura 10), así como enfermedades postcosecha de manzanas (Figura 11).

	<p>AGUSANADO (<i>Cydia pomonella</i>). SINTOMAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Excremento del gusano en la fruta. • Perforaciones en la fruta, especialmente en el corazón del fruto. • La putrefacción asociada a los orificios. 	<p>PLAGAS</p>
	<p>ARAÑA ROJA (<i>Tetranychus urticae</i>) SINTOMAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pequeños puntos rojos en las hojas y su decaimiento. • Curvatura de hojas y su caída, en ataques graves puede caer el fruto. 	
	<p>Picado amargo (Deficiencia de calcio en la etapa de crecimiento y desarrollo de la fruta en el árbol). SINTOMAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Depresiones de color café y secas que penetran el fruto. 	
	<p>OIDIO (<i>Phodospheera leucotricha</i>) SINTOMAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Las hojas estrechas, duras y de color blanco(micelio). • La yema de la flor infectada se deforma y florece mas tarde. • Los frutos pueden emegrecer y deformarse. 	<p>ENFERMEDADES</p>
	<p>MOTEADO (<i>Venturia inaequalis</i>) SINTOMAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Manchas oscuras y redondas en las hojas y frutos. • Decaimiento y caída de flores. • El fruto se deforma y queda pequeño. 	

Figura 10. Plagas y enfermedades del manzano. Fuente: Murray y Alston, (2014) y Soljardi (2010).

		
<p>Podredumbre gris (<i>Botrytis cinerea</i>) La podredumbre es de color marrón palido con márgenes difusos, con desarrollo de micelio blanquesino a gris.</p>	<p>Podredumbre negra (<i>Alternaria alternata</i>) La podredumbre es de color marrón oscuro a negro, con un desarrollo circular y lento, con desarrollo de micelio gris y algodonoso.</p>	<p>Podredumbre del corazón o corazón mohoso (Géneros <i>Alternaria</i>, <i>Fusarium</i> y <i>Penicillium</i>) Podredumbre seca, de color gris oscuro afecta las semillas y el corazón del fruto con consistencia blanda y acuosa que afecta la pulpa del fruto.</p>

Figura 11. Enfermedades postcosecha de la manzana.

Fuente: Viñas et al., (2006).

Pero la principal enfermedad postcosecha más común e importante en manzanas es la podredumbre azul o también denominada moho azul.

Moho Azul



Figura 12. Manzana infectada de *Penicillium expansum*.
Fuente: Soto, (2014).

Es una podredumbre blanda, acuosa, en general de color marrón claro, con margen definido, la superficie de la zona afectada se cubre de un micelio blanquecino cambiando de color azul o azul-verdosa (Figura 12).

La zona esporulada llega a cubrir toda la zona afectada, con esporulación abundante y esporas de fácil separación del micelio (Viñas *et al.*, 2006).

Investigaciones en Polonia, Sudáfrica y Estados Unidos demuestran que otras especies de *Penicillium* pueden causar una enfermedad similar, pero *P. expansum* es la causa más grande de pérdidas en manzanas almacenadas. A pesar de que las lesiones ocasionadas por el moho azul empiezan por infecciones de heridas, el hongo en un fruto podrido puede causar anidamiento al desarrollarse en el tejido sano de los frutos sanos que estén a su alrededor, *Penicillium expansum* produce abundantes conidios que son fácilmente transportados por el viento (Viñas *et al.*, 2006).

El moho azul coloniza fácilmente cortaduras o perforaciones, menos frecuentemente el hongo coloniza los pedúnculos, particularmente los grueso y carnosos, la lenticelas son también infectadas usualmente después de que sufren alguna herida, aunque también cuando las manzanas se manejan en agua (Kader, 2011).

1.2. Generalidades del hongo *Penicillium expansum*

1.2.1. Características y condiciones óptimas para el crecimiento

Características macroscópicas

Las colonias de *Penicillium expansum* en agar Czapek (CYA) a 25°C crecen rápidamente, alcanzando un diámetro de 16 a 34 mm, presentando una superficie flocosa a fasciculada, con conidios de color verde azulado a verde (Figura 13), también presenta un exudado en forma de gota copiosa y clara, el reverso en el agar CYA es de color crema a amarillo con centro café hasta naranja-café o café oscuro (Frisvad y Samson, 2004).



Figura 13. Características de *Penicillium expansum* en agar CYA.

Fuente: Propia.

Características microscópicas



Figura 14. Conidióforos y conidios de *Penicillium expansum*.
Fuente: Méndez, (2003).

El hongo *Penicillium expansum* presenta estipes de paredes lisas de 200- 500 μm x 3-4 μm , rugosas en la parte baja, con conidióforos hialinos, septados y principalmente terverticilados, conidios elipsoidales de paredes lisas de 3.0-3.5 x 2.5-3.0 μm (Figura 14), con fiálides cilíndricas y métula cilíndrica de 11-15 μm x 3.4 μm (Frisvad y Samson, 2004).

Penicillium expansum es un psicrófilo que crece bien a 0°C, pero que también puede crecer a -2 o -3°C aunque la temperatura óptima de crecimiento es de 25°C y la máxima de 35°C. (Soriano del Castillo, 2007). Tiene una mínima actividad de agua (A_w) para la germinación de 0.82-0.83 y tiene bajo requerimiento de oxígeno (Funes, 2011), pero la importancia de conocer las condiciones óptimas de crecimiento es que este hongo puede producir la micotoxina patulina durante su crecimiento.

1.3. Micotoxinas

1.3.1. Definición y clasificación

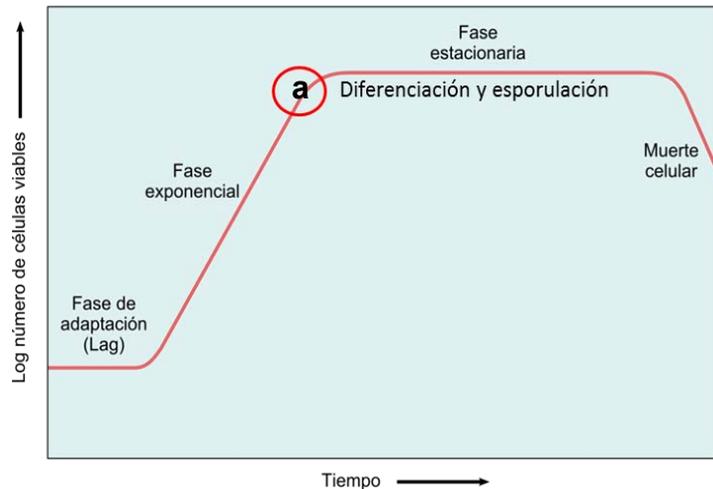


Figura 15. Fases de crecimiento fúngico, donde a: Es la localización de las síntesis de micotoxinas.
Fuente: Soriano del Castillo (2007).

La palabra micotoxina deriva de la palabra griegas mikes y del latín toxina, que significan hongo o mohos y veneno respectivamente. Las micotoxinas pueden ser definidas como compuestos tóxicos producidos por contaminación de hongos (Back *et al.*, 2002), estos compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento (fase exponencial) llega a su etapa final y durante la fase estacionaria (Figura 15), conocidos como metabolitos secundarios, siendo a menudo asociado

y durante la fase estacionaria (Figura 15), conocidos como metabolitos secundarios, siendo a menudo asociado

con la diferenciación y la esporulación. Son moléculas relativamente pequeñas ($P_m < 700$). La mayor parte de estas moléculas se originan en la ruta policetónica. La cadena general policetónica del tipo $R-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-S-CoA$, es de la cual se deriva la mayoría de las micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales (sin excluir las aves) y personas (Pitt, 1996).

En cuanto a su clasificación se puede clasificar de acuerdo a el lugar de procedencia de las micotoxinas en: toxinas de almacenamiento (aflatoxinas, ocratoxinas) y toxinas de campo (las del género *Fusarium* o tricotecenos, patulina) [Rueda, 2006], algunas micotoxinas encontradas en alimentos observadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Micotoxinas en alimentos.

MICOTOXINA	HONGO PRODUCTOR	PRESENCIA EN
Ocratoxina	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Cereales
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Cereales
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Jugo de manzana
Tricotecenos	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. verticilliodes</i>	Cereales y Harinas
Fumonisinias	<i>Fusarium verticilliodes</i> <i>F. proliferatum</i>	Maíz
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Cereales

Fuente: Méndez y Moreno (2009).

Existe la clasificación realizada por International Agency for Research on Cancer (IARC) en relación al poder cancerígeno de las micotoxinas (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las micotoxinas según la IARC.

Micotoxinas	Grupo IARC
Aflatoxinas	1
Aflatoxina M1	2B
Citrinina	3
Fumonisina B1	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3

Fuente: IARC, (1986).

Grupos:

- Grupo 1: El agente es carcinógeno en humanos
- Grupo 2A: Agente probablemente carcinógeno en humanos; existe limitada evidencia sobre humanos pero suficiente con animales.
- Grupo 2B: Agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.
- Grupo 3: El agente no es clasificable como carcinógeno para humanos, y no puede incluirse en otro grupo.
- Grupo 4: el agente probablemente no es carcinógeno en humanos; la evidencia disponible, tanto de humanos como de experimentación animal (IARC, 1986).

La IARC concluye que no hay evidencia adecuada que demuestre un efecto carcinogénico de la patulina en animales de experimentación y no se ha evaluado su efecto en humanos.

1.3.2. Generalidades de Patulina

La patulina es una lactona tóxica producida por *P. griseofulvum*, común en cereales y nueces, *P. expansum*, frecuente en manzanas, *P. gladioli* y *P. sclerotigenum* asociado a rizomas y bulbos, *P. claverigenum*, *P. vulpinum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. glandicola*, *P. formosanum* y *P. carneum* (Carrillo, 2003).

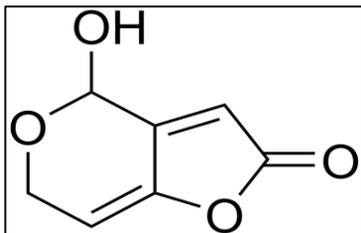


Figura 16. Estructura de la patulina
Fuente: Carrillo, (2003).

Tiene una estructura química de 4-hidroxi-4H-furo [3,2-c] piran-2-(6H)-ona (Figura 16) [Carrillo, 2003].

La mayoría de las especies productoras de patulina crecen a temperatura de refrigeración (Frisvad y Seifert, 2000). A lo largo de los años este compuesto recibió varios nombres según la fuente, entre otros clavacina, claviformina, expansina (Moss y Adak, 1986).

La patulina aparece fundamentalmente en las frutas infestadas de moho, aunque la presencia de éste no implica necesariamente la presencia de patulina en una fruta sino que indica que esto es posible. En algunos casos, el desarrollo de moho en el interior de la fruta puede deberse a los insectos o a otras invasiones en tejidos por lo demás sanos, lo que tiene como consecuencia la aparición de patulina en frutas que externamente no presentan daños. Sin embargo, también se puede producir patulina en la fruta magullada tras el almacenamiento en atmósfera controlada y la exposición a condiciones ambientales, con y sin pudrición del centro (CCFH, 2003).

El rango de crecimiento para la producción de la patulina es de 0-24°C, la mínima de actividad de agua (Aw) es de 0.99 y es estable en medio ácido (Funes, 2011).

1.3.2.1. Toxicología de la patulina y límites permitidos en alimentos

La patulina es altamente tóxica para las células animales y vegetales. Puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de proteínas y polipéptidos presentes en los alimentos. Se ha observado que provoca disrupción de la membrana plasmática, inhibición del transporte de aminoácidos dependiente de sodio, interfiere en la traducción y la transcripción, inhibe la síntesis de ADN y de la interferón y que produce las células T tipo 1, y produce rupturas persistentes de los enlaces dobles y simples de la cadena de nucleótidos en *E. coli*, así como daños oxidativos en células humanas, también pueden inhibir la actividad de numerosas enzimas debido a su afinidad por los grupos sulfhidrilo y tiene un efecto inhibitorio sobre parámetros bioquímicos tales como la actividad ATPasa, alcalina fosfatasa, aldolasa y hexoquinasa (Cano *et al.*, 2014).

La principal afección que provoca esta toxina en humanos es alteraciones a hígado, nefrona, así como desarrollo de carcinomas, se han dado casos de náuseas y vómitos considerada también inmunosupresiva (Gimeno y Ligia, 2011). En estudios donde la patulina era administrada a dosis altas durante dos meses en ratones se observó un efecto carcinogénico con la producción de sarcomas, pero en estudios con dosis bajas no se observó efecto (JECFA, 2002).

Los efectos adversos gastrointestinales, inmunotóxicos y neurotóxicos producidos por esta micotoxina en pruebas efectuadas en roedores no se han podido de momento extrapolar en humanos. Los estudios realizados acerca de la inmunotoxicidad han sido asociados a la ingestión de cantidades de patulina que son substancialmente más elevadas que aquellas a las que normalmente están expuestas los humanos (FDA, 2000). En cuanto a la DL50 de la patulina en ratas es de 15 y 25 mg kg⁻¹ si es administrada de forma subcutánea y su muerte se debe a un edema pulmonar (JECFA, 2002).

La mayoría de la toxina administrada a los animales de experimentación es eliminada dentro de las 48 horas por heces y orina, solamente un 2% es metabolizado y aparece asociada a los eritrocitos (Wouter y Speijers 1989).

Para los límites tolerables en la unión europea el Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 es el que establece contenidos máximos para la patulina, entre otros productos, en el zumo de manzana y los ingredientes de zumo de manzana en otras bebidas,

además existe un código de prácticas de higiene para prevenir y reducir la contaminación por patulina del zumo de manzana y los ingredientes de zumo de manzana en otras bebidas, recogido en la Recomendación 2003/598/CE de la Comisión europea, además se investiga en mermeladas y jugos de manzanas en la Unión Europea (Agencia Española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición, 2015). Estableciendo un valor máximo de 50 µg/Kg en zumos de fruta, zumos de fruta concentrados y reconstituidos y en néctares de fruta, así como un valor máximo de 25 µg/Kg en productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados al consumo directo, excepto los destinados a alimentación infantil (Soriano *et al.*, 2002). Mientras que a nivel internacional como medidas de gestión del riesgo existe un código de prácticas de higiene del Codex Alimentarius que ayuda a disminuir la presencia de los hongos productores de patulina: Código de Prácticas para Prevenir y Reducir la Contaminación de patulina en zumo de manzana y derivados (Agencia Española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición, 2015). Los límites tolerables de patulina según la FDA son 50 µg/L en productos como jugos de fruta (Soriano *et al.*, 2002).

El tratamiento con carbón activado por vapor, reduce hasta un 70% del contenido de patulina en jugo de manzana de 12°Brix a 55°C (Leggott *et al.* 2001) y la pasta de manzana pierde hasta el 80% de la toxina por centrifugación (Bissessur *et al.* 2001). Sin embargo aún existe presencia de la toxina en diferentes productos sean o no derivados de la manzana, en la Tabla 5 se observa algunos de los productos con presencia de patulina.

Tabla 5. Ocurrencia natural de la patulina a nivel mundial.

Producto	Positivo /total	Concentración
Manzanas con putrefacción visible	30/30	1000 - 3000 µg/Kg
Residuos de manzana	30/30	300 µg/Kg
Jugo de manzana	3-100%	140 - 1150 µg/L
Concentrado de jugo de manzana	78-100%	7 -376 µg/L
Sidra en botellas	28%	24.2 - 35.2 µg/L

Fuente: Fernández *et al.*, (2010).

En México no existe hasta el momento una normatividad sobre la presencia de la micotoxina patulina en productos sólidos o semisólidos comercializados de la manzana, a pesar de ello es

importante la determinación de la toxina en productos mexicanos para evaluar su presencia de la misma.

1.3.2.2. Técnicas de detección de patulina basados en el método cromatográfico

La cromatografía se define como un procedimiento de separación que se fundamenta en los equilibrios de concentración de una mezcla de dos o más compuestos presentes entre dos fases no miscibles: estacionaria y móvil. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación (Rouessac y Rouessac, 2000).

Existen diversas técnicas cromatográficas, como la cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography: TLC), cromatografía líquida (Liquid Chromatography: LC) y la cromatografía gaseosa (Gas Chromatography: GC) entre otras, son ampliamente utilizadas para este fin presentando una mayor sensibilidad en la detección de cepas productoras de micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Para la determinación de la presencia de patulina existen diversos métodos principalmente aplicado en zumo de manzana. Pero los principales métodos de determinación de la patulina utilizados respetan en general el esquema siguiente (Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, 1999):

- 1 - Extracción
- 2 - Purificación o eliminación de compuestos indeseables
- 3 - Concentración
- 4 - Determinación cualitativa y cuantitativa mediante técnicas cromatográficas.

Aun sin embargo es importante destacar que antes de determinar la toxina patulina en productos, es aún más importante evitar el crecimiento del hongo productor de la toxina.

1.4. Métodos de conservación de manzanas

Para la conservación de manzana existen procedimientos que se basan principalmente en alargar la vida útil y en conservar sus características organolépticas, evitando en todo momento el daño de la fruta y así evitar enfermedades postcosecha.

Las tecnologías que se usan e fundamentan en la disminución de la temperatura y en la modificación de su atmósfera interna (Guerra y Casquero, 2005). A continuación se muestran los principales procedimientos de conservación de la manzana (Tabla 6).

Tabla 6. Métodos de conservación de manzanas.

Método	Principio
Irradiación	Consiste en exponer el producto a la acción de las radiaciones ionizantes (radiación capaz de transformar moléculas y átomos en iones, quitando electrones) mata las bacterias dañinas y otros microorganismos que pueden causar intoxicación alimentaria, también tiene otros efectos tales como retrasar la maduración y el brote en los alimentos de ese modo ayudar a extender la vida útil. (EUFIC, 2002).
Atmosferas controladas	Consiste en empaquetar los productos alimenticios en materiales con barrera a la difusión de los gases, en los cuales el ambiente gaseoso ha sido modificado disminuye el grado de respiración, reduce el crecimiento microbiano y retrasa el deterioro enzimático con el propósito de alargar la vida útil del producto (Ospina y Cartagena, 2008).
Enfriamiento	Es una operación de acondicionamiento que se aplica para la eliminación rápida del calor de campo hasta alcanzar la temperatura recomendada para su almacenamiento o transporte garantizando que el desarrollo de microorganismos sea menor, así como la tasa de respiración, los cuales son responsables por la pérdida de calidad y la rápida maduración de la fruta (Teruel <i>et al.</i> , 2003).
Atmosferas modificadas	Esta consiste en cambiar inicialmente la atmósfera gaseosa en el entorno del producto, permitiendo que las actividades del producto envasado ocasione una variación del entorno gaseoso en las inmediaciones (Umaña, 2011).
Refrigeración	Consiste en la conservación de los productos a bajas temperaturas, pero por encima de su temperatura de congelación. De manera general, la refrigeración se enmarca entre -1° C y 8° C. De esta forma se consigue que el valor nutricional y las características organolépticas casi no se diferencien de las de los productos al inicio de su almacenaje (Umaña, 2011).

Si bien estos métodos son los más empleados en la conservación de las manzanas, han surgido en escena los recubrimientos comestibles para contribuir y complementar los anteriores.

1.4.1. Generalidades de recubrimientos comestibles

1.4.1.1. Definición, funciones y propósitos

Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz continua, delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento (García *et al.*, 2010). También definida como una delgada capa de material protector que envuelve a un alimento y que puede ser consumida como parte del mismo (Sánchez *et al.*, 2011).

Las cubiertas o recubrimientos involucran la formación de una estructura de polímero, directamente en la superficie del objeto que se pretende proteger o mejorar de alguna manera. De este modo, las cubiertas llegan a ser parte del producto y permanecen en el mismo durante su uso y consumo (Krochta y De Mulder, 1997).

Según Hardenburg (1967), la aplicación de recubrimientos, para la protección de los alimentos con el fin de prolongar su vida de anaquel no es nada nuevo, menciona que desde los siglos XII y XIII en China se utilizaban ceras para recubrir a los cítricos retardando su desecación. En el siglo XVI sucedía que el recubrimiento de las frutas se llevaba a cabo con parafinas previniendo la pérdida de humedad del alimento (Labuza y Contreras, 1981). Desde hace más de 50 años se ha estudiado y reportado en la literatura el uso de recubrimientos comestibles, para extender el tiempo de vida de anaquel, incrementar la calidad debido a la frescura, para productos congelados y procesados (Kester y Fennema, 1986).

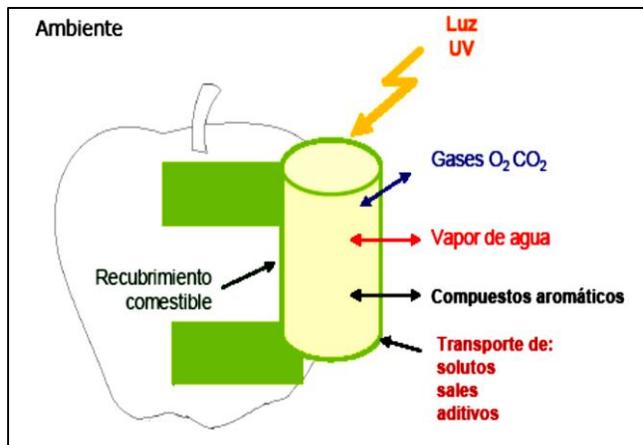


Figura 17. Principales funciones de los recubrimientos comestibles.
Fuente: Rojas-Graü, (2006).

El propósito de las películas y recubrimientos es inhibir la migración de la humedad, el oxígeno, el dióxido de carbono (Figura 17), de aromas y lípidos o como vehículo de ingredientes tales como antioxidantes, antimicrobianos, sabores y/o mejorar la integridad o las características de manejo del alimento (Kester y Fennema, 1986).

El principal beneficio de las cubiertas comestibles es que pueden consumirse con el alimento, proveer de nutrientes

adicionales, mejorar las características sensoriales e incluir antimicrobianos que conservan la calidad (Guilbert y Biquet, 1996). En la Tabla 7 se muestran ejemplos de los recubrimientos comestibles empleados en manzanas.

Destacando la carboximetilcelulosa (CMC) que es un derivado de la celulosa que ha recibido una atención considerable por sus aplicaciones en frutas y vegetales. Su carácter de alta viscosidad en soluciones diluidas, buenas propiedades formadoras de película e inocuidad, han diseminado su uso en la industria alimentaria Aguilar-Méndez *et al.* (2012).

Tablas 7. Recubrimientos por materiales compuestos en manzanas frescas.

Matriz de la película comestible	Plastificante y aditivos	Función de la película
CPS Y APS	Glicerol	Reducción de pardeamiento enzimático
CPS + CMC	Glicerol, AA, AO, CaCl ₂	Mantenimiento de la textura, reducción de la tasa respiratoria
APS + cera de abeja	Glicerol, AE	Reducción de pardeamiento enzimático
Puré de manzana + pectina+ CAB o aceite vegetal	Glicerol, AA, AC	Reducción de pérdida de humedad y pardeamiento enzimático
Maltodextrina + MC	Glicerol, AA, SP, CaCl ₂	Disminución de la producción de etileno y pardeamiento enzimático
Carragenina, pectina, alginato, CM + MGA	AA, AC, CaCl ₂ , NaCl	Disminución de la producción de CO ₂ y etileno en un 50-90%
Quitosan + CPS	CAB	Barrera a los gases, reducción de la pérdida de humedad y efecto antifúngico
Alginato, gelano	Glicerol, aceite de girasol, N-cys	Reducción de la pérdida de humedad, manteniendo el color original
CPS: Concentrado de proteína de suero lácteo; APS: Aislado de proteína de suero lácteo; AA: Ac. ascórbico; AO: Ac. Oxálico; AC: Ac. Cítrico; CMC: Carboximetilcelulosa; CaCl ₂ : Cloruro de calcio; N-cys: N-acetilcisteína; AE: Ac. Estearico; CAB: Cera de abeja; MC: Metilcelulosa; NaCl: Cloruro de sodio; SP: Sorbato de potasio; MGA: Monoglicérido acetilado; CM: Celulosa microcristalina.		

Fuente: Rojas-Graü, (2006).

1.4.1.2. Componentes de formación de los RC

Krochta *et al.* (1994) clasifican a los componentes de los recubrimientos comestibles en tres categorías: lípidos, hidrocoloides y mezclas.

Los hidrocoloides incluyen proteínas, derivados de celulosa, alginatos, pectinas, almidones y otros polisacáridos. Mencionan también que los lípidos incluyen a las ceras, acilgliceroles y ácidos grasos y las mezclas que contienen componentes lipídicos e hidrocoloides. Mencionan que dependiendo del tipo de componente dependerán las propiedades de cada película, a continuación se mencionan los principales compo nes empleados en cada uno de los recubrimientos comestibles:

- RC a base de proteínas: Gelatina, Colágeno, Zeína, Proteínas de la leche, Caseína, Proteínas del suero de leche, Aislados de proteína de soya

- RC a base de polisacáridos: Alginatos, Pectina, Carragenina, Almidón, Dextrina, Celulosa y derivados
- RC con lípidos y a base de lípidos: Ceras.

Guilbert *et al.* (1986) menciona que varios materiales pueden ser incorporados dentro de los RC y tener influencia en las propiedades mecánicas, protectoras y sensoriales. Menciona también que para incrementar las propiedades organolépticas o nutricionales en los alimentos se pueden incorporar agentes saborizantes, pigmentos o aditivos nutricionales en los RC o las películas comestibles.

La influencia que tendrá el aditivo (Figura 18) en las propiedades de la película dependerá en el grado de concentración, en la estructura química, en el grado de dispersión en la película y en la interacción con los polímeros (Córsico *et al.*, 2014).

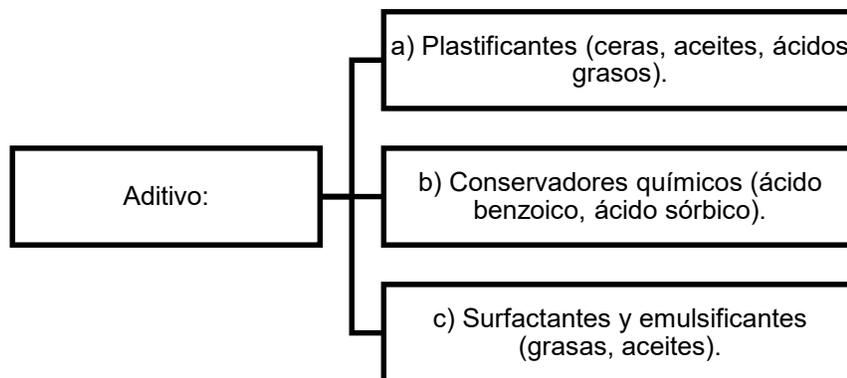


Figura 18. Principales aditivos de los recubrimientos comestibles.
Fuente: Rojas-Graü, (2006).

1.4.1.3. Compuestos antifúngicos

En la formulación de los recubrimientos comestibles o películas comestibles también se pueden incorporar productos naturales con actividad antimicrobiana procedentes de plantas, organismos marinos, insectos o microorganismos como alternativas viables al uso de los químicos de síntesis.

Es conocido que los aceites esenciales, resinas, extractos y especias obtenidos de diferente procedencia son y fueron utilizados desde la antigüedad en gran número de aplicaciones: perfumes, ambientadores, cosméticos e incluso fármacos (Sánchez *et al.*, 2008).

Es por eso que los métodos alternativos para el control de enfermedades se han estudiado con énfasis en nuevos compuestos derivados de fuentes vegetales, como aceites esenciales y

extractos vegetales, como en el principio de los tiempos, ya que son más seguros para los consumidores y el medioambiente, su uso eficaz es contra patógenos resistentes a los plaguicidas y enfermedades de postcosecha (Villa *et al.*, 2015).

1.4.2. Generalidades de extractos vegetales

1.4.2.1. Definición

Los extractos vegetales se definen como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruiz y Susunaga, 2000).

Se sabe que las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en protegerlas (Wilson *et al.*, 1999). Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. El proceso para obtener metabolitos secundarios de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos (Bautista *et al.*, 2002) o polvos (Bautista *et al.*, 2003), o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (Abou *et al.*, 2002).

Entre los compuestos que sintetizan cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber varios con propiedades antifúngicas, destacan en su mayoría a los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999). Montes *et al.* (2000) evaluaron 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos fitopatógenos, y encontraron que entre 32 y 51 % de las plantas evaluadas interactuaban con los hongos y causaban desde estimulación biológica hasta inhibición total.

Se ha observado que las mezclas de compuestos con propiedad antifúngica encontrados en las plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones. Así mismo, diversos métodos de extracción son estudiados para salvaguardar las propiedades extraídas de la mejor y más viable manera posible.

1.4.2.2. Métodos de extracción

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal. (Arévalo y Enciso, 1996) Los principales métodos empleados en la extracción de extractos vegetales se pueden observar en la Tabla 8

Tabla 8. Métodos de extracción de los extractos vegetales.

Método	Breve descripción
Por solventes	Para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona.
Extracción continua en Soxhlet	La cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal.
Por reflujo	El material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal
Maceración en frío	El material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío.
Extracción asistida por ultrasonidos	Extracción de compuestos activos, sabores y especias de material vegetal es una aplicación generada disruptas a las células vegetales y mejorando la transferencia de masa para que disponga del material intracelular debido a las ondas sonoras en el medio líquido. De este modo, se logra una extracción más eficiente y de mayor rendimiento.

Fuente: Arévalo y Enciso, (1996) y Kadkhodae, (2007).

1.4.3. Generalidades de Sangre de drago

1.4.3.1. Taxonomía, morfología y características

El estudio de la actividad biológica de algunos compuestos que se encuentran en las plantas que son extraídos por diferentes métodos, ofrece una oportunidad para descubrir nuevas y eficaces bioactivos para el control de plagas.

En la zona árida del noreste México, se cuenta con más de 3,500 especies de plantas medicinales identificadas y clasificadas (Aguilar *et al.*, 2008), que forman parte de una gran fuente de agentes antimicrobianos (Castillo *et al.*, 2010). Sin embargo, existe muy poca información sobre la extracción e identificación de compuestos fitoquímicos de estas plantas, siendo uno de estos casos la especie de *Jatropha dioica* (Wong *et al.*, 2010).

Jatropha dioica es una planta originaria de México, también comúnmente conocida como sangre de drago, sangre de grado o sangregado, pertenece a la familia de las Euforbiáceas (*Euphorbiaceae*); dentro del género *Jatropha* se clasifican alrededor de 180 especies; el nombre del género (*Jatropha*) deriva del griego “iatros” (doctor o sanador) y “trophe” (alimento o nutrición), que hace referencia a sus efectos terapéuticos; con el nombre de Sangre de drago se conocen alrededor de una docena de especies en México, principalmente las especies *Jatropha dioica* y *Croton draco*, la cual también desprende un líquido rojizo al hacerle cortes y pertenece a la misma familia (*Euphorbiaceae*) por lo que la confusión suele ser frecuente (Martínez, 2012).

La planta de sangre de drago tiene nombres comunes alrededor de México desde batácora (Baja California), coatli, dextrí (Hidalgo), drago, felondilla, gualulo (Hidalgo), matácora (Baja California), piñón de cerro, sangre de drago (Hidalgo, Valle de México), sangre de grado (Durango, Valle de México), sangre gaco, sangregada, sangregado (Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora), sangregado (Durango, San Luis Potosí, Sonora, Zacatecas), sangregao, suzi (Oaxaca), tacote prieto (Sinaloa, Sonora), telondilla (ciudad de México, Hidalgo), tlapalezpatli (náhuatl), torote amarillo, torote prieto (Baja California) [Manzanero *et al.*, 2009].



Figura 19. Morfología de *Jatropha dioica*.
Fuente: Martínez, (2012).

Jatropha dioica:

El hábitat de esta especie es en climas secos, con suelos muy pedregosos sobre las sierras, aunque se logra desarrollar en las faldas de los cerros. Es una especie capaz de crecer en zonas perturbadas en donde es muy difícil el crecimiento de otras plantas.

Es una planta arbusto semileñosa, herbácea de tallos carnosos y flexibles, de color café rojizo, que alcanza hasta 1.5m de altura, comúnmente mide medio metro; hojas agrupadas generalmente en los nudos, con la punta redondeada, de 2 a 4 cm de largo; contiene un líquido incoloro que al estar en contacto con el aire toma un color

rojizo (látex); las flores son pequeñas y de color rosa o blancas en grupos observadas en la Figura 24; produce un fruto globoso con una semilla y la raíz es suculenta, las hojas suelen presentarse durante la época de lluvias frecuente (Martínez, 2012). Es una planta que tiene una raíz tuberosa, suculenta y rastrera, se han encontrado raíces que miden hasta cinco metros alrededor de la planta (Márquez, 2007).



Figura 20. Distribución geográfica de sangre de drago en México.

Fuente: González y Sosa, (2003).

Se encuentra principalmente en matorrales xerófilos de zonas desérticas y semidesérticas, desde Chihuahua hasta Oaxaca, en un amplio rango altitudinal, desde los 5 hasta los 2 800 m (Rzedowski y Calderón, 2001). Esta especie tiene una amplia distribución en México y se han registrado usos etnobotánicos en más de 17 estados (Figura 20) de la República Mexicana (Sánchez, 2012).

1.4.3.2. Propiedades medicinales

La sangre de drago es uno de los medicamentos de uso tradicional de renombre en las diferentes culturas del mundo. Tiene varias propiedades medicinales como (García, 2009):

- Actividad antitumoral y citotóxica
- Actividad antihemorrágica
- Actividad inmunomoduladora
- Actividad antidiarreica y antiulcerosa
- Actividad analgésica
- Actividad antioxidante
- Actividad antiinflamatoria
- Actividad mutagénica
- Actividad cicatrizante

Además de estas aplicaciones medicinales, se utiliza como material para colorear, barniz, y también tiene aplicaciones en la magia popular. Estos jugos y resinas de color rojo se derivan de una serie de diferentes especies de vegetales. A pesar de su amplia utilización, se han realizado muy pocos estudios científicos para conocer su verdadero origen, control de calidad y aplicaciones clínicas. Existen diferentes especies de sangre de drago, así como diversos componentes químicos y usos terapéuticos (García, 2009).

En México, específicamente el mercado de Sonora se anuncia contra la caída del cabello, con el uso de baños cuando hay debilidad, dolor de riñones, y problemas con la digestión. Así mismo se utiliza en el uso para afecciones de la piel, del tejido subcutáneo y problemas odontológicos, por medio de una infusión que se aplica externamente (Manzanero *et al.*, 2009). En cuanto la toxicidad

de *Jatropha dioica* es considerada muy baja en bajas concentraciones, sin embargo en altas [] puede producir el aborto en ratones embarazadas (Martínez, 2012).

1.4.3.3. Composición química de sangre de drago

Jatropha dioica es una especie muy poco estudiada. Las únicas investigaciones que existen se han hecho por científicos mexicanos en colaboración con extranjeros, siendo relativamente antiguas (Wong *et al.*, 2010). Vargas y Trejo, (2013) realizaron la identificación por cromatografía (HPLC) de los principales componentes del extracto etanólico de sangre de drago mostrando los resultados en la Figura 21. Los componentes principales se muestran sus características en la Tabla 8.

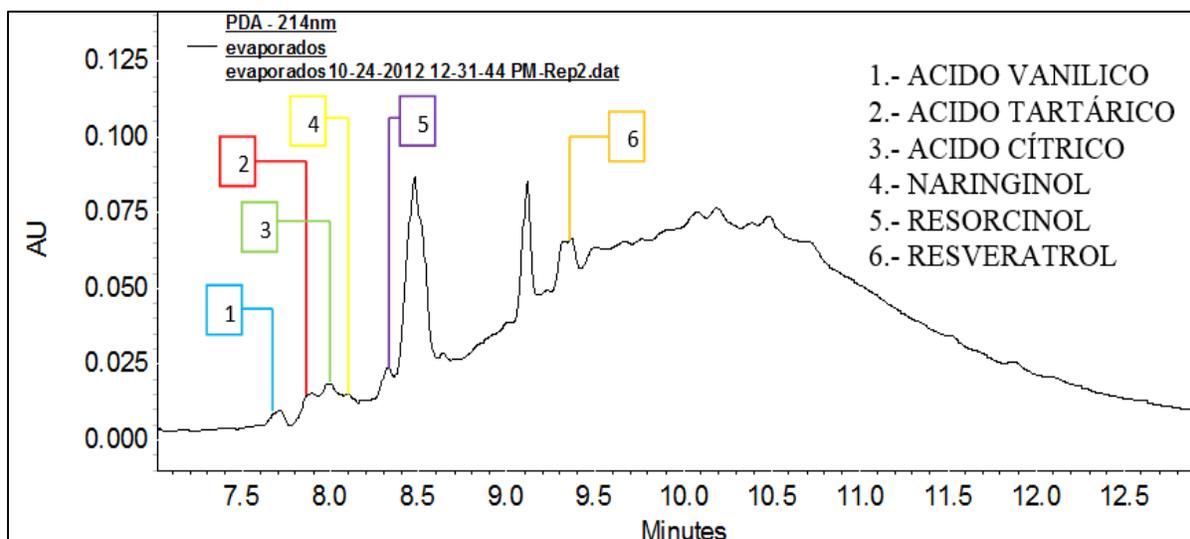
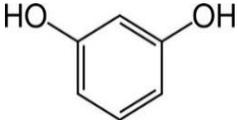
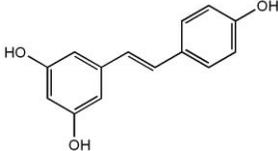
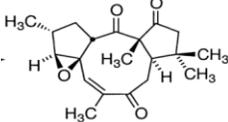
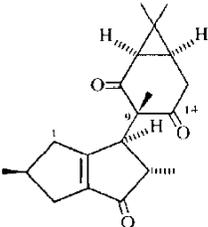
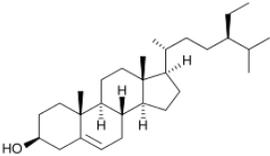
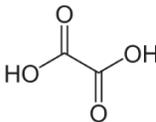
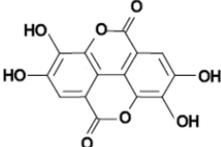


Figura 21. Electroferograma de la identificación de los compuestos del extracto etanólico de sangre de drago (*Jatropha spp.*).
Fuente: Vargas y Trejo (2013).

Mientras que la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM), (2009) menciona que han identificado tres diterpenos de la raíz de *Jatropha dioica Cerv.* Entre los diterpenos, se encuentran el riolozatriona, la citlalitriona, el Jatropholona B y β -Jatrophona (Tabla 8), además de un esteral, el β -sitosterol, resina, saponinas, alcaloides, ácido oxálico y ácido elágico (Sánchez, 2012).

Tabla 9. Características de los componentes de sangre de drago.

Componente	Composición química	Breve descripción	Localización en la planta
Resorcinol		Compuesto que comparte muchas características con el fenol. Empleado en la industria farmacéutica como antiséptico dermal.	-
Resveratrol		Compuesto miembro de un grupo de compuestos vegetales llamados polifenoles. Con propiedades antioxidantes y producido por la planta como defensa ante ataques fúngicos.	-
β -Jatrofona	-	Diterpeno macrocíclico, que posee múltiples actividades biológicas como citotoxicidad, inhibición de las células tumorales y efectos gastroprotectores en ratas.	Raíz
Citlaltiriona		Un compuesto derivado de un epoxitiriona desconocido del diterpeno, estrechamente relacionada a jatrofatrion/jatrofon.	Raíz
Riolozatriona		Diterpeno que ha mostrado actividad antibiótica frente a <i>S. aureus</i> .	Raíz
β -sitosterol		Compuesto químico que pertenece al grupo de los fitosteroles, que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Es extremadamente insoluble en agua y pobremente soluble en lípidos. Ha demostrado tener actividad quimioprotectora.	Raíz
Ácido oxálico		Es un ácido orgánico carboxílico, con presencia natural en vegetales, principalmente en las espinacas.	Raíz
Ácido elálgico		Es un polifenol que protege a muchas plantas contra la luz ultravioleta, virus, bacterias y parásitos, es un antioxidante natural.	Tallos y látex

Fuente: Domínguez, (2008) y Martínez, (2013).

Aguilera *et al.*, (2008) cuantificaron uno de los taninos presentes en *Jatropha dioica*, específicamente el ácido elágico, reportando una concentración de 0.81 mg/g de planta por lo que puede ser considerada como una importante fuente alternativa de dicho compuesto debido a sus propiedades relacionadas a la salud, como acciones antiesteroescleróticas, propiedades anticarcinogénicas. Las partes de donde se extraen los taninos son muy variadas, pero principalmente es en la corteza y en la madera de las plantas dicotiledóneas de donde es extraída (Olivares, 1983). Y cuanto más cálido el clima, tanto mayor es la cantidad de extracto curtiente (López y Mendoza, 2000).

El género *Jatropha* ha sido identificado como un género rico en terpenos (Devappa *et al.*, 2011), en la actualidad han sido aislado cerca de 68 diterpenos, cuya actividad biológica varía desde actividad antitumoral y antimicrobiana *in vitro* y en su mayoría muestran actividad citotóxica, algunos otros compuestos muestran actividad antitumoral (Seigler, 1994; Devappa *et al.*, 2011). A pesar de que esta planta contiene ácido elágico, se podría suponer que éste no es uno de sus compuestos principales debido a las bajas concentraciones en las que se encuentra. Esto realza todavía más la importancia de la investigación de *Jatropha dioica* al pensar en la presencia de compuestos distintos aún sin explorar y con mayor relevancia (Wong *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que extractos acuosos de la raíz ejercen una actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* (BDMTM, 2009). Ortiz *et al.*, (2003) refieren la actividad antibacteriana de la sangre de grado. En otro estudio la especie *Jatropha dioica* presentó actividad antimicrobiana contra *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus niger*, así como contra las bacterias Gram + *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Sánchez, 2012).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL. Evaluar el efecto de la aplicación de recubrimientos comestibles a base de carboximetilcelulosa (CMC) con extracto de sangre de drago para el control de *Penicillium expansum* y la inhibición de la producción de patulina en manzanas *Golden delicious* para evitar problemas de inocuidad durante el almacenamiento.

Objetivo Particular 1. Determinar la actividad antifúngica de extractos etanólicos de sangre de drago por medio de pruebas *in vitro* que permita establecer la concentración de extracto que inhiba el crecimiento de *Penicillium expansum*.

Objetivo Particular 2. Elaborar películas modelo a base de CMC (0.5, 1, 1.5 %) en diferentes formulaciones adicionadas con extracto etanólico de sangre drago y seleccionar las que presenten mejores propiedades físicas y de barrera, para su aplicación como recubrimiento en manzanas *Golden delicious*.

Objetivo Particular 3. Realizar pruebas *in vitro* de las películas comestibles adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago con mejores propiedades físicas y de barrera para evaluar la inhibición del crecimiento micelial del *Penicillium expansum*.

Objetivo Particular 4. Evaluar el efecto de la aplicación de recubrimientos comestibles adicionados con extracto etanólico de sangre de drago sobre los parámetros físicos, fisiológicos, fisicoquímicos y características sensoriales de manzana *Golden delicious* almacenada en refrigeración.

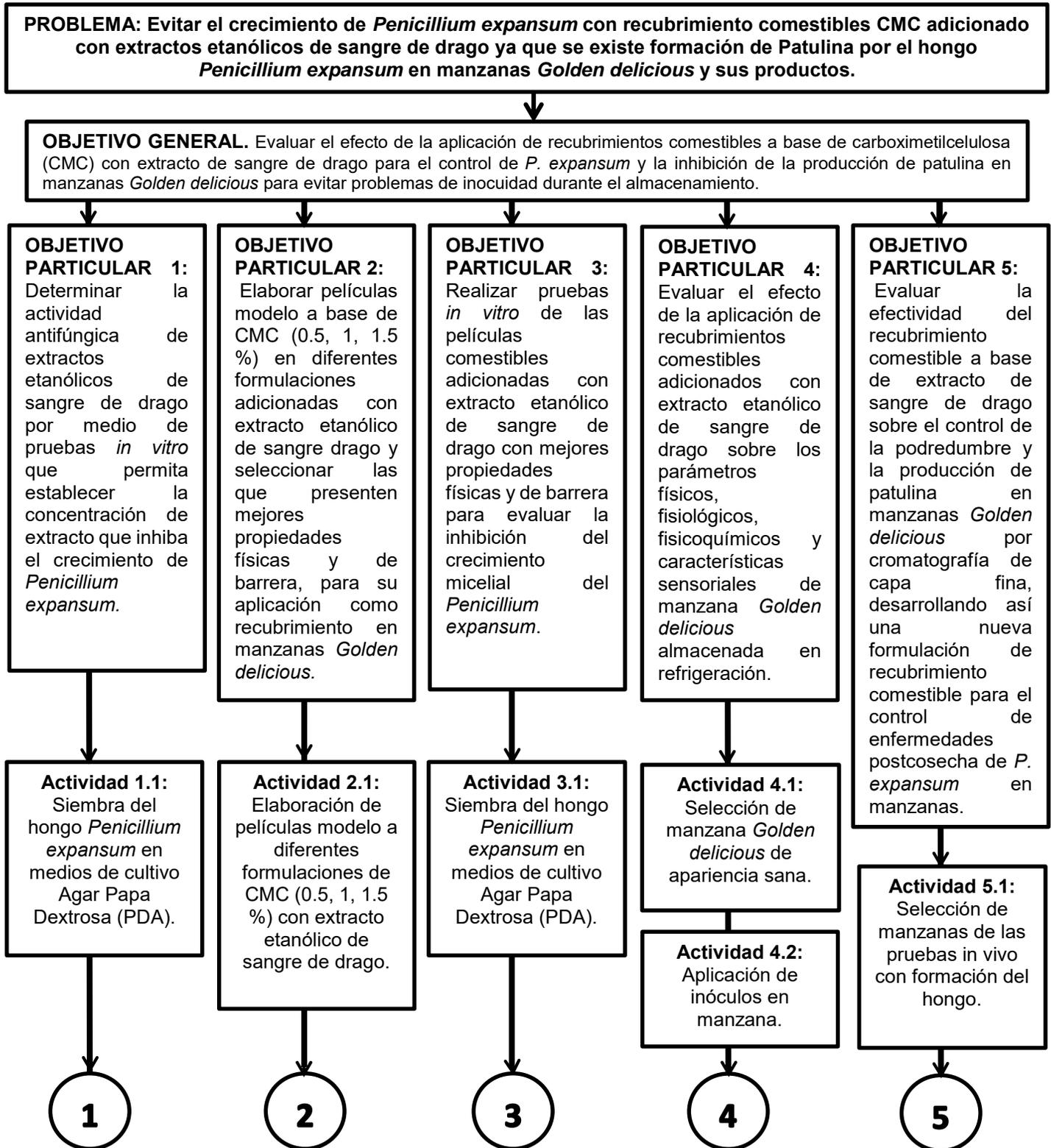
Objetivo Particular 5. Evaluar la efectividad del recubrimiento comestible a base de extracto de sangre de drago sobre el control de la podredumbre y la producción de patulina en manzanas *Golden delicious* por cromatografía de capa fina, desarrollando así una nueva formulación de recubrimiento comestible para el control de enfermedades postcosecha de *P. expansum* en manzanas.

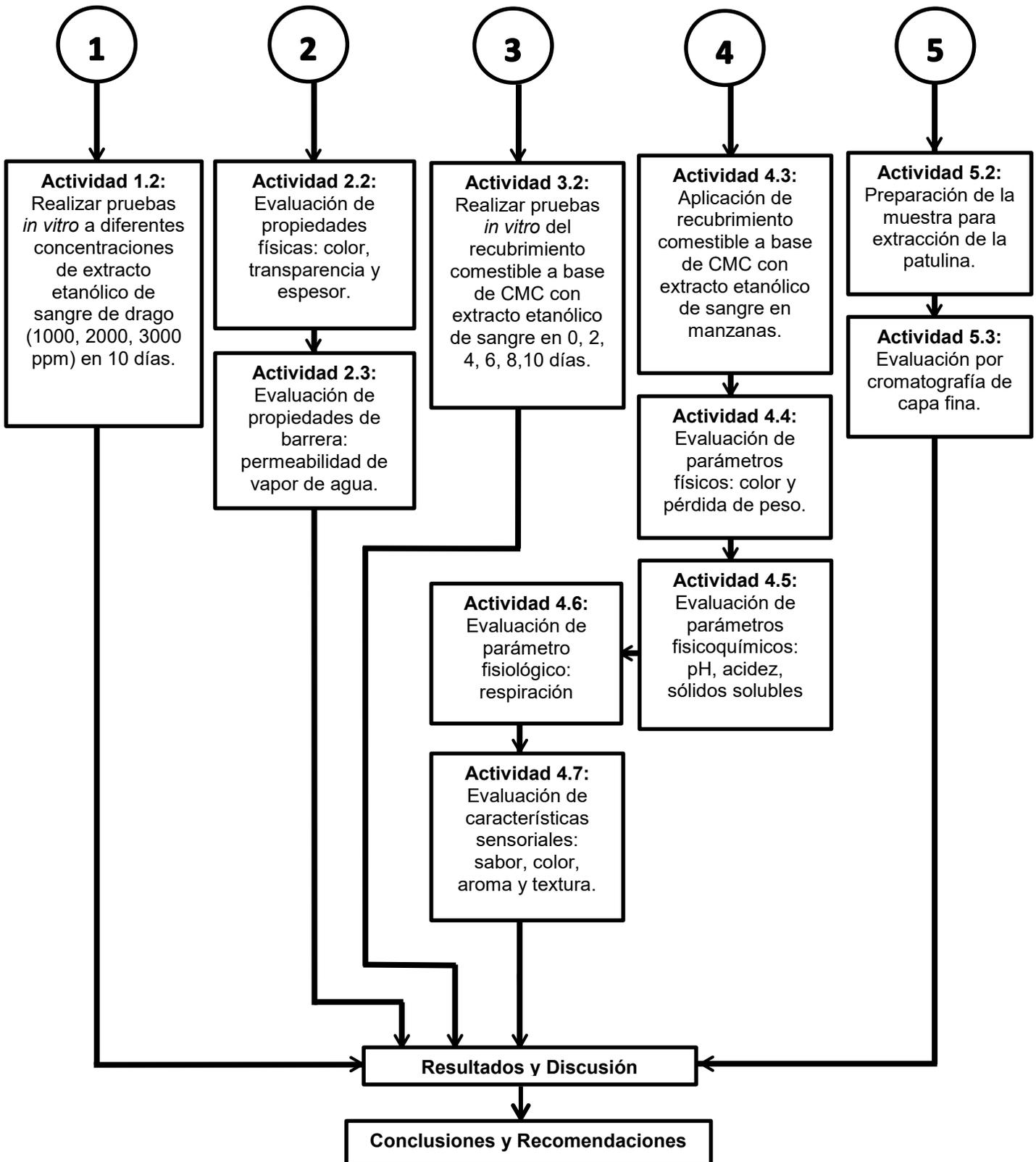


MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cuadro metodológico





3.2. Material biológico

En el presente estudio se utilizaron manzanas de la variedad *Golden Delicious* procedentes de Chihuahua obtenidos en la central de abastos de la Ciudad de México, trasladadas al Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales del Centro de Asimilación Tecnológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM donde se acondicionaron para su posterior tratamiento, explicado más adelante.

Las plantas de Sangre de drago (*Jatropha dioica*) se utilizaron para la obtención de los compuestos bioactivos, estas fueron adquiridas en la Central de Abastos de la Ciudad de México y en Saltillo, Coahuila (Figura 22). Estas plantas fueron clasificadas por el Herbario de Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.



Figura 22. Ramas secas de sangre de drago.

3.3. Obtención de extractos vegetales

Para la obtención de extractos etanólicos de las plantas denominada sangre de drago (*Jatropha dioica*), se pulverizó la planta en un molino marca Hamilton Beach CM05 hasta obtener un polvo que pasó por el tamiz (ISICAS) del número 20 de 0.84 mm de diámetro.

La extracción de los compuestos bioactivos se realizó por el método de extracción asistida por ultrasonido (Ultrasonic Cleanern marca Cole-Parmer 8891-21) [Figura 23] en una relación 1:10 es decir 5 g de planta por cada 50 mL de etanol al 70% como disolvente, con un tiempo de extracción de 90 minutos. El extracto etanólico obtenido se filtró y se almacenó a una temperatura de menor de 4°C para su uso posterior.



Figura 23. Baño de ultrasonido empleado para la obtención de extractos etanólicos.

3.4. Pruebas *in vitro* de extractos etanólicos de sangre de drago

Para realizar las pruebas *in vitro* fue necesario realizar el cultivo de *Penicillium expansum* en medio de cultivo Agar papa Dextrosa (PDA) con crecimiento de 10 días a una temperatura de 25 °C, para posteriormente tomar muestras del micelio del hongo.

El hongo *Penicillium expansum* fue obtenido de una colección de cepas del laboratorio de postcosecha de frutos y hortalizas del CAT, originalmente se aisló de manzanas *Golden delicious* procedente del mercado del Carmen de Cuautitlán, Izcalli.

El método para las pruebas *in vitro* fue el de adición al medio (Fuentes *et al.*, 2012), el cual consiste en preparar diluciones del extracto etanólico de sangre de drago a 3 diferentes concentraciones (1000, 2000 y 3000ppm) utilizando como solvente el medio de cultivo PDA hasta obtener las concentraciones deseadas. Una vez obtenidos los medios de cultivo a las diferentes concentraciones y ya solidificado se colocaron explantes con ayuda de un sacabocado, de 1 cm de diámetro de *Penicillium expansum* colocándolo en el centro del agar. Después se incubaron a 25 °C durante 10 días tomando registro diariamente del crecimiento micelial (Figura 24). Así también se consideró el control positivo (PDA sin extracto etanólico) y control negativo (PDA con etanol 70%) para la evaluación comparativa. Para determinar el %Crecimiento micelial se determinó de la siguiente manera (Fuentes *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Crecimiento micelial} = \frac{\text{Crecimiento micelial de control positivo (Diámetro del crecimiento micelial que se midió diariamente con un vernier)} - \text{crecimiento micelial del tratamiento}}{\text{crecimiento micelial de control positivo}} \times 100$$



Figura 24. Procedimiento de las Pruebas *in vitro*: a) Obtención del explante del hongo *Penicillium expansum*, b) Siembra del mismo en el medio de cultivo, c) Registro diario del crecimiento micelial.

3.5. Elaboración de películas modelo

Las películas modelo se elaboraron a base de Carboximetilcelulosa (CMC) a diferentes concentraciones empleado como aditivos al glicerol como plastificante y al Tween 80 como emulsificante a las concentraciones mostradas en la Tabla 10 de acuerdo a Tongdeesoontorn *et al.* (2011). Para elaborar la matriz de la película se disolvió CMC en agua destilada a una

temperatura no máxima de 80°C. Posteriormente ya disuelto se agregó tween 80 y el glicerol, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se le adicionó la cantidad necesaria del extracto etanólico. Enseguida se mezclaron hasta obtener una matriz homogénea.

Tabla 10. Formulaciones de películas modelo de CMC.

Concentraciones %P/P*		
Polisacárido CMC	Tween 80	Glicerol
0.5, 0.75, 1%	0.5%	1%
*%P/P: Porcentaje peso/peso		

Posteriormente se agregaron 30 mL de la mezcla y se vaciaron en platos de plástico de polipropileno de un diámetro de 15 cm de cada formulación y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 72 horas en una base nivelada (Figura 25), posteriormente se les realizó la evaluación de las propiedades físicas y de barrera.

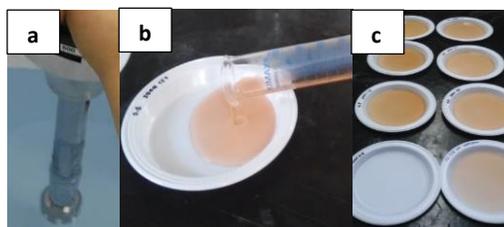


Figura 25. Procedimiento para la elaboración de películas modelo: a) Homogenización de la mezcla de los componentes, b) Vaciado de la mezcla en platos, c) Secado de las películas modelo.

3.6. Pruebas *in vitro* de películas modelo adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago

El método realizado para las pruebas *in vitro* fue el de adición al medio mencionado en el apartado 3.5 con diferencia que se agregó al agar PDA en una relación 1:1 la película modelo adicionadas con el extracto etanólico de sangre de drago (Figura 26). De igual forma se considera el control de PDA (PDA sin Película modelo) y el control Película (PDA con Película modelo sin extracto etanólico) para la evaluación comparativa.



Figura 26. Procedimiento de pruebas *in vitro* de películas modelo: 1) Elaboración del medio adicionado con película modelo con extracto de sangre de drago, 2) Vaciado en cajas, 3) Colocación del explante en el medio de cultivo, 4) Seguimiento diario del crecimiento micelial.

3.7. Aplicación de recubrimientos en manzanas *Golden delicious*

El proceso de aplicación de recubrimientos en manzana se muestra en la Figura 27. Se presenta en detalle cada etapa que comprende el proceso.

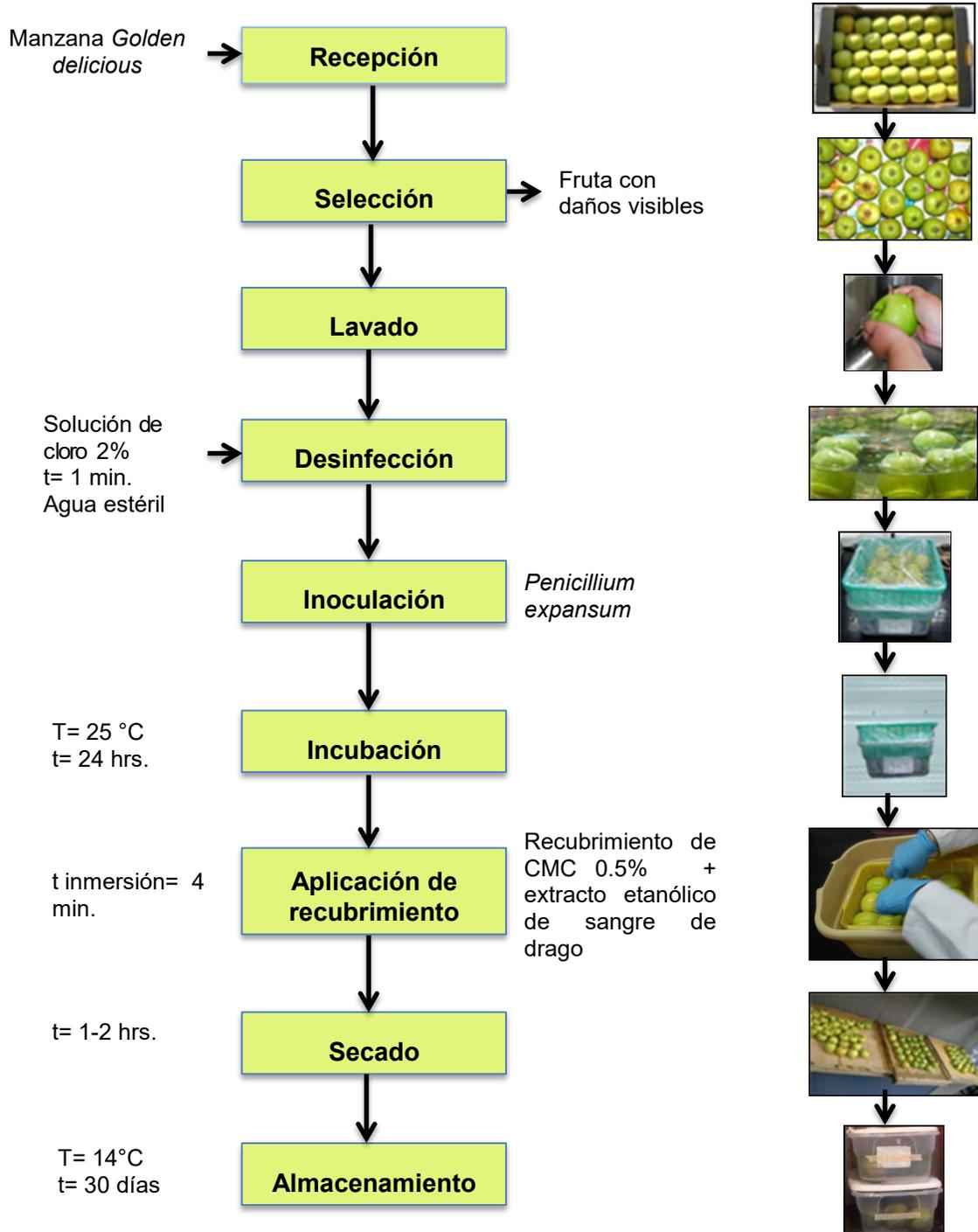


Figura 27. Diagrama de proceso de aplicación de RC.

La descripción del proceso se realiza a continuación:

- **Recepción:** Se recibieron las cajas de manzanas *Golden delicious*.
- **Selección:** Fueron seleccionadas aquellas manzanas que no presentaron lesiones mecánicas, picaduras y sin presencia aparente de hongos, aceptando solo las de apariencia firme, color homogéneo y de aproximadamente 95 g de peso y unas medidas aproximadas a 20x20 cm de ancho y largo.
- **Lavado y desinfección:** Se retiraron las hojas de las manzanas para posteriormente realizar la desinfección por inmersión con una solución de cloro al 2% durante 1 minuto, posteriormente las manzanas fueron enjuagadas con agua estéril para eliminar impurezas y residuos de cloro, y se dejaron secar con una corriente de aire forzado.
- **Inoculación e incubación:** El inóculo se preparó con una suspensión de esporas en una solución de tween 80 al 0.5%. Agregando unos mililitros de solución del tween a la colonia de *P. expansum* incubado previamente 10 días a 25°C (para romper la tensión superficial y no dispersar las esporas al ambiente) y realizando un raspado en el medio de cultivo con ayuda de un bisturí de la colonia (Figura 28).

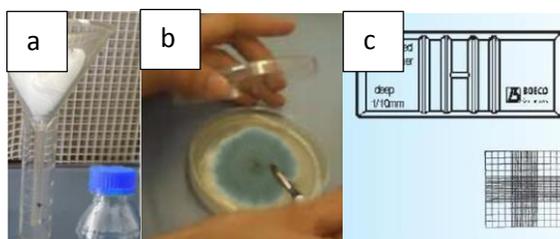


Figura 28. Procedimiento de preparación del inóculo: a) Materiales, b) Raspado del hongo con tween 80% para la separación de conidios, c) Cámara de NeuBauer.

Posteriormente la suspensión de esporas se filtró a través de una gasa. El conteo de esporas se realizó en una cámara de NeuBauer siguiendo la metodología de Cañedo y Ames (2004).

Se obtuvo una concentración del inóculo de 1.85×10^8 conidios/mL, después se colocaron 1.80 μ L de la solución del inóculo de *Penicillium expansum* en el pedúnculo de la manzana y se repartió en todo el cuerpo de fruto frotándolo con una gasa estéril y se dejaron incubar durante 24 horas a una temperatura de 25 °C.

- **Aplicación del recubrimiento:** La aplicación se realizó por inmersión del fruto en lotes de 6 manzanas en aproximadamente 4 L de la mezcla del recubrimiento durante 4 minutos a una temperatura de 25 °C, y con la ayuda de mallas se retiró el excedente.

- **Secado:** Las manzanas en las mallas se dejaron secar por una corriente de aire forzado por 1 a 2 horas aproximadamente.
- **Almacenamiento:** Finalmente las manzanas se colocaron en contenedores limpios y desinfectados a una temperatura de 14°C y una humedad relativa (H.R.) del 90% durante 30 días para realizar la evaluación de los parámetros de calidad, fisiológicos, características sensoriales, control de podredumbre de *Penicillium expansum* y presencia de patulina en las manzanas.

3.8. Técnicas analíticas

3.8.1. Propiedades de las películas modelo

- Propiedades físicas
 - Color

Se determinó color de las películas modelo con un colorímetro (marca KONICA MINOLTA modelo CM-600D) [Figura 29] por el sistema Hunter ($L^*a^*b^*$) Donde L^* es un indicador de la luminosidad, a^* indica la cromaticidad en el eje verde (-) a rojo (+), y b^* la cromaticidad en el eje azul (-) a amarillo (+), y a partir de éstas se determinaron las coordenadas psicométricas tono del ángulo Hue y Croma (Cortés y Chiralt, 2008).

- Tono ($^{\circ}$ Hue): Atributo de la sensación visual, se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Tono } (^{\circ}\text{Hue}) = \arctan b/a$$
- Croma: Atributo a la intensidad del color o pureza, se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2}$$
- Luminosidad: Atributo de la sensación visual según la cual una superficie parece emitir más o menos luz (Manera, 2004).

$$\text{Luminosidad} = L$$



Figura 29. Determinación de color en películas modelo por el colorímetro.

- Espesor

El espesor de las películas modelo fue determinado con un micrómetro (marca MITUTUYO modelo P65) [Figura 30] determinando digitalmente la medida en milímetros (Alfonso, 2011).



Figura 30. Determinación del espesor de las películas modelo por un micrómetro.

- Transparencia

La prueba de transparencia (Figura 31) se realizó con un espectrofotómetro (marca Thermo Spectronic modelo Genesys 10 uv) empleando una longitud de onda de 600nm (Camal, 2011). La transparencia de la película se calculó con la ecuación de Han y Floros (1997):

Transparencia = A/s ; donde A: es la absorbancia leída y s: es el espesor de la película

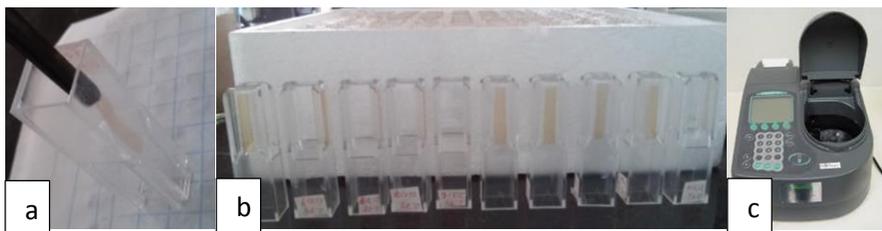


Figura 31. Desarrollo de la prueba de transparencia de las películas modelo: a) Colocación de la película en la celda de espectrofotómetro, b) Celdas con Películas modelo, c) Espectrofotómetro Thermo Spectronic.

- Propiedades de barrera

- Permeabilidad de vapor de agua

La permeabilidad de vapor de agua de las películas fue determinada utilizando una variación del método gravimétrico sugerido por la ASTM E 96-80 (Association of Standard Testing Methods, EUA) reportado por McHugh *et al.* (1993).

Para determinarlo se empleó una celda de permeación con la película, introducida en una cámara de ambientación que cumplía con las condiciones controladas de humedad y temperatura así como de hermeticidad. La celda se pesó a través del tiempo para obtener peso ganado de la celda denominada técnica gravimétrica (Morey y Quinde, 2012), empleando como material desecante cloruro de calcio (Figura 32).

La tasa de transmisión del vapor de agua (WVTR) se determinó con los datos obtenidos de los cambios en peso de las celdas de permeación a través del tiempo con la siguiente ecuación:

$$WVTR = \text{Pendiente} / \text{área película o recubrimiento} \quad (\text{gm}^2/\text{h}) \quad \dots\dots\text{Ec. (1)}$$

Donde la pendiente = Pérdida de peso vs. Tiempo (el análisis de regresión debe realizarse para asegurar que se obtiene el equilibrio y los coeficientes de regresión deben ser > 0.97 aproximadamente).

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$WVP = WVTR (\text{espesor de la película}) / P_2 - P_1 \quad (\text{g m} / \text{kPa m}^2 \text{ h}) \dots\dots\text{Ec. (2)}$$

Donde:

$$P_2 = P_o (HR/100)$$

$$P_1 = P_T - (P_T - P_n) \text{EXP} (-WVTR R T H_o / P_T D)$$

$$P_n = P_o (HR_i/100)$$

HR_i: Es la humedad relativa dentro de la celda.

HR: Es la humedad relativa de la cámara de ambientación.

P_o: Es la presión de vapor de agua a la temperatura de la prueba y se obtiene de tablas reportadas por la literatura (Geankopolis, 1999), y equivale a 7.38 kPa.

P_T: Es la presión atmosférica total del ambiente.

T: Es la temperatura absoluta durante la prueba

R: Cte. Universal de los gases = 0.000462 m³ kPa / g °K

D: Es el coeficiente de difusión del vapor de agua en el aire donde D = 2.819561 m²/día

H_o = Es el espacio que se encuentra entre el cloruro de calcio y la película dentro de la celda.

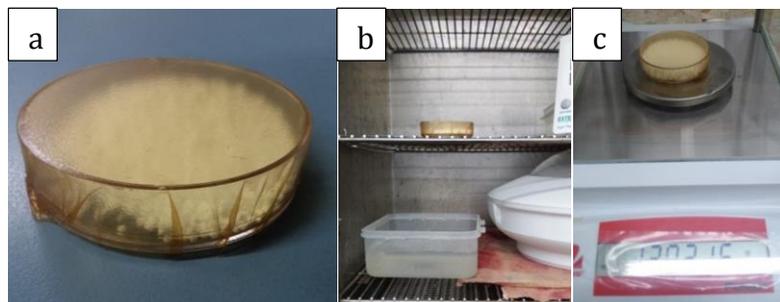


Figura 32. Desarrollo de la permeabilidad de vapor de agua de las películas modelo: a) Celda de permeación con la película modelo y dentro de ella el material desecante, b) Cámara de ambientación, c) Medición de la ganancia de peso de la celda de permeación.

3.8.2. Parámetros de calidad de la manzana

- Parámetros fisicoquímicos
 - Sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles (A.O.A.C., 2000) se realizó agregando una gota de jugo de manzana directo sobre el sitio de medición de un refractómetro digital (marca ATAGO modelo PAL-BX/RI) [Figura 37], calibrado previamente con agua destilada y obteniendo los °Brix en forma indirecta.



Figura 33. Refractómetro digital para la determinación de sólidos solubles de los frutos.

- Acidez

La determinación de la acidez se obtuvo por medio de la técnica de la A.O.A.C. (1990). Se licuaron 10 g de muestra del fruto a 100 mL de agua destilada, tomando 10 mL de muestra filtrada. Después se realizó una titulación con NaOH (0.1 N), utilizando fenolftaleína como indicador (Figura 36). Se determinó el % de Acidez con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V \times N \times \text{Meq}}{\text{g ó mL de muestra}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec.(3)}$$

Dónde:

V = Volumen de NaOH consumidos

N = Normalidad del NaOH

Meq = Peso miliequivalente del ácido predominante en la muestra



Figura 34. Determinación de Acidez por titulación de muestra de los frutos.

- pH

La determinación del pH se determinó en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en la muestra del fruto con un potenciómetro (marca HANNA modelo HI208) [Figura 35] de acuerdo a la NMX-F-317-S-1978. El valor del pH de la muestra se leyó directamente en la escala del aparato.



Figura 35. Potenciómetro para la determinación del pH de los frutos.

- Parámetros físicos

- Color

Para la determinación del color se llevó a cabo con un colorímetro (marca KONICA MINOLTA modelo CM-600D) en el exterior de la manzana, se registraron los cambios en luminosidad, tono Hue y croma mediante el sistema Hunter Lab mencionado en el apartado 3.8.1 de técnicas analíticas de las propiedades físicas de las películas modelo.

- Pérdida de peso

La pérdida de peso se determinó por la diferencia del peso inicial del fruto comparado con el peso registrado del fruto en el día correspondiente a la evaluación (Gómez *et al.*, 2012), empleando una balanza digital (modelo Scout Pro) [Figura 34]. El porcentaje de pérdida de peso se determinó con la formula siguiente:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial}} \times 100 \dots\dots\text{Ec. (4)}$$



Figura 36. Balanza digital para la determinación del peso de los frutos.

- Firmeza

Para la determinación de la firmeza se utilizó un penetrómetro (marca Force Gauge modelo PCE-FM200) [Figura 33] utilizando una punta cilíndrica de 8 mm de diámetro, esta se basa en la fuerza necesaria para penetrar o insertar una sonda en la pulpa del fruto expresada en Newtons (Alonso, 2011).



Figura 37. Determinación de la firmeza de los frutos por un penetrómetro digital.

- Parámetro fisiológico

- Respiración

Para la determinación de la respiración de los frutos se empleó un sistema cerrado, que consistió en un frasco de vidrio con tapa de aluminio con capacidad de 4 L donde se colocaron dos manzanas. Se evaluó en función de la producción de O₂ registrándolo mediante un analizador de gases por infrarrojo (marca Quantek modelo Dual Track 902 D) [Figura 38]. La concentración de mg O₂/ Kg h se determinó con el siguiente cálculo:

$\text{mgO}_2 / \text{Kg h} = \text{Oxígeno inicial} - \text{Oxígeno final después de 1 hora en el sistema...Ec. (5)}$



Figura 38. Determinación de la respiración de los frutos por un analizador de gases.

- Índice de severidad y porcentaje de infección

El porcentaje de infección se calculó dividiendo el número de frutos infectados con síntomas de deterioro causados por el hongo, entre el número total frutos por unidad experimental. El índice de severidad de la infección se determinó por el daño evaluado visualmente en función del porcentaje de la superficie infectada exhibida por el fruto con la siguiente escala arbitraria de categorías (Martínez *et al.*, 2012):

1= Sin daño.

2= Daño ligero 1-5 %.

3= Daño moderado 6-15%.

4= Daño severo >16%.

5= Daño completo ó daño total.

Utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de severidad} = \frac{X_i (1) + X_i (2) + X_i (3) + X_i (4) + X_i (5)}{N} \dots \text{Ec. (6)}$$

Dónde:

X_i = Número de frutos enfermos por cada grado de daño

1, 2, 3, 4 y 5= Grado de daño en la escala empleada

N= Total de frutos por unidad experimental

- Parámetro sensoriales

Se realizó mediante pruebas de aceptación, también conocidas como de nivel de agrado (hedónicas) [Clark *et al.*, 2009]. Se emplean para determinar el grado de aceptación de un producto por parte de los consumidores y según su tipo permiten medir cuánto agrada o desagrade dicho producto, estas pruebas por lo general se llevan a cabo con paneles de consumidores no entrenados (Ramírez, 2012).

El análisis sensorial se realizó con cierto grupo de panelistas, a los cuales se les pidió evaluar muestras codificadas con números aleatorios de 3 dígitos en recipientes idénticos, de distintos tratamientos marcando una de las categorías en la escala, con la finalidad de valorar tales

parámetros. En la Tabla 11 se observa cuáles fueron los parámetros a evaluar así como la escala correspondiente de cada uno.

Tabla 11. Pruebas empleadas para los parámetros sensoriales de las manzanas.

Muestra				
Parámetro				
Apariencia visual (A)				
Intensidad del color (D)				
Olor (A)				
Presencia de olores extraños (B)				
Sabor (A)				
Presencia de sabores extraños (B)				
Textura (C)				
Calificación global (A)				
Escala A	Escala B	Escala C	Escala D	
1= Muy mala	1= Mucho	1= Muy blanda	1= Amarillo- Verde muy claro	
2= Mala	2= Alguno	2= Blanda	2= Amarillo - verde claro	
3= Aceptable como límite de consumo	3= Aceptable	3= Aceptable como límite de consumo	3= Amarillo- verde	
4= Buena	4= Poco	4= Firme	4= Amarillo- verde intenso	
5= Muy buena	5= Ninguna	5= Muy firme	5= Extremadamente amarillo - verde	

3.8.3. Evaluación de la presencia de patulina en manzanas por el método cromatografía de capa fina

i) Muestreo

La aplicación del inóculo del hongo se realizó a las manzanas de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.7. Posteriormente se seleccionaron lotes de 30 manzanas para cada tratamiento (Tabla 12) de las cuales, a una mitad se les realizó 4 picaduras con un palillo desinfectado cerca del pedúnculo del fruto y a la otra mitad se les proporcionó un golpe (con una caída libre a una altura de 1.5 m) esto con el fin de facilitar las condiciones del establecimiento de *Penicillium expansum* así mismo se les proporcionó un ambiente de 4°C y una H.R. de 98% aproximadamente, durante 30 días.

Tabla 12. Tratamiento de aplicación a las manzanas.

Tratamiento	
A	Manzanas + RC adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000ppm
B	Manzanas + RC adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 3000ppm
C	Manzanas + RC
D	Control
RC: Recubrimiento comestible	

i) Preparación de la muestra

Cada manzana de diferente lote después de 30 días de ser inoculadas (halla o no presencia del crecimiento del hongo) se licuó con 50 mL de agua destilada. El puré que se obtuvo se filtró a través de papel filtro (Whatman no. 1).

ii) Extracción de la muestra (A.O.A.C. 1995)

Partiendo de 20 mL obtenidos de la muestra se mezclaron durante 1 minuto con 60 mL de acetato de etilo (Sigma-Aldrich para HPLC) en embudo de separación. Una vez separadas las fases se extrajo la fase inferior, conservando la fase superior a la cual se le añadió 8 g de sulfato de sodio (JT Baker) manteniendo un reposo de 30 minutos. Posteriormente se decantó la muestra a través de un filtro de microfibras de vidrio (Vicam, 1.5 μm) y se le realizó un lavado al sulfato de sodio con 10 mL de acetato de etilo.

Enseguida la muestra se colocó en un rotavapor (marca Heidolph Laborota 4002/4003) para separar la muestra del solvente hasta un volumen aproximado de 1 a 2 mL (temperatura no máxima de 60°C al vacío).

La muestra se llevó hasta su sequedad en un evaporador con una corriente de nitrógeno (marca TurboVap LV) a una temperatura de 35°C, adaptado a la técnica del Laboratorio de Postcosecha (Figura 39). Con el fin de concentrar la toxina la cual posteriormente se resuspendió en 5 mL de alcohol etílico absoluto (J.T. Baker) agitándolo durante 1 minuto. Las muestras se almacenaron en congelación (-25 °C) en viales ámbar para evitar su exposición a la luz.



Figura 39. Procedimiento para la extracción de la Patulina: 1) Extracción de la fase inferior en el embudo de separación, 2) Adición del sulfato de sodio a la fase superior recuperada, 3) Decantación de la muestra por un filtro de microfibras, 4) Evaporación en rotavapor al vacío, 5) Evaporación final con corriente de nitrógeno.

iii) Determinación de patulina por cromatografía en capa fina

La determinación de patulina por cromatografía de capa fina se llevó a cabo de acuerdo al método reportado en jugos por A.O.A.C. 1995. Se emplearon placas de Silica Gel G60 con un grosor de

200 μm marca Merck de 20 x 20cm y una solución estándar de patulina, una cámara de desarrollo con una fase móvil y un revelador cromatográfico.

La preparación de la solución estándar de patulina se llevó a cabo disolviendo 0.1 mg de patulina cristalina pura comercial (marca Sigma- Aldrich) en un aforo de 1 mL de cloroformo, posteriormente se almacenó en un vial envuelto en papel aluminio para evitar su exposición a la luz en congelación (-25°C).

En cada placa se dibujó con lápiz una línea a 4 cm de distancia sobre su borde inferior y sobre ella se aplicaron dos puntos con 5 y 10 μL de la muestra con un cm de distancia entre ellos (Figura 40), después se colocaron 1, 3, 5, 7 y 10 μL del estándar de patulina con ayuda de una microjeringa de cromatografía.

Posteriormente se colocó la placa en la cámara de desarrollo con una fase móvil de tolueno-acetato de etilo 90%- ácido fórmico (5+4+1) hasta que éste ascendió hasta 4 cm de distancia del borde superior de la placa. Posteriormente se sacó la placa de la cámara de desarrollo y se dejó evaporar el solvente de ella.

Enseguida se realizó la preparación del revelador a emplear, con 0.5 g de clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona hidrocloclorhídrica monohidrato (MBTH) en 100 mL de agua destilada, almacenándola en un atomizador a una temperatura de 8°C . Esta solución se preparó cada tercer día de uso. El empleo de este reactivo permite la visualización de compuestos como la toxina patulina.

Después para revelar la placa se roció el revelador MBTH al 0.5% sobre la placa y se dejó secar en un horno de convección (marca Quincy Lab AF modelo 40 Lab Oven) por 15 minutos a una temperatura de 130°C , obteniendo finalmente la visualización amarilla que evidencia la presencia de patulina.

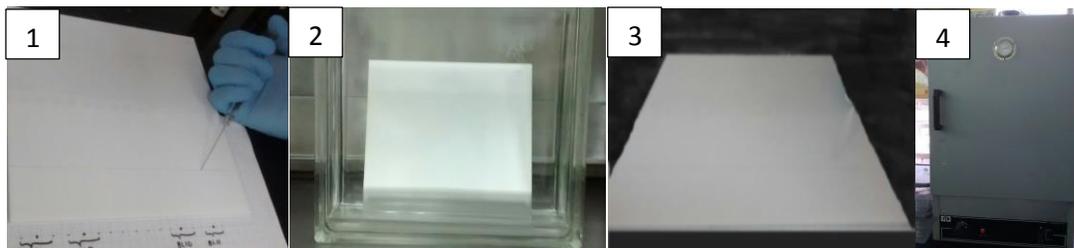


Figura 40. Procedimiento para el desarrollo de la cromatografía de capa fina:
1) Aplicación de las muestras sobre la placa de cromatografía, 2) Introducción de la placa a la cámara de desarrollo, 3) Aplicación del revelador MBTH en placa, 4) Secado de la placa en horno de convección.

iv) Registro y valoración

La placa revelada se examinó bajo luz ultravioleta y luz visible observando si aparece la presencia de la toxina y el estándar. La patulina aparece como una mancha amarilla bajo y como una mancha amarilla fluorescente bajo luz ultravioleta con un Rf de 0.4 a 0.5 (Carrillo, 2003).

Así mismo se le determinó el valor de Rf (Factor de retención) de cada muestra y el estándar empleando con la finalidad de corroborar que las muestras coincidieran con el valor del estándar comprobando así la presencia de la patulina.

En el sistema de cromatografía de capa fina se emplea el Rf que se define como factor de retención (Figura 41), correspondiente a su migración relativa en relación con el disolvente (Rouessac y Rouessac, 2000):

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

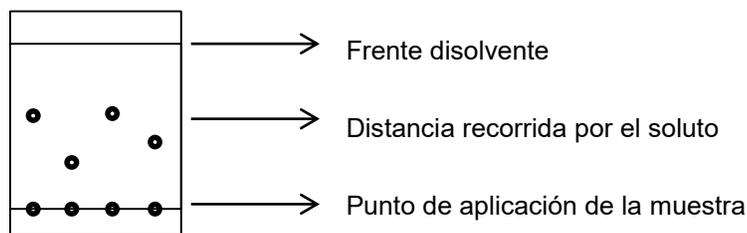


Figura 41. Relación de las distancia para el cálculo del factor de retención (Rf).

3.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un paquete estadístico IBM SPSS Statistics 2.0, donde se realizó un análisis de varianza para un diseño simple completamente al azar (ANOVA) en todos los datos obtenidos en todos los objetivos y una comparación de medias con la prueba de rango múltiple Duncan y Turkey con un nivel de significancia (0.05%).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de las películas modelo

• PROPIEDADES FÍSICAS

○ Color

El color es un atributo de calidad muy importante para la determinación del tiempo de vida útil de un producto y muy apreciado por los consumidores (Cortés y Chiralt, 2008).

▪ Croma

Uno de los parámetros determinados del color, fue croma que se refiere a un índice análogo a la saturación o intensidad de color (McGuire, 1992) los resultados se muestran en la Figura 42.

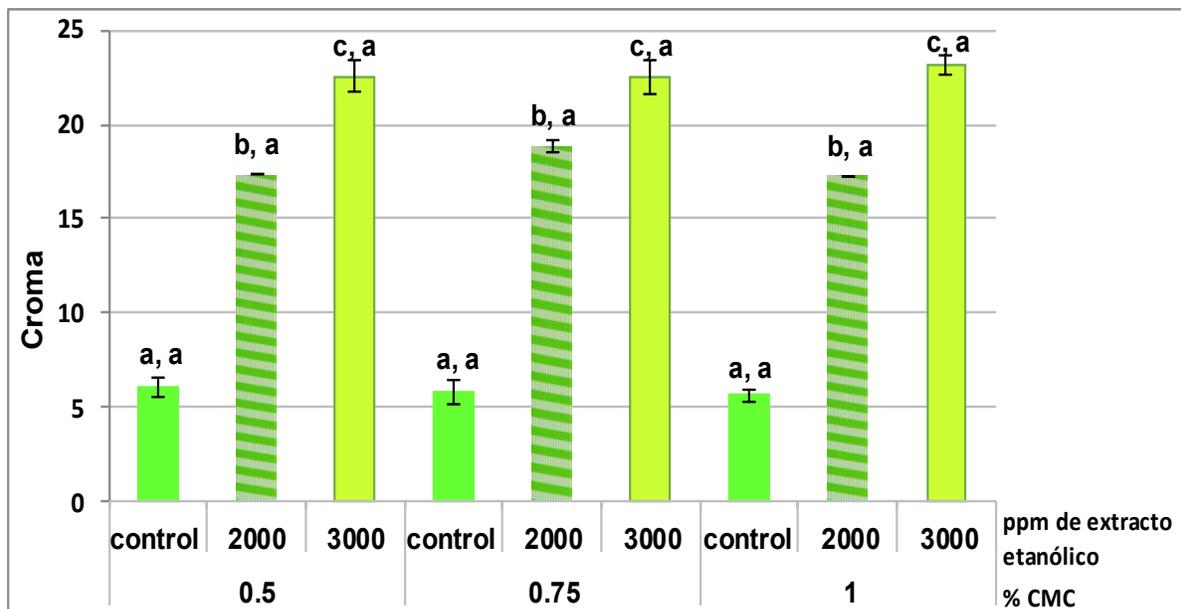


Figura 42. Croma de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm. Las letras diferentes de cada barra indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La primera letra representa el efecto por la concentración del extracto etanólico y la segunda por la concentración de CMC. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Observando que existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el croma de las películas modelo adicionadas con extractos etanólicos, siendo las películas con 3000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago la que presentaron el mayor croma con 74.46 % de diferencia con control que fueron las que presentaron menor croma con un 5.87 de promedio, mientras que las películas modelo adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico presentaron un croma de 17.82 de promedio, presentando una diferencia del 21.68% con respecto a la de mayor croma.

Estas diferencias en croma se deben principalmente al propio extracto que adicionado a la película

modelo le confiere una mayor saturación del color, por tanto a mayor concentración de extracto adicionado a la película modelo mayor es su croma.

Mientras que a las diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa (0.5, 0.75 y 1%) en la matrices de las películas modelos, el croma no presentó diferencia significativa ($P \geq 0.05$) esto se pudo deber a que la concentración del polisacárido empleado en la elaboración de las películas no afectaron la intensidad del color de las películas modelo a pesar de adicionarles extractos etanólicos de sangre de drago.

Por lo que conforme a los resultados anteriores señalan que la concentración del extracto etanólico adicionado a la película modelo modifican el parámetro de croma, por lo que si se desean películas con menor croma se recomiendan emplear las concentraciones más bajas de extracto etanólico de sangre de drago, mientras que si se desea una mayor saturación del color generando un color vivo e intenso se emplearían la utilización de concentraciones elevadas de extracto etanólico ya que presentaron los mayores cromas.

Sánchez (2013) realizó películas modelo a base de maltodextrina con concentraciones de 7, 9 y 11% y CMC a 0.5, 0.75 y 1.0% adicionadas con extractos etanólicos de orégano, hoja Sen y sangre de drago a 3000 ppm, determinaron su croma, donde obtuvo un valor de 9.6 aproximadamente en promedio de las películas adicionadas con extracto de sangre de drago a las diferentes concentraciones de CMC variando con este proyecto ya que los valores obtenidos de las películas adicionadas con extracto etanólico a diferentes concentraciones de CMC fueron mayores un 53% respecto a lo presentado por Sánchez (2013). Así mismo se observó que al aumentar la concentración del polisacárido empleado para las distintas matrices, el valor de croma se incrementaba, siendo diferente a lo obtenido en este proyecto ya que a las diferentes concentraciones de CMC empleadas en las películas no mostró diferencias significativas. Esto puede ser debido a que los extractos obtenidos en este proyecto se obtuvieron en una relación solvente/planta menor a la empleada por Sánchez (2013) por lo que la interacción del extracto y la matriz del polisacárido pudieron ser diferentes.

▪ Tono °Hue

El parámetro de Tono °Hue indica el respectivo color donde 0=rojo-púrpura, 90=amarillo, 180=azul-verde y 270=azul (McGuire, 1992), los resultados se muestran en la Figura 43.

En las películas modelo se observa que las de control presentaron mayor °Hue, es decir las que

no presentaron extracto etanólico de sangre de drago adicionado a la película modelo, registraron una diferencia de 11.06% con respecto a la de menor tono que fueron las películas adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico con 1.16 de promedio de tono pero para las películas adicionadas con 3000 ppm de extracto etanólico presentaron un tono de 1.21 de promedio, siendo 7.55% menor que las películas control. Existiendo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el tono de las películas a diferentes concentraciones de extracto de sangre de drago.

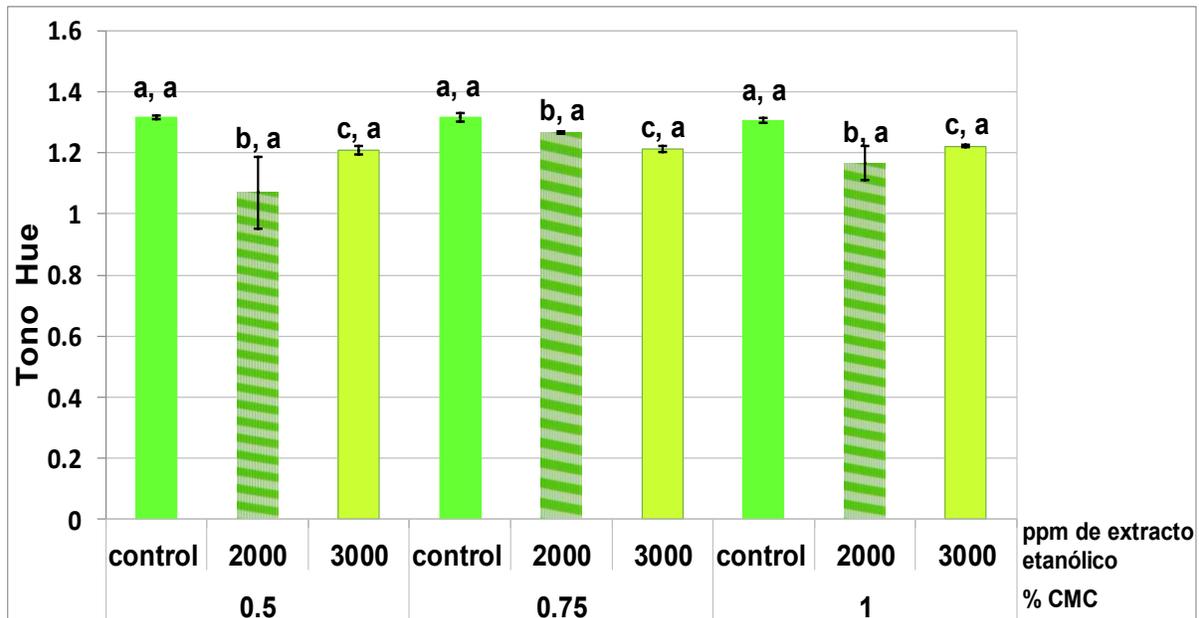


Figura 43. Tono °Hue de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm. Las letras diferentes de cada barra indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La primera letra representa el efecto por la concentración del extracto etanólico y la segunda por la concentración de CMC. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Así mismo se observa que el polisacárido empleado a las diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1% de CMC) en las películas modelo no afectó el tono de las diferentes películas modelo sin ocasionar diferencia significativa ($P \geq 0.05$).

Las diferencias en °Hue fue a causa principalmente a la adición del extracto etanólico de sangre de drago ya que modificaron completamente la coloración de la película modelo debido a los propios pigmentos del extracto confiriéndole una coloración rojiza de acuerdo a la escala en el espacio CIELAB. Sin embargo se debe considerar el croma debido a que ambos parámetros de color se deben analizar en conjunto ya que son difíciles de interpretar separadamente (Francis, 1980), por lo que a pesar de que las películas control presentaron mayor tono, como se observó

anteriormente estas presentaron un croma menor respecto a los demás y por tanto no presentaron coloraciones similares a las películas modelo adicionadas con extractos etanólicos de sangre de drago.

En un estudio Sánchez (2013), determinó el tono de películas modelo a diferentes concentraciones de CMC a 0.5, 0.75 y 1.0% adicionadas con extractos etanólicos de orégano, hoja Sen y sangre de drago a 3000 ppm, obteniendo valores promedio de 36.39°Hue de las películas con extracto de sangre de drago en las diferentes concentraciones de CMC, diferente a los obtenidos en este trabajo con una diferencia del 97% menor a lo obtenido por Sánchez (2013), esto pudo se debido a la relación de solvente/planta para la obtención de extractos, ya que en este proyecto fue menor tal relación y por tanto pudo cambiar la interacción de la matriz en la película.

▪ **Luminosidad**

Para el parámetro de color de luminosidad o también brillo referido a la reflexión nula (L=0 negro) a la reflexión difusa perfecta (L=100 blanco) [McGuire, 1992] en la Figura 44 se muestran los resultados.

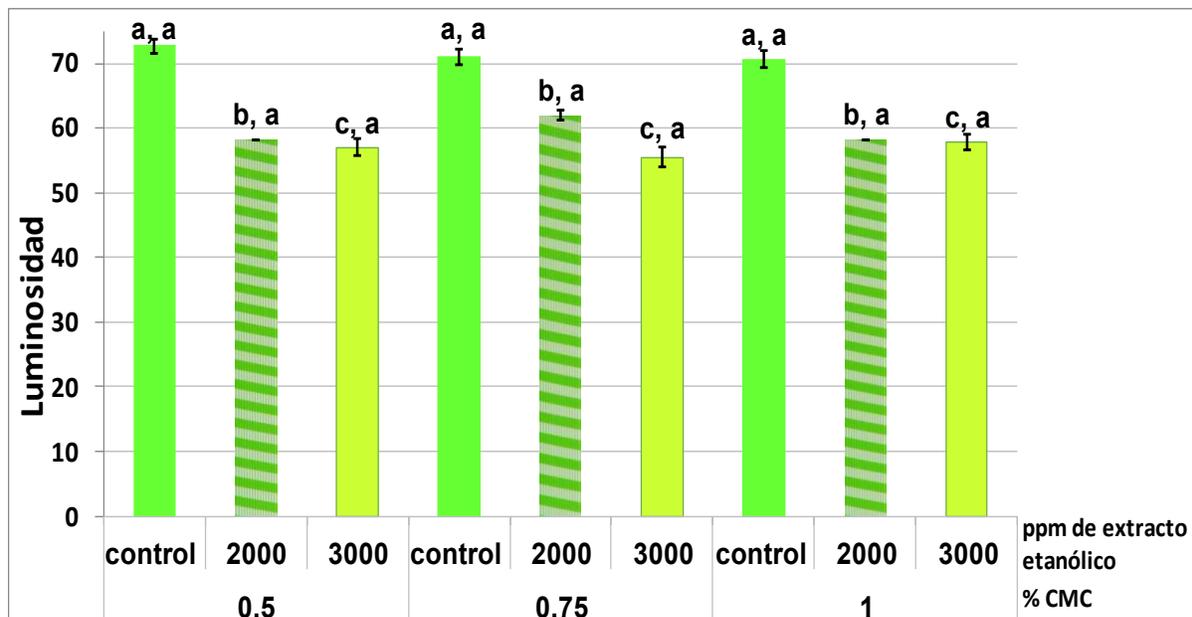


Figura 44. Luminosidad de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm. Las letras diferentes de cada barra indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La primera letra representa el efecto por la concentración del extracto etanólico y la segunda por la concentración de CMC. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Observando que para el parámetro de luminosidad las películas modelo de mayor luminosidad fueron las películas control, aquellas que no presentaron extracto etanólico de sangre de drago, registrándose una diferencia de 20.51% con respecto a las películas con menor luminosidad que fueron las adicionadas con 3000 ppm de sangre de drago con 56.78 en promedio de luminosidad pero para las películas modelo adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico presentaron una luminosidad de 59.5 de promedio teniendo una diferencia con respecto a la de mayor luminosidad del 16.7 %. Esto se debe a la presencia del extracto etanólico sangre de drago adicionado a las películas modelo, ya que cuanto menor es su concentración, mayor es su luminosidad, debido a que el extracto de sangre de drago le confirió cambios a la película comestible y que en cuanto más oscuro es el color, la luminosidad es más débil y viceversa (Coria, 2015). En cuanto a la concentración del polisacárido en las películas modelo existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en cuanto a luminosidad, esto pudo deberse a que el polisacárido no afectó la coloración en las películas por tanto no existió diferencia en la luminosidad a diferentes concentraciones de CMC.

Sánchez (2013) elaboró películas modelos de CMC en concentraciones de 0.5, 0.75 y 1.0% y de maltodextrina al 7, 9 y 11% adicionadas con extractos etanólicos de sangre de drago, hoja Sen y orégano a 3000 ppm, determinaron su luminosidad, de los cuales obtuvo valores de 75.44 a 62.66 con extractos de sangre de drago a diferentes concentraciones de CMC, con una diferencia del 19% mayor con los obtenidos en este trabajo a las diferentes concentraciones de CMC. Esto pudo variar debido a que empleó una relación mayor de solvente/planta para obtener los extractos etanólicos de sangre de drago a la empleada en este proyecto, por lo pudo cambiar la interacción del extracto con el polisacárido de la película.

Mientras que los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.* (2011) en películas a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) adicionadas con aceite esencial de bergamota a 0.5, 1 y 2%, obtuvieron luminosidades en las películas control de 83 a 85 las cuales fueron un 14% mayor en comparación a las luminosidades de las películas control obtenidas en este proyecto. En cuanto a la incorporación del aceite esencial de bergamota a diferentes concentraciones, en las matrices de las películas estas mostraron diferencias significativas ya que disminuyó su luminosidad con respecto a la película control en un 2.38%, esto concuerda con lo obtenido en este proyecto ya que sucedió de igual forma al adicionar los extractos etanólicos de sangre de drago a la matriz de CMC ya que disminuyó su luminosidad.

○ **Espesor**

El espesor de las películas es importante debido a que este influye en las propiedades de transferencia de masa y mecánicas de las películas hidrofílicas (McHugh y Krochta, 1994) los resultados se observan en la Figura 45.

Observando que no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) del espesor de las películas modelo respecto a la adición a diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de sangre de drago, como la concentración de CMC de las matrices de las películas modelos.

El espesor de la película influye principalmente de los componentes de diversa funcionalidad (plastificantes, antimicrobianos, antioxidantes, sabores, olores), si estos presentan la capacidad de mantener dicha matriz de la película, ya que la pérdida de dichas soluciones afecta directamente el espesor de la película (Park, 1999).

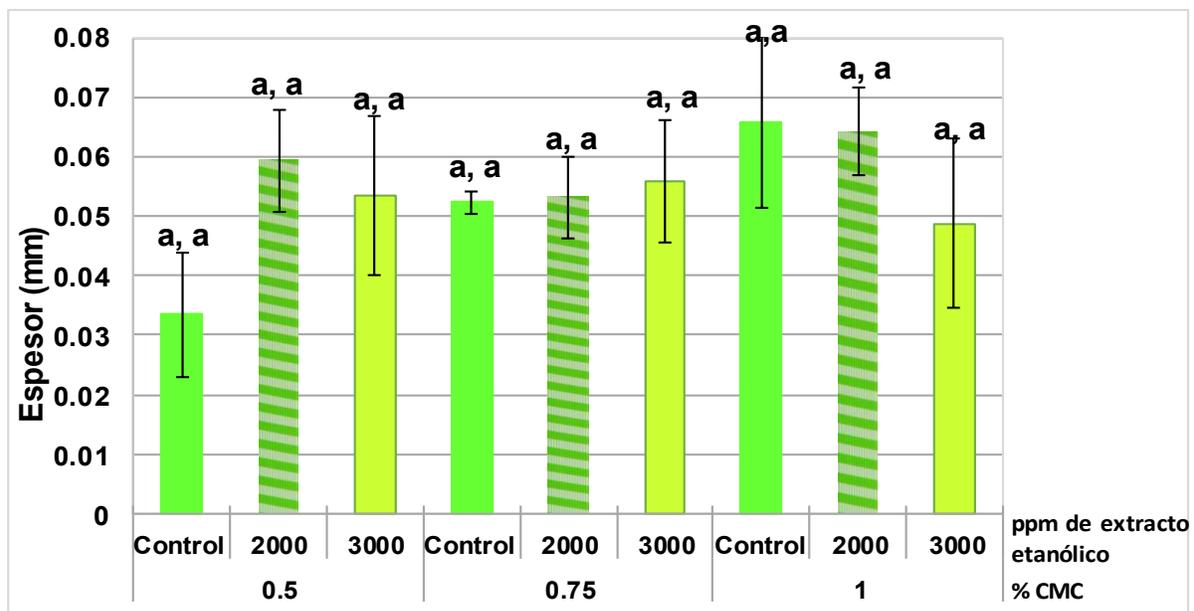


Figura 45. Espesor de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm. Las letras diferentes de cada barra indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La primera letra representa el efecto por la concentración del extracto etanólico y la segunda por la concentración de CMC. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Por lo que los resultados anteriores indican que las concentraciones del extracto etanólico de sangre de drago y las de CMC, empleadas en este proyecto no afectaron en alguna diferencia sobre el espesor de las diferentes películas modelo.

Sin embargo se observó que el espesor en las películas control aumentaba conforme aumentaba la concentración de CMC debido a que las formulaciones aumentan por lo que aumenta el contenido de sólidos y modifican la organización estructural de los componentes de la película (Navarro, 2007).

Angel (2015) realizó películas comestibles de goma guar, glicerol y aceite de oliva a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20%) donde mostraron que no hubo diferencia significativa entre las diferentes formulaciones, del mismo modo que ocurrió en este trabajo. Lo cual atribuyó a que a pesar de emplear diferentes concentraciones de aceite de oliva, también influye, el estado físico del lípido; la longitud y grado de insaturación del mismo, así como la distribución de los componentes lipídicos en la estructura final y la forma de preparación de la emulsión de partida para elaborar la película en gran medida influye en el tamaño y distribución de tamaños de gotas y por ende cambia las propiedades finales del film.

Respecto a lo reportado por Martínez *et al.*, (2012), donde realizó películas comestibles a base de aceites esenciales de clavo de olor y canela (al 0.04% y 0.06% respectivamente), donde obtuvieron espesores similares en las películas sin adición de aceites esenciales con las que presentaban aceites esenciales con una diferencia del 3% entre ellas, sin embargo se debe considerar que las propiedades de aceites esenciales son diferentes a los extractos etanólicos utilizados en el presente trabajo.

○ **Transparencia**

Parámetro relacionado con la transmisión de luz con importancia en los recubrimientos de frutos, puesto que permite mantener la apariencia de los productos, implicada en la aceptación del posible consumidor: alimento que no aparente su color verdadero, no será aceptado (Reyes, 2013), los resultados se muestran en la Figura 46.

Observando que las películas modelo de control (sin extracto etanólico) fueron las que presentaron mayor transparencia, con una diferencia del 45 % respecto a la de menor transparencia que fue la película con extracto etanólico a 3000 ppm con una transparencia de 3.16 nm/mm de promedio, mostrando diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en transparencia de las películas control con respecto a las películas con extracto etanólico a 3000 y 2000 ppm, por lo que a menor concentración extracto etanólico le confirió mayor transparencia a la película modelo, ya que entre menor tamaño y menor sean las partículas presentes en la película será mayor la transparencia ya que permite más fácil el paso de la luz.

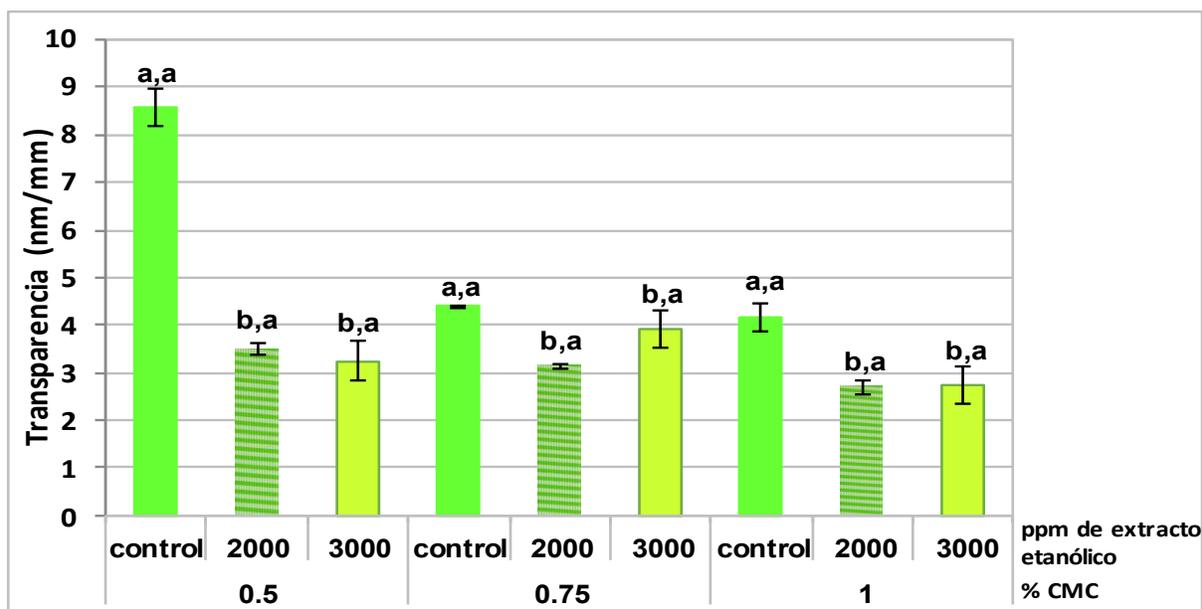


Figura 46. Transparencia de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm. Las letras diferentes de cada barra indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La primera letra representa el efecto por la concentración del extracto etanólico y la segunda por la concentración de CMC. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Coincide con lo reportado por Arce (2011) donde observó que su transparencia se redujo a medida que se les incorporaron aceites esenciales de tomillo y romero a películas comestibles de quitosano, lo cual atribuyó a la naturaleza lipídica del aceite esencial. Aunque en este proyecto se incorporaron extractos de sangre de drago, ocurrió de manera similar al reducir la transparencia al adicionar extractos etanólicos a la película.

Mostrando que las concentraciones de CMC de las películas modelo no existió diferencia estadísticamente ($P \geq 0.05$) en sus transparencias.

Concuerda con lo reportado por Valle *et al.* (2008) quienes realizaron películas comestibles de CMC a diferentes concentraciones (0.25, 0.5 y 0.75%), donde no hubo diferencia significativa entre formulaciones con una transparencia promedio de 81%, lo cual atribuyeron a que la adición de CMC causó que el recubrimiento dejara de ser opaco y adquiriera una apariencia transparente, sugiere que basta agregar 0.25% de CMC en la formulación para conseguir esta característica.

• PROPIEDADES DE BARRERA

○ Permeabilidad de vapor de agua

La permeabilidad es la propiedad que tienen las películas plásticas de permitir el paso de gases o vapores a través de su estructura molecular, ya sea hacia adentro o hacia afuera del envase (Guarda y Galotto, 2000).

La permeabilidad al vapor de agua es una forma de cuantificar la facilidad con que un material puede ser traspasado por el vapor de agua (Marzo, 2010). Los resultados se muestran en la Figura 47.

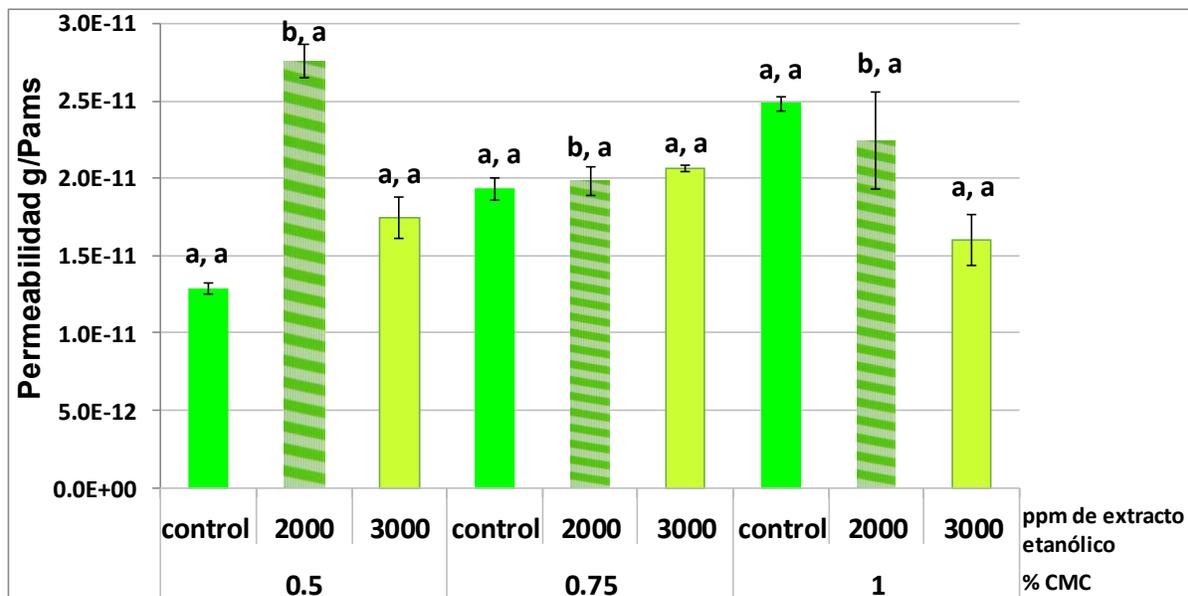


Figura 47. Permeabilidad de vapor de agua de las películas modelo de CMC a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1%) adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago a 2000, 3000 ppm. Las letras diferentes de cada barra indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La primera letra representa el efecto por la concentración del extracto etanólico y la segunda por la concentración de CMC. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Observando que las películas adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago fueron las que presentaron mayor permeabilidad de vapor de agua con 2.33×10^{-11} g/Pa·m·s de promedio y las que presentaron menor permeabilidad de vapor de agua con un 22.5% de diferencia respecto a la de mayor permeabilidad de vapor de agua, fueron las películas modelo adicionadas con 3000 ppm de extracto etanólico.

Existiendo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la permeabilidad de vapor de agua de las películas adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago con respecto a las películas

adicionadas a las concentraciones de 3000 ppm y control (sin extracto etanólico de sangre de drago).

Pastor (2010) indica que el factor principal que afecta la permeabilidad de vapor de agua en películas modelo es la concentración del polisacárido, mientras que Rojas-Grau (2006) señala los films de polímeros naturales, tales como los polisacáridos (almidón y derivados de la celulosa, alginatos, pectinas, gelano, carragenano, etc.) se comportan pobres como barrera frente al paso del vapor de agua, debido a que son de naturaleza hidrofílica, que tienen afinidad por el agua y permiten su paso, lo cual limita sus aplicaciones. Sin embargo en los resultados obtenidos en este estudio se observó que la concentración de CMC de las películas no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en la permeabilidad de vapor de agua, mostrando efecto solamente por la concentración de extracto etanólico de sangre de drago adicionado a las películas modelo.

De acuerdo con Martínez (2000), la transferencia de vapor de agua en una película disminuye al incrementar la hidrofobicidad, ya que el paso de vapor de agua ocurre preferentemente a través de una matriz hidrofílica, por que la concentración del extracto etanólico a 2000 ppm le pudo favorecer al aumento de la característica hidrofílica de la película modelo lo cual nos señala una mayor permeabilidad al vapor de agua, sin embargo a 3000 ppm de extracto esto pudo disminuir debido a que se presentan en mayor concentración los compuestos presentes del extracto ya que de acuerdo con Farag *et al.*, (1989) los compuestos fenólicos son la naturaleza hidrófoba.

Contradictorio con Siripatrawan y Harte (2010), donde encontraron que la permeabilidad de vapor de agua de películas de quitosano con extracto de té verde fue menor cuando el contenido de extracto en la formulación se incrementó, variando desde 2.96×10^{-12} g/Pa*m*s (0% de extracto) hasta 1.00×10^{-12} g/Pa*m*s (20% de extracto).

Pero Chana *et al.* (2011) quienes evaluaron la permeabilidad de vapor de agua en películas de hidroxipropilmetilcelulosa con la adición del extracto de madera kiam (*Cotylelobium lanceolatum*) cuyos resultados mostraron que el incremento de la concentración de los extractos desde 300 a 1500 mg/L incrementaba la permeabilidad de vapor de agua de 1.75 a 2.40×10^{-10} g/Pa*m*s.

Mientras que Ramírez *et al.* (2012) realizaron películas de CMC al 2% con extractos de murta a diferentes concentraciones (0, 50 y 100%), mostraron que no existieron diferencias significativas con la incorporación del extracto de murta en la permeabilidad de vapor de agua.

Aun así se debe considerar que el contenido de sólidos como el extracto a adicionar en las películas debido al hecho de que pueden interactuar con el polímero haciendo más compacta la matriz de la película (Ramírez *et al.*, 2012).

En otro caso Zaritzky (2007) realizó películas de almidón y quitosano plastificadas con glicerol donde presentaron valores de permeabilidad de vapor de agua en el rango de $3.8-4.5 \times 10^{-11}$ (g/Pa*m*s). Mientras que Vásquez y Vidal (2011) señalaron diferentes permeabilidades de vapor de agua de diferentes films, como son a base de celofán con $7.7-8.4 \times 10^{-11}$ g/Pa*m*s, acetato de celulosa con $0.5-1.6 \times 10^{-11}$ g/Pa*m*s y cloruro de polivinilideno con $0.7-2.4 \times 10^{-13}$ g/Pa*m*s de permeabilidad de vapor de agua. Estos resultados muestran valores de permeabilidad de vapor de agua similares o menores que los reportados precedentemente de las películas existentes.

Por lo que si se desean películas con menor permeabilidad de vapor de agua se recomienda emplear la concentración más alta de extracto etanólico de sangre de drago debido a que le confirió menor permeabilidad de vapor respecto a las demás con 1.805×10^{-11} g/Pa*m*s de promedio, ya que si las películas modelo presentaran mayor permeabilidad de vapor de agua le conferirían mayor interacción de procesos bioquímicos y por ende no sería una barrera adecuada y no favorecería la inhibición del hongo *Penicillium expansum*.

4.2. Evaluación de las propiedades antifúngicas del extracto etanólico de sangre de drago

• PRUEBAS *IN VITRO* DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SANGRE DE DRAGO

Para evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos de sangre de drago se realizaron pruebas *in vitro* de tres diferentes cepas del hongo *Penicillium expansum* que fueron identificadas y aisladas previamente; además como criterio de selección se tomó en cuenta que dichas cepas produjeran la micotoxina patulina.

En la Figura 48, se muestra el porcentaje de crecimiento micelial de tres concentraciones de extractos etanólicos de sangre de drago.

Observando que existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en las cepas 119 y 103 a partir del día dos, en el crecimiento micelial de control positivo (sin adición de extracto etanólico) con respecto a las tres diferentes concentraciones extracto etanólico de sangre de drago (1000, 2000 y 3000 ppm), así también con control negativo (etanol 70%), comportamiento similar para la cepa 120 hasta en el día diez donde hubo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el crecimiento micelial de

control positivo (sin adición de extracto etanólico) con la concentración de 1000 ppm de extracto etanólico y este a su vez con las concentraciones de extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm, y de control negativo (etanol 70%).

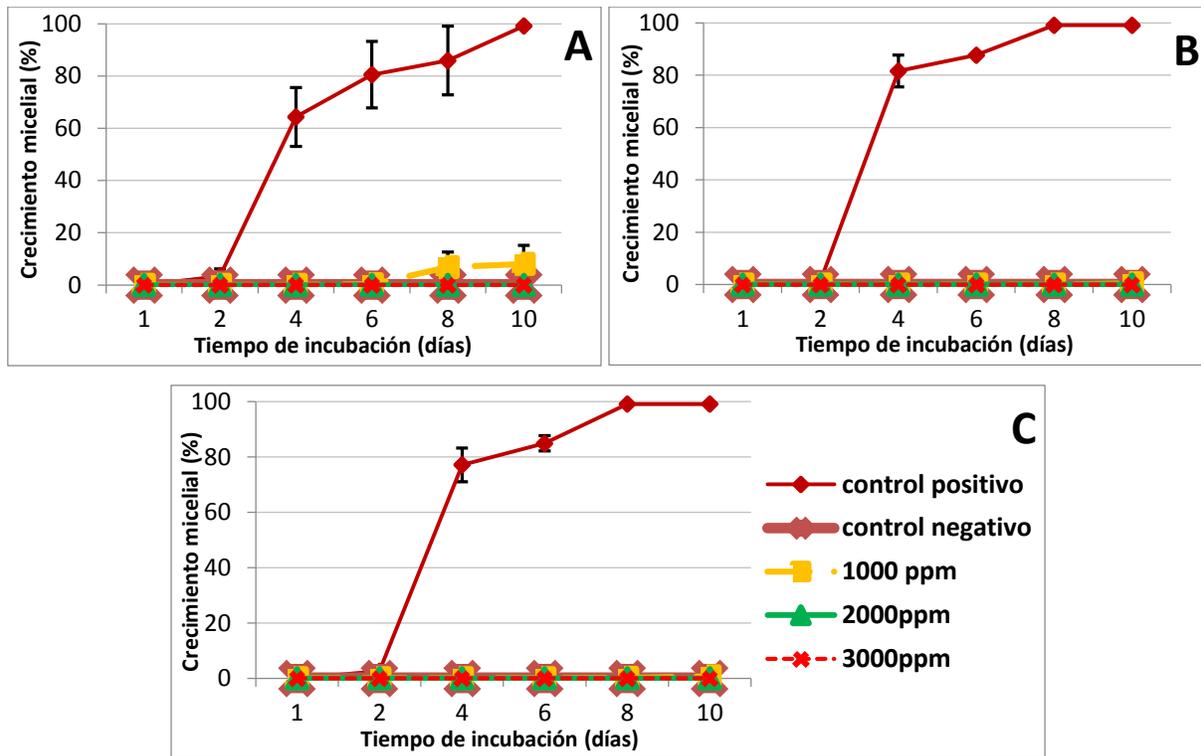


Figura 48. Porcentaje de crecimiento micelial de la cepa 120 (A), 119 (B) y 103 (C) de *Penicillium expansum* a diferentes concentración del extracto etanólico de sangre de drago. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

De esta manera se registró un efecto inhibitor sobre el crecimiento micelial del hongo *Penicillium expansum* durante los 10 días a las concentraciones de 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago para las tres diferentes cepas (120, 119 y 103) de este hongo. Sin embargo se observa que la concentración de 1000 ppm de extracto etanólico en la cepa 120 inició un crecimiento micelial del hongo en el día 8, contrario con el comportamiento de las demás cepas (119 y 103), esto se observa en el seguimiento fotográfico de los medios de cultivo de las Tablas 13, 14 y 15.

Tabla 13. Observación visual de pruebas *in vitro* con *Penicillium expansum* (120) y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.

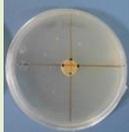
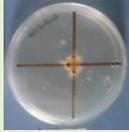
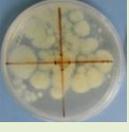
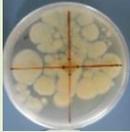
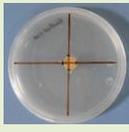
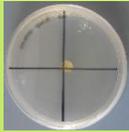
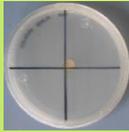
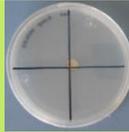
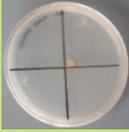
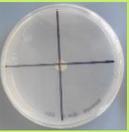
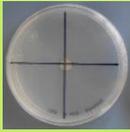
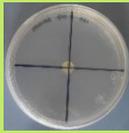
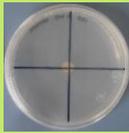
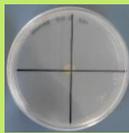
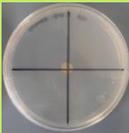
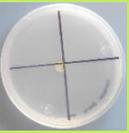
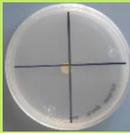
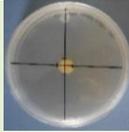
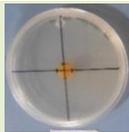
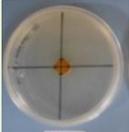
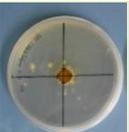
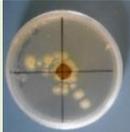
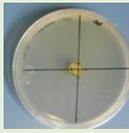
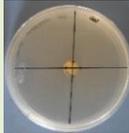
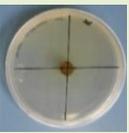
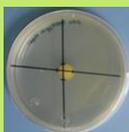
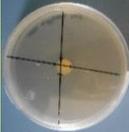
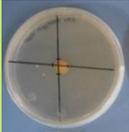
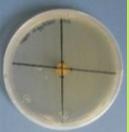
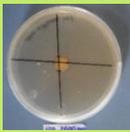
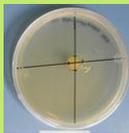
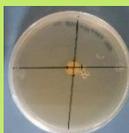
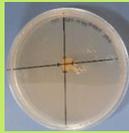
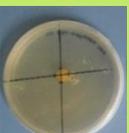
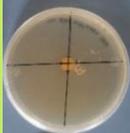
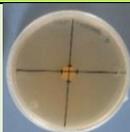
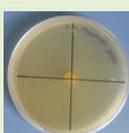
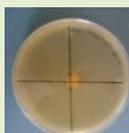
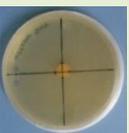
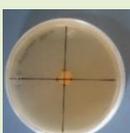
	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control positivo						
						
Control negativo						
						
1000 ppm						
						
2000 ppm						
						
3000 ppm						
						

Tabla 14. Observación visual de pruebas *in vitro* con *Penicillium expansum* (119) y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.

	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control positivo						
Control negativo						
1000 ppm						
2000 ppm						
3000 ppm						

Tabla 15. Observación visual de pruebas *in vitro* con *Penicillium expansum* (103) y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.

	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control positivo						
Control negativo						
1000 ppm						
2000 ppm						
3000 ppm						

Sánchez (2012) realizó un estudio químico biodirigido, con la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos metanólicos y de diclorometano de rizomas y tallos de *Jatropha dioica*, obtenidos con una extracción por maceración en una relación 1:2 de tejido seco y pulverizado de la planta durante 24 hrs, y realizó una identificación de compuestos activos de los extractos por HPLC donde identificó compuestos como citlaltiriona y β -sitosterol, que presentaron actividad antimicrobiana contra el dermatofito *Trichophyton rubrum* (de 200 $\mu\text{g/mL}$) y contra *Aspergillus niger* (con 200 $\mu\text{g/mL}$), así mismo contra las bacterias Gram + como *Staphylococcus aureus* (con 100 $\mu\text{g/mL}$) y *Salmonella typhi* (con 100 $\mu\text{g/mL}$), observando que la actividad antifúngica para *Penicillium expansum* en este trabajo fue a las concentraciones de 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago, siendo mayores las concentraciones a las utilizadas por Sánchez (2012) en diferentes microorganismos.

Mientras que Silva *et al.* (2013) realizaron una evaluación antimicrobiana y citotoxicidad de extractos a base de hexano, acetona y metanol de la raíz de *Jatropha dioica*, extraída por maceración contra especies como *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans* entre otros, donde evaluaron la actividad antimicrobiana mediante la medición de la inhibición alrededor de discos con extracto crudo contra control (fármacos que inhiben microorganismos comprobados anteriormente), donde obtuvieron mayor inhibición que control, la cual lo atribuyeron en gran parte a la presencia de terpenos en la composición del extracto de *Jatropha dioica*, en especial al β -sitosterol, mostraron que para el extracto a base de hexano presentó una máxima concentración inhibitoria media (IC 50) de $>1000 \mu\text{g/ml}$. A pesar de ser diferentes microorganismos trabajados en el estudio, se emplearon mayores concentraciones de extracto etanólico de sangre de drago en este proyecto para mostrar actividad antifúngica sobre *Penicillium expansum*.

Así mismo Garza *et al.* (2007) realizaron una investigación sobre la actividad antifúngica de diferentes plantas del noreste de México, emplearon raíces molidas de la *Jatropha dioica* y extraídas por maceración con diferentes disolventes como etanol al 90%, hexano y acetato de etilo y butanol, y prepararon inóculos de diferentes hongos con importancia clínica. Evaluaron su concentración inhibitoria mínima (MIC) que leyó visualmente, describiéndose como aquella concentración de extracto que inhibe el 80% o más de crecimiento del organismo frente a un control (prueba sin extracto de evaluación), observaron que el extracto etanólico al 90% presenta un MIC de 500 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida albicans* pero para los extractos con hexano, acetato de etilo y butanol fue de $\geq 250 \mu\text{g/mL}$, mientras que para *Aspergillus fumigatus* y *Coccidioides immitis* presentó un

MIC de $>1000 \mu\text{g/mL}$ y *Hisoplasma capsulatum* con $1000 \mu\text{g/mL}$ de los extractos etanólicos. Observando que las concentraciones empleadas en todos los microorganismos trabajados en el estudio son menores a los empleados en este proyecto sobre *Penicillium expansum*.

Los resultados anteriores también pueden ser atribuidos al disolvente ya que el etanol acuoso es un disolvente con mayor polaridad que el hexano y la acetona, y se sabe que los compuestos fenólicos son la mayoría polar permitiendo más fácil la difusividad en el etanol y mezcla de agua (Wong *et al.*, 2015).

De igual forma Oliveira *et al.* (2013), llevaron a cabo una evaluación de los extractos de *Jatropha dioica* Cerv. contra diferentes especies de *Candida*, evaluado así mismo la citotoxicidad del extracto, para ello realizó la extracción con 200 mL de etanol al 70% y 18 g hojas y raíces de *Jatropha dioica* Cerv. durante 24 hrs, evaluaron la actividad antifúngica de los extractos obtenidos con una prueba de microdilución de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* y *Rhodotorula mucilaginosa*, donde encontraron una mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración fungicida (MFC: concentración de agente antifúngico en la que el número de unidades formadoras de colonias es de cero [Hawser y Islam, 1999]) de $28,1 \text{ g/mL}$ para los dos extractos de las hojas y raíces de *J. dioica* Cerv., las pruebas de citotoxicidad se realizaron por la supervivencia de células de fibroblastos de ratón (NIH 3T3), lo que concluyó que los extractos etanólicos de *Jatropha dioica* Cerv. se pueden utilizar como un agente antifúngico potencial con baja citotoxicidad. Observando que para inhibir el crecimiento de *Penicillium expansum*, las concentraciones empleadas de 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago en este trabajo son menores a las empleadas para las diferentes especies de *Candida* empleadas en el proyecto de Oliveira *et al.* (2013).

Ventura *et al.* (2006) reportaron que los extractos de *Fluorensia cernua*, *Jatropha dioica*, *Turnera diffusa* y *Euphorbia antisyphilitica* fueron efectivos contra algunos hongos importantes incluyendo *Penicillium purpurogenum*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Rhizoctonia spp.* y *Aspergillus flavus*, de igual forma que los extractos de sangre de drago (*Jatropha dioica*) empleadas en este trabajo sobre el hongo *Penicillium expansum*.

Por lo que el extracto etanólico de sangre de drago (*Jatropha dioica*) empleado mostró una inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium expansum* del 100% a concentraciones de 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico. Lo cual se le atribuye a los componentes de *Jatropha dioica* que proveen la actividad antimicrobiana, que son metabolitos secundarios, como polifenoles,

flavonoides y terpenos. Entre estos se encuentran específicamente a la citlalitriona, el riolozatriona, el jatropholona B, β -Jatrophona, el β -sitosterol, ácido oxálico y ácido elágico (Sánchez, 2012).

El efecto inhibitorio de los extractos etanólicos sobre el crecimiento del hongo se basa en el daño que ocasionan los compuestos bioactivos de las plantas, que son metabolitos secundarios, los cuales son sintetizados de manera natural como mecanismo de defensa ante artrópodos, insectos y microorganismos (Wong *et al.*, 2010).

La actividad antifúngica de los compuestos fenólicos se debe a que generan un daño severo a las paredes celulares especialmente cambiando la morfología de las hifas, reduciendo el espesor de la pared celular y el diámetro de las hifas de los patógenos de las plantas, debido a la interferencia del componente volátil con la síntesis de pared celular y enzimáticas reacciones que conducen a disposición incorrecta de componentes de la pared celular, quitina, glucanos y glicoproteínas (Selvam *et al.*, 2013).

A pesar de que en este trabajo no se evalúa el mecanismo por medio del cual los extractos etanólicos de sangre de drago afectan el crecimiento de *P. expansum*, algunos autores indicaron que los compuestos fenólicos de aceites esenciales afectan principalmente la membrana plasmática y los orgánulos celulares como las mitocondrias de los hongos por la disminución de los lípidos y los niveles de ácidos grasos saturados, y el aumento de los ácidos grasos insaturados, lo que resulta en la fuga de Ca_2^+ , Mg_2^+ y K^+ (Helal *et al.*, 2006).

Nychas (1995) señala que los fenoles pueden causar daño o destrucción de las enzimas implicadas en la germinación de esporas y los aminoácidos que están involucrados en la germinación de esporas.

De igual forma la naturaleza hidrófoba de los compuestos fenólicos, asegura su partición preferencial en la membrana lipídica, además la existencia del núcleo aromático y el grupo OH en la estructura de los compuestos fenólicos que causa daño a la pared celular (Frag *et al.*, 1989).

El mecanismo del efecto antifúngico de los compuestos fenólicos entonces depende predominantemente de la capacidad de afectar la función de las membranas celulares de lipoproteínas, causando un deterioro de la homeostasis celular iónica, la acidificación del pH vacuolar y citosólico, e incluso la destrucción de la integridad celular estructural (Zabka y Pavela, 2013) también alteran las enzimas que son responsables de la energía y la producción de

proteínas, causando así la muerte celular (Kalemba y Kunicka 2003).

Compuestos polifenólicos como son los taninos, tienen la capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas por lo que se convierten en material no disponible para los microorganismos (Betnoit *et al.*, 1968). Precipitan con sales de metales pesados, proteínas y alcaloides. Se trata de compuestos hidrosolubles, solubles también en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares (Carretero, 2000).

Otros compuestos bioactivos como los terpenos tienen propiedades antioxidantes que protegen a lípidos y componentes celulares del ataque de agentes oxidantes como radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos. La acción inhibitoria de los terpenos en células de microorganismos implica la granulación citoplasma, ruptura membrana citoplasmática y la inactivación y / o inhibición de la síntesis intracelular y de enzimas extracelulares (Gehan *et al.*, 2012).

- **PRUEBAS *IN VITRO* DE PELÍCULAS MODELO ADICIONADA CON EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SANGRE DE DRAGO**

Los resultados de las pruebas *in vitro* de las películas modelo adicionadas con el extracto etanólico de sangre de drago de las tres diferentes cepas de *Penicillium expansum* se muestran en las Tablas 16, 17 y 18.

Observando que tienen un efecto inhibitorio del 100% sobre el crecimiento de *Penicillium expansum* durante los 10 días las concentraciones empleadas (2000 y 3000 ppm) de extracto etanólico de sangre de drago adicionadas a las películas modelo en las tres diferentes cepas (120, 119 y 103).

Mientras que para el control (sin adición de extracto ni de película modelo) *Penicillium expansum* empezó un crecimiento micelial a partir del día 2 en las tres diferentes cepas (120, 119 y 103), para el control de películas modelo de carboximetilcelulosa existió un crecimiento del hongo a partir del día 4 en las cepas 120 y 103, y en la cepa 119 a partir del día 2. Esto puede deberse a que como bien se sabe un medio de cultivo es aquel que debe contener los nutrientes suficientes y agua para que permita el desarrollo de microorganismos (Cañedo y Ames, 2004) y al agregar al medio de cultivo la película modelo con carboximetilcelulosa limita el agua disponible ya que ésta en conjunto con la carboximetilcelulosa, es decir la película modelo, dificultó el crecimiento de *Penicillium expansum* pero no lo inhibió totalmente.

Tabla 16. Observación visual de pruebas *in vitro* con *Penicillium expansum* (120) de películas modelo y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.

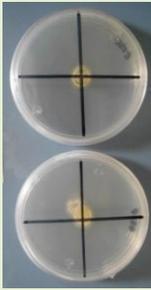
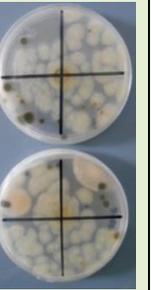
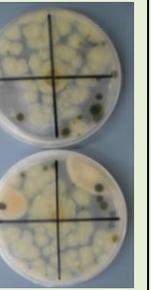
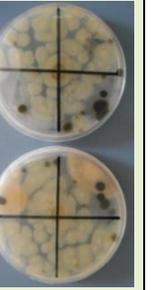
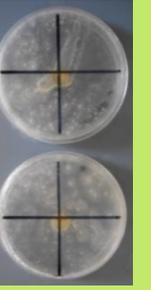
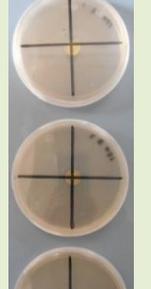
	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control						
Control película 0.5% CMC						
2000 ppm						
3000 ppm						

Tabla 17. Observación visual de pruebas *in vitro* con *Penicillium expansum* (119) de películas modelo y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.

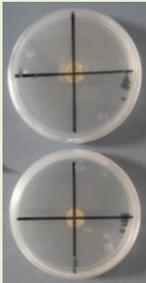
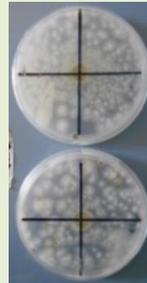
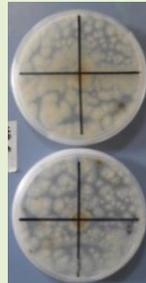
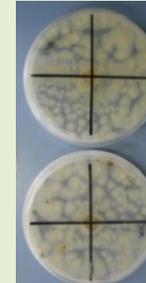
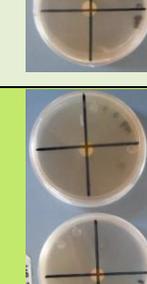
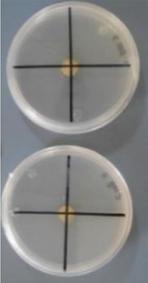
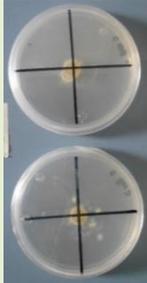
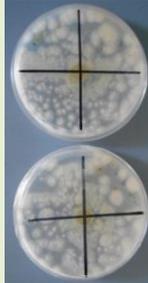
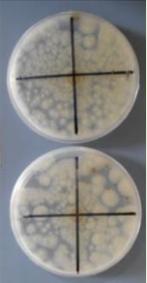
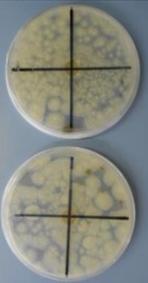
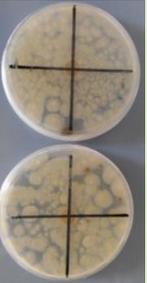
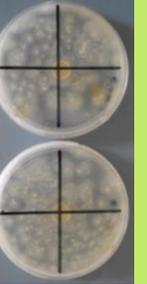
	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control						
Control película 0.5% CMC						
2000 ppm						
3000 ppm						

Tabla 18. Observación visual de pruebas *in vitro* con *Penicillium expansum* (103) de películas modelo y extractos etanólicos de sangre de drago a diferentes concentraciones.

	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control						
Control película 0.5% CMC						
2000 ppm						
3000 ppm						

Existen diferentes extractos que inhiben el crecimiento de *Penicillium expansum*, como lo menciona Tequida *et al.* (2002) donde evaluaron el efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres (*Larrea tridentata*, *Karwinskia humboldtiana*, *Ricinus communis*, *Eucalyptus globulus*, *Ambrosia ambrosioides*, *Nicotiana glauca*, *Ambrosia confertiflora*, *Datura discolor*, *Baccharis glutinosa*, *Proboscidea parviflora*, *Solanum rostratum*, *Jatropha cinerea*, *Salpianthus macrodonthus* y *Sarcostemma cynanchoide*) sobre la inhibición de crecimiento de diferentes hongos entre los que se encuentran *Penicillium expansum*, la extracción se realizó con una maceración con calentamiento-agitación de la planta (tallos y hojas) con los solventes: metanol y etanol ambos al 70%, posteriormente el extracto obtenido fue mezclado con agar Czapeck extracto de levadura (CYA) en una relación 1:10, y se le agregó inóculos del hongo al cual se les determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento, donde observó que todos los extractos metanólicos inhibieron el crecimiento de *Penicillium expansum*, pero su porcentaje de inhibición fue menor en algunos casos de los extractos etanólicos por ejemplo los extractos de *Baccharis glutinosa* inhibieron en un 38.5% con metanol pero 85.8% con etanol, así mismo observó que solo los extractos etanólicos de *Jatropha cinere*, *Karwinskia humboldtiana*, *Salpianthus macrodonthus* y *N. glauca* no inhibieron el crecimiento de *Penicillium expansum*. Caso contrario ya que a diferencia de la planta del mismo género *Jatropha cinere* del estudio anterior, para la planta *Jatropha dioica* empleada en este proyecto si inhibió el crecimiento de *P. expansum* a concentraciones de 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico, con una inhibición micelial del 100%.

Otro estudio fue realizado por Gómez *et al.* (2014) quienes evaluaron el efecto antifúngico del extracto de acuyo (*Piper Auritum*) contra *Penicillium expansum*, la extracción la realizó en horno de microondas a 380 W donde colocaron un matraz con hojas de acuyo secas con agua destilada en una relación 1:3, el vapor obtenido llegó a un condensador, donde se enfrió y se obtuvo el extracto líquido, este se añadió al agar PDA a 0 (control), 100, 500, 1000, 2000 y 3000 ppm y posteriormente de su solidificación se inocularon 10 µL de una suspensión de esporas del hongo en el centro de la caja para su evaluación antifúngica, donde observó que el hongo *Penicillium expansum* creció en todas concentraciones del extracto, pero este disminuyó a mayor concentración del extracto, a 3000 ppm de extracto de acuyo disminuyó un 65.6% el crecimiento micelial con respecto a control. Mientras que para el extracto etanólico de sangre de drago empleado en este trabajo existió una inhibición del 100% sobre el crecimiento de *Penicillium expansum* a las concentraciones de 2000 y 3000 ppm, siendo mayor la disminución del crecimiento micelial, a lo obtenido por Gómez *et al.* (2014).

Zabka *et al.* (2009) evaluaron diferentes aceites esenciales de 25 especies de plantas medicinales como inhibidores del crecimiento de seis importantes especies de hongos patógenos y toxinógenos, uno de ellos fue *Penicillium expansum*, los aceites se obtuvieron por hidrodestilación y se evaluó el porcentaje de inhibición con el crecimiento radial del micelio de los hongos por el método de dilución en agar PDA adicionado con aceite esencial a una concentración de 1µL/mL, observaron que el % porcentaje de inhibición de las 25 especies de plantas medicinales va desde 25.81% hasta el 100%, es así que las especies como *Anthemis nobilis* y *Juniperus communis* fueron las de menor porcentaje de inhibición con 25.81 y 27.96% respectivamente, caso contrario con las especies como *Pimenta dioica* y *P. roseum* ya que ambos presentaron un porcentaje de inhibición del 100%. Observando que se emplearon concentraciones menores de aceite esencial para inhibir el crecimiento de *P. expansum* que los trabajados en este proyecto con extracto etanólico de sangre de drago.

Mohammadifar *et al.* (2012) realizaron un estudio de la actividad antifúngica de siete aceites esenciales de algunas plantas medicinales iraníes: ajowan (*Trachyspermum ammi*), shirazi avisán (*Zataria multiflora Boiss*), ajedrea (*Satureia hortensis*), clavo (*Caryophillum aromaticus*), menta (*Mentha piperita*), comino (*Cuminum cyminum L.*) y alcaravea (*Carum carvi*) contra diversos hongos fitopatógenos poscosecha entre los que se encuentran *Penicillium expansum*, los aceites esenciales fueron obtenidos por destilación al vapor, después se incorporó la cantidad 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 500 ppm de cada agente antimicrobiano por cada 100 mL de agar PDA y se determinó el % de inhibición con el crecimiento radial del hongo en el medio de cultivo, donde observaron que para *Penicillium expansum* existió inhibición del 100% a la concentración de 150 ppm de *Satureia Hortensis* y *Caryophillum aromaticus*, con 500 ppm de *Mentha piperita*, *Cuminum cyminum L.*, *Carum carvi* y *Trachyspermum ammi*, con 50 ppm de *Z. multiflora Boiss* y con 100 pm de *Satureia hortensis*. Siendo mucho menores las concentraciones de los aceites esenciales, a las empleadas en este proyecto (2000 y 3000 ppm) de extracto etanólicos para inhibir el crecimiento de *P. expansum*.

De León *et al.* (2013) determinaron la inhibición de extractos de *Flourensia cernua* fermentada en ensayos *in vitro* contra *Penicillium expansum* y *Fusarium oxysporum*, emplearon 5 concentraciones (0, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 g / L) que se adicionaron en el agar PDA, donde encontraron que a mayor concentración, mayor inhibición de *Penicillium expansum*, con una inhibición del 18,64 % a la concentración de 1 g/ L. Obteniendo que a pesar de que se emplearon concentraciones mayores

(2000 y 3000 ppm) de extracto etanólico de sangre de drago en este trabajo, existió mayor % porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *P. expansum*.

Observando una vez más que la inhibición del crecimiento de *Penicillium expansum* fue 100% en las diferentes concentraciones (2000 y 3000 ppm) de extractos etanólicos de sangre de drago, siendo concentraciones menores en comparación con los diferentes extractos y concentraciones mayores con los diferentes aceites esenciales anteriormente citados, a pesar de esto la diferencia que existió con los aceites esenciales pudo deberse a que presentan diferentes propiedades e incluso existen diferencias en su composición con los extractos de las plantas (Wannes *et al.*, 2010). Además la incorporación de la película modelo al medio no tuvo repercusión en el efecto de inhibición que poseía el extracto etanólico de sangre de drago contra el hongo *Penicillium expansum*. Por lo que para aplicarlo como recubrimiento comestible en algún fruto adicionado con cualquiera de las diferentes concentraciones (2000 y 3000 ppm) de extracto etanólico de sangre de drago podría ser una opción viable para el control del crecimiento de *Penicillium expansum*.

4.3. Evaluación de los parámetros de calidad en manzanas con recubrimientos comestibles de carboximetilcelulosa adicionados con extractos etanólicos de sangre de drago

- **Parámetros fisicoquímicos**
 - **Sólidos solubles**

La concentración de sólidos solubles tiende a aumentar a medida que maduran las manzanas debido a que los almidones se convierten en azúcares y como consecuencia incrementan la dulzura en las frutas, por lo que es un índice útil de madurez en estos frutos (Contreras, 2010). En la Figura 49 se muestran los resultados de las manzanas con los diferentes tratamientos aplicados a las manzanas *Golden delicious*.

Durante el almacenamiento de las manzanas recubiertas y sin recubrir se observó un ligero aumento en los sólidos solubles, para el inicio del almacenamiento (día 0) no existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en los diferentes tratamientos aplicados a las manzanas indicando que su estado de madurez fue similar en todo el lote, para el día 6 y 30 los sólidos solubles presentes en las manzanas presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en aquellas manzanas control (sin RC ni extractos) con respecto a las manzanas con RC + extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm, mostrando así a las manzanas control con una diferencia del 13.76% (en el día 6) y 32.75% (en el día 30) en sólidos solubles con respecto a la de menor contenido que fueron aquellas con

el tratamiento con RC+ 3000 ppm de extracto con un promedio de 10.23 °Brix de promedio para el día 6 y de 8.96 °Brix el día 30, siendo mayor el aumento de sólidos solubles en las manzanas control ya que permitió la maduración normal de las manzanas contrario de las manzanas con RC que redujo el aumento de sólidos solubles que normalmente ocurren en el fruto.

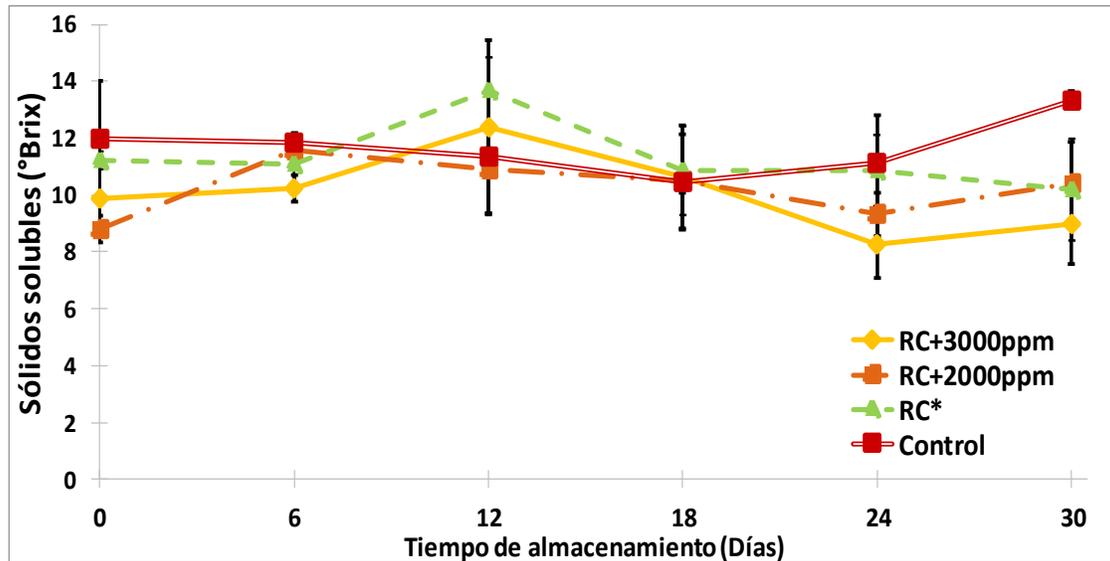


Figura 49. Sólidos solubles de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

Así mismo durante el almacenamiento de las manzanas durante 30 días, en todos los tratamientos aplicados existió un aumento de sólidos solubles de los frutos, para el caso de las manzanas recubiertas adicionadas con 3000 y 2000 ppm de extracto de sangre de drago fue de un 9.12% y 15.65% respectivamente, mientras que para las manzanas con el recubrimiento sin extracto solo aumentaron un 9.19% los sólidos solubles, y en el caso de control su incremento fue de un 10%, mostrando que las manzanas con el tratamiento de RC + 3000 ppm de extracto de sangre de drago obtuvieron menor ganancia de sólidos solubles, logrando cambios favorables en la maduración de las manzanas.

Este comportamiento no concuerda con los obtenidos por Ochoa *et al.* (2011) donde realizaron una evaluación de un recubrimiento comestible basado en cera de Candelilla adicionado con una cera extraída de *Euphorbia antisyphilitica*, que contenía ácido elágico (EA), para prolongar la calidad de la vida útil y la seguridad de las manzanas "Golden delicious", donde obtuvieron que los sólidos solubles (°Brix) durante un periodo de 8 semanas no presentaron cambios en todos los

tratamientos durante todo el periodo de almacenamiento, los resultados de dicho trabajo indicaron que los sólidos solubles varían entre el 13.5 y 16°Brix, con una diferencia mayor del 9 al 17% respecto a los obtenidos en este trabajo, esto puede deberse a la naturaleza del recubrimiento empleado ya que en el caso de Ochoa *et al.* (2011) es de naturaleza lipídica y en el caso del presente trabajo fue un polisacárido.

Así mismo en cuanto a recubrimientos comerciales disponibles en el mercado se encuentra el “Semperfresh” que es un recubrimiento a base de una combinación de ésteres de sacarosa derivados de ácidos grasos, con carboximetilcelulosa de sodio, el cual de acuerdo con Baldwin *et al.* (2011) al aplicarla en manzanas *Golden delicious* no mostró diferencia significativa en cuanto a sólidos solubles con respecto a manzanas sin RC durante un almacenamiento de 4 meses a 5°C. De igual forma en otro estudio donde Aguilar-Méndez *et al.* (2012) realizaron una caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de la guayaba, mostraron que se incrementaron los °Brix con el tiempo de almacenamiento y que los frutos recubiertos con la película presentaron los valores menores, sin embargo no existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Contrario a los resultados obtenidos en el contenido de sólidos solubles de las manzanas en este estudio donde si mostraron diferencias significativas en aquellos frutos con y sin recubrimiento durante el tiempo de almacenamiento de 30 días.

Por otro lado El Anany *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la goma de la soja, cera de jojoba, glicerol, goma arábica y aceite de parafina como recubrimientos comestibles en la vida de anaquel y calidad de la manzana *Malus domestica* durante el almacenamiento de 60 días en frío, mostraron que para el contenido de sólidos solubles de las muestras de control sin tratamientos de recubrimiento tuvieron significativamente el nivel más alto de valor que fue 14.6 °Brix al final del período de almacenamiento y los valores de °Brix en las manzanas recubiertas con cera de jojoba, aceite de parafina, goma de aceite de soja, glicerol y goma arábica fueron respectivamente de 1.06, 1.05, 1.066, 1.08 y 1.08 veces menor que el valor de control sin recubrimiento al final del periodo almacenamiento. Observando así que las manzanas con RC presentaron menor contenido de sólidos solubles que las manzanas sin RC durante todo el periodo de almacenamiento, obteniendo resultados similares al del presente trabajo.

Por lo que la aplicación de los recubrimientos comestibles con extractos etanólicos de sangre de drago en las manzanas obtuvo un efecto al reducir los sólidos solubles, ya que los frutos control presentaron mayores sólidos solubles de un 22 a un 33% de diferencia con respecto a los

demás tratamientos aplicados, esto debido a que la aplicación de un RC retrasaron la maduración del fruto.

○ **Acidez**

El ácido más importante en las manzanas es el málico, aunque también se encuentran otros como el succínico, láctico, cítrico, etc. Estos van disminuyendo tanto durante la maduración como durante su conservación (Delhom, 1985). En la Figura 50 se observan los resultados obtenidos del porcentaje de acidez (ácido málico principalmente) en las manzanas.

Al inicio del almacenamiento la acidez de las manzanas con RC + extractos etanólicos de sangre de drago mantuvieron una acidez superior del 40 al 53% con respecto a las de control y RC con 0.1563 y 0.1284 % de acidez respectivamente, atribuyéndolo principalmente a que los extractos de sangre de drago (*Jatropha dioica*) ya que poseen ácidos orgánicos en su composición como los ácidos oxálico y elágico (Sánchez, 2012), también ácidos vanílico, tartárico y cítrico (Vargas y Trejo, 2013), durante los días posteriores se puede percibir la pérdida de acidez debido a que en la maduración, los ácidos orgánicos son utilizados en el ciclo de respiración o convertidos en azúcares, disminuyendo así su contenido mismo (Hernández, 2013).

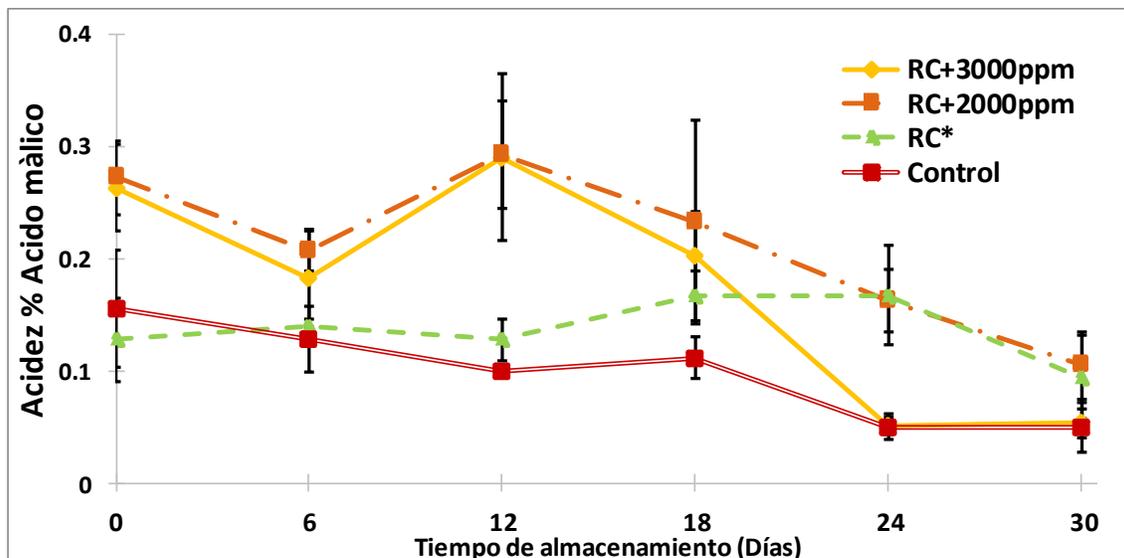


Figura 50. Porcentaje de acidez de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

En los días 0, 6 y 12 de almacenamiento el porcentaje de acidez de las manzanas control y RC presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a los frutos con RC adicionados con

extractos etanólicos a 2000 y 3000 ppm, para el día 18 se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de las manzanas control con los frutos con RC y aquellas adicionadas con extractos, presentando una diferencia del 51.92% con respecto a la de mayor acidez en el día 18 que fueron las manzanas con RC adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico.

Posteriormente para el día 24 y 30 en el porcentaje de acidez de las manzanas con los tratamientos con RC+ extracto etanólico a 3000 ppm y control presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a las manzanas de los demás tratamientos, específicamente el tratamiento de las manzanas con mayor porcentaje de acidez fueron las de RC+ 2000 ppm de extracto etanólico con 0.15% de promedio, con una diferencia del 52.12% respecto a la de menor acidez que fue el tratamiento de control con 0.0503% de promedio.

Durante todo el tiempo de almacenamiento de las manzanas (30 días), se examinó que en cuanto a la pérdida del % de acidez, las manzanas con los tratamientos de RC con 3000 y 2000 ppm de extracto etanólico disminuyeron 79.66% y 61.47% respectivamente, mientras que en los controles existió una disminución del 67.85% y para el caso del tratamiento con solo RC un 26.08%, siendo así que el tratamiento de RC en las manzanas fue el que presentó el menor cambio de acidez total.

En un estudio de Olivas *et al.* (2007) aplicaron recubrimientos comestibles a base de alginato para preservar la calidad de manzanas *Gala* mínimamente procesadas durante un almacenamiento de 9 días, encontraron que la concentración de ácido málico disminuyó en todos los tratamientos pero no se encontraron diferencias significativas entre el control y manzanas tratadas con RC. Esto no concuerda con este trabajo en donde si existió diferencia significativa durante el almacenamiento de las manzanas, esto pudo ser debido que en este trabajo existió la adición de extractos etanólicos de sangre de drago a la matriz del recubrimiento a base de CMC lo que pudo conferirle cambios.

Así mismo El-Anany *et al.* (2009) evaluaron recubrimientos comestibles a base de la goma de la soja, cera de jojoba, glicerol, goma arábica y aceite de parafina, en la vida de anaquel y calidad de la manzana *Malus domestica* almacenados por 60 días, donde observaron que la acidez disminuyó gradualmente y significativamente con el aumento del período de almacenamiento, las muestras de control (sin recubrimiento) tuvieron el nivel más bajo de acidez que fue del 0.3 % al final del período almacenado, los demás tratamientos aplicados mostraron una acidez del 0.35 a 0.37% al final del almacenado. Existiendo una diferencia en los resultados de acidez con este proyecto ya

que presentó un 73 al 87% mayor a los obtenidos en este estudio, pero concuerda en que los frutos control presentaron la menor acidez al final del periodo de almacenamiento.

Es así que la aplicación de recubrimientos comestibles adicionados con extractos etanólicos muestran un efecto positivo ya que disminuyeron la pérdida de ácidos orgánicos en las manzanas, ya que el tratamiento de control presentó una menor acidez con una diferencia del 6 hasta el 50% en comparación con los demás tratamientos, debido a que el empleo de RC redujo la maduración normal de las manzanas.

○ pH

La modificación del contenido de ácidos orgánicos es de gran importancia a nivel bioquímico, ya que el pH condiciona la actividad de un gran número de enzimas responsables de los sucesos claves (ablandamiento, color, entre otros) asociados a la maduración (Gil, 2010). Así mismo Pantástico (1981) afirma que el aumento del pH ocurre debido a la reducción de la acidez titulable, de igual forma Chitarra y Chitarra (2005) mencionan que el contenido de ácidos orgánicos disminuye con la maduración debido a la respiración o su conversión en azúcares, por lo tanto el pH de la fruta aumenta con una disminución de la acidez, y por ende este parámetro se utiliza como un indicador de la variación de la maduración. Los resultados de pH de las manzanas con los diferentes tratamientos se observan en la Figura 51.

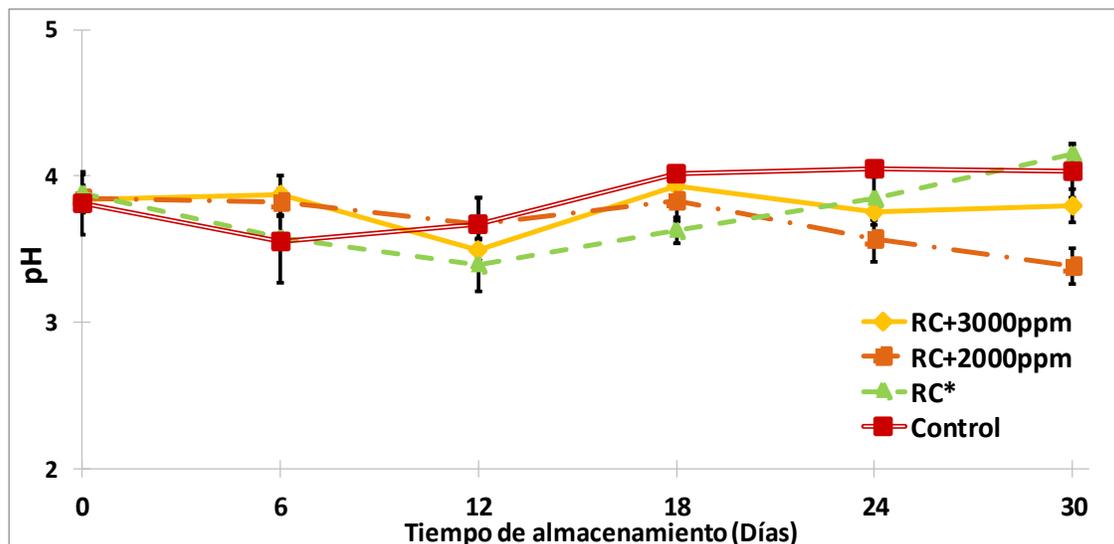


Figura 51. pH de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

Para el inicio del almacenamiento las manzanas no presentaron ninguna diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en cada uno de los tratamientos aplicados pero para los días 18 y 24 si la hubo ($P \leq 0.05$) entre las manzanas con el tratamiento de control (sin RC ni extractos etanólicos) con respecto a las manzanas con RC+ extracto etanólico a 2000 y 3000 ppm, del 5 al 12 % respectivamente.

En el día 30 las manzanas con el tratamiento RC mostraron el valor más alto de pH con 4.09 de promedio, con una diferencia del 17.34% respecto a la de menor pH que fueron las manzanas con RC+ 2000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago con un pH de 3.38, existiendo así mismo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de las manzanas con RC + extractos etanólicos a 2000 ppm con respecto a los frutos con RC y control, esto debido a que a medida que avanza el tiempo de almacenamiento estos aumentaron en pH, mientras que los tratamientos con extractos etanólicos presentaron una disminución de pH atribuyéndolo al empleo de los mismos extractos sobre el RC, como se mencionó en el apartado anterior de acidez, que va de la mano con la determinación de pH.

Para el almacenamiento de las manzanas con cada uno de los tratamientos aplicados durante los 30 días, existió un aumento del 5.37% para las manzanas del tratamiento control, un 5.21% para el tratamiento de RC y para los frutos de los tratamientos de RC + extractos etanólicos a 2000 y 3000 ppm existió una disminución del 61.47 y 79.66% respectivamente, por lo que las manzanas con los tratamientos con los extractos etanólicos mostraron diferencia significativa ya que en vez de aumentar estos disminuyeron de pH.

Los resultados concuerdan con Fontes *et al.* (2008) donde utilizaron un recubrimiento comestible de alginato en manzanas *Royal Gala* mínimamente procesados y almacenados en 2°C durante 13 días y encontraron que el pH de las manzanas con RC redujo el pH de 4.13 a 4.01 durante todo el almacenamiento, mientras que control aumento el pH de 3.73 a 3.88, ya que en este trabajo existió el mismo comportamiento en cuanto a la disminución del pH de los tratamientos con RC + extractos etanólicos aplicados a las manzanas, de igual forma los resultados en pH concuerdan con los obtenidos en este estudio mostrando pH similares con una diferencia del 1 al 10%.

Cruz *et al.* (2015) evaluaron recubrimientos comestibles de cera de candelilla, goma árabe, el aceite de jojoba, y los polifenoles de granada con el fin de mejorar la calidad de vida de anaquel en peras, donde observaron que los valores de pH no muestran ninguna diferencia significativa en la concentración de cera de candelilla y el aceite de jojoba, pero a mayor concentración de goma árabe y polifenoles los valores de pH aumentan, los resultados de pH de los frutos con RC fue

diferente significativamente en comparación con los frutos control mostrando valores mayores de pH con la aplicación de diferentes mezclas del RC. Esto no concuerda respecto a los resultados obtenidos en este trabajo ya que las manzanas control fueron las que presentaron mayores pH respecto a los frutos con los tratamientos de RC adicionados con extractos.

De este modo es así que la aplicación de recubrimientos comestibles con extractos etanólicos provocó una disminución del pH en manzanas debido a que la adición de los propios extractos etanólicos, mostrando a los frutos control con un pH del 6 al 16% mayor respecto a los tratamientos con adición del extracto etanólico mientras que las manzanas con el tratamiento RC presentaron un pH 2% superior que control, por lo que la aplicación de un RC adicionado con extractos etanólicos es viable para el atraso de la maduración normal del fruto.

- **Parámetros físicos**

- **Color**

El color de las manzanas, constituye uno de los factores organolépticos más atractivos; la clorofila es la que proporciona el color verde característico, que enmascara la presencia de otros pigmentos; las antocianinas se encuentran en la piel de esta fruta, dándole el color rojo; los carotenoides son los responsables del color amarillo (Gil, 2010). Es así que el uso de recubrimientos comestibles permite una atmósfera modificada entre la película y la superficie de las mismas, prolongando la degradación de pigmentos debido a la ausencia de CO₂ y el desarrollo de colores indeseables (Pérez *et al.*, 1999).

- **Croma**

El croma se refiere al aspecto que varía entre un color intenso o de máxima pureza y uno apagado o grisáceo, suponiendo que permanezca al mismo tinte (Caivano, 1995). Los valores de croma se observan en la Figura 52.

Donde se puede observar que para el día 0 existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en las manzanas con RC y RC + 3000 ppm de extracto etanólico con respecto con los frutos que presentaron RC + extracto etanólico a 2000 ppm y control (sin RC ni extractos etanólicos), siendo el croma de 35.53 y 38.38 respectivamente, presentando una diferencia del 18 al 24% con la de mayor croma que fueron las manzanas con RC. Para los días siguientes el croma fue incrementando ya que en el proceso de maduración se produce una degradación de la clorofila superficial del fruto mientras que se van sintetizando pigmentos coloreados, ya sean carotenoides o antocianos (Delhom, 1985).

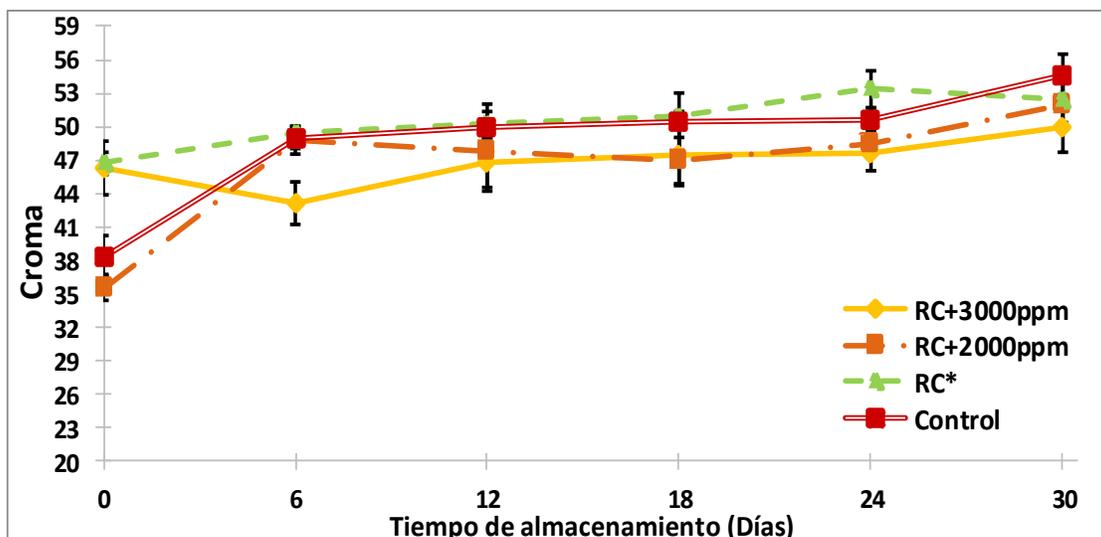


Figura 52. Croma de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

Para el día 24 existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de las manzanas control y RC ya que presentaron una diferencia mayor de un 9 al 11% de croma con respecto a aquellas adicionadas con extractos etanólicos de sangre de drago de un menor croma. En el día 30 no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en el croma de las manzanas con cada uno de los tratamientos aplicados, sin embargo el que obtuvo un mayor croma fueron los frutos control con 54.67 de promedio.

El almacenamiento de 30 días de las manzanas con los diferentes tratamientos aplicados, presentaron un aumento del parámetro de croma, mostrando que para las manzanas con el tratamiento de RC + 2000 ppm de extracto etanólico aumento un 31.68%, mientras que los frutos con RC + 3000 ppm de extracto un 7.35% de aumento en croma, finalmente para las manzanas control un 29.79% y RC existió un 11.04% de aumento, definiendo así que los frutos con adición de 3000 ppm de extracto en el RC fueron los que presentaron un menor aumento en croma.

Moncayo (2013) realizó una evaluación de recubrimientos comestibles de biopolímero tipo dextrano en fresa, por dos métodos de aplicación: por aspersion e inmersión, donde mostraron que existió una disminución del croma en los frutos pero se presentó de mayor manera en los frutos recubiertos por inmersión, así mismo los frutos con ambos tratamientos de aplicación del recubrimiento presentaron menor disminución del croma que los tratamientos control. Esto no concuerda por lo expuesto en este trabajo debido a que no existió una disminución si no un aumento y eso puede ser debido a la naturaleza del RC ya que el biopolímero utilizado por

Moncayo (2013) es un polisacárido mucho más complejo que el empleado en este proyecto además de que es un fruto completamente diferente.

Es así que la aplicación de un recubrimiento comestible con extractos etanólicos de sangre de drago es viable para que no exista aumento del Croma (saturación del color) del 4 a 9%, que es el aumento que presentaron las manzanas control con respecto a los frutos de los demás tratamientos, ya que de acuerdo a Rocha y Moráis (2003) un RC es benéfico ya que el color de los frutos recubiertos presentan menores cambios en comparación con las manzanas sin RC.

▪ Tono Hue

Propiedades como el color y brillo tienen un gran impacto en la aceptación del consumidor (Cruz, 2013). El valor Hue representa el verdadero color, el cual es efectivo para visualizar la apariencia de los productos alimenticios (McGuire, 1992).

Los resultados del ángulo Hue se muestran en la Figura 53. Como se mencionó anteriormente el cambio en la coloración de las manzanas se debe a que éste fue degradando la clorofila y deja al descubierto otros pigmentos o sintetiza otros compuestos responsables del color durante la maduración (Gil, 2010). Sin embargo en el parámetro de °Hue no existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en los días 0 al 18, hasta el día 24 en donde las manzanas control y las de RC, presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con el de las manzanas con RC + extractos etanólicos, esta diferencia fue del 6.45 y 7.19% en los tratamientos con adición de extractos etanólicos a 2000 y 3000 ppm respectivamente. Además se observó que las manzanas que presentaron el mayor tono que fueron las del tratamiento de RC con 88.69 de promedio en °Hue, estos valores indican tonos verdosos. Para el día 30 no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en los diferentes tratamientos aplicados a los frutos.

Al final del almacenamiento de las manzanas con los diferentes tratamientos aplicados mostraron un aumento en el parámetro de tono, donde existió un aumento del 7.22% en las manzanas con RC, un 8.18% para control, y para los frutos adicionados con extractos etanólicos de 2000 y 3000 ppm presentaron un aumento del 10.93 y el 2.29% respectivamente, variando así el ángulo sobre la coloración normal, es decir que permitió la maduración normal al cambiar de tono, siendo el tratamiento de RC + 3000 ppm de extracto etanólico el que presentó menor variación en este parámetro sobre las manzanas.

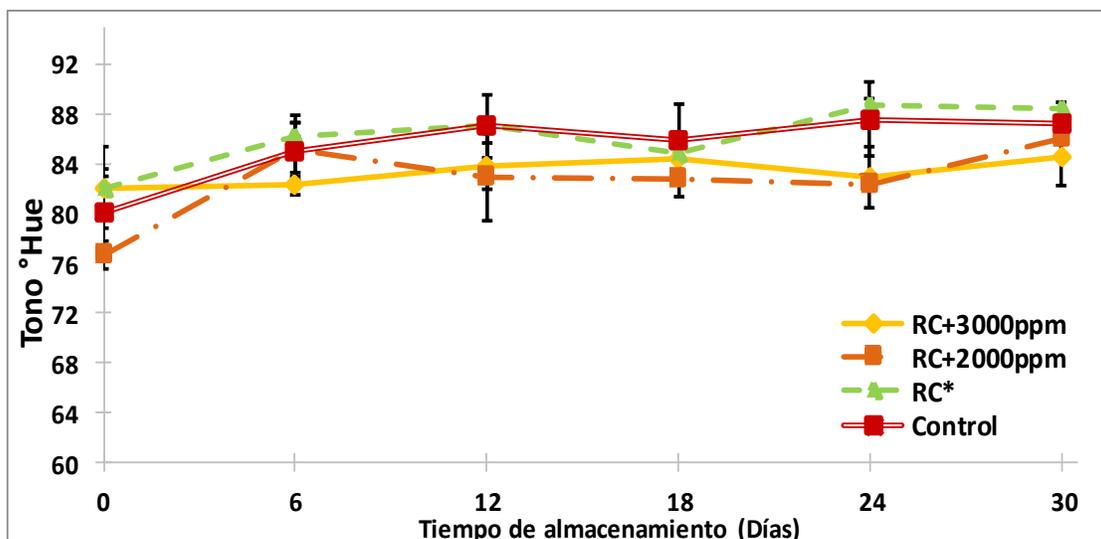


Figura 53. Tono °Hue de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

Lucimara *et al.* (2015) analizaron el efecto de la goma de anacardo y carboximetilcelulosa como RC en guayabas frescas y cortadas, observaron que la cáscara en la fruta entera en las muestras de control sufre una fuerte reducción en el ángulo Hue, los valores disminuyeron en descomposición continua durante el almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que los frutos con RC sufren una pérdida menor del ángulo Hue. Esto no concuerda debido a que en este estudio en vez de existir una disminución existió un aumento del ángulo Hue, lo único en que coincide es que el aumento (en este caso) fue menor en comparación con control, esto puede ser debido a que en este proyecto solo se empleó CMC en la matriz del RC y no una mezcla con otra goma, lo que pudo generar cambios propios en el fruto sobre el tono.

Siendo así que las manzanas con recubrimientos comestibles adicionados con extractos etanólicos de sangre de drago aplicados a las manzanas presentaron un aumento de tono menor, con respecto a los frutos sin recubrir (control) y RC con una diferencia del 2 al 4%, pudiéndose explicar debido a una limitación en la permeabilidad del oxígeno a través del recubrimiento que modificó la maduración y retrasaron los cambios de color de la piel de acuerdo a trabajos de Wu y Chen (2013). Así mismo que fue reforzada por la actividad antioxidante de los extractos etanólicos incorporado en el RC, que de acuerdo con Chitarra y Chitarra (2005), la clorofila es abundante en productos ecológicos y la pérdida de este pigmento es debido a su descomposición estructural, principalmente por los cambios en pH y la presencia de sistemas oxidantes.

▪ **Luminosidad**

La luminosidad es un parámetro que nos permite describir objetivamente los cambios de color en los frutos (González y Guzmán, 2011).

Observando que durante el paso del tiempo de almacenamiento las manzanas en este parámetro tiende una disminución (Figura 54) debido a que existe una pérdida de brillo del color estudiado durante la maduración de los frutos, debido a que el valor de L va desde una reflexión nula ($L=0$) a una reflexión difusa perfecta ($L=100$) [González y Guzmán, 2011].

En el primer día de almacenamiento la luminosidad de las manzanas no presentaron estadísticamente diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en todos los tratamientos aplicados pero para el día 6 y 12 si existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la luminosidad de las manzanas con los tratamientos sin recubrimiento (control) y con RC con respecto a los demás tratamientos aplicados a los frutos, siendo menores la luminosidad de las manzanas control con 67.4 a 67.32 y las RC con 67.3 a 68.45 de luminosidad del día 6 al 12 respectivamente, presentando estas una diferencia del 6 al 7% con las de mayor luminosidad que fueron las manzanas con RC adicionado con extracto etanólico a 2000 y 3000 ppm.

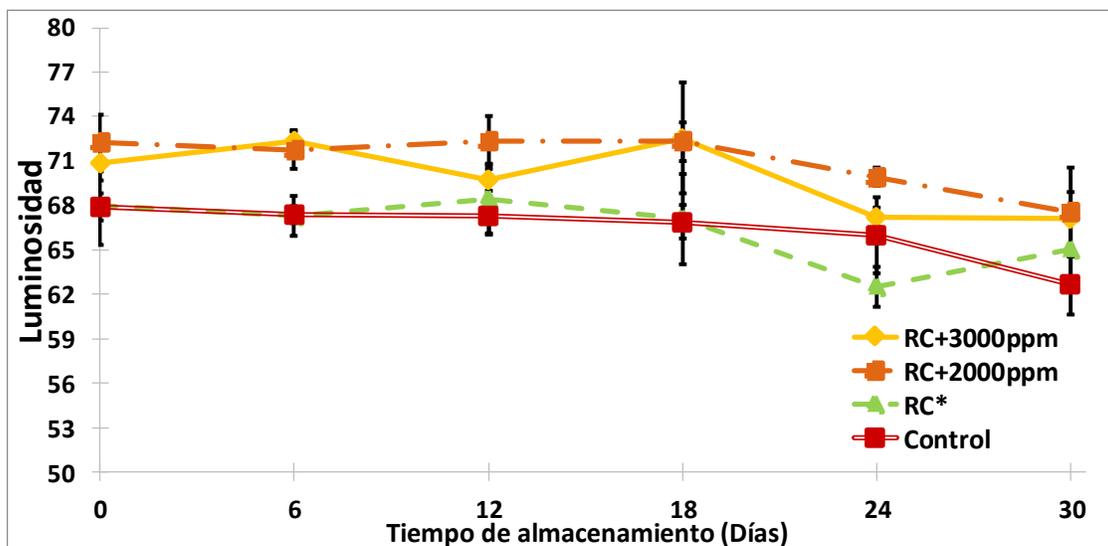


Figura 54. Luminosidad de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

Mientras que en el día 24, las manzanas con RC mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a los frutos con RC + 2000 ppm de extracto etanólico al presentar una mayor luminosidad

con 69.94 de promedio, la diferencia que presentaron fue de 10.64% con respecto a la de menor luminosidad que fueron las manzanas únicamente con RC. Para el día 30 no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en ninguna de las manzanas con los diferentes tratamientos aplicados, presentando al final la mayor luminosidad aquellos frutos con recubrimiento adicionado con 2000 ppm de extracto etanólico con 67.57 de promedio.

Para los 30 días de almacenamiento de las manzanas, estas presentaron una disminución de la luminosidad en los diferentes tratamientos, en el caso del tratamiento de control hubo un descenso del 7.74%, para el caso de las manzanas con RC fue un 4.35%, finalmente para los frutos con recubrimiento y adicionados con 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico existió un 6.42% y 5.32% de disminución de luminosidad respectivamente, siendo así que las manzanas con RC fue el que permitió menor pérdida de la luminosidad durante todo el almacenamiento.

En otros estudios como el realizado por Jo *et al.* (2014), evaluaron la aplicación de un recubrimiento comestible de cera de carnauba y goma laca (CSW) basada en una nanoemulsión adicionada con aceite de hierba de limón (LO) en Manzanas 'Fuji', que se compararon con manzanas sin recubrimiento con respecto a su calidad y la seguridad microbiana durante 5 meses, mostraron que el valor de luminosidad, para las manzanas sin revestir después del tiempo del almacenamiento disminuyeron de 45 a 40 de L^* , sin existir diferencias con las manzanas recubiertas solamente con el CSW ya que también aminoraron de 46 a 45 de L^* , pero las manzanas recubiertas con CSW-LO el valor de luminosidad ligeramente se redujo y volvió a aumentar de 44 a 46 de L^* durante el almacenamiento. Esto no concuerda respecto a los valores de L^* en las manzanas de este estudio que mostraron una diferencia superior de aproximadamente 37 a 41%, pero si concuerda respecto a la pérdida de luminosidad que es mayor en control con respecto a los demás tratamientos con RC debido a que de acuerdo con los resultados obtenidos de Wan *et al.* (2013) la aplicación de un recubrimiento disminuyó la pérdida de luminosidad y otros parámetros en los frutos.

Así mismo Kraśniewska *et al.* (2015) realizaron la aplicación de recubrimientos con pululano enriquecidos con extractos de *Bergenia crassifolia* para controlar el crecimiento de microorganismos y mejorar la calidad de los pimientos y manzanas, donde las manzanas con el recubrimiento de pululano y las adicionadas con extracto no tenían diferencia significativa sobre los cambios en luminosidad en los 24 días de almacenamiento, con valores de L^* mayores que control con 32 a 33 de L^* , mientras que control mostró reducido el valor L^* de 31.6 a 30.61; es

decir que contribuyó al oscurecimiento de manzana, este comportamiento fue similar al presente trabajo ya que las manzanas con RC y adicionadas con extractos etanólicos mostraron una luminosidad mayor a control, así mismo se observa la disminución de luminosidad.

Por ende la aplicación de un recubrimiento comestible adicionado con extracto de sangre de drago en manzanas reduce la pérdida de luminosidad, como lo ocurrido en las manzanas control (sin RC ni extractos etanólicos) ya que presentaron una mayor pérdida de luminosidad con una diferencia del 4 al 7% de los demás tratamientos, por lo que el RC pudo mantener el color específicamente en la luminosidad de las manzanas durante el almacenamiento.

○ Pérdida de peso

La transpiración y en menor medida el consumo de sustratos, son la razón de la pérdida de peso en los frutos durante la maduración en postcosecha (Solarte, 2010). En la Figura 55 se muestran los resultados de % porcentaje de pérdida de peso de las manzanas.

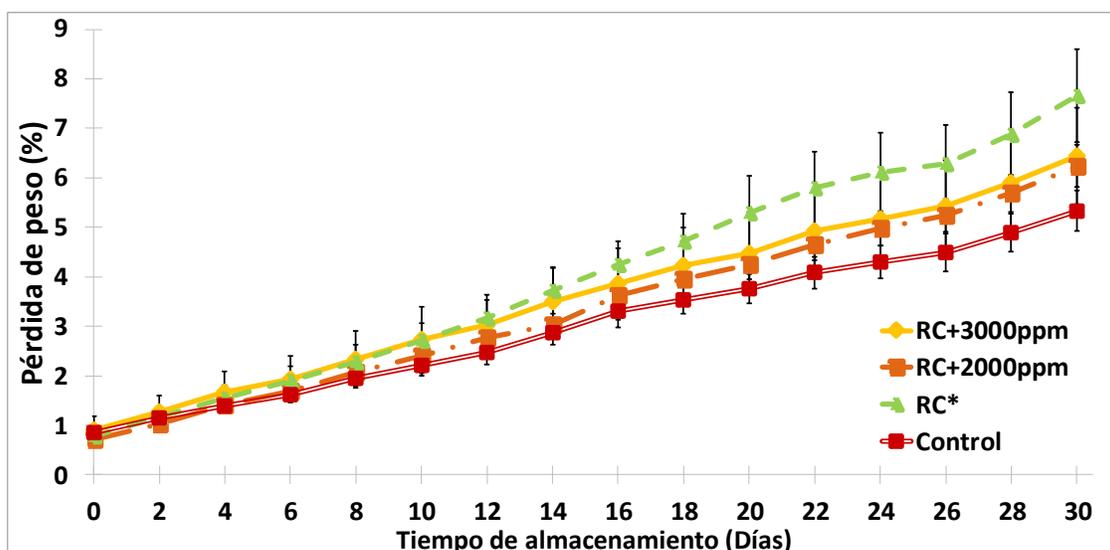


Figura 55. Pérdida de peso de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

Las manzanas sin recubrir y las manzanas recubiertas y aquellas recubiertas adicionadas con extracto de sangre de drago no presentaron diferencia significativa ($P \geq 0.05$) del día 0 al 20, y el día 26 en la pérdida de peso. Sin embargo para los días del 22 al 30 (excluyendo al día 26) las manzanas control mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a las del tratamiento con RC, ya que estas frutas registraron la mayor pérdida de peso, con diferencia del 30.34% en el

día 30 con respecto a la de menor pérdida de peso que fueron las manzanas control, mientras que aquellas manzanas con recubrimiento adicionadas con 2000 ppm de extracto etanólico mostraron una diferencia del 14.5% con respecto a los frutos control.

Durante todo el tiempo de almacenamiento de las manzanas presentaron ascenso en la pérdida de peso, para el caso de las manzanas con RC + extractos etanólicos a 2000 y 3000 ppm mostraron un incremento del 88.66 y 86.9% respectivamente, aquellos frutos con recubrimiento sin adición de extracto el %pérdida de peso aumentó un 89.87%, para las manzanas control un 84.16%, siendo este último el que presentó menor ascenso en la pérdida de peso.

De acuerdo con Wan *et al.* (2013) quienes evaluaron la aplicación de un recubrimiento comestible de cera de carnauba y goma laca (CSW) basada en una nanoemulsión adicionada con aceite de hierba de limón (LO) en Manzanas 'Fuji', encontraron que hubo una diferencia en la pérdida de peso entre las muestras de manzana sin recubrir y recubiertas después de 5 meses de almacenamiento, donde el peso de las manzanas sin recubrir disminuyó en un 7.22 %, mientras que la pérdida de peso de las manzanas recubiertas con CSW y CSW -LO fueron de 4,82 % y 5,18 % respectivamente. Por lo que no concuerda con los resultados obtenidos en este proyecto, ya que las pérdidas de peso en este trabajo fueron mayores de las manzanas con RC que aquellas sin recubrimiento, esto puede deberse a que de acuerdo a los resultados obtenidos por Johnston y Banks (1998) que realizaron recubrimientos a base de CMC al 2% en aguacates, este no reducía la pérdida de peso atribuyéndolo que el CMC al ser un polisacárido hidrofílico no ejerció una barrera al vapor de agua efectiva, del mismo modo que los resultados obtenidos en este proyecto.

Del mismo modo Synowiec *et al.* (2014) determinaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de la película de pululano que contiene extracto de albahaca y realizaron una evaluación de la eficacia como recubrimiento en la prolongación de la vida útil de las manzanas almacena durante 30 días en condiciones de refrigeración, resultaron que para la pérdida de peso en las manzanas sin RC eran más altas en comparación con las recubiertas, donde después de 30 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración las pérdidas de peso fueron 4,1% (manzanas sin RC), 3,2% (manzanas con RC pero sin extracto) y 2,8% (manzanas recubiertas con recubrimiento más extracto). Esto no concuerda debido a que las pérdidas de peso son mayores en un 5 a 7% en este proyecto y de igual forma en este trabajo las que presentaron mayor pérdida de peso fueron las manzanas con los tratamientos con RC.

Conforti y Totty (2007) observaron la pérdida de peso constante en manzanas *Golden delicious* tanto con y sin recubrimiento a base de un hidrocoloide lípido y estadísticamente no mostraron diferencia durante el almacenamiento de 8 semanas en refrigeración es decir no mostraron cambios. Mientras que Erbil y Mnftngil (1986) observaron un incremento de pérdida de peso en melocotones a los que se les aplicó recubrimientos a base de CMC y aceite de coco. Por lo que estos resultados concuerdan con este proyecto ya que existió mayor pérdida de peso en las manzanas con recubrimiento.

Mientras que Debeaufort *et al.* (1998) reportaron que en manzanas (*Golden delicious*) tratadas con una cobertura comestible de cera de carnauba, almacenadas a 3 y 14 °C, presentaron mayores pérdidas que los controles (sin cobertura) en las dos diferentes temperaturas de almacenamiento, lo cual se atribuyeron a que el recubrimiento pudo estar actuando como agente sacrificante, es decir, el agua que primero sale es la del recubrimiento y evita la pérdida por el fruto. Es así que estos resultados concuerdan con este proyecto ya que de igual forma existió mayor pérdida de peso en las manzanas con RC

De este modo la aplicación en manzanas de un recubrimiento comestible con extractos etanólicos de sangre de drago no disminuyó la pérdida de peso, ya que las manzanas sin recubrir fueron las que presentaron una menor pérdida de peso con una diferencia del 15 al 30% aproximadamente con respecto a los demás tratamientos, debido a que los recubrimientos no redujeron la pérdida de peso, esto puede ser debido a la naturaleza hidrofílica de la matriz del RC ya que no pudo aportar una barrera adicional a la deshidratación en la superficie de los frutos, sumando la barrera de vapor de agua que ejerce la propia piel de las frutas y las ceras naturales presentes en la misma de acuerdo a Baldwin *et al.* (1997).

○ Firmeza

La pérdida de textura es el cambio más notable que ocurre en frutas y vegetales durante prolongados tiempos de almacenamiento y está relacionado a los cambios metabólicos y al contenido de agua (García *et al.*, 2000). En la Figura 56 se muestran los resultados de firmeza expresado en Newtons.

Observando que la firmeza disminuye al paso del tiempo del almacenamiento, esto es debido a la degradación basada sobre los cambios en la estructura química de los polisacáridos de la pared celular como pectinas, responsables de la estructura de la fruta, con el consiguiente ablandamiento

de su tejido (Gil, 2010). En el día 0 no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre la firmeza de las manzanas con los diferentes tratamientos.

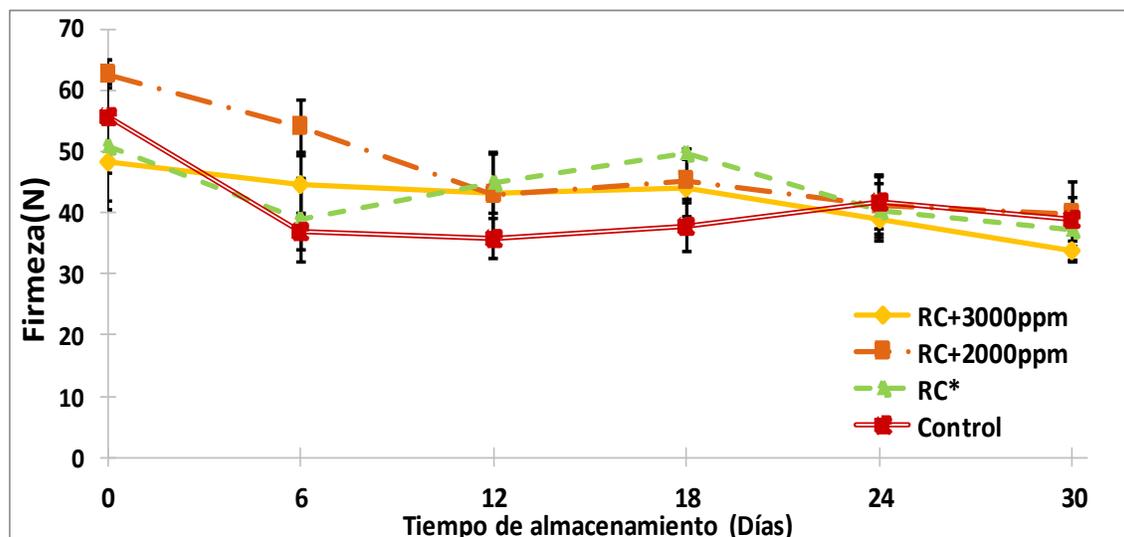


Figura 56. Firmeza de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

En los días 6 y 18 del almacenamiento existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre la firmeza de las manzanas control con respecto a los frutos tratados con RC + 2000 ppm de extracto etanólico en el día 6 y los de RC en día 18, mostraron así la menor firmeza, las manzanas control con 39.91 y 37.83 N en los días 6 y 18 respectivamente. Para el último día de almacenamiento de las manzanas, la firmeza no presentó diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en cada uno de los tratamientos aplicados a los frutos, siendo las manzanas con RC + 2000 ppm de extracto etanólico las que presentaron mayor firmeza con 39.75 N

En cuanto al almacenamiento de las manzanas durante los 30 días presentaron una disminución de firmeza, siendo evidente en las manzanas con los tratamientos con RC + 2000 y 3000 ppm de extracto etanólico presentaron una disminución del 36.56 y 30% respectivamente, mientras que para las manzanas control y aquellas con RC sin extracto etanólico presentaron una disminución del 30.24 y 26.77% respectivamente, mostrando que las manzanas con RC sin adición de extracto fueron las que presentaron menor pérdida de firmeza.

Bai y *et al.* (2003) realizaron recubrimientos comestibles a base de Polietileno, candelilla, laca de carnauba y goma laca con un monitoreo de 2 ó 4 semanas a 20°C en diferentes variedades de

manzanas como *Delicious*, *Fuji*, *Braeburn* y *Granny Smith*, en donde, la firmeza de las manzanas al inicio en las diferentes variedades *Delicious* (73 N) *Braeburn* (72 N), *Fuji* (76 N) y *Granny Smith* (78 N) presentaron valores similares, así mismo la pérdida de firmeza durante el almacenamiento era menor para las frutas con recubrimiento, obtuvieron que el RC que presentaba menor pérdida de firmeza era el de goma laca, en las diferentes variedades exceptuando a la variedad *Granny Smith* que en su caso fue el RC de laca de carnauba, mientras que el que presentó mayor pérdida de firmeza en todas las variedades fue el RC de polietileno. Esto resultados fueron diferentes respecto al presente estudio ya que los que presentaron mayor pérdida de la firmeza fueron los que poseían un RC, excluyendo al RC +2000 ppm de extracto, sin embargo con respecto a los valores de firmeza estos muestran una diferencia solamente del 15 al 30% aproximadamente con los obtenidos en este trabajo, esto pudo deberse a la naturaleza hidrofílica del CMC empleado en la matriz del recubrimiento que fomentó la transferencia de vapor de agua en el fruto favoreciendo a cambios estructurales del mismo lo que afectó este parámetro

Del mismo modo Lucimara *et al.* (2015) analizaron el efecto de la goma de anacardo y carboximetilcelulosa como RC en guayabas frescas y cortadas, donde observaron que no hubo diferencias significativas en la pérdida de la firmeza de los frutos durante los 12 días de almacenamiento, sin embargo estas pérdidas fueron menores en los frutos sin recubrir que los que tenían un RC lo que atribuyeron a que la disminución progresiva de la firmeza de la pulpa de la fruta en la maduración también se refleja con la pérdida de peso. Por lo que estos resultados coinciden con los obtenidos en este proyecto ya que los frutos sin RC presentaron una menor pérdida de firmeza. Además de que estos presentaron menor pérdida de peso lo que concuerda con Lucimara *et al.* (2015).

Es así que la aplicación en manzanas de un recubrimiento comestible con extractos etanólicos de sangre de drago no disminuyó la pérdida de la firmeza con respecto a las manzanas que no se le aplicó RC, debido a que la aplicación del RC no retardaron los cambios en la firmeza por la maduración del fruto, es decir que con o sin RC la pérdida de firmeza fue similar.

- **Parámetro fisiológico**

- **Respiración**

La respiración en los frutos es el proceso mediante el cual reservas orgánicas (carbohidratos, proteínas, etc.) son degradadas a productos finales simples con una liberación de energía, donde

el oxígeno (O_2) es consumido y usado para producir el bióxido de carbono (CO_2) en este proceso (Kader, 1992).

En la respiración, el fruto consume el O_2 presente en el interior del mismo y genera CO_2 , lo que empobrece en O_2 la atmósfera interna del fruto y la enriquece en CO_2 . De esta manera, se establece un gradiente de concentración de ambos gases entre la atmósfera interna del fruto y la atmósfera que rodea al mismo, que genera un flujo de ambos gases a través de la piel del fruto, entrando O_2 al interior del mismo y saliendo CO_2 . Los recubrimientos aplicados en la superficie de los frutos, aportan una barrera adicional a los gases CO_2 y O_2 que afecta el transporte de estos (Navarro, 2007).

En la Figura 57 se muestran los resultados de la respiración del fruto en $mgO_2/Kg \cdot h$ donde se puede examinar que ésta disminuye debido a que la tasa de respiración del oxígeno se reduce por el consumo del mismo para la producción de CO_2 . En donde al inicio del almacenamiento de las manzanas al día 8 y del día 16 al 30 no hubo estadísticamente diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en los diferentes tratamientos aplicados a los frutos.

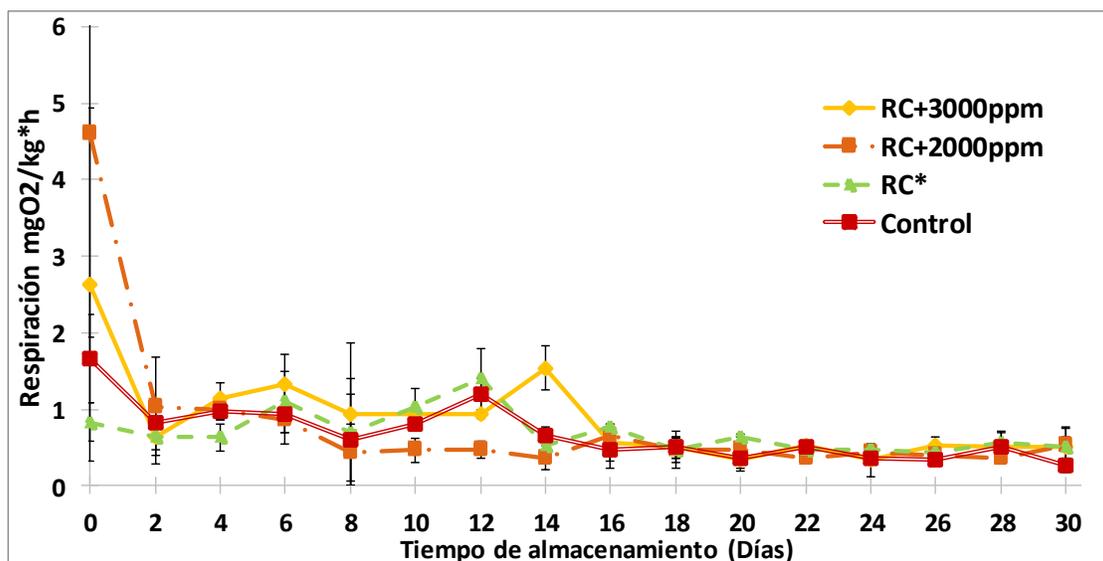


Figura 57. Respiración de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm. Las barras verticales representan \pm desviación estándar. RC*: Recubrimiento comestible.

En cuanto a los días 10 y 12 hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de las manzanas con RC con respecto a los frutos con recubrimiento + 2000 ppm de extracto etanólico mostrando una diferencia con los frutos con RC del 54.83%(día 10) y 66.66%(día 12) en la tasa de respiración, del mismo

modo para el día 14 existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de las manzanas con RC adicionado con 3000 ppm de extracto con los demás frutos de los diversos tratamientos aplicados, con una diferencia del 76.08% con respecto a la de menor tasa de respiración que fueron las manzanas control con $0.36 \text{ mgO}_2/\text{Kg} \cdot \text{h}$ de promedio.

Finalmente para el día 30 no existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en la tasa de respiración de las manzanas con los diferentes tratamientos aplicados a pesar de esto, se observó que las manzanas con RC presentaron una mayor tasa de oxígeno con una diferencia del 46 al 50% respecto a las manzanas sin RC (control) con una tasa de respiración del $0.26 \text{ mgO}_2/\text{Kg} \cdot \text{h}$, por lo que indica que existe una menor producción de CO_2 en las manzanas con RC que las manzanas control.

Mostrando que durante los 30 días de almacenamiento de las manzanas decrecían en la tasa respiratoria ya que existe el consumo de O_2 , para los frutos con RC mostraron una disminución del 40%, mientras que las manzanas control un 84%, para las manzanas con RC y adicionadas con extracto a 3000 y 2000 ppm el descenso en la tasa respiratoria fue del 81.01 y 88.4% respectivamente, por lo que el que presentó una menor disminución de la tasa de respiración de O_2 fueron las manzanas con RC, debido a que muestra que es menor el consumo de O_2 para dar a la creación de CO_2 .

Chauhan *et al.* (2011) realizaron una evaluación de RC de goma laca y gel de Aloe para mantener la calidad de rodajas de manzanas, donde determinaron la respiración en $\text{mLCO}_2/\text{kg} \cdot \text{hr}$, donde resultó que la aplicación de los recubrimientos comestibles de goma laca y gel de aloe por separado y en combinación mostraron un efecto significativo en el comportamiento respiratorio a diferencia de las no recubiertas, señalaron que estas tuvieron las tasas de respiración más altas de CO_2 debido a que el fruto al madurar empieza a consumir el O_2 reduciéndolo del medio para transformarlo en CO_2 y por ende al pasar el tiempo presenta mayores valores en la tasa de CO_2 , esto concuerda con los resultados obtenidos en este proyecto, pero en este caso la tasa de respiración analizada fue de O_2 , donde las manzanas sin recubrir mostraron menor tasa de respiración de O_2 lo que sugiere que existió mayor consumo del mismo por el fruto para transformarlo en CO_2 .

Zhang *et al.* (2014) mencionan que los derivados de celulosa proporcionan la humedad y barreras de oxígeno y dióxido de carbono, y mejoran la adherencia de las formulaciones de revestimiento,

estos derivados de celulosa son generalmente transparentes, flexibles, inodoro, insípido, soluble en agua, y resistentes a O₂ y CO₂. Así mismo Lin y Zhao (2007) señalaron que los RC de carboximetilcelulosa pueden reducir la absorción de oxígeno sin aumentar el nivel de dióxido de carbono en el interior de manzanas recubiertas mediante la simulación de una atmósfera controlada.

Bonilla *et al.* (2012) analizaron que las películas y recubrimientos comestibles pueden incluir agentes antioxidantes en su formulación y, al mismo tiempo, representan una barrera al oxígeno, lo que resulta en una mejor preservación de la calidad.

Por lo que el uso de recubrimientos comestibles adicionados con extractos etanólicos pueden retardar el proceso de la maduración, ya que como se observó las manzanas sin recubrimiento presentan la menor tasa de O₂, lo que puede significar altos niveles de producción de CO₂, con una diferencia aproximada del 50% con las manzanas con RC, por lo que su aplicación podría ser benéfica para aumentar la vida de anaquel de manzanas.

- **Análisis sensorial**

Las pruebas de análisis sensorial permiten traducir las preferencias de los consumidores en atributos definidos para un producto, es así que definen el rechazo o la aceptación del producto (Ramírez, 2012). La evaluación del análisis sensorial de las manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa al 0.5% adicionadas con extractos etanólicos de sangre de drago se realizó para determinar aquellas características sensoriales que pudieran verse afectadas por el uso de recubrimientos comestible y extracto etanólicos durante el almacenamiento.

En la Figura 58 se observan los resultados obtenidos de los días 0, 18 y 30 de almacenamiento de las manzanas. Los atributos sensoriales evaluados fueron: apariencia visual, intensidad de color, olor, sabor, olores y sabores extraños, textura y calificación global.

En la figura 58 A se observa que para el primer día de almacenamiento estadísticamente no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en los atributos percibidos por los panelistas en ninguno de los tratamientos aplicados en las manzanas.

En el día 18 (Figura 58 B) los panelistas percibieron en el atributo de Intensidad de color diferencias en las manzanas adicionadas con extractos etanólicos en el RC con respecto a las manzanas control y las manzanas con RC sin adición de extracto, mostrando que las manzanas con el

tratamiento RC con una intensidad de color de “Amarillo- Verde muy claro”, mientras que las manzanas con RC + 3000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago los panelistas la calificaron con una intensidad de color de “Amarillo-Verde”, existiendo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en este parámetro. Sin embargo para los atributos restantes no presentaron diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en ninguno de los tratamientos.

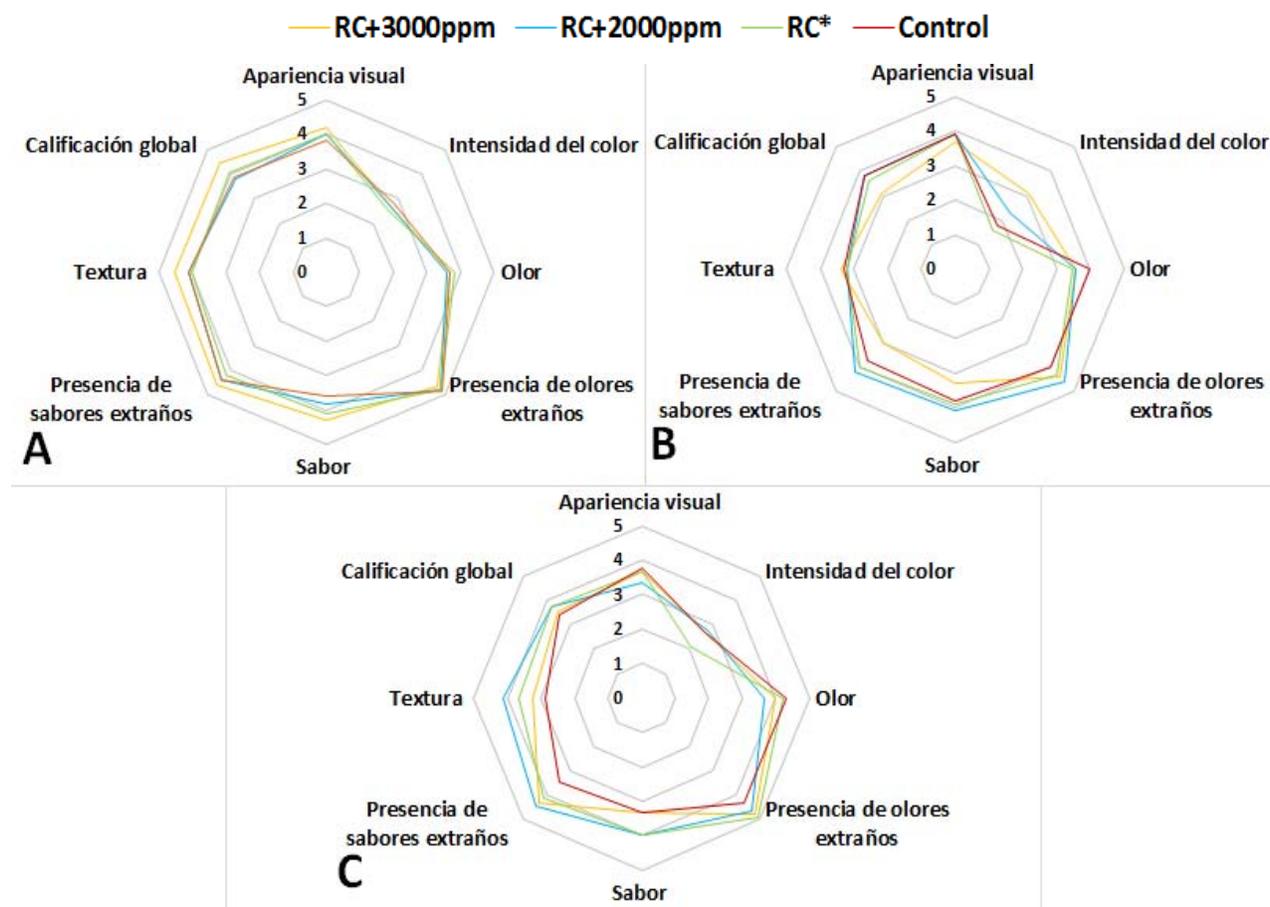


Figura 58. Análisis sensorial de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm; Donde A: es en el día 0, B: es en el día 18 y C: es el día 30. RC*: Recubrimiento comestible.

Finalmente para el día 30 (Figura 58 C) se puede observar que presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en los atributos de “Textura”, “Sabor” y “Presencia de sabores extraños”, en cuanto a textura la diferencia fue entre las manzanas control al presentar una calificación de “Aceptable como límite de consumo” con las manzanas con RC +2000 ppm de extracto etanólico al calificarla los panelistas como “Firme”, en cuanto al sabor las diferencia fue entre las manzanas con RC con una calificación de “Buena” contra las manzanas con RC + 3000 ppm de extracto etanólico con la

calificación de “Aceptable como límite de consumo”, así mismo para la presencia de sabores extraños se percibe que las manzanas control presentaron una calificación de “Aceptable como límite de consumo” mientras que los demás tratamientos con RC y adicionados con extractos etanólicos obtienen una calificación de “poco” en presencia de sabores extraños”. Para los demás atributos no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en ninguno de los tratamientos.

Durante todo el tiempo de almacenamiento, en general el atributo de “Apariencia visual” disminuyó un 12.69 y 16.66% en las manzanas con los tratamientos de RC + 3000 y 2000 ppm de extracto etanólico respectivamente, en cuanto a los frutos con solo RC disminuyeron un 8.33% y para las del control no presentaron un cambio. Para el atributo de “Intensidad de color” el único tratamiento que provocó una disminución en las manzanas fue el de solo RC con un 18.8%, en cuanto al atributo de “Olor” ningún tratamiento disminuyó, en cuanto a los atributos de “Presencia de sabores” y “olores extraños” el único que provocó una disminución fueron las manzanas control con 11.54 y 21.71% respectivamente. Mientras que para el atributo de “Sabor” el único tratamiento que provocó una disminución en las manzanas fue RC + 3000 ppm de extracto con 22.48% y para RC + 2000 ppm de extracto aumentó un 5%. Otro de los atributos que disminuyeron fue el de “Textura”, para las manzanas tratadas con el RC + 3000 ppm de extracto disminuyeron un 22.48%, para los frutos solo con RC un 8.33% y las manzanas control un 29.53%. Y finalmente para la “Calificación Global” los únicos que disminuyeron fueron las manzanas control con un 11.68%, las de RC con un 7.85% y los frutos con RC + 3000 ppm de extracto de sangre de drago con un 20.98%, para las recubiertas con 2000 ppm de extracto no mostraron ningún cambio. Es así que los frutos con RC + 2000 ppm de extracto etanólico fue el que presentó menos cambios en cuanto a la calificación de los atributos antes mencionados por los panelistas durante el almacenamiento de los 30 días de las manzanas.

Shariatifar y Jafarpour (2013) evaluaron la calidad de manzanas con recubrimientos de caseína de sodio y glicerol, almacenados a 4°C durante 112 días, al final del período de almacenamiento se realizaron análisis sensoriales a un grupo de panelistas que calificó atributos sensoriales como color de la superficie, sabor, textura, la apariencia y la aceptabilidad en general de las manzanas con y sin recubrimiento, donde mostraron que hubo diferencia significativa en los diferentes tratamientos, con mayor aceptación sensorial de las manzanas con recubrimientos. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en este proyecto debido a que existió diferencia en algunos de los atributos sensoriales en los diferentes tratamientos aplicados, mostrando aceptación de las manzanas con RC.

Synowiec *et al.* (2014) determinaron la eficacia como recubrimiento del pululano que contiene extracto de albahaca para la prolongación de la vida útil de las manzanas almacenadas en condiciones de refrigeración, obtuvieron en su análisis sensorial que los frutos con el recubrimiento más el extracto, originaba ligeramente cambios en las propiedades sensoriales. Mostraron diferencias significativas en el sabor y el olor de los frutos con recubrimiento con extracto y sin recubrir, también el panel sintió el sabor a albahaca de las manzanas con RC con extracto, pero a pesar de ello la adición de los extractos al recubrimiento pululano no afectó negativamente a la evaluación en el color por los panelistas, mientras que el atributo más beneficioso en el empleo de recubrimientos en manzanas, fue el brillo con puntuaciones más altas lo que aumento su atractivo general. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este proyecto ya que la aplicación de los extractos etanólicos de sangre de drago al RC no mostraron cambios en el sabor ni en el olor, esto pudo ser debido a las cantidades empleadas en partes por millón (ppm) de extracto de sangre de drago en el recubrimiento y en adición con el polisacárido empleado en este proyecto no influyeron en los atributos sensoriales percibidos por los panelistas de los frutos.

De igual forma Del Valle *et al.* (2005) mencionan que los extractos de plantas de sabores y olores fuertes y característicos, adicionados a los recubrimientos pueden cambiar desfavorablemente las propiedades sensoriales de productos, lo que influye decisivamente en las preferencias del consumidor. Sin embargo en este proyecto esto no afectó con la adición de la planta sangre de drago como extracto etanólico en el RC del fruto.

En la Tabla 19 se puede observar el seguimiento fotográfico de las manzanas *Golden delicious* sin infectar con los diferentes tratamientos aplicados en ellas, mostrando todas las caras de la manzana desde su pedúnculo a su cuerpo, así mismo observan los cambios de color y apariencia general de los frutos.

La aplicación de recubrimientos comestibles con extractos etanólicos de sangre de drago en manzanas resultó aceptable a buenas en su “calificación global” de acuerdo con los panelistas, así mismo no fueron capaces de diferenciar entre el control y las muestras con recubrimiento.

Tabla 19. Seguimiento fotográfico de las manzanas *Golden delicious* de manzanas recubiertas con CMC a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 2000 y 3000 ppm.

	2000 ppm	3000 ppm	Control CMC	Control
Día 6				
Día 12				
Día 18				
Día 24				
Día 30				

4.4. Evaluación del control del moho azul y presencia de patulina en manzanas con recubrimientos comestibles de carboximetilcelulosa adicionados con extractos etanólicos de sangre de drago

- Índice de severidad y porcentaje de infección

Se determinó el índice de severidad de la enfermedad de moho azul causada por *Penicillium expansum*, los resultados se muestran en la Figura 59 donde va desde: 1= Sin daño; 2= Daño ligero 1-5%; 3= Daño moderado 6-15%; 4= Daño severo >16%; 5= Daño completo (Martínez *et al.*, 2012).

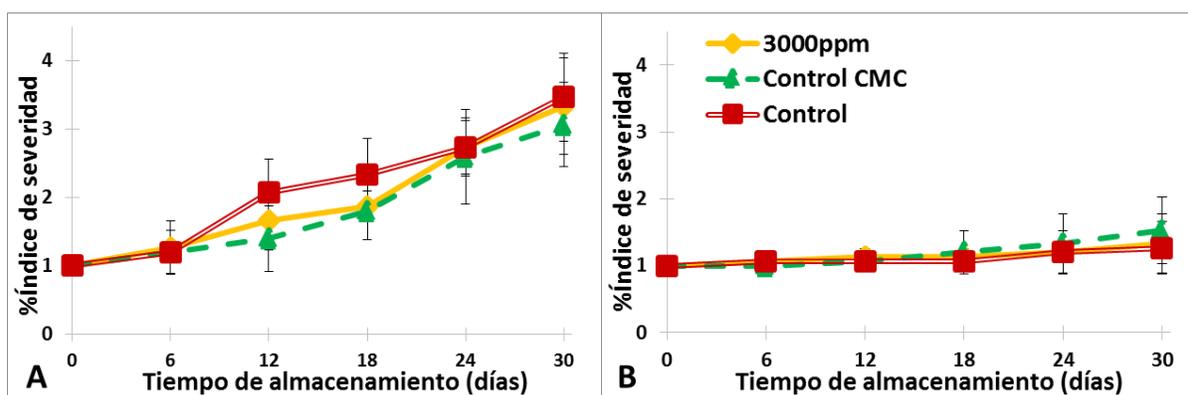


Figura 59. Índice de severidad de manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm inoculadas con el hongo *Penicillium expansum*. Donde A: son las manzanas picadas y B: las manzanas golpeadas. Las barras verticales representan \pm desviación estándar.

Observando que el índice de severidad de las manzanas con los tratamientos con y sin recubrimiento comestible y aquellas adicionadas con extracto etanólico de sangre de drago presentaron un “Daño moderado” en manzanas picadas mientras que para las manzanas golpeadas un “Daño ligero”, para las manzanas golpeadas no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) del % de índice de severidad en ninguno de los días de almacenamiento con los diferentes tratamientos aplicados a las manzanas.

En los días 12 y 18 para las manzanas picadas si hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el índice de severidad de las manzanas control con un “Daño ligero” con respecto a los frutos con recubrimiento sin extractos, mostrando una diferencia del 32.25 al 22.85%. En los días restantes y anteriores a estos no existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$). Al finalizar para el día 30 las manzanas picadas presentaron mayor índice de severidad en las frutas control con una diferencia del 4 al 12% aproximadamente con los demás tratamientos aplicados a los frutos, mientras que en las manzanas golpeadas la del RC fueron las que presentaron mayor índice de severidad con una

diferencia del 13 al 17% con las otras manzanas sin recubrir (control) y recubiertas adicionales con extracto.

De tal modo que el índice de severidad de la enfermedad del moho azul en las manzanas, durante los 30 días de almacenamiento, aumentó en los diferentes tratamientos aplicados. Para los frutos con RC + 3000 ppm de extracto etanólico aumentó un 70% en manzanas picadas y un 25% para las manzanas golpeadas, mientras que las manzanas con RC el aumento en las picadas fue de un 67.39% y en las golpeadas un 34.78% y por último para aquellas manzanas control, las manzanas picadas aumentaron el 71.15% y un 21.05% en las manzanas golpeadas. Siendo así que las manzanas sometidas a un golpe no aumentaron a mayor escala su índice de severidad en comparación con las manzanas picadas debido que el tejido interno de las manzanas picadas fue expuesto y por ende mayor severidad del hongo sobre el fruto.

Martínez *et al.* (2012) evaluaron dos aceites esenciales (canela y clavo de olor) para el control de pudriciones fungosas (*Thanatephorus donk*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*). Determinaron la vida útil mediante películas protectoras comestibles a base de cera comercial en papaya, observaron que el tratamiento blanco, es decir, sin ningún recubrimiento es el que mostraba mayor índice de severidad y posteriormente los tratamientos con ceras sin adición de aceites esenciales, mientras que los que incluían aceites esenciales a mayor concentración del mismo, menor era el índice de severidad. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este proyecto, respecto a los frutos control con picadura, ya estas manzanas muestran mayor índice de severidad.

Bosquez *et al.* (2010) determinaron el efecto fungicida de aceites esenciales a base de tomillo y limón mexicano contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, y evaluaron la posibilidad de adicionarlos en recubrimientos comestibles a base de goma de mesquite y evitar enfermedades de postcosecha en papaya. Obtuvieron que las papayas con recubrimientos adicionados con los aceites esenciales tenían una diferencia significativa con el tratamiento control ya que los frutos control presentaban mayor índice de severidad por los hongos. Así mismo en el caso del aceite esencial de tomillo a mayor concentración del mismo, menor su índice de severidad, mientras que el caso del aceite esencial de limón mexicano con la concentración mínima presentaba un índice de severidad menor. Por lo que los resultados no concuerdan con lo obtenidos en este proyecto ya que no existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en el índice de severidad de las manzanas control con los frutos con los tratamientos con RC y adición de

extractos etanólicos, esto pudo ser debido a que el extracto de sangre de drago no afectó el crecimiento del hongo *Penicillium expansum* en las manzanas.

Rupasinghe *et al.* (2006) analizaron que las diferencias en las pruebas *in vivo* e *in vitro* de diferentes tratamientos pueden estar relacionados con características del tejido de la manzana, tales como el pH, los niveles de nutrientes esenciales, compuestos fenólicos o naturales. Mientras que Salas *et al.* (2011) mencionaron que la actividad antifúngica *in vivo* depende de la naturaleza de los hongos y compuestos utilizados sobre su inhibición. Así mismo Valentines *et al.* (2005) encontraron que el pardeamiento enzimático no es un factor determinante de la resistencia de la manzana sobre *P. expansum*.

En la Tabla 20 y 21 se puede observar el seguimiento fotográfico sobre el Índice de severidad de las manzanas *Golden delicious* infectadas con *Penicillium expansum*, donde se aprecia que el efecto fue de mayor intensidad en las manzanas picadas que en aquellas que fueron golpeadas. Además de que la infección del moho azul no fue total en el fruto, esto puede deberse a que el hongo pudo haber perdido agresividad durante todo el tiempo de vida desde su recolección.

Es así que la aplicación de recubrimientos comestibles con extractos etanólicos de sangre de drago no mostraron un efecto para reducir el índice de severidad del moho azul sobre las manzanas, a pesar de que las manzanas picadas muestran un mayor índice de severidad en los frutos control, para las manzanas golpeadas no es el mismo caso, por lo que la aplicación de RC no inhibe del todo los síntomas de la enfermedad del moho azul causado por *P. expansum*.

Tabla 20. Apariencia visual de manzanas *Golden delicious* picadas e inoculadas con *P. expansum* recubiertas a base de CMC y extracto etanólico de sangre de drago.

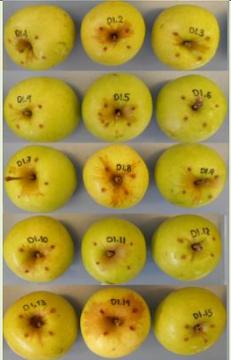
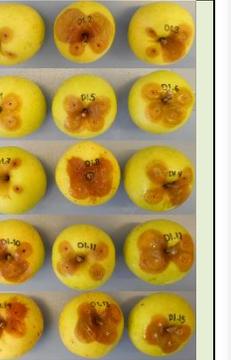
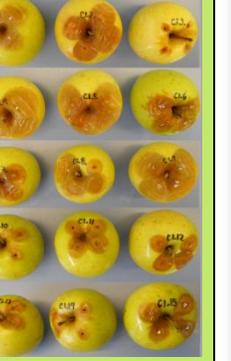
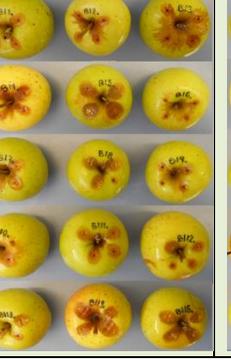
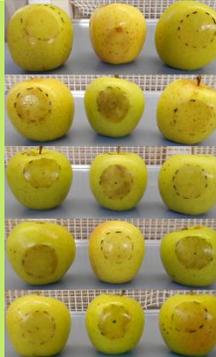
Tratamiento	DIA 1	DIA 6	DIA 12	DIA 18	DIA 24	DIA 30
Control infectado						
RC sin extracto etanólico						
RC + extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm						

Tabla 21. Apariencia visual de manzanas *Golden delicious* golpeadas inoculadas con *P. expansum* recubiertos a base de CMC y extracto etanólico de sangre de drago

Tratamiento	DIA 1	DIA 6	DIA 12	DIA 18	DIA 24	DIA 30
Control infectado						
RC sin extracto etanólico						
RC + extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm						

- **Presencia de patulina**

La presencia de la toxina patulina se determinó evaluando el factor de retención (Rf) en manzanas dañadas por picadura ya que presentaron mayor índice de severidad de la enfermedad provocadas por el hongo *Penicillium expansum* durante los 30 días.

Carrillo, (2003) menciona que la patulina tiene un Rf de 0.4 a 0.5. Por lo que en este proyecto se evaluó el factor de retención de las muestras obtenidas de las manzanas con los diferentes tratamientos, dando como positivo de presencia de patulina aquellos con un $Rf \geq 0.4$. Observando que los frutos control (sin RC ni adición de extracto) presentaron un Rf de 0.45 de promedio en 14 muestras mientras que solamente una muestra presentó un Rf de 0, para las manzanas con RC sin extracto presentaron un total de 9 muestras con un Rf de 0.41 de promedio mientras que exclusivamente 6 muestras presentaron un Rf de 0.08 de promedio, en cuanto a las manzanas con extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm solo 8 muestras presentaron un Rf de 0.40 de promedio y 7 muestras un Rf 0.05 de promedio. Siendo las manzanas control aquellos con un Rf mayor en comparación con los demás tratamientos y con un número mayor de positivos de presencia de patulina.

El estudio de la inhibición de la patulina tiene grandes avances en cuanto a la aplicación de nuevas tecnologías postcosecha como es el caso de atmósferas controladas, uso de agentes de biocontrol (Morales *et al.*, 2010), alta presión hidrostática (Hao, 2015), entre otras. Sin embargo, aún sigue la aplicación de fungicidas para inhibir el crecimiento del hongo y así evitar la producción de la micotoxina. Pero la producción de patulina en el fruto es complicado y no siempre se corresponde con el crecimiento específico del hongo *P. expansum*. Así mismo la acumulación de patulina también se asocia con las implicaciones del huésped (fruto) en la limitación de su síntesis y/o en la desintoxicación patulina por el mismo fruto (Menniti *et al.*, 2010). Además de que se ha observado la existencia de cepas de *P. expansum* resistentes a algunos fungicidas en pruebas *in vitro* (Morales *et al.*, 2007).

Observando la Figura 60 sobre el efecto de la aplicación de un RC con extractos etanólicos sobre la producción de patulina, se puede observar que el lote de manzanas con el recubrimiento de CMC adicionadas con el extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm, presentaron menor porcentaje de manzanas contaminadas con la toxina en comparación con el lote con recubrimiento comestible (RC), mientras que el lote control (sin RC y extracto etanólico) presentó una diferencia del 58.35% con respecto a las adicionadas con el extracto etanólico. Existiendo de igual manera

diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de aquellas manzanas sin RC y las adicionadas con extracto etanólico. Esto pudo deberse, de acuerdo con algunos autores a que los compuestos fenólicos podrían influir en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Sanzani *et al.*, 2009), sin embargo no hay información en la literatura sobre el efecto específico de los compuestos de los extractos etanólicos de sangre de drago (*Jatropha dioica*) sobre la biosíntesis de patulina.

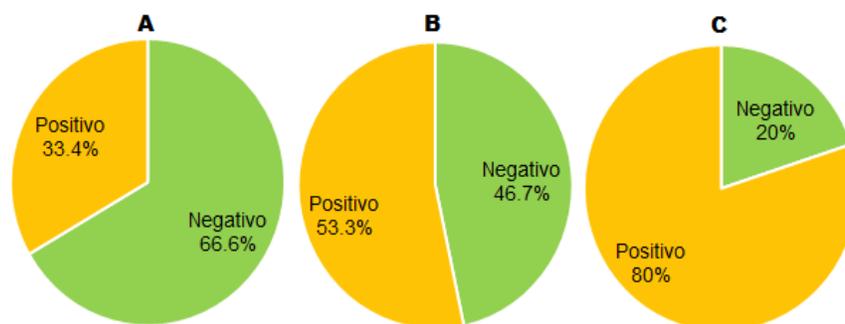


Figura 60. Porcentaje de manzanas que presentaron patulina en manzanas picadas inoculadas con el hongo *Penicillium expansum*, donde A son manzanas con RC con extracto etanólico de sangre de drago a 3000 ppm, B son manzanas recubiertas con carboximetilcelulosa a 0.5% (RC) y C representa manzanas control.

Salas *et al.* (2011) determinaron la eficacia de distintos flavonoides obtenidos a partir de residuos de cítricos para prevenir la contaminación por patulina de *Penicillium expansum*, *Aspergillus terreus* y *Byssochlamys fulva*, entre los flavonoides se encuentran naringina, hesperidina, neohesperidina, prunina, hesperetina glucósido, entre otras. Ellos observaron que todos los flavonoides reducían la acumulación de la patulina al menos en un 95% comparada con el control en los diferentes hongos. Esto indica que la aplicación de distintos compuestos bioactivos obtenidos de plantas o residuos de frutos podrían inhibir la producción de micotoxinas como la patulina, tal es el caso de los resultados se obtuvieron en este proyecto.

Zhu *et al.* (2015) evaluaron la aplicación en precosecha de ácido oxálico sobre el aumento de la calidad y resistencia de *Penicillium expansum* en kiwis durante el almacenamiento postcosecha, observaron que el tratamiento del ácido oxálico antes de la cosecha redujo tanto la acumulación de patulina y el crecimiento de *P. expansum* en kiwi cosechado, y también aumentado el contenido de ácido ascórbico. Por lo que el control de la síntesis de patulina o/y la desintoxicación es debido especialmente a su efecto sobre el metabolismo del ácido ascórbico, ya que este puede oxidarse a ácido dehidroascórbico que posteriormente reacciona con la patulina en un proceso catalizado por el oxígeno, junto con Fe^{2+} . El ácido oxálico también se encuentra como uno de los

componentes bioactivos de la planta *Jatropha dioica*, de acuerdo con Sánchez (2012).

Por lo que la aplicación de recubrimientos comestibles adicionados con extractos etanólicos de sangre de drago tuvo un efecto positivo, debido a que inhibió la producción de la micotoxina patulina en manzanas *Golden delicious* durante el tiempo de almacenamiento de 30 días.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente proyecto se concluye lo siguiente:

- ✓ El empleo en *in vitro* del extracto de sangre de drago y de las películas modelo resultó ser efectiva ya que inhibió el 100% el crecimiento micelial del hongo *Penicillium expansum* a 2000 y 3000 ppm, por lo que el uso de extractos etanólicos de esta planta puede ser efectivo para el control de este hongo.
- ✓ La concentración de carboximetilcelulosa (0.5, 0.75 y 1%) no presentó efecto en cuanto a sus parámetros físicos y de barrera en las películas modelos, por lo que para su aplicación en recubrimientos comestibles en frutos se puede emplear la de menor concentración y así tener un menor gasto en materia prima.
- ✓ Las concentraciones de extracto etanólico mostraron diferentes comportamientos en las películas modelo obteniendo mejores resultados en las propiedades de barrera y espesores a las adicionadas con 3000 ppm de extracto etanólico de sangre de drago.
- ✓ La aplicación de un recubrimiento comestible a base de carboximetilcelulosa al 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago (3000 ppm) en manzanas ayudó a preservar los parámetros de calidad como: sólidos soluble, acidez, pH, respiración, y color (Croma, Tono Hue y Luminosidad) pero fue contrario para el parámetro de pérdida de peso y firmeza durante su almacenamiento refrigerado.
- ✓ En el análisis sensorial los panelistas calificaron a las manzanas con recubrimientos comestibles adicionadas con extractos etanólicos de sangre de drago como aceptables a buenas en los diferentes atributos sensoriales, por lo que su aplicación podría ser aceptable para el consumidor.
- ✓ La práctica en el uso de un recubrimiento comestible a base de carboximetilcelulosa al 0.5% adicionado con extracto etanólico de sangre de drago (3000 ppm) en manzanas puede ser considerada una opción viable como un método alternativo de conservación para la vida útil del fruto y controlar la producción de la micotoxina patulina generada por *P. expansum*.



RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un estudio por cromatografía o HPLC para determinar específicamente cuales son los compuestos bioactivos que ejercen actividad de la planta de sangre de drago (*Jatropha dioica*).
- ✓ Evaluar diferentes concentraciones de los aditivos empleados en el estudio (emulsificantes, plastificantes) sobre las películas modelo ya que influyen de manera importante en las propiedades físicas, mecánicas y de barrera, y su posterior uso como RC.
- ✓ Evaluar propiedades mecánicas en las películas modelo para analizar si estas muestran un efecto sobre la aplicación como RC.
- ✓ Evaluar con un microscopio electrónico de barrido la incorporación de los RC al fruto para mostrar las distintas conformaciones estructurales del RC y la incorporación de los extractos etanólicos sangre de drago empleadas en el presente estudio.
- ✓ Evaluar el parámetro de capacidad antioxidante ya que diversos estudios muestran a la planta sangre de drago (*Jatropha dioica*) como alta en compuestos antioxidantes y podría diferenciarse a diferentes concentraciones del mismo.
- ✓ Determinar la concentración de la patulina producida para evaluar de manera completa la inhibición de la misma sobre las manzanas con extracto etanólicos de sangre de drago.
- ✓ Emplear otra matriz en el recubrimiento comestible como el quitosano, la carragenina o el alginato, cuyas propiedades podrían influir para obtener mejores resultados.
- ✓ Evaluar otros agentes antimicrobianos ya sea como extractos etanólicos o aceites esenciales aplicados en las manzanas como orégano, epazote, canela, etc.
- ✓ Estudiar el empleo de extractos de sangre de drago (*Jatropha dioica*) en otros hongos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, y evaluarlos en otro tipo de frutos u hortalizas.



REFERENCIAS

4. REFERENCIAS

1. Abou, Y., Sobh, H. y Salarnet, A. (2002). Antimicrobial activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11): 3208-3213.
2. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2015). Informe de la reunión del grupo de trabajo sobre cuestiones agrícolas (productos fitosanitarios). Fecha de consulta: 5 Febrero 2015. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Patulina_ficha_JUL15/UTH.
3. Aguilar, C., Rodríguez, R., Saucedo, S. y Jasso, D. (2008). Fitoquímicos sobresalientes del semidesierto mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología (12-25 pp.). México: Path Design S. A.
4. Aguilar-Méndez, M., San Martín, E., Espinoza, N., Sánchez, M., Cruz, A. y Ramírez, M. (2012). Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba, *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, Superficies y Vacío*, 25: 1-7.
5. Aguilera, A., Augur, C., Prado, L., Aguilar, C. y Favela, E. (2008). Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chemical Papers* 62: 4, 440-444.
6. Aidi, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. y Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5): 1362–1370.
7. Alfonso, C. (2011). Caracterización de películas comestibles de quitosano y la afectación de las propiedades por aplicación de aceites esenciales. Tesis de especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
8. Alonso, M. (2011). Caracterización sensorial y físico-química de manzanas reineta y pera. Tesis Doctoral. Universidad de León, España.
9. Angel, E. (2015). Efecto de un recubrimiento comestible funcional a base de goma guar sobre la postcosecha de guayaba. Tesis para obtener el título de Ing. en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Coahuila, México.
10. A.O.A.C. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Analytical Chemists. Arlington, USA, 319 pp.

11. A.O.A.C. (2000). Official methods of Analysis. 16th ed. 939, 05 y 976.22. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., USA.
12. A.O.A.C. (1995). Official methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist March 1996 Supplement International, sec. 995. 10. Determinación de patulina en manzana por método: cromatografía de capa fina. Gaithersburg, USA.
13. Arévalo, A. y Enciso, R. (1996). Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de *Espeletias* encontradas en el páramo de Guasca. Trabajo de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia.
14. Arce, C. 2011. Caracterización de películas comestibles de quitosano y la afectación de las propiedades por aplicación de aceites esenciales. Trabajo de grado de Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
15. Back N., Cohen I., Kritchevsky D., Lajtha A. y Paoletti R. (2002). Advances in experimental medicine and Biology: Mycotoxins and food safety, 504: 1-284.
16. Bai, J., Hagenmaier, R. y Baldwin, E. (2003). Coating selection for 'Delicious' and other apples. Postharvest Biology and Technology, 28 (3): 381-390.
17. Baldwin, E., Nisperos, M., Hagenmaier, R. y Baker, R. (1997). Use of lipids in coatings for food products. Food Technology, 51 (6): 6-63.
18. Bautista, S., Barrera, L., Bravo, L. y Bermúdez, K. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incident of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. Revista mexicana de fitopatología, 20: 8-12.
19. Bautista, S., García, E., Barrera, L., Reyes, R. y Wilson, C. (2003). Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 29: 81-92.
20. Baldwin, E., Hagenmaier, R. y Bai, J. (2011). Edible Coatings and Films to Improve Food Quality (310-312 pp.). (2^a ed.) USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
21. Betnoit, R., Starkey, R. y Basaraba, J. (1968). Effect of purified plant tannin on decomposition of some organic compounds and plant materials. Soil Science, 105 (3):153-158.
22. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana: Sangre de drago o sangregado: *Jatropha dioica* Cerv. Euphorbiaceae. Fecha de consulta: 12 Enero 2015. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7483/UTH>.

23. Bissessur, J, Permaul, K, Odhav, B. (2001). Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, 64 (8): 1216-1219.
24. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. y Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110 (2): 208–213.
25. Botanicalonline (2004). Manzano. Fecha de consulta: 15 septiembre 2014. Disponible en: <http://www.botanicalonline.com/flormalusdomestica.htm/UTH>
26. Bosquez, E., Ronquillo E., Bautista S., Verde J. y Morales J. (2010). 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 (2): 132–137.
27. Bravo, J. (2013). Manzanas una temporada de alto valor de exportaciones. Fecha de consulta: 18 Noviembre 2014. Disponible en: http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/138124860212431.pdf/UTH
28. Castillo, F., Hernández D., Gallegos G., Méndez M., Rodríguez R., Reyes A. y Aguilar C. (2010). *In vitro* antifungal of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products*, 32: 324-3.
29. Caamal, I., Pereira, F., Madera, T. (2011). Caracterización óptica y mecánica de películas comestibles a base de mezclas binarias de almidones de *Phaseolus lunatus* L, *Manihot esculenta* Crantz y *Zea mays* L. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12 (1): 101-109.
30. Caivano, J. (1995) *Sistemas de orden del color*, serie difusión No°12. Secretaria de investigaciones en ciencia y técnica. Buenos Aires, Argentina.
31. Cano, G., Marín, S., Ramos, A. y Sanchis, V. (2014). *Micotoxinas: Estudio de dieta total en Catalunya 2008-2009*. (2ª ed.) Barcelona, España: Generalitat de Catalunya.
32. Chana, J., Chanthachum, S. y Wittaya, T. (2011). Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. *Food Science and Technology*, 44 (1): 284-292.
33. Cañedo, V. y Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos* (18 pp.). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP)
34. Carretero, M. (2000). Plantas medicinales: Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual Medico*, 24 (235): 633-636.

35. Chauhan, O., Raju, P., Singh, A. y Bawa, A. (2011). Shellac and aloe-gel-based surface coatings for maintaining keeping quality of apple slices. *Food Chemistry*, 126 (3): 961–966
36. Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes: Microbiología agrícola (6: 1-7 pp.). Universidad Nacional de Salta, Argentina.
37. Chitarra, M. y Chitarra, A. (2005). Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio (783 pp.). (2ª ed.) Brasil: Lavras UFLA.
38. Cerespain. (2011). Historia de la manzana. Fecha de consulta: 17 Noviembre 2014. Disponible en: <http://www.cerespain.com/historia-de-la-manzana.html/UTH>
39. Clark, S., Costello, M., Drake, M. y Bodyfelt, F. (2009). The sensory evaluation of dairy products (573 pp.). (2ª ed.) New York, USA: Springer.
40. Comisión del Codex Alimentarius. (1999). Documento de síntesis relativo a la patulina. Fecha de consulta: 4 Diciembre 2014. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac31/fa99_16s.pdf/UTH
41. Committee on Food Hygiene (CCFH), Codex. (2003). Contaminación por patulina del zumo (jugo) de manzana e ingredientes de zumo (jugo) de manzana en otras bebidas (CAC/RCP 50-2003).
42. Conforti, F. y Totty, J. (2007). Effect of three lipid/hydrocolloid coatings on shelf life stability of *Golden Delicious* apples. *International Journal of Food Science and Technology*, 42 (9): 1101-1106.
43. Contreras, N. (2010). Efecto de la aplicación de vitamina e sobre la vida útil de manzana fresca cortada. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli.
44. Coria, G. (2015). La visión del color en los seres humanos. Titulado en Grado en Óptica y Optometría. Universidad de Valladolid, España.
45. Córscico, F., Larrosa, V., López, L., Altamirano, A., Naef, A., Alfaro, C., Garzón, C. y Lound, L. (2014). Oregano essential oils: Antimicrobial activity and its application to films based on cornstarch and glycerol. *Journal of Microbiology*, 2 (2): 043-053.
46. Cortés, M. y Chiralt, A. (2008). Cinética de los cambios de color en manzana deshidratada por aire fortificada con vitamina E. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Colombia*, 15 (1): 8-16.
47. Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 564-582.

48. Cruz, V., Rojas, R., Saucedo, S., Martínez, D., Aguilera, A., Álvarez, O., Rodríguez, R., Ruiz, J., y Aguilar, C. (2015). Improvement of shelf life and sensory quality of pears using a specialized edible coating. *Journal of Chemistry*. Fecha de consulta: 4 Mayo 2015. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/138707/UTH>
49. Cruz, J. (2013). Cambios químicos y fisicoquímicos que se presentan en cubos de manzana *starking (Malus doméstica borkh)* durante la deshidratación osmótica. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli.
50. Debeaufort, F., Quezada, J., Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science*, 38 (4): 299-313.
51. De León, M., Sáenz, A., Jasso, D., Rodríguez, R., Pandey, A. y Aguilar, C. (2013). Fermented *Flourensia cernua* extracts and their *in vitro* assay against *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum*. *Food Technology and Biotechnology*, 51 (2): 233-239.
52. Delhom, M. (1985). La calidad de manzanas y peras. Hojas divulgativas Núm. 6, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España: Publicaciones de extensión agraria.
53. Del Valle, V., Hernández, P., Guarda, A., y Galotto, M. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf life. *Food Chemistry*, 91 (4): 751-756.
54. Devappa, R., Makkar, H. y Becker, K. (2011). *Jatropha* diterpenes: A review. *Journal of Am Oil Society*, 88 (3): 301-322.
55. Domínguez, I. (2008). Estudio etnobotánico de plantas medicinales de Tunititlan, Hgo. y evaluación antibacteriana de la especie vegetal más empleada en el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa. Tesis de licenciatura en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
56. El Anany, A., Hassan, G. y Rehab, F. (2009). Effects of edible coatings on the shelf life and quality of Anna apple (*Malus domestica Borkh*) during cold storage. *Journal of Food Technology*, 7 (1): 5-11.
57. EL ECONOMISTA. (2015). México impone cuotas antidumping a manzanas de EU. Fecha de consulta: 30 Noviembre 2014. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/industrias/2016/01/06/mexico-impone-cuotas-antidumping-manzanas-eu/UTH>
58. Erbil, H. y Mnftngil, N. (1986). Lengthening the postharvest life of peaches by coating with hydrophobic emulsions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 10 (4): 269-279.

59. EROSKY CONSUMER (2008). Manzana. Fecha de consulta: 23 Octubre 2014. Disponible en: <http://frutas.consumer.es/manzana/UTH>
60. European Food Information Council (EUFIC). (2002). Food Irradiation. Fecha de consulta: 21 Diciembre 2014. Disponible en : <http://www.eufic.org/article/en/food-technology/food-processing/artid/food-irradiation/UTH>
61. FAOSTAT (2014). Cultivos y productos de ganadería. Fecha de consulta: 21 Noviembre 2014. Disponible en: <http://www.faostat.fao.org/UTH>
62. Farag, R., Daw, Z.y Abo-Raya, S. (1989). Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic médium. Journal Food Science, 54 (1): 74-79.
63. FDA (Food and Drug Administration). (2000). Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. Guidance for FDA Components and Industry: apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products – adulteration with patulin (1-12 pp.). USA.
64. Fernández, M., Mansilla, M. y Tadeo, J. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. Journal of Advanced Research, 1 (2): 113-122.
65. Francis, F. (1980). Color quality evaluation of horticultural crops. Horticultural Science, 15: 58-59.
66. Frisvad, J., y Samson, R. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus, *Penicillium*: A guide to identification of the food and air-borne terverticillate and their mycotoxins. Studies in Mycology, 49: 1-173.
67. Frisvad, J. y Seifert, K. (2000). *Penicillium* on solid wood products: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (285-298 pp.). Australia: Harwood Academic Publishers.
68. Fontes, L., Sarmiento, S., Spoto, M. y Dias, C. (2008). Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 28 (4): 872-880.
69. Fuentes, O., Cerna, E., Landeros, F., Hernández, C. y Delgado, J. (2012). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metabólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. Revista Internacional de Botánica experimental, 81: 69-73.
70. Funes, G. (2011). Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el procesamiento de alimentos. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

71. García, J. (2009). Sangre de drago: botánica y usos medicinales. Tesina para licenciatura en Biología. UNAM, Iztacala.
72. García, M., Martino, M., Zaritzky, N. (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65 (6): 941-947.
73. García, M., Bautista, S. y Barrera, L. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortifrutícolas. *Revista Mexicana de fitopatología*, 28 (1): 44-57.
74. Garza, A., González, G., Salazar, R., Waksman, N. y Rivas, V. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 114 (3): 468-471.
75. Geankopolis, C. (1999). Procesos de transporte y operaciones unitarias (1007 pp.). (3^{ra} ed.) México: CECOSA.
76. Gehan, M., Mona, A. y Samir, A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 56-61.
77. Gil, A. (2010). Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. (2^a ed.) Madrid, España: Médica Panamericana S.A.
78. Gimeno, A. y Ligia, M. (2011). Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos (1-160 pp.). (3^{ra} ed.) USA: Special Nutrients Inc.
79. Gómez, N., Sosa, M. y López, A. (2014). Extracción asistida con microondas de aceite esencial de acuyo (*Piper Auritum*) y evaluación de su efecto antifúngico con *Penicillium expansum*. Congreso internacional sobre innovación y tendencias en procesamiento de alimentos. XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos. Guanajuato, México.
80. Gómez, R., Nieto, D., Téliz, D., Mora, J., Nava, C., Martínez, M. y Vargas, M. (2012). Manejo postcosecha de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) y su impacto en la calidad de la fruta. *Revista Chapingo Serie horticultura*, 18 (2).
81. Gonzáles, M. y Guzmán, M. (2011). Efecto de películas comestibles formuladas a base de alginato y gretina en la vida útil del mango cortado listo para consumir. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli.

82. González, P. y Sosa, C. (2003). Análisis de la vegetación del área de protección de flora y fauna Cañón de Santa Elena (desierto chihuahuense, México) utilizando modelos digitales de elevación. *Ecosistemas*, 21 (2).
83. Greenwood, P., Rodríguez, C., González, J. y Halstead, A. (2009). Enciclopedia de las plagas y enfermedades de las plantas: Guía completa para la prevención, la identificación y el tratamiento de los problemas de las plantas. Barcelona, España: Blume.
84. Guarda, A. y Galotto, M. (2000). Aspectos teóricos de la permeabilidad en envases plásticos para alimentos: Memorias del II Congreso Internacional de Envases para Alimentos (74-78 pp.). Hermosillo, México: RISEA.
85. Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., Olivar, R. y Maffei, M. (2010). Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30 (1):43-47.
86. Guerra, M. y Casquero, P. (2005). Evolución de la madurez de variedades de manzana y pera en almacenamiento frigorífico conjunto con absorbedor de etileno. *Información Tecnológica*, 16 (4): 11-16.
87. Guilbert, S. y Biquet, B. (1996). Edible films and coatings: Food packaging technology (315-353 pp.). New York, USA: VCH Inc. Publishers.
88. Guilbert, S., Gontard, N. y Cuq, B. (1986). Technology and application of edible films. In *Food Packaging and Preservation* (371-394 pp.). New York, USA: Elsevier Applied Science Publishers.
89. Han, J. y Floros, J. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 13: 287-298.
90. Hao, H. (2015). Control of patulin in fruit and vegetable beverage processing using high hydrostatic pressure. Tesis of Master of Science in Food Science. University of Guelph Ontario, Canada.
91. Hardenburg, R. (1967). Wax and related coatings for horticultural products: a bibliography, *Agricultural Research Service Bulletin* (15-51 pp.). Washington D. C.: United States Department of Agriculture.
92. Hawser, S. y Islam, K. (1999). Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43 (3): 411-413.

93. Helal, G., Sarhan, M., Abu, A. y Abou, E. (2006). Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of *Aspergillus niger* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, 46 (6): 456-469.
94. Hernández, J. (2013). Caracterización físico-química y microbiológica del tomate margariteño (*Lycopersicon esculentum* var. España) y evaluación de la efectividad de tratamientos de pre-ensado para el incremento de su vida comercial a temperatura ambiente. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España.
95. Hernández, O. (2014). Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Penicillium spp.* obtenidos de frutos de manzanas (*Malus x domestica Borkh*) en México y pruebas de agresividad. Tesis de Postgrado. Colegio de Postgraduados, Estado de México.
96. IARC (International Agency for Research on Cancer). (1986). Patulin: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans, 4: 83-98.
97. INFOAGRO (2011). El cultivo de la manzana. Fecha de consulta: 17 Octubre 2014. Disponible en: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzanas.htm/UTH
98. Jackson, D. y Palmer, J. (1999). Pome fruits: Temperate and subtropical fruit production (189-202 pp.). (2ª ed.) Wallingford, U.K.: CABI Publishing
99. JECFA (Food safety and quality: Sustancias químicas). (2002). Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Reports on tasks for scientific cooperation, Directorate General Health and Consumer Protection. Berlín, Alemania.
100. Johnston, J. y Banks, N. (1998). Selection of a surface coating and optimisation of its concentration for use on "Hass" avocado (*Persea Americana* Mill) fruit. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 26 (2): 143-141.
101. Kader, A. (1992). Postharvest technology of horticultural crops. *Bilología y tecnología de postcosecha: una revisión general*, Curso de invernadero INCAPA. California, USA.
102. Kader, A. (2011). *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas* (3ª ed). California, USA: División de agricultura y recursos naturales.
103. Kadkhodae, R. (2007). Extracción ultrasónica de compuestos activos. Simposio Internacional sobre la Tecnología, Irán. Fecha de consulta: 12 Enero 2015. Disponible en: <https://www.hielscher.com/es/ultrasonically-assisted-saffron-extraction.htm/UTH>
104. Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial y antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
105. Kester, J. y Fennema, O. (1988). *Edible films and coatings: Edible coatings and films to improve food quality*. USA: Technomic Publishing Co. E.U.

106. Kraśniewska, K., Gniewosz, M., Synowiec, A., Przybył, J., Baczek, K. y Weglarz, Z. (2015). The application of pullulan coating enriched with extracts from *Bergenia crassifolia* to control the growth of food microorganisms and improve the quality of peppers and apples. *Food and Bioproducts Processing*, 94: 422-433.
107. Krochta, J., Baldwin, E. y Nisperos, M. (1994). Recubrimientos comestibles y grandes películas para mejorar la calidad alimentaria. Florida, USA: CRC Press.
108. Krochta, J. y De Mulder, C. (1997). Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technology*, 51 (2): 61-74.
109. Labuza, T. y Contreras, R. (1981). Prediction of moisture protection requirements for foods. *Cereal foods World*, 26: 335.
110. Leggott, N., Shephard, G., Stockenström, S., Staal, E. y Van Schatkwyk, D. (2001). The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. *Food Additives and Contaminants*, 18 (19): 825-829.
111. Lin, D. y Zhao, Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Food Science and Food Safety*, 6 (3): 60-75.
112. López, J. y Mendoza, S. (2000). Cuantificación de taninos condensados de corteza y madera en la especie sangre de drago (*Jatropha dioica*). *Revista Chapingo: Serie Zonas Áridas*, 1 (1): 1-6.
113. Lucimara, A, De Britto, D., De Rizzo, J., Gastaldi, T. y Assis, O. (2015). Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf life of fresh and cut guavas. *Food Packaging and Shelf Life*, 5: 68-74.
114. Manera, F. (2004). Evolución del color externo e interno en diferentes variedades de pomelo (*Citrus paradisi* Macf), y limonero (*Citrus limón* L.). Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández Escuela Politécnica Superior de Orihuela Alicante, España.
115. Márquez, B. (2007). La sangre de grado (*Jatropha dioica*). Boletín 36 CECADES (Centro de Calidad para el Desarrollo Rural) y SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Ganadería). México.
116. Martínez, E. (2012). Sangre de drago (*Jatropha dioica*). Plantas medicinales de México. Fecha de consulta: 5 Febrero 2015 Disponible en: <http://plantasdemexico.blogspot.mx/2012/09/sangre-de-drago-jatropha-dioica.html/UTH>
117. Martínez, N. (2013). Evaluación del efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de *Jatropha dioica* en ratones albinos suizos cepa ICR mediante ensayo cometa *in vivo*. Tesis

- de grado en Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
118. Martínez, L. (2000). Influencia del grado de hidratación sobre los mecanismos de transferencia de vapor de agua en películas hidrofílicas formuladas con biopolímeros. Trabajo práctico-científico. Universidad Veracruzana, México.
119. Martínez, M., Ponce, L. y Castell, S. (2012). Uso y Evaluación de dos aceites esenciales (canela y clavo de olor) para control de las pudriciones fungosas y determinación de la vida útil mediante películas protectoras comestibles en papayas (*Carica papaya* C.v. Hawaiiana). Tesis de grado Ingeniera de Alimentos. Escuela superior politécnica del litoral, Ecuador.
120. Manzanero, G., Flores, A., Sandoval, E. y Bye, R. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Rev. Poli botánica*, 27: 191-228.
121. Marzo, I. (2010). Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas en zeína. Tesis para Ingeniero Técnico Agrícola en Industrias Agrarias y Alimentarias. Universidad Pública de Navarra Escuela Técnica Superior De Ingenieros Agrónomos. España.
122. McGuire, R. (1992). Reporting of objective color measurements. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 27 (12): 1254-1255.
123. Méndez, A. y Moreno, M. (2009). Las micotoxinas: Contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia de México*, 1: 1-7.
124. Méndez, S. (2003). Enfermedades fúngicas del manzano, Curso de Control Biológico de Enfermedades de Plantas (PEDECIBA Química). Universidad de la República de Uruguay.
125. McHugh, T., Avena, R. y Krochta, J. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58 (4):899-903.
126. McHugh, T. y Krochta, J. (1994). Permeability properties of edible films: Edible coatings and films to improve food quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (3): 307-311.
127. Menniti, A., Neri, F., Gregori, R. y Maccaferri, M. (2010). Some factors influencing patulin production by *Penicillium expansum* in pome fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (13): 2183-2187.
128. Mohammadifar, M., Norabadi, M., Hasanzadeh, M., Dashtipoor, S., Etebarian, H. y Sahebani, N. (2012). Study of antifungal activities of seven essential oils from some Iranian

- medicinal plants against various postharvest phytopathogenic fungi. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 45 (17): 2046-2056.
129. Moncayo, D. (2013). Desarrollo de un recubrimiento comestible a partir de un biopolímero para prolongar la vida útil de frutas frescas. Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
130. Montes, R., Cruz, V., Martínez, G., Sandoval, G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermúdez, K., Flores, H. y Carvajal, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores: Análisis retrospectivo de investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología, 18: 125-131.
131. Morales, H., Marín, S., Rovira, A., Ramos, A. y Sanchis, V. (2007). Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. Letters in Applied Microbiology, 44 (1): 30-5.
132. Morales, H., Marín, S., Ramos, A. y Sanchis, V. (2010). Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. Food Control, 21 (7): 953-962.
133. Morey, A. y Quinde, A. (2012). Obtención de quitosano y su aplicación en recubrimientos comestibles en mezclas con almidón. Proyecto de investigación para el Título de Ingeniero Químico. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
134. Moss, M. y Adak, G. (1986). Microorganisms and microbiological rapid methods in the bioassay of mycotoxins: Spoilage and Mycotoxins of Cereals and Other Stored Products (141-145 pp.). Wallingford: CABI International.
135. Murray, M. y Alston, D. (2014). Plagas frutales: Manzana. Pests fact sheet. Fecha de consulta: 24 Octubre 2014. Disponible en: <http://utahpests.usu.edu/htm/factsheets/file=15501/UTH>
136. Navarro, M. (2007). Efecto de la composición de recubrimientos comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa y cera de abeja en la calidad de ciruelas, naranjas y mandarinas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
137. Nychas, G. (1995). Natural antimicrobials from plants: In New Methods of Food Preservation (58-89 pp.). London, U.K.: Blackie Academic Professional.
138. NMX-F-317-S-1978. Norma Mexicana para la determinación de pH en Alimentos.
139. Ochoa, E., Saucedo, S., Rojas, R., De la Garza, H., Charles, A. y Aguilar, C. (2011). Evaluation of a candelilla wax-based edible coating to prolong the shelf life quality and safety of apples. Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6 (1): 92-98.

140. Olivares, S. (1983). Determinación del contenido de taninos vegetales en *Acacia*, *Prosopis* y *Quercus*, y la comparación entre los curtidos vegetales y minerales. Tesis Profesional. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, México.
141. Oliveira, G., Nascente, P., Escareño, J., Carvalho, R., Piva, E. y Lund, R. (2013). Evaluation of anti-*Candida* activity and cytotoxicity of *Jatropha dioica* Cerv. extracts. *Journal of Microbiology*, 7 (30): 3903-3907.
142. Olivas, G., Mattinson, D. y Barbosa, G. (2007). Alginate coatings for preservation of minimally processed "Gala" apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45 (1): 89-96.
143. Ortiz, T., Humberto, J., Capcha, R., Palomino, E. y Aguilar, J. (2003). Actividad antibacteriana de la sangre de grado (*Crotonlechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Revista Medicina Herediana*, 14 (2): 81-88.
144. Ospina, S. y Cartagena, J. (2008). La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 5: 122-123.
145. Pantástico, E. (1981). Fisiología de post-recolección (812-815 pp.). México: Limusa S.A.
146. Park, H. (1999). Development of advanced edible coatings for fruit. *Trend Food Science Technology*, 10: 254-260.
147. Pastor, C. (2010). Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa: Caracterización y aplicación. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
148. Pérez, A., Saucedo, C. y Arana, R. (1999). Effect of individual seal packaging in plastic films on the quality of dancy mandarins stored under refrigeration. *Food Science and Technology International*, 5 (3): 215-222.
149. Pitt, J. (1996). What are mycotoxins?. *Mycotoxin Newsletter*, 7 (4): 1.
150. Puel, O., Galtier, P., Oswald, P. (2010). Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins (Basel)*, 2 (4): 613-631.
151. Química Analítica instrumental UNAM (2007). Técnicas Cromatográficas. Fecha de consulta: 12 Febrero 2015. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf/UTH
152. Ramírez, J. (2012). Análisis sensorial: Pruebas orientadas al Consumidor. *Revista Reciteia Colombia*. Fecha de consulta: 3 Febrero 2015. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/257890512/UTH>
153. Ramírez, C., Ihl, M. y Bifani, V. (2012). Study of contact angle, wettability and water vapor permeability in carboxymethylcellulose (CMC) based film with murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) extract. *Journal of Food Engineering*, 109 (3): 424-429.

154. Reyes, L. (2013). Caracterización de dispersiones filmogénicas a base de almidón de maíz y ácido oleico en nanoemulsión con capacidad de formación de recubrimientos comestibles activos. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
155. Rocha, A. y Morais, A. (2003). Shelf life of minimally processed apple (cv. *Jonagored*) determined by colour changes. *Food Control*, 14: 13-20.
156. Rodríguez, M., Sánchez, L., González, C., Cháfer, M. y Vargas, M. (2011). Caracterización de recubrimientos comestibles a base de HPMC con aceite esencial de bergamota. Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, España.
157. Rojas Graü. (2006). Recubrimiento y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: Una nueva estrategia de conservación. Tesis de doctorado. Universidad de Lleida, España.
158. Rouessac, F. y Rouessac, A. (2000). Análisis Químico. Barcelona, España: Mc-GrawHill.
159. Rueda, V. (2006). Sustancias indeseables, contenidas en los alimentos (II) Micotoxinas. *Ganadería*, 40: 46-50.
160. Ruiz, M. y Susunaga, C. (2000). Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens* (*Burseraceas*), frente a microorganismos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinerea*. Trabajo Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia.
161. Rzedowski, J. y Calderón, G. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. (2ª ed.). Michoacán, México: CONABIO Instituto de Ecología A. C.
162. Salas, M., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M. y Resnik, S. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry* 124 (4): 1411-1415.
163. Sánchez, A. (2012). Estudio químico biodirigido y evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. Tesis para maestría en ciencia y recursos bióticos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
164. Sánchez, A. (2013). Caracterización de películas biodegradables y su aplicación como envase activo en zarzamora (*Rubus frocticosus*) para el control de podredumbre gris. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli.

165. Sánchez, L., Vargas, M., Gonzales, C. y Chafer, M. (2008). Incorporación de productos naturales en recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos (64: 2 pp.). Valencia, España: VIII Congreso SEAE Bullas.
166. Sánchez, R., Fabra, M. y Talens, P. (2011). Recubrimientos comestibles a base de caseinato sódico con capacidad antioxidante. Master en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Sevilla, España.
167. Sanzani, S., De Girolamo, A., Schena, L., Solfrizzo, M., Ippolito, A. y Visconti, A. (2009). Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. *Food Research and Technology*, 228 (3): 381-389.
168. SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2014). Fecha de consulta: 26 Agosto 2015. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/UTH>
169. SAGARPA-SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2011). Cierre de producción agrícola por cultivo. Fecha de consulta: 17 Noviembre 2013. Disponible en: www.siap.gob.mx/UTH
170. Seigler, D. (1994). Phytochemistry and systematics of the *Euphorbiaceae* on accumulation of secondary metabolites in plants. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (11): 681-1686.
171. Selvam, P., Sivakumar, D. y Soundy, P. (2013). Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. *Journal of Food Safety*, 33: 86-93.
172. Shariatifar, M. y Jafarpour, E. (2013). Edible coating effects on storage life and quality of apple. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 3 (6): 24-27.
173. SHCP (Secretaría de Hacienda y Crédito Público). (2014). Panorama de la manzana. Fecha de consulta: 25 Noviembre 2014. Disponible en: <http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/UTH>
174. Sidras de Asturias. (2014). El mundo de las manzanas DOP. Fecha de consulta: 4 Diciembre 2014. Disponible en: <http://www.sidradeasturias.es/detalle.php?var=54/UTH>
175. Silva, Y., Rivas, C., Viveros, E., De la Cruz, M. y Carranza, P. (2013). Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots. *Journal of Biological Sciences*, 17 (5): 748-750.
176. Siripatrawan, U. y Harte, B. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24 (8): 770-775.
177. Solarte, M., Hernández, M., Morales, A., Fernández, J. y Melgarejo, L. (2010). Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de guayaba durante la maduración:

- Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (*Psidium guajava* L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva (Cap. 3: 85-119 pp.). Bogotá, Colombia: Panamericana.
178. Soljardí (2010). Plagas y Enfermedades más frecuentes en los árboles frutales. Fecha de consulta: 29 Noviembre 2014. Disponible en: http://www.soljardi.com/web_esp/extras/tractaments.pdf/UTH
179. Sommer, N., Fortlage, R. y Donald, E. (2011). Enfermedades postcosecha de producto seleccionado: Tecnología Postcosecha de cultivos hortofrutícolas. Universidad de California, USA, 18: 231.
180. Soriano del Castillo, J. (2007). Micotoxinas en alimentos. España: Díaz de Santos.
181. Soriano, M., Bejar, V., y Bonilla, P. (2002). Frecuencia de hongos anemófilos productores de micotoxinas en algunos mercados de Lima: Detección de Patulina en manzanas en descomposición. Ciencia e Investigación, 2: 36-45.
182. Soto, S. (2014). Las claves para entender las enfermedades de las manzanas en poscosecha. El Mercurio. Fecha de consulta: 12 Enero 2014. Disponible en: <http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Analisis/2014/02/13/Las-claves-para-entender-las-enfermedades-de-las-manzanas-en-poscosecha.aspx/UTH>
183. Synowiec, A., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Przybył, J., Bączek, K. y Węglarz, Z. (2014). Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 23: 171–181.
184. Tequida, M., Cortez, M., Rosas, E., López, S. y Corrales, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. Revista Iberoamericana de Micología, 19: 84-88.
185. Teruel, B., Kieckbusch, T. y Cortés, L. (2003). Enfriamiento de frutas cítricas de diferentes dimensiones en un sistema con agua fría. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 5: 70-75.
186. Tongdeesontorn, W., Mauer, L. J., Wongruong, S., Sriburi, P. y Rachtanapun, P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. Chemistry Central Journal, 5 (6): 1-8.
187. Umaña, E. (2011). Conservación de alimentos por frío: Ciencia y tecnología. El Salvador: FIAGRO, FUSADES y PROINNOVA.

188. UNIFRUT, Comité Estatal Sistema Producto Manzana del Estado de Chihuahua A.C. (2012). PLAN RECTOR SISTEMA PRODUCTO MANZANA. Fecha de consulta: 21 Noviembre 2014. Disponible en: <http://www.unifrut.com.mx/archivos/cespm/informaciongeneral/Plan20Rector%20Manzana/UTH>
189. Valentines, M., Vilaplana, R., Torres, R., Usall, J. y Larrigaudière, C. (2005). Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 36 (3): 227–234.
190. Valle, G., López, R., Reyes, V., Castillo, M. y Santos, M. (2008). Recubrimiento comestible basado en goma arábica y carboximetilcelulosa para conservar frutas en atmósfera modificada. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14 (3): 235-241.
191. Vargas, M. y Trejo, M. (2013). Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del semidesierto mexicano y microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel de frutas y hortalizas. Informe técnico de proyecto del Fondo de Innovación Tecnológico Secretaría de Economía - CONACYT.
192. Vasantha, H., Boulter, J., Ahnc, T. y Odumerub, J. (2006). Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms *in vitro* and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Research International*, 39 (5): 575-580.
193. Vásquez, J. y Vidal, M. (2011). Caracterización y alternativa de uso de una película biodegradable de quitosano a partir de la extracción de quitina de langostino (*Pleuroncodes planipes*) para la industria de alimentos. Tesis para optar por el título de Ingeniero de Alimentos e Ingeniera Químico. Universidad de El Salvador.
194. Ventura, J., Saucedo, S., Belmares, R., Aguilera, A., Heredia, N. y Aguilar, C. (2006). New effective alternatives of control of bacterial and fungal foodborne pathogens. *International Congress on Food Safety*. Monterrey, Mexico.
195. Viñas, M., Usall, J., Echeverría, G., Graell, J., Ayala, I. y Recasens, D. (2006). Poscosecha de pera, manzana y melocotón. Madrid, España: Mundi-Prensa.
196. Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J. y Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Universidad Nacional de Colombia Acta Agronómica*, 64 (2): 194-205.
197. Wilson, C., El Ghaouth, A. y Wisniewski, M. (1999). Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. *Revista Mexicana Fitopatología*, 17:49-53.

198. Wu, S. y Chen, J. (2013). Using pullulan-based edible coatings to extend shelf life of fresh-cut "Fuji" apples. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55: 254-257.
199. Jo, W., Song, H., Song, N., Lee, J., Min, S. y Song, M. (2014). Quality and microbial safety of 'Fuji' apples coated with carnaubashellac wax containing lemongrass oil. *Food Science and Technology*, 55 (2): 490-497.
200. Wong, J., Muñiz, D., Martínez, G., Belmares, R. y Aguilar, C. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 474-481.
201. Wong, J., Castillo, M., López, L., Contreras, J., Nevárez, G. y Aguilar, C. (2010). *Jatropha dioica*: fuente potencial de agentes antimicrobianos: Acta química mexicana. Fecha de consulta: 21 Enero 2015. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%204/AQM4Jatropha.html/UTH>
202. Wouters, M. y Speijers, G. (1989). Patulina: Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives*, 35.
203. Zabka, M., Pavela, R. y Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 30 (2): 250-253.
204. Zabka, M. y Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxigenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93 (6): 1051-1056.
205. Zaritzky, N. (2007). Películas biodegradables y recubrimientos comestibles a base de hidrocoloides: caracterización y aplicaciones. Argentina: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).
206. Zhang, Y., Rempel, C. y McLaren, D. (2014). Edible coating and film materials carbohydrates: Innovations in Food Packaging (12: 305-323 pp.). (2ª ed.) Academic press Elsevier.
207. Zhu, Y., Yu, J., Brecht, J., Jiang, T. y Zheng, X. (2015). Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. *Food Chemistry*, 190 (1): 537-543.