



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE DOS
RECUBRIMIENTOS. QUITOSÁN Y QUITOSÁN CON
MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES CONTRA
HONGOS PATÓGENOS DEL LIMÓN MEXICANO**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

MARISOL HERNÁNDEZ MURILLO

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

**COASESORA : DRA. MARÍA CRISTINA JULIA
PÉREZ REYES**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| CAPITULO 1 | 10 |
| ANTECEDENTES | 10 |
| 1.1 Generalidades del limón: | 11 |
| 1.1.1 Origen, definición y clasificación:..... | 11 |
| 1.1.2 Producción en México: | 12 |
| 1.1.3 Importancia económica..... | 14 |
| 1.1.4 Manejo poscosecha..... | 16 |
| 1.1.5 Legislación | 17 |
| 1.2 Especificaciones del producto | 18 |
| 1.2.1 Calidad del limón | 18 |
| 1.2.2 Daños y hongos presentes en el limón..... | 21 |
| 1.2.3 Fuentes de infección | 25 |
| 1.3 Control y prevención de podredumbre | 25 |
| 1.3.1 Recubrimiento con biopelículas: | 25 |
| 1.3.2 Quitosano..... | 26 |
| 1.3.3 Substancias naturales de acción antimicrobiana..... | 27 |
| 1.3.4 Aceites esenciales..... | 29 |
| CAPÍTULO 2 | 35 |
| METODOLOGÍA..... | 35 |
| 2.1 Cuadro metodológico: | 36 |
| 2.2 Materiales y métodos..... | 37 |
| 2.2.1 Actividades preliminares | 37 |
| 2.3 Aislamiento y purificación de los hongos | 37 |
| 2.4 Preparación de tratamiento con quitosán y quitosán con aceites esenciales | 39 |
| 2.5 Identificación de actividad antifúngica de quitosán y aceites esenciales <i>In Vitro</i> | 40 |
| 2.6 Recubrimiento del fruto..... | 42 |
| 2.7 Evaluación de pruebas físicas y fisicoquímicas | 42 |
| CAPÍTULO 3 | 45 |
| RESULTADOS | 45 |
| 3.1 Pruebas preliminares..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1 Aislamiento y purificación de los hongos | 47 |
| 3.2 Cinética de crecimiento de hongos con tratamiento de quitosán y quitosán con aceites esenciales | 49 |
| 3.2.1 Identificación de la actividad fungicida y/o fungistática de los tratamientos..... | 54 |
| 3.3 Evaluación del quitosán mejorado al 1% en vivo | 55 |
| 3.3.1 Evaluación de pruebas físicas y químicas | 55 |
| CONCLUSIONES..... | 60 |
| ANEXOS | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura. 1 | Árbol de limonero | 11 |
| Figura. 2 | Producción en México..... | 14 |
| Figura. 3 | <i>Penicillium italicum</i> presente en el fruto | 25 |
| Figura. 4 | Pruebas de recubrimiento con quitosán y aceites esenciales | 37 |
| Figura. 5 | Hojas cloróticas de árbol de limón..... | 38 |
| Figura. 6 | Fruto enfermo..... | 38 |
| Figura. 7 | Limón enfermo incubado en cámara húmeda | 39 |
| Figura. 8 | Quitosán en polvo | 39 |
| Figura. 9 | Solución de quitosán al 1% | 40 |
| Figura. 10 | Siembra de hongos en las placas con tratamiento..... | 40 |
| Figura. 11 | Selección de limones en base a peso y madurez fisiológica | 42 |
| Figura. 12 | Inmersión de limón en quitosán al 1% | 42 |
| Figura. 13 | Secado por convección natural | 42 |
| Figura. 14 | Inmersión de limón en quitosán al 1% | 42 |
| Figura. 15 | Limones en manta de cielo..... | 43 |
| Figura. 16 | Extracción de jugo de limón | 43 |
| Figura. 17 | Titulación de la muestra..... | 44 |
| Figura. 18 | Pérdida fisiológica de peso con respecto al tiempo | 46 |
| Figura. 19 | Limones dentro de una atmósfera modificada | 46 |
| Figura. 20 | Limones con quitosán y aceites esenciales a 200 ppm | 46 |
| Figura. 21 | Cultivo de <i>Alternaria</i> en medio PDA..... | 47 |
| Figura. 22 | Cultivo axénico de <i>Alternaria</i> en medio agar papa-zanahoria..... | 47 |
| Figura. 23 | Conidios | 47 |
| Figura. 24 | Cepa purificada de <i>Geotricum</i> | 48 |
| Figura. 25 | Crecimiento de <i>Geotricum</i> en medio PDA | 48 |
| Figura. 26 | Colonia de <i>Penicillium</i> en medio PDA | 48 |
| Figura. 27 | Purificación de <i>Penicillium digitatum</i> en medio CYA | 49 |
| Figura. 28 | Micromorfología de <i>Penicillium digitatum</i> con tinción azul algodón | 49 |
| Figura. 29 | Cinética de crecimiento de los hongos <i>Alternaria</i> , <i>Geotricum</i> , <i>Penicillium</i> (<i>digitatum e italicum</i>) en fotoperiodo durante ocho días a 28°C, en medio PDA..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura. 30 Cinética de crecimiento de los hongos <i>A. alternata</i> , <i>G. candidum</i> y <i>P. italicum</i> y <i>digitatum</i> | 51 |
| Figura. 31 Tabla comparativa de los diferentes tratamientos empleados en el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> | 52 |
| Figura. 32 Cinética de crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> | 53 |
| Figura. 33 Tabla de los diferente tratamientos empleados para <i>Geotricum candidum</i> | 53 |
| Figura. 34 Tabla de los diferentes tratamientos empleados para <i>Penicillium digitatum</i> | 54 |
| Figura. 35 Tabla de los diferentes tratamientos empleados para <i>Penicillium italicum</i> | 54 |
| Figura. 36 Explante discoidal en medio PDA | 55 |
| Figura. 37 Pérdida fisiológica de peso durante quince días. | 56 |
| Figura. 38 Limón con tratamiento a los quince días..... | 56 |
| Figura. 39 Limón sin tratamiento a los quince días..... | 56 |
| Figura. 40 Limón con quitosán modificado 1% a la tercera semana..... | 57 |
| Figura. 41 Limón partido a la tercera semana con tratamiento de quitosán modificado..... | 57 |
| Figura. 42 Contenido de jugo de limón con quitosán mejorado y sin quitosán | 57 |
| Figura. 43 Cantidad de ácido cítrico contenido en el jugo de limón durante veinte días... | 59 |

RESUMEN

EL objetivo de este trabajo fue la comparación de dos tratamientos a base de quitosán mejorado al 1% y quitosán con aceites esenciales de clavo, canela y tomillo, esto con la finalidad de evitar las podredumbres ocasionadas por hongos en el limón mexicano que son las principales causas de pérdidas poscosecha en frutos cítricos y alcanzan del 60 al 80% de total de los limones.

Para este trabajo se emplearon hojas de árbol de limón y frutos enfermos, los principales hongos que se aislaron e identificaron en el limón mexicano fueron; *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* y *Geotricum candidum* que son los principales causantes de la pérdida poscosecha en dicho fruto como lo cita la bibliografía.

Posterior a la identificación de los hongos se realizaron las pruebas *in vitro* para evaluar la capacidad antifúngica de los tratamientos, que esta consistió en monitorear cajas Petri con medio de cultivo PDA más el tratamiento a evaluar que fueron; quitosán mejorado solo al 1%, quitosán mejorado con aceite esencial de canela, con aceite esencial de clavo, aceite esencial de tomillo y finalmente un tratamiento con quitosán y la mezcla de dichos aceites; para esta evaluación siempre se contó con una caja control, que solo tenía medio de cultivo PDA.

Para la evaluación *in vivo* se trataron alrededor de quince limones de la especie *Citrus aurantifolia* con un recubrimiento de quitosán mejorado al 1% y se evaluaron algunos parámetros físicos, químicos y fisicoquímicos a través del tiempo.

Con los resultados obtenidos durante la experimentación se observó que en la parte *in vitro*, la cinética de crecimiento presentaba un efecto antifúngico para cada uno de los principales tratamientos, dando así lugar a una evaluación para saber si los tratamientos presentaban un comportamiento fungicida o fungistático; al presentar un efecto fungicida, es decir que no permite el crecimiento del hongo, se decidió utilizar solamente quitosán mejorado la 1% como recubrimiento final para los limones.

Con la relación a los parámetros evaluados en el limón mexicano, no hubo una diferencia significativa con respecto al fruto control (sin ningún tratamiento), lo cual nos indica que el recubrimiento a base de quitosán mejorado al 1% no afectó la calidad del limón y sin embargo si ayudó a evitar la contaminación de los hongos al fruto.

INTRODUCCIÓN

América Latina es considerada como la principal región productora de cítricos con una aportación del 32% del total de la producción mundial. En el caso particular del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle), México es el principal país productor en el mundo, exportando principalmente a los Estados Unidos un promedio anual de 30 mil toneladas de fruta, con un valor aproximado de 11.3 millones de dólares. A pesar de la derrama económica que se obtiene con este cítrico, existen problemas en la conservación de la fruta en poscosecha, debido a las pudriciones causadas principalmente por hongos (Sharma et al. 2009; Hao et al. 2010). Una de las enfermedades comunes de los cítricos es la denominada pudrición ácida causada por el hongo *Geotrichum citriauranti* (Sinónimo *Geotrichum candidum*). Las infecciones por este patógeno se originan principalmente a través de las heridas en la superficie de los frutos durante la recolección o posteriormente en el manejo poscosecha. El tratamiento tradicional de control es a base de fungicidas sintéticos, sin embargo, se ha documentado ampliamente sobre la aparición de cepas resistentes a varios ingredientes activos, principalmente al tiabendazol e imazalil, por lo que la búsqueda de alternativas ha llevado a experimentar con el uso de agentes desinfectantes, aceites orgánicos, pesticidas etc.

Los limones son de suma importancia si tenemos en cuenta el número de aplicaciones que tienen, a diferencia del resto de productos agrícolas. Lo más importante de los limones es su jugo, que puede suponer hasta el 50% de su peso.

Cada fruta contiene 0,5 mg de vitamina C, es decir, el 71% de la cantidad diaria que necesita un adulto. Los limones ayudan a combatir la gripe gracias a su acción antiséptica y estimulan el sistema inmunológico.

En la industria de las bebidas se utilizan grandes cantidades de zumo pasteurizado, mientras que la industria alimentaria utiliza mucho aceite esencial de limón.

Por último, la esencia de limón es uno de los básicos de la industria del perfume.

La demanda de limón se ha incrementado mucho en los últimos años y esto son muy buenas noticias, porque en las últimas décadas la demanda se había mantenido constante y repetitiva.

La industria transformadora (zumos, aceites esenciales) y alimentaria han ido absorbiendo cada vez más cantidad de limones.

El consumo se ha incrementado gracias a la presencia cada vez más frecuente del limón en dietas hipocalóricas.

Este trabajo, está enfocado a buscar alternativas para el control de estas enfermedades por lo que se aislaron los microorganismos causantes de las diversas pudriciones y se enfrentaron a diferentes concentraciones de quitosán mejorado y finalmente se evaluó el tiempo de vida útil de estos limones cubiertos con quitosán comparados con limones no cubiertos.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del limón:

1.1.1 Origen, definición y clasificación:

El limonero (*Citrus limón*) (figura. 1) es un árbol frutal perenne perteneciente a la familia de las rutáceas y del género cítrico que resulta muy poco resistente al frío por su carácter tropical y su floración permanente. También es un árbol muy sensible a los terrenos con alta salinidad o a terrenos poco profundos pero lo cierto es que en muchos casos llega a adaptarse a pesar de no ser lo habitual.

El limonero es un árbol con forma menos redondeada que el naranjo. Se trata de un árbol pequeño que no suele sobrepasar los 4 metros de altura y cuyas hojas verdes mate son perennes y con un olor a limón muy fuerte. (Técnica, Norte, Del, & Sutil, 2006)

Sus hojas son bastante largas, (de 5 a 10 centímetros) terminan en punta y poseen un borde levemente dentado, suelen tener unas espinas muy gruesas, aunque cortas, en sus ramas. Las hojas son de color brillante por la cara superior y verde pálido y claro por la parte inferior. La raíz es un eje vertical con varias raíces secundarias que nacen en desorden y el tronco es grueso con la corteza gris, lisa o áspera y brillante.

Sus flores son denominadas flores de azahar, al igual que sucede con las flores del naranjo, y son de color blanco rosáceo con multitud de estambres. Se trata de flores solitarias o flores en racimos, dependiendo de la variedad y gracias a su floración continua podemos dejar el fruto sin recolectar durante más tiempo y hacerlo justo en el verano, que es la época más rentable para este árbol.



Figura. 1 Árbol de limonero

Lima de jugo ácido, de forma oval u oval a esférica, perteneciente a la familia *Rutaceae* del género *Citrus* y especie *aurantifolia*, con semilla, de cáscara delgada, de color verde al amarillo conforme avanza su madurez. (NMX-FF-087-SCFI-2001, 21001).

Frutos ovoides o globosos de color verde oscuro al principio pasando a verde amarillento o amarillo en la madurez. Mide 3.5 a 5 cm de diámetro o más. Su piel es delgada y se rompe fácilmente. La pulpa es verdosa, jugosa, muy ácida. Semillas pequeñas, ovoides altamente poliembriónicas (producen dos o más plantas por semilla). Fue introducida en América desde los primeros viajes de Colón (Técnica et al., 2006).

1.1.2 Producción en México:

La citricultura en México está localizada en 27 estados con una superficie cercana a 500,000 hectáreas (incluye tierras de riego y de temporal), con una producción media anual de 5 millones de toneladas y con rendimientos de 11 a 19 toneladas por hectárea para los diferentes cultivos. La industria dispone de 19 plantas procesadoras de jugos orientadas principalmente al comercio exterior. De esta total, únicamente operan 4 plantas, el resto se encuentran subutilizadas y descapitalizadas (Mota, 2003).

En México se producen tres especies de cítricos considerados como limones por el carácter ácido de su jugo. El Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle), limón Persa (*Citrus latifolia*, Tanaka) que botánicamente pertenecen al grupo de limas ácidas además del limón verdadero o limón italiano (*Citrus limón*, Burm).

Según datos de la FAO (2015), en el año 2013 México fue el quinto productor mundial de cítricos, con un 5.6% de la producción mundial, después de China (24%), Brasil (14.5%), Estados Unidos (7.49%) e India (7.46%). En el año 2014 se produjeron en México 7.6 millones de toneladas de cítricos, predominando naranjas (4.45 millones de toneladas) y limones y limas (2.2 millones de toneladas),⁵ seguidos de toronjas (424 mil toneladas) y mandarinas y tangerinas (492 mil toneladas).⁶ Los cítricos constituyen un producto agrícola básico en México, ya que forman parte de la dieta de la población, es decir, el

consumo de cítricos es muy elevado y la mayor parte de la producción de cítricos en México se dedica al consumo doméstico. Esto se refleja en el hecho de que de las cifras de producción arriba anotadas, en el año 2013 sólo se exportaron 29 mil toneladas de naranjas, 531 mil toneladas de limones y limas, y 17 mil toneladas de toronjas. Las naranjas se exportan casi totalmente a Estados Unidos (alrededor de 81%), en tanto que las toronjas se dirigen mayormente a la Unión Europea (Francia, Bélgica y Países Bajos sobre todo). Por su parte, limones, limas y mandarinas se comercializan fundamentalmente en Estados Unidos (aproximadamente 95%). (Maya, 2017)

México produce tres tipos de limón:

1. Limón mexicano (lima ácida), se produce en los estados del Pacífico Sur (Colima, Michoacán y Oaxaca principalmente).
2. Limón persa o sin semilla (lima ácida) se produce en el Golfo de México y Sureste (Veracruz principalmente).
3. Limón verdadero o italiano (limón) se produce principalmente en Yucatán.

Casi 2.44 millones de toneladas en 2016. México es 2º productor mundial de este cítrico. Cifras preliminares del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) afirman que Veracruz (717,014 toneladas); Michoacán (619,612 t), y Oaxaca (263,448 t) se ubicaron como los mayores productores de limón durante 2016, producto que nos ha colocado a nivel internacional en segundo lugar de producción, abriendo y diversificando nuestras fronteras para que en otras naciones disfruten de la calidad de este cítrico reconocido por su calidad e inocuidad. (Mota, 2003)

La mayor parte de la producción en México es de limón tipo mexicano, luego limón persa y en muy poca proporción el limón italiano. Para exportación el limón mexicano representa un poco más del 5%, siendo el limón persa y el limón verdadero los más solicitados para esta actividad.

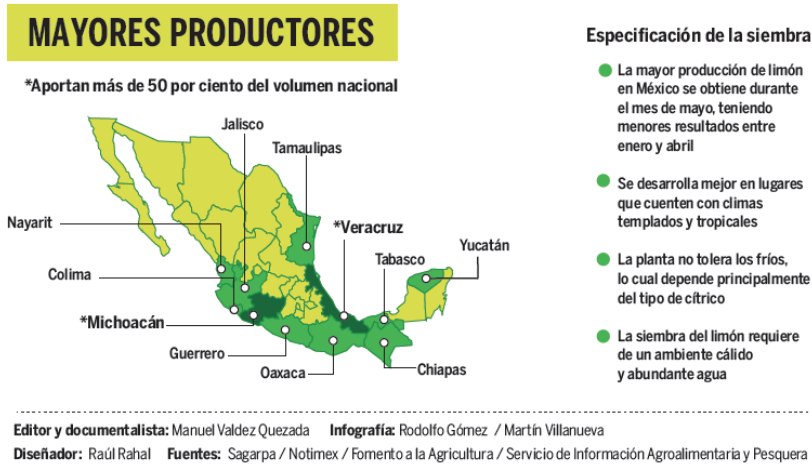


Figura. 2 Producción en México
<http://www.greentv.com.mx/especiales/limon-nacional-gotas-de-sabor>

1.1.3 Importancia económica.

En términos de valor, los cítricos son las frutas de mayor importancia en el comercio internacional, con una producción de 96 millones de toneladas. Pueden distinguirse dos mercados nítidamente diferenciados. Uno corresponde a los productos frescos, principalmente naranjas, encabezado por España; y también limas y limones, donde a la punta va México. El otro es el mercado de productos cítricos, principalmente jugo de naranja, dominado por Brasil, mientras que la producción de naranja en México es de 4'533,427 toneladas. (Maya, 2017)

El limón mexicano es usado como fruta en fresco para consumir su jugo y como aderezo culinario. A través del procesamiento industrial se extraen aceites esenciales, jugos concentrados y cáscara. El aceite esencial es la materia prima en la fabricación de bebidas de cola, productos farmacéuticos, saborizantes y fabricación de perfumes y jabones. (Mota, 2003)

México es el principal proveedor a nivel mundial de aceite esencial de limón (a base de extracto de la cáscara del limón mexicano), se estima que participa con el 77% de la producción mundial de aceite esencial.

El valor de la cadena limón es de importancia estratégica para nuestro país, por su capacidad generadora de empleo y divisas, constituyéndose también en factor de desarrollo de las regiones tropicales, en las cuales se concentra una gran proporción de la población que vive en condiciones de pobreza.

En las regiones tropicales de México se cuenta con importantes recursos naturales, características climáticas, disponibilidad de infraestructura y ubicación geográfica, que posicionan a la cadena de limón como un sector estratégico para el desarrollo económico de estas regiones.

Al analizar la cadena Limón Mexicano, se puede observar que en las principales regiones productoras de Limón Mexicano como son: Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco y Nayarit en cada una de ellas se tiene diferentes niveles de integración, disponibilidad de infraestructura productiva y procesos de comercialización, lo cual está correlacionado con la capacidad organizativa de los productores y empresarios así como con su rentabilidad y competitividad.

Por otra parte, entre los principales importadores de cítricos frescos sobresale la Unión Europea, abastecida por Sudáfrica, Argentina y Turquía. Otros importadores significativos son Rusia, Canadá y Japón, este último se surte principalmente de Estados Unidos, pero también realiza compras de estos frutos a otros países. En particular, en el mercado japonés ya domina el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), que en realidad es una lima, del cual México aporta alrededor de dos mil toneladas, lo cual representa una gran oportunidad para otros cítricos de México, ya que Japón importa 52 mil toneladas anuales de limón verdadero (*Citrus x limón*). Posteriormente se identificarán los papeles que tienen ambos países en el mercado cítrico mundial: México como uno de los principales productores y exportadores de distintas variedades de cítricos, y Japón como uno de los mayores importadores de cítricos y productor de una exquisita variedad de mandarina japonesa, la *Citrus unshiu (unshu mikan)*. (Maya, 2017)

El cultivo de cítricos en México, en particular del Limón Mexicano, ha alcanzado durante los últimos años un importante desarrollo. Las plantaciones de limón mexicano se localizan en la costa del Pacífico, principalmente en los estados de Colima, Michoacán, Oaxaca, Guerrero y Nayarit (Froylan, 2008).

En el 2030, se estima un aumento de la demanda mundial de 4.82 a 5.98 MMt (un crecimiento acumulado de 24%), mientras que la producción nacional de limón tiene la capacidad de incrementarse de 2.42 a 2.98 MMt, lo cual representa un crecimiento acumulado de 23.37%. Ante este escenario, es factible destinar 2.07 MMt para consumo nacional y 1.07 MMt a las exportaciones. (SAGARPA, 2016)

1.1.4 Manejo poscosecha.

Como en todos los cítricos, las limas ácidas una vez cosechadas, experimentan un metabolismo relacionado con el fenómeno de senescencia, caracterizado por pérdidas en el contenido de clorofila (responsables del color verde), elevada transpiración que conduce al marchitamiento y endurecimiento de la piel, reacciones de fermentación (producción de etanol), pérdidas del valor nutricional (principalmente Vitamina C) y su sensibilidad al ataque de microorganismos causantes de pudriciones se incrementa. Se ha reportado, la evolución de la senescencia en cítricos es acelerada por diversos factores como: inadecuado momento de cosecha, manejo brusco del producto tanto en campo como en empacadora, insuficiente aplicación de técnicas para control de patógenos y pérdidas de agua por transpiración, así como empleo de inadecuadas condiciones de temperatura y humedad relativa para el almacenamiento y/o transporte del producto (principalmente inductoras de daños por frío). Entre las técnicas poscosecha que se han venido aplicando para mantener la calidad y extender la vida poscosecha de los frutos de limón mexicano y 'Persa' se incluye principalmente el uso de recubrimientos a base de ceras y el empleo de temperaturas de refrigeración. (Veloz, 2006)

Para el enfriamiento de los cítricos se recomienda el sistema de aire forzado que permite bajar rápidamente la temperatura de la fruta. Dependiendo de la variedad, la temperatura de la fruta no debe ser menor de 3.0 °C, siendo los limones agrios los más resistentes al frío, después de las naranjas, mientras que las toronjas son muy susceptibles al frío. Dependiendo del mercado de destino, los cítricos pueden almacenarse por corto tiempo a la temperatura ambiente. Cuando los periodos de almacenamiento son mayores es necesario almacenarlos bajo refrigeración. La fruta empacada puede almacenarse durante varias semanas e inclusive meses a temperaturas de 3.0 °C a 8.0 °C, sin embargo las toronjas deben mantenerse a temperaturas de 10.0 °C a 15.0 °C para evitar el daño por frío. La humedad relativa debe mantenerse a humedades del 85 % a 90 %. Temperaturas cercanas a 0 °C producen daños por frío a la mayoría de los cítricos.

El limón se cultiva en una franja que va desde el ecuador hasta los 40° latitud norte y sur; es de clima tropical y tienen un buen desarrollo tanto en áreas costeras como en altiplanicies. Se cultiva bajo condiciones muy variables que van del clima tropical al subtropical, con altitudes de cero a 1,000 metros y precipitaciones de 600 a 2,000 mm anuales.

Para evitar la pérdida poscosecha, se ha propuesto el uso de recubrimientos comestibles, para prolongar la vida útil de frutas frescas y mínimamente procesadas, debido a que actúan como una barrera contra la humedad. Además presentan permeabilidad a gases, en fruta almacenada disminuye su respiración, evita pérdida de compuestos volátiles y retarda la oxidación enzimática (Alvarez Quintero, 2012).

1.1.5 Legislación

Como en todos los productos alimenticios se rigen bajo normas de calidad para su venta, su exportación e importación, a continuación se muestran algunas normas del limón.

- Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle) en estado fresco.
- Productos alimenticios no industrializados para uso humano - fruta fresca - limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*) – ESPECIFICACIONES
- Calidad suprema en limón mexicano
- NMX-FF-009-1982 Productos alimenticios no industrializados para uso humano – Fruta fresca - Determinación del tamaño en base al diámetro ecuatorial. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación 10 de junio de 1982.
- NMX-FF-012-1982 Productos alimenticios no industrializados para uso humano – Fruta fresca - Determinación del contenido de jugo en frutas cítricas en base al peso. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación 10 de junio de 1982.

1.2 Especificaciones del producto

1.2.1 Calidad del limón

Calidad Suprema

Es la calidad certificada que presenta un producto agroalimentario al garantizar el cumplimiento y valor agregado que brinda el empaque, etiquetado y calidad por atributos (color, sabor, apariencia, textura, etc.), adicionalmente a la minimización y ausencia de riesgos biológicos, químicos y físicos para la salud humana, animal y vegetal.

Daño

Es cualquier lesión, perjuicio, menoscabo, estropicio, avería, deterioro, contusión, machucamiento, corrupción, pudrición, destrozo, herida, magulladura, laceración o lastimadura provocada por causas externas; ya sea por plagas o enfermedades atribuibles a un mal manejo de las prácticas agrícolas, o por ramas o espinas, o por utensilios, productos químicos, aparatos o máquinas utilizados en el proceso, o por descuido en el manipuleo o permanencia en ambientes inapropiados.

Daño menor

Aquel que no afecta en forma considerable la aceptación del limón por el consumidor; puede ser rozaduras, raspaduras, heridas leves cicatrizadas u otros que sean superficiales y de escasa extensión.

Daño mayor

Es aquel que reduce en forma considerable la aceptación del limón por el consumidor; puede presentarse como evidencias de plagas o enfermedades, heridas cicatrizadas u otros que no afecten la pulpa de la fruta.

Daño crítico

Es aquel que afecta la pulpa del limón y ocasiona el rechazo del mismo por el consumidor; consiste en estados avanzados de ataques de plagas o enfermedades, grietas, heridas no cicatrizadas, magulladuras, picaduras ocasionadas por espinas u otros.

Defecto

Es cualquier malformación o deformación provocada por variaciones genéticas, fisiológicas o por efectos climatológicos, que afecte la apariencia o utilidad del producto.

El producto objeto de este Pliego de condiciones, debe cumplir con las siguientes especificaciones sensoriales:

Deben ser limones:

Sin Daños

- Sanos interior y exteriormente
- Libres de enfermedades
- Exentos de plagas
- Exentos de daños causados por plagas
- Libres de pudrición

Defectos menores:

Se consideran defectos menores: las ligeras raspaduras, costras, rozaduras, manchas, quemaduras de sol y otros que afecten un área hasta de 25 m², siempre y cuando sean superficiales.

Defectos mayores

Se consideran defectos mayores: la antracnosis, fumagina, evidencias de plagas y enfermedades, grietas cicatrizadas, magulladuras, claveteado y otros que no afecten el albedo, cuando el área afectada sea mayor de 25 mm² y menor de 100 mm² incluyendo defectos menores.

Limpios

Exentos de materia extraña visible (tierra, manchas o residuos químicos o de materia orgánica)

- Libres de escamas
- Libres de costras o roña
- Libres de manchas por contacto

De consistencia firme; exentos de magulladuras:

- Libres de degradación de la punta floral
- De sabor y olor característicos

- Exentos de cualquier olor y/o sabor extraño
- De aspecto fresco

Libres de manchas de aceite (oleocelosis)

- Libres de piel dura o seca
- Libres de daños por baja temperatura
- Libres de señales de haber sido expuestos a altas temperaturas

Enteros

- Con el Pedúnculo adherido, o con muestras de que se separó naturalmente
- Libres de heridas sin sanar
- Libres de daño causado por la maquinaria o por las uñas del personal.
- Sin Defectos

Bien desarrollados:

- De forma característica
- Libres de aberraciones genéticas, de desórdenes fisiológicos
- Libres de defectos ocasionados por efectos meteorológicos, por desbalance nutricional o por factores del medio (clima, suelo, agua)
- De textura uniforme
- De coloración uniforme

Exentos de manchas por sombreado

- Es característica de este fruto el que, habiendo cicatrizado la unión con el cáliz, éste se desprenda naturalmente, cosa que sucede a los pocos días de haber sido separado del árbol. Por lo que la ausencia natural del cáliz no afecta la condición de “Sin daños”, “Enteros”.

Color

- El Limón Mexicano debe presentar coloración uniforme, pasando del verde oscuro al amarillo conforme avanza su madurez fisiológica. Lo anterior se verifica visualmente de acuerdo a la siguiente relación.

Contenido de jugo

- Los limones objeto de este Pliego de Condiciones deben presentar un grado de madurez fisiológica o punto sazón mínimo, el cual se determina por el contenido de jugo, que no debe ser menor de 30 % en base a su peso.
- Es tolerable el 2%, en número o peso de frutas que no satisfagan el requisito de contenido de jugo.
- Cabe mencionar que mientras más oscuro sea el color, menor cantidad de jugo se obtendrá.

Peso y/o Tamaño del Limón

- Podrán clasificarse los limones según su peso y/o su tamaño. El emparador debe contar con especificaciones de calidad documentadas que consideren el tamaño solicitado por sus clientes.

Para la clasificación por peso.

- Deberán usarse los gramos (g); pudiendo especificar los gramos que pesa cada Limón (ej. 35g), o la cantidad de limones que contiene un kilogramo (ej. 28/kg). Para ambos casos es necesario mencionar el rango, si lo hubiera, plasmando inicialmente la cifra más pequeña (ej. 31-35g, 28-32/kg).

Para la clasificación por tamaño:

- Deberán usarse los milímetros (mm) en concordancia con la tabla anterior. Es tolerable el 1%, en número o peso de frutas que no satisfagan los requisitos de tamaño indicados en el envase o lote, siempre y cuando se ajusten al rango inmediato superior o inferior, al momento de empacar.

1.2.2 Daños y hongos presentes en el limón

El maltrato de la fruta durante a línea de empaque es causado principalmente por golpes, picaduras de espinas, rozadura de ramas, excesiva humedad en el fruto repercuten en un rompimiento de las glándulas de aceite en la cáscara del fruto, así como la susceptibilidad al daño por plagas y enfermedades. En estas condiciones la vida útil de los frutos durante el almacenamiento y transporte al mercado se reduce sensiblemente y la apariencia resulta fuertemente afectada. Los esfuerzos por conservar los frutos en óptimas condiciones de refrigeración y atmósferas controladas resultan infructuosos cuando se almacenan, sometidos a un mal manejo. (Froylan, 2008)

Especies del género *Geotrichum* son los agentes causales de la podredumbre amarga o ácida de los cítricos, frutos de hueso, tomates, zanahorias y otras frutas y hortalizas. Junto con *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, la especie *G. citri-aurantii* es responsable de importantes pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades de poscosecha en frutos cítricos en todo el mundo. (Palou, Jerbi, Taberner, & de la Fuente, 2016)

El *Geotrichum candidum* es un hongo que se instala en los frutos por heridas. Se da con frecuencia este tipo de podrido sobre fruta madura con defectos y almacenada durante algún tiempo. Hongos del tipo *Penicillium* instalados sobre podrido de *Geotrichum*, aceleran la total descomposición de los frutos atacados.

Los hongos del género *Alternaria* pueden causar enfermedades en numerosos productos hortofrutícolas, las cuales pueden presentarse durante el desarrollo del cultivo o en la poscosecha y causar la destrucción generalizada del cultivo y pérdidas en la producción. Durante la poscosecha, *Alternaria* tiene la capacidad de mantener una infección quiescente y manifestarse cuando se presentan las condiciones adecuadas, principalmente durante la maduración.

En esta etapa, la principal especie que se ha identificado es *A. alternata* que causa la enfermedad del moho negro en solanáceas, principalmente. (Black-solis, Ventura-aguilar, & Barrera-necha, 2017)

Los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum* representan mundialmente la principal pérdida económica para el sector cítrícola durante la etapa de poscosecha (Tamayo & Carvalho, 2014), esto debido al mal manejo poscosecha, incluyendo su mal almacenamiento; todo esto durante su comercialización (Domínguez, 2003), éstas alcanzan del 60 al 80%; siendo *Penicillium digitatum* (moho verde) la principal causa de pérdida durante la comercialización. Sin embargo, en los limones, el moho verde presenta una incidencia mucho más baja que en naranjas o mandarinas. El moho verde suele tener una elevada incidencia a principio y mitad de la comercialización, mientras que el *Penicillium Italicum* (moho azul) suele ser importante al final de la misma (Domínguez, 2003). Cabe mencionar que ninguno de dichos patógenos puede atacar a la fruta si no tiene heridas o lesiones en su superficie y difícilmente se propagan por contacto (Holmes & Eckert, Joseph W, 1999).

Las podredumbres ocasionadas por *Penicillium* son las principales causas de pérdidas de los frutos cítricos durante su comercialización en condiciones mediterráneas (Tuset, 1987; Viñas *et al.*, 2005), éstas alcanzan del 60 al 80% del total de los agrios (Tuset, 1987); siendo la podredumbre verde, sin ningún género de dudas, la principal de nuestros agrios a lo largo de toda la campaña de comercialización. Sin embargo, en los limones, la podredumbre verde presenta una incidencia mucho más baja que en naranjas o mandarinas (Tuset, 1987). La podredumbre verde suele tener una elevada incidencia a principio y mitad de la campaña de comercialización, mientras que la azul suele ser importante al final de la misma. Las lluvias tempranas seguidas o no de tiempo seco y caluroso son factores climáticos muy a tener en cuenta porque favorecen la podredumbre azul, mientras que la podredumbre verde se ve acrecentada por lluvias más tardías seguidas de ambiente húmedo y fresco.

El podrido producido por este tipo de hongos, es el más conocido y el que más se ve en nuestros almacenes. Son los clásicos mohos verde y azul. Ninguno de dichos patógenos puede atacar a la fruta si no tiene heridas en su superficie y difícilmente se propagan por contacto, si los frutos no presentan lesiones en su corteza.

El *Penicillium digitatum* tiene un desarrollo fácil a 20°C y humedad relativa alta. El *Penicillium italicum* puede crecer entre 3 y 32 °C, aunque se desarrolla con más facilidad a 24 °C y humedad relativa alta.

Penicillium digitatum: podredumbre verde causada por el hongo que penetra en la corteza de los frutos a través de heridas. Los síntomas empiezan en una zona húmeda en la epidermis del fruto seguido por el crecimiento de un micelio incoloro y, a continuación, se produce la esporulación de color verde. *P. digitatum* es, sin ningún tipo de dudas, el principal hongo causante de la podredumbre de los agrios en nuestro país a lo largo de toda la campaña de comercialización.

Desde el punto de vista epidemiológico, *P. digitatum* es un típico parásito de herida. Perdura en estado saprofitario sobre todo tipo de matriz vegetal, entrando en actividad cuando el fruto cítrico se encuentra en período avanzado de maduración o completamente maduro, es decir, cuando el fruto se encuentra con sus defensas mermadas.

En la comercialización citrícola, la contaminación por este hongo tiene lugar en los siguientes puntos:

- a) En el campo, estando el fruto maduro todavía en el árbol o en las operaciones de recolección y transporte.
- b) En el almacén acondicionador o conservador de la fruta.
- c) Durante el período de distribución y venta en los mercados.

Normalmente predomina durante la permanencia del fruto maduro en el huerto. Sin embargo, si los frutos permanecen tiempo en cámara, es probable encontrar proliferaciones más o menos abundantes debido a la dispersión por el ambiente de los conidios a partir de los frutos afectados.

La fuente principal de contaminación son los conidios, pero también el micelio puede jugar un papel interesante cuando los frutos están en contacto (contaminación cruzada). Caso éste de frecuencia considerable durante el periodo de comercialización.

Una vez en los frutos, si estos se encuentran maduros y presentan heridas o roturas de la cutícula y la humedad del aire es apropiada (más del 80%), los conidios de *P. digitatum* entran en actividad, germinan y el tubo germinativo en crecimiento, penetra con rapidez en el interior de los tejidos de la corteza (albedo), produciéndose la infección y al poco tiempo la podredumbre .

Durante la conservación frigorífica, *P. digitatum* es menos activo que *P. italicum*, predominando éste claramente en los frutos que sufren este proceso térmico. La razón de ello se debe a que *P. digitatum* disminuye el desarrollo en condiciones de bajas temperaturas (especialmente la esporulación), lo que no sucede en *P. italicum*.

Penicillium italicum: Podredumbre azul que puede penetrar en la piel sin que haya heridas y puede propagarse a los limones adyacentes (contaminación cruzada). Los síntomas son parecidos a los de la podredumbre verde, pero en este caso las esporas son de color azul en masa y por su apariencia constituyen pequeñas masas polvorientas de color azulado. *P. italicum* es, después del “moho verde”, el micromiceto más importante de nuestros frutos cítricos. En frigoconservación, la actividad parasitaria de *P. italicum* alcanza el primer puesto.

Al mismo tiempo que se forma en el exterior la parte reproductora asexual del hongo, los tejidos del fruto invadidos por el micelio del patógeno, se desorganizan como consecuencia de la disolución de las pectinas que constituyen las paredes celulares. Se producen pérdidas de líquidos, mostrándose al final éste blando y completamente arrugado. En condiciones de temperatura igual o superior a los 8-10°C, esta podredumbre es rápida y continua, difundiéndose en todas direcciones hasta afectar al fruto completamente. Si ésta tiene lugar en atmósfera húmeda, el fruto se descompone blandamente con importantes exudados acuosos. Si por el contrario el ambiente es seco, el fruto se deshidrata rápidamente quedando al final arrugado y con aspecto coriáceo.



Figura. 3 *Penicillium italicum* presente en el fruto

1.2.3 Fuentes de infección

Las esporas procedentes del suelo, los envases, el aire, la línea de tratamiento, etc.

Ambos hongos, pueden permanecer durante meses sobre la piel y desarrollarse posteriormente, en cuanto entran en contacto con los líquidos liberados por las heridas de la corteza.

La contaminación de los frutos, se produce siempre por esporas, que se instalan en las heridas de la piel. En el caso del *Penicillium italicum*, también puede producirse la contaminación por contacto con frutos podridos, ya que las hifas pueden atravesar la piel de un fruto sano, en determinadas circunstancias.

1.3 Control y prevención de podredumbre

1.3.1 Recubrimiento con biopelículas:

Aunque pareciera que el uso de recubrimientos comestibles en alimentos es nuevo, desde hace mucho tiempo se ha aplicado. Durante los siglos XII y XIII se practicó en China la inmersión en cera de naranjas y limones para retardar la pérdida de agua.

Los polisacáridos derivados de celulosa, pectinas, alginatos, quitosán y gomas, son capaces de constituir una matriz estructural, permitiendo obtener recubrimientos comestibles transparentes y homogéneos (Jiménez Munguía, 2012).

El uso de recubrimientos comestibles es una tecnología que está ganando importancia para prolongar la vida útil de frutas frescas y mínimamente procesadas, debido a que

actúan como una barrera contra la humedad. Además presentan permeabilidad a gases, en fruta almacenada disminuye su respiración, evita pérdida de compuestos volátiles y retarda la oxidación enzimática.

Los recubrimientos comestibles en frutas crean una atmósfera modificada en el interior de éstas, reduciendo la velocidad de transpiración, debido a que crean una barrera semipermeable a gases como O₂, CO₂ y vapor de agua. Esto retrasa el deterioro de la fruta.

Los polisacáridos derivados de celulosa (metilcelulosa MC, hidroximetil celulosa HMC, hidroxipropil metilcelulosa HPMC y carboximetilcelulosa CMC), pectinas, derivados de almidón, alginatos, carragenina, quitosano y gomas, son capaces de constituir una matriz estructural, permitiendo obtener recubrimientos comestibles transparentes y homogéneos, sin embargo están divididos por la solubilidad en agua.

La efectividad de un recubrimiento comestible en frutas depende del control de la humectabilidad, y de la capacidad de la matriz para mantener compuestos de diversa funcionalidad (plastificantes, antimicrobianos, antioxidantes, sabores y olores) debido a que la pérdida de los componentes afecta el espesor del recubrimiento y su solubilidad en agua. (Vazquez Briones M.C. & Guerrero Beltrán J.A., 2013)

1.3.2 Quitosano

El quitosano es un compuesto derivado de la quitina constituida por unidades de β -(1,4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucosa y β -(1,4)-amino-2-deoxi-D-glucosa. Este polímero biodegradable y no tóxico para los humanos presenta múltiples cargas positivas que le confieren valiosas propiedades funcionales, entre las que destaca su actividad antimicrobiana (I. C. A. Rodríguez, 2011).

Se propone que el modo de acción del quitosano, se debe a las cargas positivas del grupo NH₃⁺, que permiten la interacción con las cargas negativas de las membranas celulares alterando su funcionalidad y afectando el crecimiento de los microorganismos; además se ha reportado que el quitosano presenta un efecto antifúngico asociado al peso molecular y a su grado de desacetilación. Otras investigaciones han demostrado que la aplicación de películas de quitosano en productos frutícolas, tiene el potencial de inhibir su descomposición y prolongar la vida útil de almacenamiento. Trabajos donde se han realizado observaciones microscópicas indican que el quitosano tiene un efecto directo sobre la morfología de los microorganismos tratados, (I. C. A. Rodríguez, 2011) lo cual refleja su potencial fungistático o fungicida, en otros estudios sugieren que el quitosano induce una serie de reacciones de defensa relacionada con la actividad enzimática y se

ha demostrado que aumenta la producción de glucanohidrolasas, compuestos fenólicos y la síntesis de fitoalexinas específicas con actividad antifúngica, y también reduce las enzimas de maceración como poligalacturonasas, pectina metil esterasa, etc. Además, se menciona que induce a las barreras estructurales, un ejemplo de ello es, la inducción de la síntesis de la lignina. Para algunos productos hortícolas y ornamentales, ya que aumentó la producción de la cosecha y debido a su capacidad para formar una capa semipermeable, el quitosano extiende la vida útil de las frutas y los vegetales tratados, reduciendo al mínimo la tasa de respiración y la pérdida de agua. (I. C. A. Rodríguez, 2011)

1.3.3 Substancias naturales de acción antimicrobiana

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación, procesamiento o comercialización.

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen: (E. N. S. Rodríguez, 2011)

1. Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán.
2. Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.
3. Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

Otro compuesto que servirá para sustituir al ácido sórbico en la conservación de los alimentos es la vainillina, un componente cristalino de la vaina de la vainilla, que se ha mostrado muy eficaz en frutas como la manzana, las fresas o el mango. En general, cada

vez se descubren más plantas o partes de éstas que contienen antimicrobianos naturales, por lo que ya no solo tendremos mayor seguridad, sino mayor calidad de los alimentos.

Los sistemas antimicrobianos naturales presentes en plantas, animales o microorganismos van ganando lugar en el ámbito de la «conservación natural», sobre todo de las actividades antimicrobiana procedente de extractos de varios tipos de plantas y partes de plantas que se usan como agentes saborizantes en algunos alimentos. Los extractos de especies con propiedades conservantes naturales son más utilizados que los antimicrobianos sintéticos. En la mayoría de los casos, los antimicrobianos se usan principalmente para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras, y su acción depende en gran medida del pH. Cuanto más ácido es un alimento, más activo es contra los microorganismos. (E. N. S. Rodriguez, 2011)

Los aceites esenciales son un grupo de sustancias naturales que se están probando en experimentos científicos planeados desde la década de 1940 y están ofreciendo resultados prometedores para que puedan ser utilizados en el futuro en el marco de una Producción Integrada de cítricos. Estos aceites son compuestos, de tipo lipofílico, altamente volátiles y con fuertes propiedades aromáticas que son sintetizados y almacenados en determinados compartimentos y estructuras celulares. Presentan un importante papel en la protección de las plantas, ya que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas.

En la actualidad se conoce la actividad antimicrobiana de muchos de estos aceites y se utilizan al menos en el industria alimentaria como inhibidores de microbiota bacteriana acompañante, pero son escasos los trabajos que estudian su mecanismo de acción y se desconoce este mecanismo en gran parte.

La actividad antifúngica de los aceites esenciales ha sido atribuida a fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol; también al D-limoneno, cineol, α -pineno, β -pineno, β -mirceno y alcanfor o adicionalmente a p-anisaldehído y L-carvona. Sin embargo, existe cierta especificidad entre ellos, L-carvona es efectiva contra *B. cinerea*, pero no contra *Penicillium* sp. . Los extractos de aceites de tomillo y enebro también han mostrado su eficacia para controlar las especies de *Penicillium* patógenas de los agrios.

Se está utilizando un formulado a base de aceites esenciales de romero como un fungicida de amplio espectro en cultivos y el aceite de clavo se usa comercialmente como herbicida, inhibidor de la brotación de la patata y fungicida. Los aceites de tomillo rojo

(*Thymus zygis* L.) son utilizados en España como fungicidas y repelente natural con acción preventiva y curativa en agricultura ecológica.

1.3.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos oleosos, derivados volátiles de plantas, obtenidos de diferentes partes de la planta, como tallos, flores, hojas, raíces, semillas, frutos etc. ; los cuales son responsables de su aroma. En la planta funcionan como mensajeros, atrayentes de polinizadores y para defensa contra herbívoros y microorganismos que producen enfermedades. Esta característica les confiere sus propiedades para su posible aplicación en el control de hongos fitopatógenos.

Pueden obtenerse por diferentes métodos pero el más común es por destilación utilizado primordialmente para la producción. Se estima que aproximadamente se conocen más de 3000 aceites esenciales y que 300 de ellos tienen importancia comercial, ya que se usan en diferentes productos ya sean de belleza, en alimentos, como condimentos o sabores entre otros usos. Se sabe que algunos aceites esenciales tienen efecto antibacteriano, antifúngico, antiviral, insecticida y además poseen propiedades antioxidante así como antiinflamatorias

Los aceites esenciales están constituidos por una mezcla compleja de compuestos, principalmente terpenos, alcoholes fenólicos como es el caso del timol, carvacrol, eugenol; alcoholes no fenólicos como el geraniol, linalol, aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres, entre otros y cada planta puede tener hasta 100 sustancias químicas distintas en diferentes cantidades y que en conjunto proporcionan al aceite esencial características propias

Los aceites esenciales son de naturaleza hidrofóbica y de gran viscosidad. Estas características pueden reducir la capacidad de la dilución o pueden causar distribución desigual del aceite a través del medio, aún si se usa un agente correcto disgregante o solubilizante. Se tiene que comprobar si las concentraciones aplicadas del emulsor o del solvente no afectan el crecimiento y la diferenciación de los microorganismos de prueba.

Los cultivos de microorganismos se realizan en medios líquidos, bajo condiciones físicas óptimas para las especies individuales. Los microorganismos tienen que alcanzar una fase apropiada del crecimiento, y un número especificado de células tiene que ser utilizado para la prueba.

Por otra parte los aceites esenciales son un grupo de sustancias que están ofreciendo resultados prometedores. Estos aceites presentan un importante papel en la protección de

las plantas, ya que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas (Reyes Jurado, 2012).

En la actualidad se conoce la actividad antimicrobiana de muchos de estos aceites y se utilizan al menos en el industria alimentaria como inhibidores de microbiota bacteriana (Barrera Necha, 2008), pero son escasos los trabajos que estudian su mecanismo de acción y se desconoce este mecanismo en gran parte.

Toxicidad de los aceites esenciales:

Por regla general, los aceites esenciales por vía oral poseen una toxicidad débil o muy débil: la mayoría de los que se utilizan frecuentemente tienen una DL_{50} comprendida entre 2 y 5 g/Kg (anís, eucalipto, clavo, canela etc.), o lo que es más frecuente, superior a 5 g/Kg (manzanilla, lavanda, etc.), similar caso se da con los componentes de los aceites esenciales. Son raros aquellos que tienen una DL_{50} inferior a 2 g/Kg.

Los aceites esenciales exhiben la actividad antimicrobiana en una amplia variedad de especies de insectos, bacterias, levaduras y hongos, por lo que se ha desarrollado su uso en la protección de alimentos como ingrediente o en películas.

El modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter (hidrófilo o hidrófobo) se debe a que tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplasmáticas, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo. Respecto a sus componentes, ellos también pueden actuar como agentes que interfieren con la traslocación de protones y la fosforilación del ATP.

Aceite esencial de canela

La canela es de la familia *Lauraceae*, del género *Cinnamomum* que comprende aproximadamente 250 especies, él árbol es nativo de la India e Indochina, las tres especies importantes de donde se obtienen AE de interés son *C. zeylanicum*, *C. cassia* Blume y *C. camphora* L. La canela tiene efectos biológicos como la analgesia, es antiséptico, antiespasmódico, afrodisiaco, astringente, carminativo, hemostático, insecticida y parasiticida.

El aceite de esta especie se puede extraer de la hoja, del tallo o de la raíz, lo que da lugar a diferencias en sus características de aroma, sabor y composición química principalmente. El uso más común es la perfumería, así como saborizantes en la industria de los alimentos, en farmacéuticos, preparaciones dentales y bebidas, entre otros

productos, además, se caracteriza por que tiene un aroma dulce, picante y de gran alcance.

Descripción:

Es un líquido amarillento o parduzco que se oscurece y espesa con el tiempo o por exposición prolongada al aire. Su olor y sabor son característicos. Es poco soluble con el agua y muy soluble en alcohol y en ácido acético glacial.

Principios Activos:

Según la FAO (2006), el aceite de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contiene como componente principal 75-85% de eugenol y es rico en cinamaldehído el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas.

Su actividad antifúngica es debida a la acción sobre la membrana celular, provocando la desestabilización de la misma e induciendo a la muerte celular.

Toxicidad:

La DL₅₀ para el aceite esencial de canela en aplicación dérmica fue estimada en 690mg/Kg y la dosis diaria aceptada para el aldehído cinámico fue estimada en 700ug/Kg.

Efecto antifúngico del aceite esencial de Canela

De todos los AE que se han estudiado, destacan los aceites de clavo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*); entre otros como los de menta, ajo, lima y eucalipto, observándose que los últimos tres aceites mencionados inhibieron el crecimiento micelial y la esporulación de los conidios de *C. gloeosporioides*, a concentraciones de 200, 250 y 300 µg mL⁻¹.

Aceite esencial de clavo

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*) es una especia perteneciente a la familia Myrtaceae, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales. (Aguilar-González, AE, López-Malo, 2013)

El aceite esencial de clavo es un líquido incoloro o de color amarillo-marrón claro. Tiene un aroma característico y sabor pungente, es miscible en etanol y en dietil éter; es ligeramente miscible en agua y adquiere un color marrón con el envejecimiento o en contacto con el aire. Es fotosensible y termolábil, por lo que la vida de almacenamiento es corta si no se protege adecuadamente.

De acuerdo al estudio realizado, la composición del aceite obtenido por arrastre de vapor presenta en su composición al eugenol (83.6%); acetato de eugenilo (11.6%) y cariofileno (4.2%) como componentes mayoritarios.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de clavo:

Los componentes activos de las especias que tienen actividad contra los microorganismos son en su mayoría metabolitos secundarios como alcaloides, glucósidos, entre otros atribuyen la actividad antimicrobiana del aceite esencial de clavo, a los compuestos fenólicos, así a mayor cantidad de compuestos fenólicos en el aceite esencial la actividad antimicrobiana será mayor; estos compuestos pueden desnaturalizar a las proteínas y al mismo tiempo reaccionan con los fosfolípidos de la membrana celular, cambiando así su permeabilidad y produciendo la muerte microbiana. (Aguilar-González, AE, López-Malo, 2013)

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica del aceite esencial de *S. aromaticum* abarca diversas especies de hongos y levaduras, por ejemplo: especies de *Candida* (principalmente *Candida albicans*), *Cryptococcus neoformans*, especies de *Aspergillus*, hongos aislados de *Onychomycosis* (infección de uñas), *Saccharomyces cerevisiae* y las especies de *Penicillium* aisladas del aire. El aceite de clavo es eficaz contra especies de *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Septoria* y *Penicillium digitatum*, esta actividad se debe principalmente al eugenol.

Aceite esencial de tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es de la familia Lamiaceae, es un arbusto herbáceo perenne, es una planta nativa de la región del mediterráneo pero es cultivada en distintas regiones.

El tomillo es una especie comúnmente usada de diversas maneras, una de ellas es como aceite esencial el cual es ampliamente utilizado como saborizantes de alimentos, preparación farmacéutica, enjuagues, desinfectantes además algunas veces como perfumes.

El aceite esencial de tomillo, *Thymus vulgaris*, presenta como componente mayoritario el timol y en algunas variedades su composición puede alcanzar valores hasta del 80%. Se comprueba además la presencia de carvacrol, gamma-terpineno y p-cimeno (precursor del timol). Tanto los aceites esenciales obtenidos de las especies de *Thymus*, como el timol, han sido reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes de uso humano, enjuagues bucales y otros agentes antimicrobianos utilizados a nivel doméstico. (Gallo & Malo, 2011)

Quitosán

Actualmente la quitina se obtiene principalmente del exosqueleto de crustáceos industrialmente procesados, tales como langosta, cangrejo y camarón. El uso creciente de

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

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

El quitosano es un compuesto derivado de la quitina constituido por unidades de β -(1,4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucosa y β -(1,4)-amino-2-deoxi-D-glucosa. Este polímero biodegradable y no tóxico para los humanos presenta múltiples cargas positivas que le confieren valiosas propiedades funcionales, entre las que destaca su actividad antimicrobiana.

Se propone que el modo de acción del quitosano, se debe a las cargas positivas del grupo+, que permiten la interacción con las cargas negativas de las membranas celulares NH_3 alterando su funcionalidad y afectando el crecimiento de los microorganismos; además se ha reportado que el quitosano presenta un efecto antifúngico asociado al peso molecular y a su grado de desacetilación. Otras investigaciones han demostrado que la aplicación de películas de quitosano en productos frutícolas, tiene el potencial de inhibir su descomposición y prolongar la vida útil de almacenamiento (Han et al., 2004). Trabajos donde se han realizado observaciones microscópicas indican que el quitosano tiene un efecto directo sobre la morfología de los microorganismos tratados, lo cual refleja su potencial fungistático o fungicida, en otros estudios sugieren que el quitosano induce una serie de reacciones de defensa relacionada con la actividad enzimática y se ha demostrado que aumenta la producción de glucanohidrolasas, compuestos fenólicos y la síntesis de fitoalexinas específicas con actividad antifúngica, y también reduce las enzimas de maceración como poligalacturonasas, pectina metil esterasa, etc. Además, se menciona que induce a las barreras estructurales, un ejemplo de ello es, la inducción de la síntesis de la lignina. Para algunos productos hortícolas y ornamentales, ya que aumentó la producción de la cosecha y debido a su capacidad para formar una capa

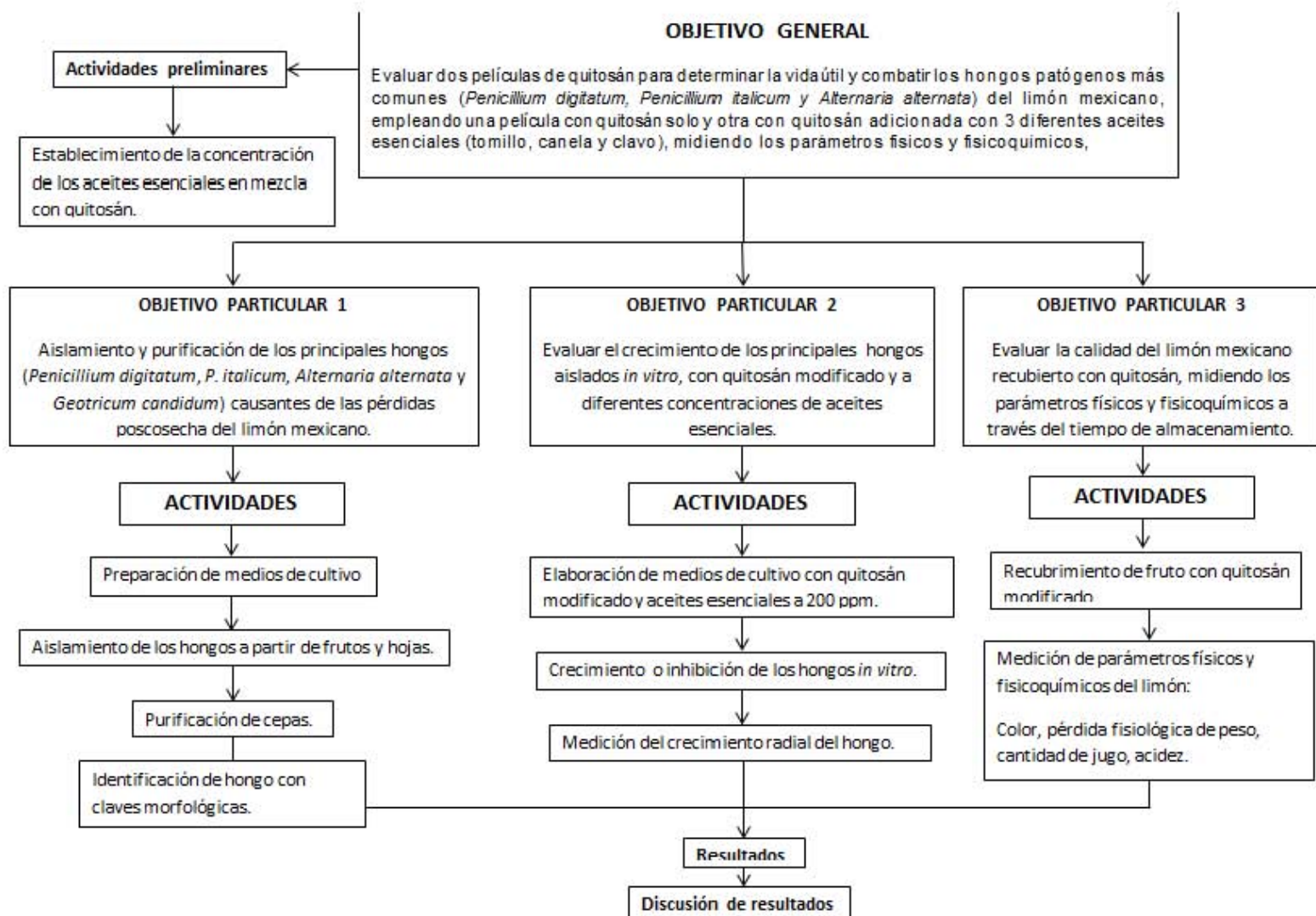
semipermeable, el quitosano extiende la vida útil de las frutas y los vegetales tratados, reduciendo al mínimo la tasa de respiración y la pérdida de agua.

El recubrimiento de quitosano (CH), un polímero obtenido del exoesqueleto de crustáceos, utilizado como recubrimiento comestible por sus propiedades antimicrobianas y su capacidad de vehiculizar sustancias bioactivas como aceites esenciales (AES) que confieren atributos sensoriales y poseen capacidad microbiciada (Rico, 2012). Se propone que el modo de acción del quitosán, se debe a las cargas positivas del grupo NH_3^+ , que permiten la interacción con las cargas negativas de las membranas celulares alterando su funcionalidad y afectando el crecimiento de los microorganismos (Mármol, Zulay, 2011); además se ha reportado que el quitosán presenta un efecto antifúngico asociado al peso molecular y a su grado de desacetilación (Mármol, Zulay, 2011). Otras investigaciones han demostrado que la aplicación de películas de quitosán en productos frutícolas, tiene el potencial de inhibir su descomposición y prolongar la vida útil de almacenamiento (Rico, 2012).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Cuadro metodológico:



2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Actividades preliminares

Selección de concentraciones de aceites esenciales para tratamiento.

Primeramente se realizaron tres tratamientos de quitosán, (el cual fue proporcionado por parte del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, campo 1) con diferentes concentraciones de aceites esenciales (100 ppm, 150 ppm y 200 ppm), se hizo el recubrimiento a 3 limones por tratamiento, se colocaron en una pecera junto con una solución de sal-agua para simular una humedad relativa de 85% y se fue registrando la pérdida de peso durante 15 días, Figura 4.



Figura. 4 Pruebas de recubrimiento con quitosán y aceites esenciales

Obtención de cepas

Posteriormente se hizo una evaluación microbiológica en la Unidad de Investigación de Granos y Semillas, laboratorio de Patología FESC-UNAM, donde se aislaron e identificaron los principales hongos (*Penicillium*, *Alternaria* y *Geotricum*) causantes de las pérdidas poscosecha en los limones y observar el efecto del quitosán mejorado junto con los aceites esenciales sobre su crecimiento y desarrollo para la formulación del recubrimiento.

2.3 Aislamiento y purificación de los hongos

El aislamiento de las cepas de hongos *Penicillium*, *Alternaria* y *Geotricum* se obtuvieron a partir de tejido vegetal enfermo de hojas cloróticas (Figura. 5) y frutos de limón.

Primeramente se hicieron cortes en hojas de árbol de limón en donde se observaba algún síntoma de enfermedad, se cortaron 9 pedazos pequeños y se colocaron en cajas Petri, con un medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), colocando tres pedazos en cada caja

en forma equidistante, haciendo un total de 3 repeticiones, Las cajas fueron colocadas en una incubadora marca Precision Scientific 815, durante 8 días a 25°C en oscuridad.



Figura. 5 Hojas cloróticas de árbol de limón

Posteriormente también los hongos patógenos del limón fueron aislados e identificados a partir de frutos enfermos (figura 6), uno de ellos se obtuvo en una tienda de autoservicio al mayoreo; se colocó en un recipiente con tapa y se incubó durante 8 días a 25°C, hasta su uso posterior. A los 8 días se tomó un fragmento del fruto donde se observaba el signo de enfermedad y se sembró en cajas Petri con medio agar papa dextrosa, hasta obtener el desarrollo de las colonias.



Figura. 6 Fruto enfermo

Otro aislamiento de las cepas patógenas de limón fue a partir de un fruto comprado en una recaudería; se colocó el fruto en una bolsa plástica con cierre hermético junto con una servitoalla y 10 ml de agua destilada (Figura 7), esto con el fin de crear una humedad elevada y así propiciar el crecimiento del hongo, colocándolo dentro de una incubadora a 25°C durante 8 días. Este hongo se aisló a través de un raspado superficial del fruto contaminado y sembrando el inóculo en cajas Petri con medio agar papa-dextrosa.



Figura. 7 Limón enfermo incubado en cámara húmeda

Por último se realizó otro aislado a partir de un limón enfermo procedente de una taquería local del Estado de México, para la purificación se realizó la misma metodología que se empleó con la cepa anterior.

2.4 Preparación de tratamiento con quitosán y quitosán con aceites esenciales

El quitosán se obtuvo a partir de las cáscaras de camarón siguiendo la patente Mexicana No. 293022 con el nombre “Proceso para la extracción de Quitina a partir de exoesqueletos de crustáceos y su conversión a Quitosán”, como se muestra en la Figura 8; posteriormente a este quitosán se le hicieron algunas mejoras que están en estudios para su patente.



Figura. 8 Quitosán en polvo

Posterior se preparó una solución de quitosán al 1% (Figura 9) con ácido acético a la cual se le ajustó el pH a 5 con una solución de NaOH 1N. En la solución resultante de quitosán se preparó el medio papa-dextrosa (PDA), posteriormente se esterilizó en la autoclave a 15 lb de presión, 121 °C por 15 minutos y se vació en cajas Petri estériles de 87 mm de diámetro.



Figura. 9 Solución de quitosán al 1%

La solución se dividió en cuatro matraces de 500 ml donde a cada uno se le adicionaron los aceites esenciales (tomillo, canela y clavo) y uno donde se le adicionó la mezcla de estos tres, para la homogenización del medio junto con los aceites empleados se utilizó Tween 80 y se vació en las cajas Petri estériles.

2.5 Identificación de actividad antifúngica de quitosán y aceites esenciales *In Vitro*

Para determinar si los tratamientos de quitosán y aceites esenciales (canela, clavo y tomillo) presentan un efecto fungicida se hizo una siembra de los hongos patógenos previamente aislados.

Para la siembra de las especies identificadas se preparó una suspensión de esporas, se extrae con un asa esterilizada una pequeña cantidad de microorganismos de cada una de las colonias colocándolas en un vial con una solución de agua agar al 0.2% con 0.05 de tween 80, se homogenizó en un vortex marca Genie 2 y con la ayuda de una micropipeta Science Marca MED se colocaron de 3-4 μ l en el centro de una placa de agar y se incubaron a 25°C durante 8 días tal y como se muestra en la Figura 10.



Figura. 10 Siembra de hongos en las placas con tratamiento

Para esta fase experimental se realizaron muestras control (cajas con medio de cultivo, agar papa-dextrosa sin tratamiento) y las otras con quitosán mejorado al 1% y los aceites esenciales (canela, clavo y tomillo) a 200 ppm cada prueba se realizó por triplicado dando un total de 96 cajas.

Inhibición del crecimiento micelial

El crecimiento micelial se midió diariamente evaluando el diámetro que alcanzó el micelio a través del tiempo con la ayuda de un vernier marca "TRUPER". El ensayo se detuvo al transcurrir ocho días llevándose a cabo la evaluación por triplicado para cada uno de los tratamientos.

Los resultados se reportaron como índice de inhibición del crecimiento micelial (*IM*)

Los tratamientos que presentaron inhibición del 100 % se sembraron en medio PDA sin la adición de aceite esencial para evaluar el efecto fungistático o fungicida de los aceites esenciales empleados.

Formulación del recubrimiento

La formulación del recubrimiento a base de quitosán, se realizó en base a los resultados obtenidos de las actividades preliminares.

Recepción y selección de materia prima

Los 30 limones de la especie *Citrus aurantifolia* (limón mexicano) se obtuvieron directamente de un árbol limonero ubicado en Jardines de San Mateo en el municipio de Naucalpan, se colocaron en recipientes plásticos para posteriormente ser trasladados al laboratorio de Biotecnología, Campo 1, FESC-UNAM.

Una vez teniendo los frutos en el lugar de la investigación, se separaron y se clasificaron de acuerdo a su peso y estado de madurez; pesando cada uno de los limones considerando un rango de peso de ± 10 gramos por fruto; y observando el color como parámetro de madurez fisiológica, esto con la finalidad de formar dos grupos, el primero sin recibir ningún tipo de tratamiento y el segundo con tratamiento como, se muestra en la figura 11.



Figura. 11 Selección de limones en base a peso y madurez fisiológica

2.6 Recubrimiento del fruto

Posteriormente fueron recubiertos con el quitosán mejorado al 1%, mediante inmersión durante 30 segundos en un vaso de precipitados para así asegurarse que el tratamiento cubriera perfectamente los limones (Figura 12), después de esto se colocaron en una rejilla para quitar el excedente y dejarlos ahí durante un día para su secado por convección natural (Figura 13).



Figura. 12 Inmersión de limón en quitosán al 1%



Figura. 13 Secado por convección natural

2.7 Evaluación de pruebas físicas y fisicoquímicas

Físicas

Pérdida fisiológica de peso

Para la evaluación de esta prueba después de haber pasado por el secado, se tomaron dos trozos de manta de cielo para formar una especie de costal que contuviera de 3 a 4

limones de cada grupo. Esto se pesó diariamente en una balanza analítica marca OHAUS modelo Scout Pro SP601 (Figura 15).



Figura. 15 Limones en manta de cielo

2.7.1 Contenido de jugo

Para esta prueba se realizó el método basado en el PC-024-2005 PLIEGO DE CONDICIONES PARA EL USO DE LA MARCA OFICIAL “MÉXICO CALIDAD SUPREMA” EN LIMÓN MEXICANO.

Que consiste en el uso de un extractor de jugo de cítricos manual o automático, deben pesarse los frutos cada uno antes de ser cortados, posteriormente, todos los frutos deben ser cortados de tal manera que queden expuestas las vesículas de jugo.

Cada mitad del fruto, debe ser colocada en el extractor manual para ser exprimidos.

Al exprimirlos, se debe de extraer todo el jugo, para ello debe presionarse con fuerza en el receptáculo del exprimidor manual, hasta que se observe que las vesículas de jugo queden sin jugo.

Mientras el jugo es extraído, debe acumularse en un recipiente de peso conocido, asegurándose que el jugo no contenga residuos del fruto, utilizando para ello, un tamiz antes de realizar la medición de su peso, Figura 16.



Figura. 16 Extracción de jugo de limón

2.7.2 Determinación de pH

Para esta prueba se realizó como lo indica la norma mexicana (NMX-F-317-S-1978, 1978), con un potenciómetro y esperando valores de entre 2 y 2.8 como lo indica la literatura.

2.7.3 ACIDEZ

Acidez titulable (método AOAC) se determinó por triplicado. Se realizó con la muestra del jugo de limón. La determinación se hizo por titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio 0.1 N, se adicionaron cuatro gotas de solución de fenolftaleína, figura 17.

Posteriormente se tituló la muestra hasta que se mantuvo el vire al color rosa por un minuto. La acidez titulable es expresada como g/L de ácido cítrico.

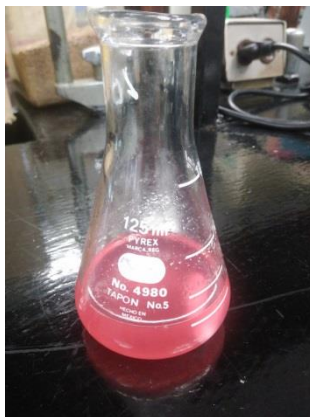


Figura. 17 Titulación de la muestra

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Pruebas preliminares

Al realizar las pruebas preliminares registrando el peso durante 15 días y observando físicamente el fruto se llegó a la conclusión de que la concentración de 200 ppm era la indicada para la experimentación definitiva.

Se observó que con las concentraciones de 100 y 150 ppm hubo una mayor pérdida de peso y en el caso de 100 ppm la pérdida de peso fue a mayor velocidad y con el de 200 ppm fue menor la pérdida y alargó más el tiempo de la pérdida (Figuras 18,19 y 20).

Para la parte microbiológica también se observó que con la mayor concentración se retardó el crecimiento de los hongos.

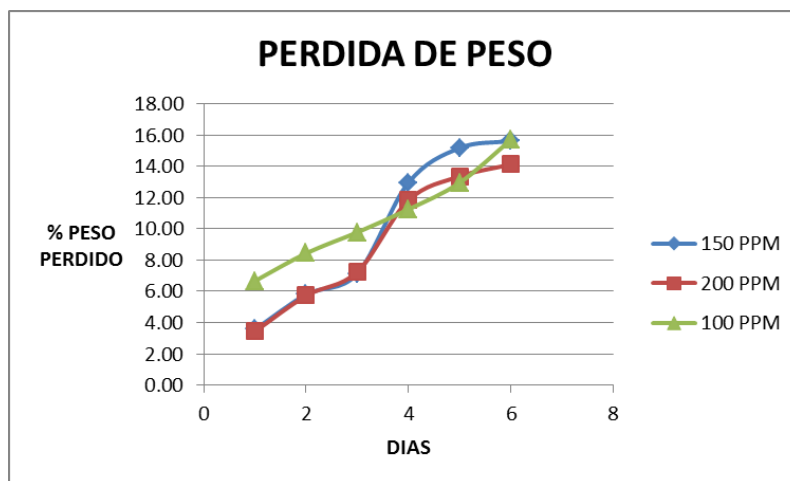


Figura. 18 Pérdida fisiológica de peso con respecto al tiempo



Figura. 19 Limones dentro de una atmósfera modificada



Figura. 20 Limones con quitosán y aceites esenciales a 200 ppm

3.1.1 Aislamiento y purificación de los hongos

Observando el desarrollo de colonias que abarcaban gran superficie de la caja como se muestra en la Figura 21. Para la obtención de cultivos axénicos se tomó una pequeña muestra de cada colonia y se resembró en una caja Petri con medio de cultivo agar papa-zanahoria, ya que en este medio se da mejor el crecimiento de *Alternaria* como se muestra en la Figura 22.



Figura. 21 Cultivo de *Alternaria* en medio PDA

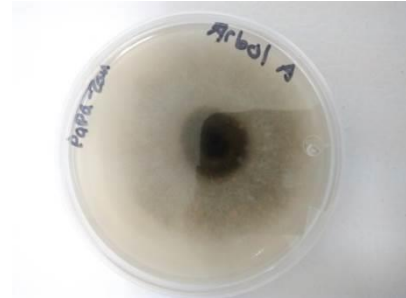


Figura. 22 Cultivo axénico de *Alternaria* en medio agar papa-zanahoria

Para la identificación de la especie *Alternaria* se consideró la macro morfología y se realizaron preparaciones semipermanentes observando las características micro morfológicas en un microscopio de contraste de fases, para identificar a nivel de especie el género *Alternaria*, se midieron 30 conidios, 15 en forma ovoide y 15 en forma elipsoidal y empleando las claves especializadas de Simmons (2007) se observó que la especie encontrada era *Alternaria alternata* como se ve en la figura 23.

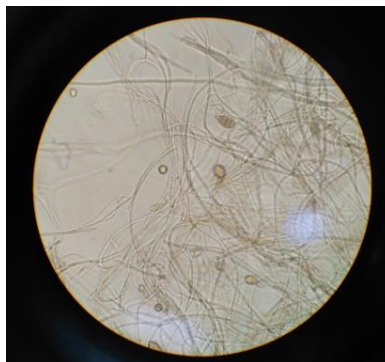


Figura. 23 Conidios

Para el aislamiento y purificación del segundo hongo, se tomó una pequeña muestra del fruto dañado con una aguja de disección previamente flameada, se dejó incubar y se observó el crecimiento de algunas colonias. Posterior a eso, se colocó en cajas Petri con

PDA para su purificación, describiendo la macro y micromorfología de la cepa, realizando preparaciones semipermanentes, siendo observadas en el microscopio de contraste de fases y utilizando las claves de Watanabe (2010) para su identificación a nivel de especie se encontró que el hongo en cuestión se trataba de la especie *Geotricum candidum* (figura 24).

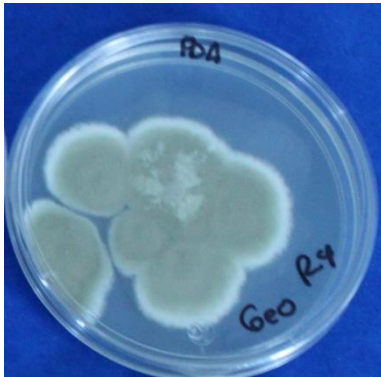


Figura. 25 Crecimiento de *Geotricum* en medio PDA



Figura. 24 Cepa purificada de *Geotricum*

Las cajas fueron depositadas en una incubadora durante 7 días a 25 °C en completa oscuridad. Las colonias se transfirieron a nuevas cajas con medio extracto de malta agar (MEA) hasta lograr su purificación. Posteriormente, se realizó la caracterización de la macro y micro morfología de las cepas aisladas, siendo identificadas con las claves propuestas por Frisvad y Samson (2004).

Como se puede observar en la Figura 26 el hongo primeramente creció en el medio PDA y a excepción del *Penicillium italicum*, para la purificación de este se utilizó un medio de cultivo llamado Czapek, extracto de levadura agar (CYA), ya que es más rico en nutrientes para que esta especie de hongo crezca (Figura 27). Se hizo una tinción con azul algodón para su observación microscópica y observar su morfología (Figura 28).



Figura. 26 Colonia de *Penicillium* en medio PDA



Figura. 27 Purificación de *Penicillium digitatum* en medio CYA

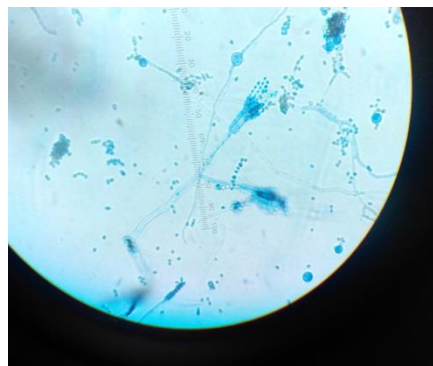


Figura. 28 Micromorfología de *Penicillium digitatum* con tinción azul algodón

3.2 Cinética de crecimiento de hongos con tratamiento de quitosán y quitosán con aceites esenciales

Como se mencionó en el capítulo anterior esta variable se realizó midiendo diariamente el diámetro que alcanzó el micelio a través del tiempo con la ayuda de un vernier.

En la figura 29, se muestra una tabla comparativa de las 4 diferentes especies de hongos con los que se trabajaron; observándose que al transcurrir los 8 días la especie de *Alternaria alternata* cubre casi en su totalidad la caja Petri, a diferencia de los *Penicillium* que su crecimiento es un poco más lento. En la figura 30, lo que se muestra es la cinética de crecimiento de cada uno de los hongos; es decir la velocidad con la que los hongos van creciendo durante el tiempo (ocho días); como ya se había observado en la figura anterior la especie con una mayor velocidad de crecimiento es la *Alternaria alternata*.

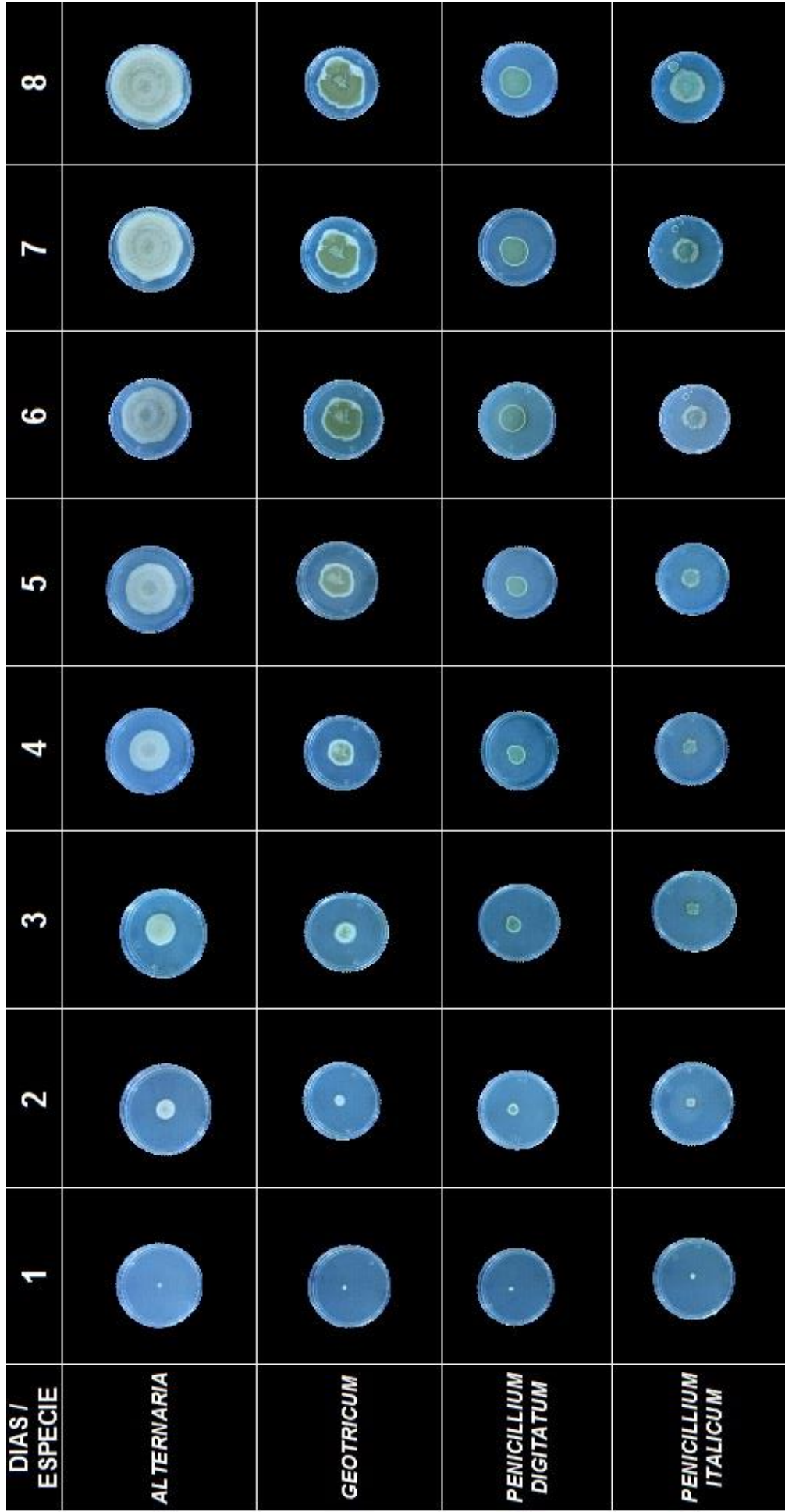


Figura. 29 Cinética de crecimiento de los hongos *Alternaria*, *Geotricum*, *Penicillium (digitatum e italicum)* en fotoperiodo durante ocho días a 28°C, en medio PDA

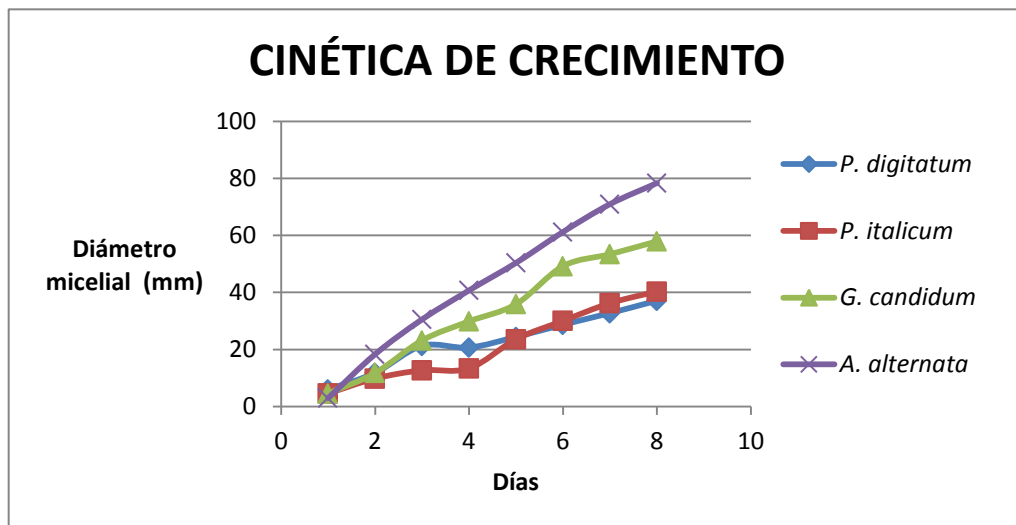


Figura. 30 Cinética de crecimiento de los hongos *A. alternata*, *G. candidum* y *P. italicum* y *digitatum*

Alternaria alternata

En la figura 31, se observa que en la placa control al transcurrir los ocho días, esta especie cubre casi en su totalidad dicha placa, al contrario como se observa en los 5 diferentes tratamientos que inhibieron en su totalidad el crecimiento del hongo.

| DÍAS / TRATAMIENTO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CONTROL | | | | | | | | |
| QUITOSÁN MEJORADO AL 1% | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CANELA | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CLAVO | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + ESENCIAL DE TOMILLO | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES | | | | | | | | |

Figura. 31 Tabla comparativa de los diferentes tratamientos empleados en el crecimiento de *Alternaria alternata*

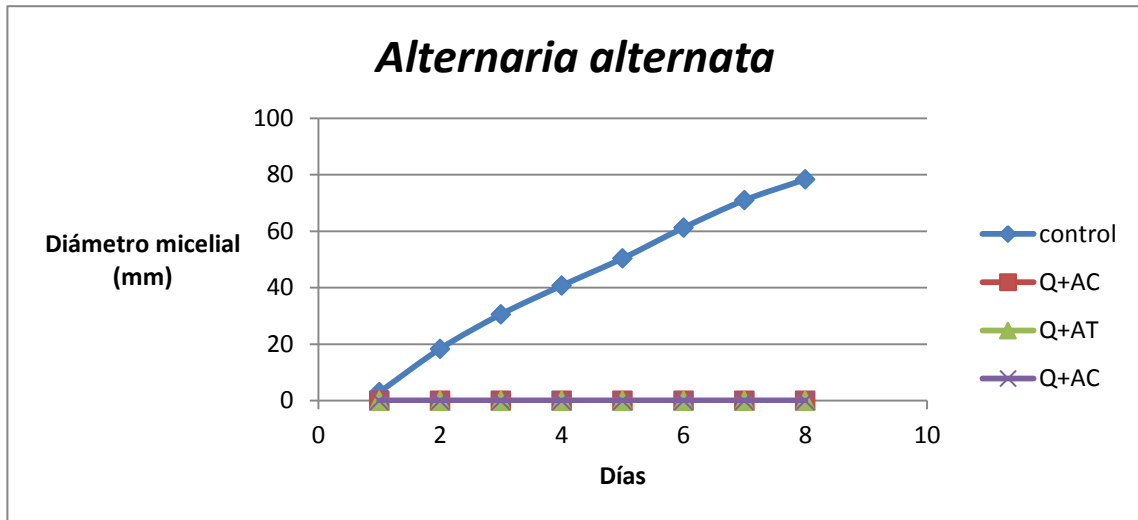


Figura. 32 Cinética de crecimiento de *Alternaria alternata*

Para el caso de los hongos *Geotricum* y *Penicillium* (*digitatum* e *italicum*) se observó el mismo efecto, en el que los tratamientos empleados inhibieron en su totalidad el crecimiento de estos (Figura 33,34y 35).

| DÍAS / TRATAMIENTO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CONTROL | | | | | | | | |
| QUITOSÁN MEJORADO AL 1% | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CANELA | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CLAVO | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + ESENCIAL DE TOMILLO | | | | | | | | |
| QUITOSÁN + MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES | | | | | | | | |

Figura. 33 Tabla de los diferente tratamientos empleados para *Geotricum candidum*.








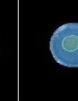

































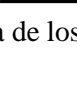
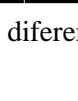
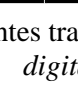
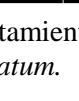
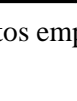
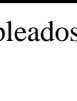
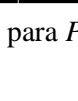
| DÍAS / TRATAMIENTO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|--|---|
| CONTROL |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN MEJORADO AL 1% |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CANELA |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CLAVO |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES |  |  |  |  |  |  |  |  |

Figura. 34 Tabla de los diferentes tratamientos empleados para *Penicillium digitatum*.































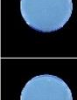










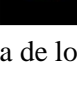
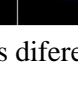
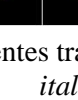
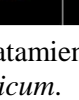
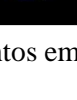
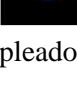
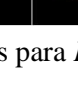
| DÍAS / TRATAMIENTO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|--|---|
| CONTROL |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN MEJORADO AL 1% |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CANELA |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE CLAVO |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO |  |  |  |  |  |  |  |  |
| QUITOSÁN + MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES |  |  |  |  |  |  |  |  |

Figura. 35 Tabla de los diferentes tratamientos empleados para *Penicillium italicum*.

3.2.1 Identificación de la actividad fungicida y/o fungistática de los tratamientos

Al obtener los resultados del índice de inhibición micelial (*IM*), estos arrojaron que los tratamientos empleados presentaron una inhibición del 100%; por lo cual se prosiguió a determinar el efecto fungicida o fungistático que consistió en obtener un explante discoidal

de cada uno de los tratamientos probados en donde no hubo desarrollo fúngico. Posteriormente se transfirió a una caja Petri con medio de cultivo PDA y se incubó a una temperatura de 25°C durante 7 días; si se observaba desarrollo de la colonia el efecto del tratamiento sería fungistático y en el caso de que no presentara crecimiento este tendría un efecto fungicida (Figura 36).

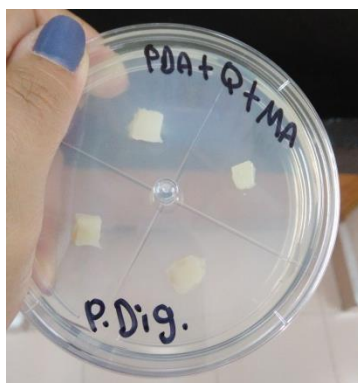


Figura. 36 Explante discoidal en medio PDA

Al realizar esta prueba se observó que el quitosán modificado al 1% pudo inhibir totalmente el crecimiento del hongo, de la misma forma que el Quitosán al 1% con todas las concentraciones de aceites esenciales y para los cuatro tipos de hongos; esto quiere decir que este tratamiento tuvo un efecto fungicida, por lo que se decidió utilizar como recubrimiento final solamente el quitosán modificado al 1% para la experimentación *in vivo*.

3.3 Evaluación del quitosán mejorado al 1% en vivo

3.3.1 Evaluación de pruebas físicas y químicas

3.3.1.1 Pérdida fisiológica de peso

Como se mencionó en la metodología se realizó la prueba de pérdida fisiológica de peso. El análisis estadístico ANOVA nos mostró que no había una diferencia significativa en la pérdida de peso de ambos tratamientos (con quitosán mejorado, sin quitosán) (Figura 37).

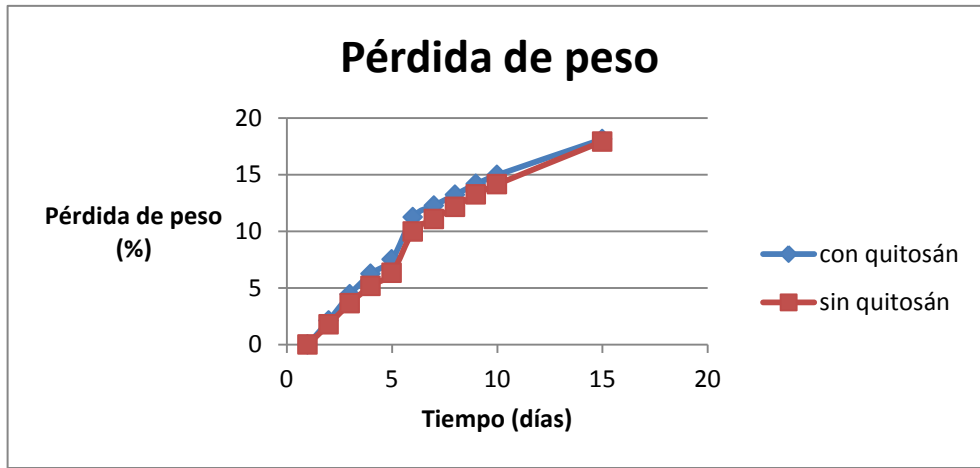


Figura. 37 Pérdida fisiológica de peso durante quince días.

Al pasar los días se observó que el fruto se iba endureciendo e incluso disminuyó ligeramente su tamaño, como se observa en las siguientes figuras 38 y 39.



Figura. 38 Limón con tratamiento a los quince días.



Figura. 39 Limón sin tratamiento a los quince días.

También se puede observar que el fruto con el tratamiento de quitosán modificado (Figura 38) tiene un color más oscuro que el que no tiene ningún tratamiento, esto se debe a que las películas en el área de alimentos funcionan como barreras selectivas para la transferencia de gases, humedad y nutrientes; son utilizadas porque ayudan a disminuir el deterioro de productos alimenticios causado por factores ambientales (Jiménez Munguía, 2012).

Para la pérdida fisiológica se obtuvo que una hubo una diferencia significativa estadísticamente hablando, ya que visualmente como se observa en las figuras 38 y 39 los frutos con el recubrimiento de quitosán mejorado 1% se muestran con un color un poco más oscuro esto es debido a que el tratamiento retardo un poco más su maduración que los que no tienen tratamiento.

3.3.1.2 Contenido de jugo

Los limones deben presentar un grado de madurez fisiológica o punto sazón mínimo, el cual se determina por el contenido de jugo. Para esta prueba se observó que físicamente los frutos con el quitosán modificado tenían un color oscuro y cabe mencionar que mientras más oscuro sea el color, menor cantidad de jugo se obtendrá (“ MÉXICO CALIDAD SUPREMA ’ EN LIMÓN MEXICANO,” 2005). Al partirlos y exprimirlos, se extrajo una cantidad considerable de jugo y su apariencia interna era bastante aceptable (figura 41); esto se debe a que el quitosán al formar una capa semipermeable dejaba respirar al fruto y permitió mantener al fruto en buen estado internamente.

Como lo menciona la norma de la Calidad Suprema el contenido de jugo no debe ser menor de 30 % en base a su peso, los limones con el tratamiento de quitosán modificado cumplieron con esta parte.



Figura. 40 Limón con quitosán modificado 1% a la tercera semana



Figura. 41 Limón partido a la tercera semana con tratamiento de quitosán modificado

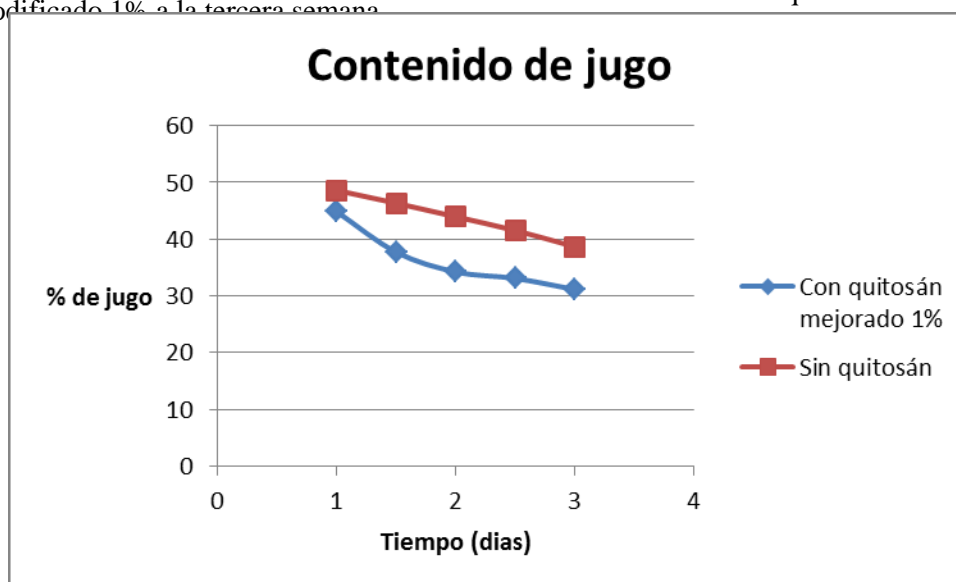


Figura. 42 Contenido de jugo de limón con quitosán mejorado y sin quitosán

3.3.1.3 Determinación de pH

Como se menciona en la metodología se realizó por la norma mexicana y los valores se encuentran dentro de lo indicado, ver tabla 1.

| Día | Limón con quitosán al 1% | Limón sin recubrimiento |
|-----|--------------------------|-------------------------|
| 7 | 2.8 | 2.3 |
| 14 | 2.7 | 2.2 |
| 20 | 2.8 | 2.2 |

Tabla 1 pH de jugo de limón con quitosán mejorado y sin quitosán

3.3.1.4 Acidez

Se sustituyeron los datos obtenidos en la ecuación que se encuentra en el apartado de anexos, para así obtener la cantidad de ácido cítrico contenido en el jugo de limón recubierto con quitosán al 1% y en el fruto sin recubrimiento.

| DIA | Ácido cítrico contenido en limón con quitosán al 1% (g/ml) | Ácido cítrico contenido en limón sin recubrimiento (g/ml) |
|-----|---|---|
| 7 | 3.762 | 3.907 |
| 10 | 3.65 | 4.0245 |
| 14 | 3.538 | 4.142 |
| 17 | 3.2535 | 4.465 |
| 20 | 2.969 | 4.788 |

Tabla 2 Ácido cítrico contenido en el jugo de limón recubierto con quitosán 1% y limón sin recubrimiento

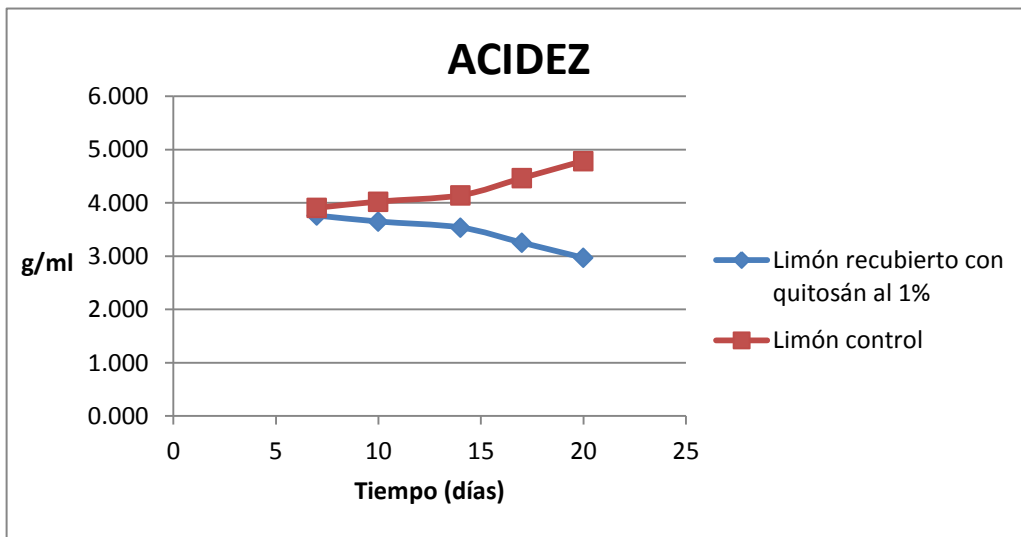


Figura. 43 Cantidad de ácido cítrico contenido en el jugo de limón durante veinte días

La teoría menciona que en el zumo de limón se encuentran entre 5-8 g/ml de ácido cítrico, lo que se observa que la acidez del jugo de limón si se vio afectada por el recubrimiento de quitosán mejorado.

La concentración del ácido depende de su maduración, época del año en el que fue cosechado el fruto y la temperatura.

CONCLUSIONES

- Se aislaron de los limones enfermos los siguientes hongos: *Alternaria alternata*, *Geotricum candidum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*
- La concentración de quitosán adecuada para inhibir su crecimiento fue de 200ppm
- En la experimentación *in vitro*, se observó que el quitosán mejorado 1% , así como los tratamiento de quitosán 1% junto con cada uno de los aceites esenciales tomillo, canela, clavo y en mezcla, inhibió por completo el crecimiento de los hongos *Alternaria alternata*, *Geotricum candidum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.
- Que el quitosán mejorado al 1% tuvo un efecto fungicida
- Para la experimentación *in vivo* debido a los resultados obtenidos previamente en la experimentación *in vitro* se decidió utilizar como recubrimiento final quitosán mejorado 1% por su efecto fungicida.
- Para el contenido de jugo se observa que se extrajo más jugo en los limones con tratamiento y que estos se encuentran dentro de los valores permitidos del 30%.
- Para el caso de la acidez se observa que está debajo de los límites permitidos, en este parámetro se puede decir que el quitosán mejorado si jugó un papel importante como recubrimiento.

REFERENCIAS

- Aguilar-González, AE, López-Malo, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 1(2), 35–41.
- Alvarez Quintero, 2012. (2012). Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabólica y evaluación de la calidad poscosecha, 221.
- “ MÉXICO CALIDAD SUPREMA ” EN LIMÓN MEXICANO. (2005).
- Barrera Necha, 2008. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8(1995), 33–41.
- Black-solis, J., Ventura-aguilar, R. I., & Barrera-necha, L. L. (2017). Chemical characterization , compositional variability and mathematical modelling of the effect of essential oils in *Alternaria alternata* Caracterización química , variabilidad composicional y modelamiento, 204–226.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1612-5>
- Domínguez, E. y C. (2003). (2003). Aumento de la vida poscosecha del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) producido en Apatzingán, Michoacán., 5, 7.
- Froylan, R. N. (2008). *Evaluación de factores en cosecha y de manejo poscosecha que inciden en la calidad de frutos de limón mexicano*.
- Gallo, A. R., & Malo, A. L. (2011). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tomillo. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), 41–50.
- Holmes, G. y, & Eckert, Joseph W, 1999. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest citrus fungicides in California, 89(17), 6.
- Jiménez Munguía, 2012. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos : propiedades y aplicaciones, 2, 12.
- Mármol, Zulay, 2011. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones., 1, 53–58.
- Maya, C. (2017). Mexican fruit citrus in Japan’s market: Experiences and opportunities for Sinaloa. *México Y La Cuenca Del Pacífico*, 6(16), 107–142.
- Mota, J. L. (2003). Cadena Productiva del Cultivo de Limón Mexicano en el estado de Colima, México. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación*, 1–33.

- NMX-F-317-S-1978. (1978). DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. *Colpos.Mx*, 3–6. Retrieved from <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- NMX-FF-087-SCFI-2001. (2001). PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA USO HUMANO - FRUTA FRESCA - LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia* Swingle) - ESPECIFICACIONES (CANCELA A LA NON INDUSTRIALIZED FOOD PRODUCTS FOR HUMAN USE - FRESH FRUIT - MEXICAN LIME (*Citrus aurantifolia*).
- Palou, L., Jerbi, N., Taberner, V., & de la Fuente, B. (2016). Sinergia entre aditivos alimentarios y calor para el control no contaminante de la podredumbre amarga de los cítricos. In *Simposio Ibérico de Maturcao e Pós Colheita* (pp. 327–334). Retrieved from http://www.aphorticultura.pt/uploads/4/8/0/3/48033811/sinergia_entre_aditivos_alimentarios_y_calor_para_el_control_no_contaminante_de_la_podredumbre_amarga_de_los_citricos.pdf
- Reyes Jurado, 2012. (2012). Vapores de Aceites Esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. Reyes Jurado 2012.
- Rico, 2012. (2012). Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales en la calidad microbiológica de mango (*Mangifera indica* L.) minimamente procesado.
- Rodriguez, E. N. S. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas., 7, 153–170.
- Rodriguez, I. C. A. (2011). *Cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en Rhizopus stolonifer por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales.*
- SAGARPA. (2016). agrícola nacional CÍTRICOS Y TORONJA Mexicanos.
- Tamayo, P. J., & Carvalho, C. P. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp., 15, 7–14.
- Técnica, U., Norte, D. E. L., Del, Q., & Sutil, L. (2006). Universidad técnica del norte.
- Vazquez Briones M.C., & Guerrero Beltrán J.A. (2013). Recubrimiento de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5–14. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Vazquez-Briones-et-al-2013.pdf>
- Veloz, C. S. (2006). PERSPECTIVAS DEL MANEJO POSTCOSECHA DE LIMAS ÁCIDAS EN MÉXICO Crescenciano Saucedo Veloz.

ANEXOS

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento de las cepas de hongos fitopatógenos del limón fue agar papa-dextrosa (PDA) marca BIOXON. La preparación de este medio se llevó a cabo pesando 39g de agar para 1000 ml de agua destilada; y se homogenizó con agitación suave. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 15lb de presión, durante 15 minutos y a 121°C; se dejó enfriar y se vació en cajas Petri estériles en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar .

El medio que se empleó para el crecimiento de la cepa del hongo *Alternaria alternata* fue agar papa-zanahoria. La preparación de este medio se llevó a cabo pesando 20 g de papa blanca, 20 g de zanahoria y 20 g de agar; la papa y la zanahoria se colocaron en 1 litro de agua para obtener una infusión; a la cual se adicionó el agar, y se esterilizó en autoclave 15 lb de presión por 15 minutos, se dejó enfriar un poco y se vació en cajas Petri estériles en una campana de flujo laminar.

Para la identificación de *Penicillium italicum* se utilizó el medio Extracto de malta agar (EMA); el cual se preparó con 20 g de extracto de malta, 1 g de peptona, 20 g de dextrosa, 15 g de agar y todo esto se disolvió en 1 litro de agua destilada para posteriormente esterilizarse a 15lb de presión durante 15 minutos, se dejó enfriar y se vació en cajas Petri estériles.

Y por último para la identificación de *Penicillium digitatum* se utilizó el medio de cultivo Czapek extracto de levadura agar (CYA), el cual se preparó con 1g de K₂HPO₄ , 10g de Czapek concentrado, 5g de extracto de levadura, 30g de sucrosa, 15g de agar y todo esto en 1 litro de agua destilada, todo se homogeniza dentro del matraz y se esteriliza a 15lb de presión por 15 minutos, y se vierte en las cajas Petri estériles.

ECUACIONES

Ecuación para medir crecimiento micelial (IM)

Donde C_C representa el crecimiento en el control y C_T el crecimiento en el tratamiento.

$$IM = \left(\frac{C_C - C_T}{C_C} \right) \times 100$$

Ecuación para el cálculo de contenido de jugo.

$$\% \text{ Contenido de jugo} = \frac{P_2 * 100}{P_1} \quad \text{Ecuación. 2}$$

DONDE:

P₂= Jugo extraído (g)

P₁= Peso total del fruto (g)

o de Ácido cítrico:

$$ACIDEZ = \frac{(GB)(N)(P_{eq})}{A} \quad \text{Ecuación. 3}$$

DONDE:

GB= Gasto de bureta

NaOH (ml)

N= Normalidad NaOH (0.1

N)

P_{eq}= Peso equivalente de
ácido cítrico

A= Muestra de jugo (ml)