UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

RECUBRIMIENTO BIODEGRADABLE ANTIFÚNGICO PARA LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE PAPAYA (*Carica papaya* L.)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
MEXICO
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

TERESA DE JESUS CORNEJO VIVAR

DICIEMBRE 2015

Chapingo, Estado de México

Instituto de Horticultura

RECUBRIMIENTO BIODEGRADABLE ANTIFÚNGICO PARA LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE PAPAYA (*Carica papaya* L.)

Tesis realizada por **Teresa de Jesus Cornejo Vivar** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____
DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR: _____
DR. JOEL CORRALES GARCÍA

ASESOR: _____
DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR: _____
DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

DEDICATORIA

A mis padres
María Yolanda Vivar Vivar y Jose Isabel Cornejo Díaz
por enseñarme el valor de la educación y
motivarme para continuar de pie en el camino.

Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca durante el periodo de realización de la maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme ser parte de ésta gran Institución.

Al Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia por por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A mi comité asesor integrado por la Dra. María del Rosario García Mateos, Dr. Joel Corrales, Dr. Marcelo Acosta y Dr. Jaime Sahagún, por su dirección asesoría, aportaciones y apoyo total en la realización de ésta investigación, les agradezco mucho.

A la Asociación Agrícola Local de Productores de Cítricos del Municipio de Tuxpan, Ver., especialmente al Ing. Felipe Jiménez Nolasco y a su hija Jazmín Jiménez Castillo, por el material donado para éste proyecto y por las facilidades brindadas.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. en especial al Grupo de Investigación de Biopolímeros y al Dr. Jaime Lizardi por el material donado para la elaboración de éste proyecto.

A la Dra. Teresa Colinas, Dr. Gustavo Almaguer, Ing. Félix Esparza, Ing. Alfredo Jimenez, por las facilidades otorgadas para el uso de material y equipo de laboratorio.

A los laboratoristas Adrián, Doris, Sinaí, Jonathan, Ing. Cecilio les agradezco su apoyo.

A la Dra. Willy Castillejos por su tiempo y su dedicación, por ser una excelente profesora.

A Ángeles, Naye, Carmen, Bety, Dra. Paty Landa, por los momentos compartidos en los laboratorios y por su apoyo.

A mi hermano por su compañía y su tiempo compartido en familia, te aprecio mucho y te quiero mucho.

A un gran profesionista e incomparable persona Sergio M. Méndez Zúñiga, por las motivaciones, el apoyo incondicional, las experiencias y el tiempo compartido juntos muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS…….……IX

ÍNDICE DE FIGURAS……..……X

RESUMEN…….……XII

I. INTRODUCCIÓN……1

2. OBJETIVOS……..3

2.1.Objetivo general……..3

2.2.Objetivos específicos……..……3

3. HIPÓTESIS……..3

4. REVISIÓN DE LITERATURA……..4

4.1.Pérdidas poscosecha por hongos fitopatógenos……..……4

4.1.1. Importancia de productos hortofrutícolas y pérdidas poscosecha por hongos fitopatógenos…..……4

4.1.2.Importancia de la papaya…….5

4.1.3.Pérdidas poscosecha en papaya ..……6

4.1.4.Principal enfermedad de papaya en poscosecha …..……..…7

4.1.5.Proceso de infección de *C. gloeosporioides* ……7

4.1.6.Métodos de control de *C. gloeosporioides*.……9

4.2.Recubrimientos biodegradables antimicrobianos: nueva tecnología en poscosecha..……..10

4.2.1.Contaminación ambiental por empaques plásticos……10

4.2.2.Películas y recubrimientos biodegradables ……10

4.2.3.Películas y recubrimientos biodegradables activos ……11

4.2.4.Películas y recubrimientos biodegradables activos con actividad antimicrobiana ……12

4.2.5.Propiedades de recubrimientos……13
4.2.6.Formación de recubrimientos……13
4.2.7.Métodos de aplicación de recubrimientos en el fruto……..14
4.2.8.Componentes de los recubrimientos biodegradables antimicrobianos……15
4.2.8.1.Biopolímeros ……15
4.2.8.2.Quitina fuente de quitosano……15
4.2.8.2.1.Quitosano ……16
4.2.8.2.2.Actividad antifúngica del quitosano……18
4.2.8.2.3.Grado de desacetilación del quitosano……19
4.2.8.3.Plastificantes……19
4.2.8.4.Aditivos……20
4.2.8.5.Aceites esenciales: aditivos antimicrobianos……20
4.2.8.5.1.Actividad antifúngica de aceites esenciales……22
4.3.Uso de residuos agroindustriales para la elaboración de recubrimientos biodegradables ……23
4.3.1.Residuos agroindustriales……23
4.3.2.Residuos de cítricos ……24
4.3.3.Residuos de productos que contienen quitosano……25
5. MATERIALES Y MÉTODOS ……27
5.1.Extracción de aceite esencial……27
5.2.Evaluación *in vitro* de los aceites esenciales ……29
5.2.1.Aislamiento de *C. gloeosporioides*……29
5.3.Ensayos biológicos……30
5.4.Elaboración de la película biodegradable ……32
5.4.1.Obtención de materiales del recubrimiento……32
5.4.2.Determinación del grado de desacetilación del quitosano……32

5.4.3.Elaboración de la película biodegradable ……..33
5.5.Caracterización fisicoquímica de la película biodegradable……..34
5.5.1.pH de la emulsión……..34
5.5.2.Grosor……34
5.5.3.Humedad ……34
5.5.4.Solubilidad en agua……34
5.5.5.Color ……35
5.5.6.Biodegradabilidad……36
5.6.Evaluación *in vivo* de las películas como recubrimiento……36
5.6.1.Material biológico……36
5.6.2.Inoculación de *C. gloeosporioides* ……37
5.6.3.Aplicación del recubrimiento……37
5.7.Medición de parámetros físicos de la fruta tratada……38
5.7.1.Pérdida de peso……38
5.7.2.pH……38
5.7.3.Sólidos solubles totales……38
5.7.4.Color de la cáscara ……38
5.7.5.Respiración……39
5.7.6.Firmeza……40
5.7.7.Evaluación del daño causado por antracnosis……40
5.8.Análisis estadísticos……41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..42
6.1.Extracción de los aceites esenciales ……42
6.2.Evaluación *in vitro* de los aceites esenciales……43
6.3.Caracterización de la película biodegradable……46
6.3.1.Grado de desacetilación de quitosano ……46
6.3.2.Propiedades fisicoquímicas de la película biodegradable……47

6.3.3.Color ……49

6.3.4.Biodegradabilidad……51

6.4.Evaluación *in vivo* del recubrimiento biodegradable ……52

6.4.1.Pérdida de peso……52

6.4.2.pH y ºBrix……54

6.4.3.Color……55

6.4.4.Respiración……58

6.4.5.Firmeza……60

6.4.6.Daño causado por antracnosis *in vivo*……61

6.4.7.Duración del recubrimiento……63

7. CONCLUSIONES……64

8. BIBLIOGRAFÍA……65

9. ANEXO 1……84

10. ANEXO 2……85

11. ANEXO 3……86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especificaciones de quitosano utilizado para la elaboración de los recubrimientos biodegradables……32

Cuadro 2. Componentes de los tratamientos formulados para la elaboración de recubrimientos biodegradables……33

Cuadro 3. Escala para determinar el área afectada con antracnosis en frutos de papaya ……40

Cuadro 4. Halo de inhibición y porcentaje de inhibición *in vitro* de los aceites esenciales de *C. sinencis, C. reticulata* y *C. paradisi* contra *C. gloeosporioides*……44

Cuadro 5. Resultados de la determinación del grado de desacetilación del quitosano por el método de titulación potenciométrica……46

Cuadro 6. Efecto de la concentración de aceite esencial de *C. reticulata* en las propiedades de pH, grosor, % humedad y % de solubilidad de películas de quitosano..…..……48

Cuadro 7. Valores de L*, *hue* y *chroma* evaluados en películas de quitosano y aceite esencial de *C. reticulata*..……50

Cuadro 8. Porcentaje de degradación de las películas en función del tiempo de contacto con el suelo.…….……51

Cuadro 9. Efecto de la concentración de aceite esencial de *C. reticulata* en el pH y ºBrix en pulpa de papaya a los 0 y 10 d de almacenamiento a 20 ºC ± 2..……54

Cuadro 10. Sintomatología, índice de severidad y porcentaje de infección de *C. gloeosporioides* en papaya ……62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1. Estructura química de quitosano y su producción a partir de quitina (tomado de Castañeda *et al.*, 2011)..……17

Figura 2. Formula estructural de compuestos encontrados en aceites esenciales (Tomado de Burd, 2004)……23

Figura 3. Especies de cítricos para extracción de aceite esencial: A) *C. sinensis;* B) *C. reticulata* y C) *C. paradisi*…..……27

Figura 4. Extracción de aceite esencial de cítricos por hidrodestilación con trampa Clevenger..…….28

Figura 5. Aislamiento en laboratorio de *C. gloeosporioides in vitro* a partir de fruta de papaya con presencia de antracnosis..……29

Figura 6. Conteo de esporas de *C. gloeosporioides* en cámara Neubauer..31

Figura 7. Prueba de solubilidad de la película por el método descrito por Gontard *et al.* (1994)..……35

Figura 8. A) Medición de color de la película con colorímetro (HunterLab, MiniScan XE Plus, USA)..……35

Figura 9. Prueba de biodegradación de películas con la metodología descrita por Pereda *et al.* (2014)……..36

Figura 10. Escala de maduración de la fruta papaya Maradol descritos por Santamaría *et al.* (2009b)..……37

Figura 11. Aplicación manual de la emulsión formadora del recubrimiento en la superficie de la papaya..……38

Figura 12. Área en la epidermis de la fruta para medición de color..……39

Figura 13. Aceites esenciales de: A)*C. cinensis* (Naranja), B) *C. reticulata* (Mandarina) y C) *C. paradisi* (Toronja)……42

Figura 14. A) Conidios del hongo *C. gloeosporioides* vistos al microscopio. B) crecimiento del hongo *C. gloeosporioides* en medio PDA a los 7 días…44

Figura 15. Pérdida de peso de frutas de papaya respecto al tiempo de almacenamiento.……52

Figura 16. Variación en los indicadores de color (*hue y chroma*) en papaya con y sin recubrimiento a los 0 y 10 días de almacenamiento ..……56

Figura 17. Variación en los indicadores de color en papaya durante 10 d de almacenamiento: A) Valores de *hue*; B) Valores de L*; C) valores de *chroma*……...57

Figura 18. Respiración en papaya durante el almacenamiento: A) Producción de CO_2; B) Producción de etileno ..……59

Figura 19. Firmeza en papaya al día 10 de almacenamiento……61

Figura 20. Desprendimiento del recubrimiento biodegradable de la superficie de papaya al día 10 de almacenamiento a temperatura ambiente……63

RECUBRIMIENTO BIODEGRADABLE ANTIFÚNGICO PARA LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE PAPAYA (*Carica papaya* L.)

BIODEGRADABLE ANTIFUNGICAL COATING FOR POSTHARVEST CONSERVATION OF PAPAYA (*Carica papaya* L.)

T. de J. Cornejo-Vivar[1] y R. García-Mateos[2].

RESUMEN

El uso de fungicidas químicos y plásticos sintéticos utilizados en el manejo poscosecha de productos hortofrutícolas han tenido un impacto negativo en la salud de consumidores y en el medio ambiente. La papaya es una fruta climatérica altamente perecedera, las principales pérdidas poscosecha se deben al deterioro causado por antracnosis. La actividad de extractos vegetales en la inhibición del desarrollo de microorganismos ha contribuido a la identificación de metabolitos secundarios como los aceites esenciales con actividad antifúngica. En el presente trabajo se elaboró un recubrimiento biodegradable antifúngico a base de quitosano y adicionado con aceite esencial de cítricos y se evaluó su efecto en las propiedades físico-químicas de papaya. Se preparó una solución formadora del recubrimiento con quitosano (1 % p/v), glicerol (0.5 % v/v), ácido acético (v/v), aceite esencial de *C. reticulata* (0.5, 1 y 1.5 %) y Tween® 80 (0.1 %). La solución se aplicó en la epidermis de las papayas y éstas se almacenaron a temperatura ambiente (24 ºC ± 2) por 10 días. Las variables evaluadas en fruta fueron color, pH, ºBrix, firmeza, respiración, peso y daño por antracnosis. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar y una comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los tratamientos con recubrimiento retardaron el cambio de coloración de la epidermis de la fruta y mantuvieron valores de firmeza altos. Los ºBrix, la pérdida de peso y la tasa respiratoria de las frutas con recubrimiento fueron significativamente menores respecto al testigo. El daño por antracnosis disminuyó en un 60 % en frutas con recubrimiento.

Palabras clave: aceite esencial, cítricos, quitosano, antracnosis.

[1]Tesista
[2]Director

ABSTRACT

The use of chemical fungicides and synthetic plastics in postharvest management of horticultural products has had a negative impact on the health of consumers and the environment. The papaya is a highly perishable climacteric fruit; the main postharvest losses are due to deterioration caused by anthracnose. The activity of plant extracts in inhibiting the development of micro-organisms has contributed to the identification of secondary metabolites, such as the essential oils with antifungal activity. In this work a biodegradable antifungal coating based on chitosan and supplemented with citrus essential oil was developed and its effect on the physico-chemical properties of papaya was evaluated. The coating solution was prepared with chitosan (1 % w/v), glycerol (0.5 % v/v), acetic acid (v/v), essential oil of *C. reticulata* (0.5 , 1 and 1.5 %) and Tween® 80 (0.1 %). The solution was applied in the epidermis of the papayas, which were then stored at ambient temperature (24 °C ± 2) for 10 d. The variables evaluated in fruit were color, pH, ºBrix, firmness, respiration, weight and damage by anthracnose. With the data obtained was an analysis of variance (ANOVA) under a completely randomized design and Tukey´s comparison of means test ($\alpha \leq 0.05$) were performed. The treatments with covering slowed the discoloration of the skin of the fruit and maintained high values of firmness. The °Brix, weight loss and the respiratory rate of the coated fruit were significantly lower compared with the control. The anthracnose damage decreased by 60 % in coated fruits.

Keywords: essential oils, citrus, chitosan, anthracnose.

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas frescas son productos perecederos, y están propensos a sufrir pérdidas en su calidad durante la poscosecha. El deterioro de estos productos se debe principalmente a su actividad biológica (respiración, transpiración) y a la invasión de organismos vivos (insectos, hongos, bacterias). Las pérdidas poscosecha ocurren en cualquier etapa del proceso de mercadeo e implican un considerable daño económico para los productores y comercializadores, por lo que el manejo poscosecha de los productos agrícolas, especialmente de los altamente perecederos, es de gran importancia (IICA, 1986; FAO, 1987).

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y poscosecha de frutas y hortalizas, estos son responsables de importantes pérdidas económicas. Se estima que la magnitud de las pérdidas poscosecha en frutas y hortalizas frescas es de 5 a 25 % en países desarrollados y de 20 a 50 % en países en desarrollo (Kader *et al.,* 2011). Entre las enfermedades fúngicas de mayor frecuencia que afectan diversas frutas de importancia comercial, específicamente la papaya, es la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Hernández-Albiter *et al.*, 2005), causante de pérdidas del 20 a 100 % (Zavala-Leon *et al.*, 2005).

El uso de fungicidas químicos para el control de hongos en productos hortofrutícolas se ha restringido debido a sus efectos negativos en humanos y al ambiente (Tripathi y Dubey, 2004). Además, la aplicación intensa de productos sintéticos se ha generado resistencia en los microorganismos patógenos (Bautista-Baños, 2005). Debido a lo anterior surge la necesidad de buscar alternativas naturales que controlen las pudriciones y que no afecten al ambiente y a la salud humana, entre las alternativas se destaca el uso de recubrimientos biodegradables (Tripathi y Dubey, 2004).

Las películas y recubrimientos biodegradables antimicrobianos han innovado el concepto de empaque y se han desarrollado para el control de microorganismos y para aumentar la vida útil del producto. Los materiales para la elaboración de empaques biodegradables son numerosos, entre los que destacan los polímeros de origen natural como el quitosano (Tharanathan, 2003). Por otro lado, la actividad de extractos vegetales en la inhibición del desarrollo de microorganismos ha contribuido a la identificación de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (García *et al.*, 2004). Viuda *et al*. (2008) consideran que los aceites esenciales obtenidos de cítricos pueden ser una alternativa en la industria de alimentos, por la actividad antifúngica que presentan.

En el presente trabajo se elaboró un recubrimiento biodegradable antifúngico a base de quitosano y adicionado con aceite esencial de cítricos y se evaluó su efecto en las propiedades físico-químicas en frutas de papaya.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Elaborar un recubrimiento biodegradable antifúngico de quitosano y aceite esencial de cítricos para reducir los daños provocados por *C. gloeosporioides* en frutas de papaya (*Carica papaya* L.) en poscosecha con la finalidad de aumentar su vida de anaquel.

2.2 Objetivos particulares

Aislar, identificar, purificar y propagar cultivo monospórico de *Colletotricum gloeosporioides* a partir de fruta de papaya infectada.

Extraer el aceite esencial del epicarpio de tres variedades de cítricos (*Citus cinensis*, *Citrus. reticulata* y *Citrus paradisi*) y evaluar *in vitro* su efecto en el control de *Colletotricum gloeosporioides*.

Elaborar una película de quitosano adicionada con aceite esencial de frutas cítricas y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas.

Evaluar *in vivo* el efecto del recubrimiento biodegradable en frutas de papaya (*Carica papaya* L.).

3. HIPÓTESIS

El recubrimiento biodegradable antifúngico elaborado de quitosano y aceite esencial de frutas cítricas reducirá los daños causados por *C. gloeosporioides* en papaya poscosecha y aumentará su vida de anaquel.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Pérdidas poscosecha por hongos fitopatógenos

4.1.1 Importancia de productos hortofrutícolas y pérdidas poscosecha por hongos fitopatógenos

Los productos hortofrutícolas son alimentos básicos en la dieta humana, pueden considerarse de alto valor nutritivo dada la cantidad de nutrientes que aportan a la alimentación humana en forma de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, además contienen un alto porcentaje de agua, de 80 a 90 %. Actualmente, existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de frutas y hortalizas debido principalmente por la preocupación de una dieta equilibrada, con menor proporción de grasas y aceites y con mayor consumo de fibra, vitaminas y minerales. Esto se fundamenta en parte, por la menor necesidad calórica de la vida moderna, caracterizada por un mayor confort y sedimentarismo. El otro factor que determina esta tendencia es la mayor conciencia de la importancia de la dieta en la salud y longevidad (FAO/WHO, 2003).

A escala mundial, dentro del sector agrario, el subsector de frutas y hortalizas destaca por su importancia económica y dinamismo. La producción hortofrutícola se mantiene como una industria competitiva a nivel mundial (Arcas y Ruiz, 1999). Sin embargo, los productos hortofrutícolas tienen el inconveniente de ser perecederos, bien por causas endógenas (reacciones enzimáticas) o bien por causas exógenas (agentes físico-químicos), por lo que se que dispone de ellos en poscosecha durante períodos cortos de tiempo (Pineda, 2011).

Según la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (2003), la contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos provoca gran porcentaje

pérdidas en la industria hortofrutícola. El crecimiento microbiano en la superficie de éstos productos es la principal causa de su deterioro (FAO/ WHO, 2003). Se ha reportado que durante el manejo poscosecha de los productos hortofrutícolas se pueden estimar pérdidas hasta del 40 % del total cosechado, estas varían entre productos, áreas de producción y época del año. De las principales razones que generan estas pérdidas son la aparición y desarrollo de enfermedades causadas principalmente por hongos de diversos géneros (Ramos-García *et al*., 2010).

Generalmente, en el caso de los hongos, éstos no aparecen durante el crecimiento de las plantas, en algunos casos permanecen en estado latente hasta la maduración del producto hortícola y otros se adquieren durante la cosecha, el transporte y/o el manejo del producto (Beverlya *et al*., 2008).

La necesidad de disponer de productos hortofrutícolas frescos durante todo el año, ha llevado desde antiguo al agricultor a desarrollar una serie de transformaciones o procesos para conseguir un mayor período de utilización de éstos. El concepto de usar un recubrimiento activo comestible y biodegradable para inhibir el deterioro y la patogenicidad de los microorganismos ha recibido un interés considerable en el último tiempo (Arcas y Ruiz, 1999).

4.1.2 Importancia de la papaya

La papaya (*Carica papaya* L.) pertenece a la familia de las caricáceas. Es un fruto nativo de América y Centroamérica, crece en clima tropical y subtropical. Las principales variedades que se cultivan son Maradol (que ocupa la mayor superficie y volumen exportado), Hawaiana y la criolla. México ocupa el sexto lugar como productor de papaya a nivel mundial y es el principal exportador. La producción en México fue aproximadamente de 300 mil ton, de la cual se exportaron 131391 ton, por un valor de 87 millones de dólares, ubicándose como el primer exportador mundial en el 2014. La mayor parte de las exportaciones de papaya se destinan a los Estados Unidos y Canadá, mercados dominados casi por completo por la papaya mexicana de la variedad Maradol (SAGARPA, 2015).

Las principales plantaciones de papaya en México están ubicadas al suroriente del país. El estado que ocupa el primer lugar en producción es Veracruz con 2500 ha sembradas (29 % de la superficie sembrada) , seguido de Colima con un 23 %, Michoacán 20 %, Chiapas 10 % (SAGARPA, 2015).

4.1.3 Pérdidas poscosecha en papaya

En los últimos años la superficie sembrada de papaya ha disminuido hasta en 50 % debido a problemas fitopatológicos en campo, pérdidas en poscosecha y a su corta vida de anaquel (Osuna-García *et al.*, 2009). La papaya es un producto climatérico perecedero con una corta vida de anaquel, se cosecha en madurez fisiológica para extender su periodo de comercialización. Ésta madurez se identifica por un color amarillo-naranja en 1/4 de la superficie del fruto (Sañudo *et al.*, 2008). Los frutos de papaya comienzan su maduración con la aparición de rayas longitudinales claras que se tornan progresivamente amarillentas (Santamaría *et al.*, 2009b).

El proceso de maduración provoca perdida de peso, senescencia y deterioro de los frutos (Osuna-García *et al.*, 2009). Su rápido deterioro es resultado de su alto contenido de agua, de su alta tasa de respiración y de su producción autocatalítica de etileno que se traduce en elevar la temperatura durante su almacenamiento, provocando el reblandecimiento de su estructura y cambios en color y sabor (Télles-Pichardo *et al.,* 2013).

Por otra parte, los frutos de papaya presentan diversos problemas fitosanitarios tales como plagas y enfermedades virales y fungosas de gran importancia mundial. Dentro de estas últimas se señala a la antracnosis una de las principales enfermedades de los frutos de papaya en poscosecha (Osuna-García *et al.*, 2009). Para mejorar o aumentar la vida útil de papaya poscosecha se han utilizado diversos tratamientos, tales como: tratamiento con agua caliente, almacenamiento con atmósferas controladas y/o modificadas, irradiación gamma, fungicidas químicos, controladores biológicos, y recientemente el uso de recubrimientos comestibles y/o biodegradables (Télles-Pichardo *et al.,* 2013).

4.1.4 Principal enfermedad de papaya en poscosecha

La antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, es una de las enfermedades que afecta a frutos de importancia comercial, sobre todo en regiones con temperaturas y humedades relativas elevadas. Generalmente, se presenta en todas las etapas fenológicas del cultivo, y causa pérdidas considerables en la producción y poscosecha de frutos tropicales entre ellos la papaya. En México, la principal limitante fitopatológica de la papaya es la antracnosis, causando pérdidas de 40 a 100 %, cuyos síntomas son mancha chocolate (café), pelado y pudrición basal del fruto (Acosta *et al.*, 2001).

En México esta enfermedad se encuentra diseminada en entidades federativas donde se producen frutas tropicales y subtropicales, con ataques destructivos en la floración y fructificación (Aguilar-Alonso *et al.*, 2013).

El hongo afecta hojas, ramas, inflorescencias y frutos, ocasionando severos daños que demeritan la calidad externa e interna de los frutos en cosecha y poscosecha, lo que causa pérdida de valor comercial y menor rendimiento por unidad de superficie. La enfermedad inicia con manchas pequeñas y redondas, tornándose acuosas y de color oscuro cuando está en estado avanzado. Además de provocar daño superficial, la lesión también penetra en el fruto deteriorando la pulpa, provocando que los frutos se pudran totalmente y se desprendan de la planta con facilidad (Suzuki *et al.*, 2010) .

4.1.5 Proceso de infección de *Colletotrichum gloeosporioides*

El hongo posee hifas septadas y produce apresorios clavados (Roca *et al.,* 2000) ovalados, con dimensiones de 4 a 12 µm de longitud (Rodríguez-López *et al.*, 2013). Los conidios son hialinos, variables en tamaño, de forma cilíndrica y obtusos en el ápice, con medidas de 6 a 25 µm de largo y 4 a 6 µm de ancho (Cano *et al.*, 2004). En medio de agar simple el 98 % de los conidios son uninucleados, incrementándose en medios líquidos a los binucleados (Jeffries *et al.,* 1990). El hongo puede infectar entre los 20 y 28 ºC, pero su temperatura óptima de crecimiento es de 27 ± 1 ºC en ambientes con humedad relativa de 80 a 100 %. El pH óptimo de crecimiento del hongo es de 5.5 a 7 (Beltrán y García, 2006; Rodríguez-López *et al.*, 2013).

Los conidios de *C. gloeosporioides* se producen dentro de acérvulos, mismos que son la fuente principal de inoculó para el desarrollo y diseminación de la enfermedad, su dispersión puede ser por aire o salpicaduras de agua de lluvia entre estructuras infectadas y estructuras sanas en la planta; al dispersarse los conidios se adhieren al hospedero por medio de una capa mucilaginosa compuesta de polisacáridos y glucoproteínas presente en el acérvulo, la cual se ha observado en el tubo germinativo y el apresorio de *C. gloeosporioides* (Huerta-Palacios *et al.*, 2009; Rodríguez-López *et al.*, 2013).

Una vez que el conidio de *C. gloeosporioides* se encuentra en la superficie, éste responde a las ceras epiculares del hospedante y al etileno, coincidiendo con la maduración del fruto; para tal efecto la señal del hospedante es el incremento en la producción de etileno en concentración internas cercanas a 0.2 μL L^{-1}, requiriendo el contacto del conidio con la superficie por un período de 2 h, necesarias para inducir la germinación y formación del apresorio (Kim *et al.*, 2000). En respuesta al etileno y la capa cerosa de la superficie del fruto, los conidios al germinar producen un tubo germinativo que se hincha en el ápice para formar una estructura denominada apresorio, el cual se adhiere firmemente a la superficie de la planta (Rodríguez-López *et al.*, 2013). El apresorio corresponde a una estructura plana, como un bulbo, que se forma cuando la hifa establece el contacto con la superficie e incrementa su diámetro, aumentando la zona de unión entre los dos organismos, lo cual permite que el patógeno se una con mayor firmeza a la planta. El apresorio penetra al tejido del hospedero y a la pared celular de la epidermis de manera directa (Cifuentes y García, 2006).

La penetración al fruto se inicia con la aparición de la hifa de penetración a través de un poro que se encuentra en la base del apresorio y se introduce a través de la cutícula de la pared celular de la planta. La penetración de la hifa en la cutícula y células epidérmicas del hospedero, involucra la fuerza mecánica a través de la alta presión de turgencia así como la acción enzimática mediante la secreción de “enzimas degradadoras de la pared celular”. Se inicia la aparición de lesiones necrotróficas en el hospedante

después de la inoculación del hongo mediante punción de la superficie del fruto. Después de 48 h se desarrollan hifas secundarias necrotróficas que degradan las paredes celulares cercanas al sitio de la infección (O´connell *et al*., 1996; Prusky *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2002).

La fase asintomática de la antracnosis cursa a partir de las 48 a 72 h después de la inoculación. Una vez formado el apresorio se produce la infección que permanece quiescente en las células epidérmicas de las células de las frutas, hasta que maduran y se ablandan durante el almacenamiento (Cifuentes y García, 2006).

4.1.6 Métodos de control de *Colletotrichum gloeosporioides*

En diferentes cultivos, el manejo de esta enfermedad se ha fundamentado en prácticas de control cultural y uso de fungicidas químicos como mancozeb, clorothalonil, captan, propiconazol, procloraz, benomil, thiabendazol y carbendazim. Sin embargo, el uso de algunas de estas moléculas químicas ha ocasionado el rechazo de fruta para exportación en mercados de Estados Unidos, Europa, Japón entre otros, debido a los altos contenidos de trazas encontrados en éstas (Gaviria-Hernández *et al.*, 2013).

Actualmente, se han explorado alternativas de control con productos a base de biocontroladores y extractos vegetales, que generalmente poseen compuestos biodegradables, de baja toxicidad y no son específicos en su modo de acción, lo que implica baja probabilidad de desarrollo de resistencia (Tripathi y Dubey, 2004). Reportes documentan el buen funcionamiento de productos biológicos en el control de C. gloeosporioides, como por ejemplo extractos ajo (*Allium sativum* L.), acuyo (*Piper auritum* HKB.), guayaba (*Psidium guajaba* L.) y eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus* Labill.) redujeron el crecimiento micelial en 54.3, 48.8, 47.7 y 39 %, respectivamente (Hernández *et al*., 2007).

4.2 Recubrimientos biodegradables antimicrobianos: nueva tecnología en poscosecha

4.2.1 Contaminación ambiental por empaques plásticos

El empaque de un alimento es aplicado para la conservación del mismo, tiene efecto sobre la conservación, distribución y mercadotecnia (Quintero *et al.,*2010). Los plásticos son ampliamente usados como materiales para empaque por sus extraordinarias propiedades fisicoquímicas y mecánicas. Generalmente, son químicamente inertes y bajo determinadas condiciones son moldeables en diferentes formas y estructuras. Además de ser livianos, los plásticos se fabrican a relativo bajo costo, proporcionan transparencia, resistencia y excelentes propiedades de barrera. Diferentes plásticos son utilizados en empaques para alimentos, siendo los más utilizados polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), polivinilacetato (PVA) y poliamidas (PA) como es el caso del Nylon 6 (Sandhya, 2010). Sin embargo, una vez que el alimento es consumido, el empaque se desecha y pasa a formar parte de las grandes cantidades de basura que se acumulan día a día en el planeta. La mayor parte de los materiales usados en la fabricación de empaques para alimentos son plásticos que provienen de una fuente no renovable y no son biodegradables (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltrán, 2012).

En las últimas décadas se ha realizado un número importante de estudios relacionados con el desarrollo de materiales de empaque, películas y recubrimientos, que puedan ser ingeridos junto con el alimento que protegen (películas comestibles) o que puedan descomponerse en corto tiempo como resultado de la acción de microorganismos y/o enzimas (películas biodegradables) (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltrán, 2012).

4.2.2 Películas y recubrimientos biodegradables

Un empaque biodegradable está definido por la American Society for Testing and Materials (ASTM) como aquel que es capaz de descomponerse en bióxido de carbono, metano, agua, compuestos inorgánicos o biomasa, siendo el mecanismo dominante de descomposición la acción enzimática de los microorganismos y los productos resultantes pueden ser obtenidos y

medidos en un periodo determinado de tiempo (ASTM, 2005). La biodegradación aerobia ocurre en presencia de oxígeno; los productos resultantes de este proceso de degradación son biomasas, dióxido de carbono, agua y compuestos inorgánicos. El grado de biodegradación del empaque va a depender de las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad, presión parcial del oxígeno, composición de la flora microbiana y pH del suelo (Kyrikou y Briassoulis, 2007).

Una película o recubrimiento biodegradable se define como una capa fina de material biodegradable que puede ser formada sobre un alimento como una cobertura o preformada como una película. Sus propiedades le permiten controlar la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas y lípidos, incluir en el sistema ingredientes alimentarios (antioxidantes, antimicrobianos y sabores), y/o mejorar la integridad mecánica y de manipulación del alimento (Krotcha y De Mulder-Johnston, 1997).

Los materiales utilizados para la elaboración de empaques biodegradables pueden ser polímeros de origen natural (proteínas, lípidos, almidón, quitosano, entre otros) (Tharanathan, 2003), entre ellos se encuentra el polisacárido quitosano, del cual se obtiene de la quitina (Tang *et al.,*2012).

4.2.3 Películas y recubrimientos biodegradables activos

El concepto de envases activos empezó con el cambio en las funciones de protección de alimentos al pasar de envases pasivos a activos. Los materiales de los envases primarios eran considerados como pasivos, refiriéndose a que su función se limitaba a la protección del alimento contra el oxígeno y humedad a través de una barrera inerte, recientemente diversos materiales han sido desarrollados para poder tener una serie de interacciones con el producto (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011).

Los empaques activos están directamente relacionados con el proceso de conservación. La definición de activo incluye varios aspectos para lograr extender la vida útil del alimento, éstos pueden ser la modificación de procesos fisiológicos, como la respiración de frutas y vegetales, procesos químicos como la oxidación de lípidos, procesos físicos como la

deshidratación, e incluso microbiológicos. Para cumplir con el proceso de conservación, generalmente los empaques activos contienen aditivos que desempeñan funciones específicas dentro del empaque con el objeto de modificar los procesos ya enunciados. Estos aditivos pueden generar sistemas adsorbentes o absorbentes para remover compuestos indeseables en la atmósfera del alimento, como podría ser el caso del oxígeno, etileno y agua. También es posible generar en el empaque sistemas de liberación controlada de compuestos que se requieren en la atmósfera del alimento, como el caso de CO_2, antioxidantes y antimicrobianos (Sierra *et al*., 2011).

4.2.4 Películas y recubrimientos biodegradables activos con actividad antimicrobiana

Una alternativa con potencial viable para la conservación de frutas y vegetales frescos son las películas y recubrimientos, que además de brindar protección, sirven como vehículos para incorporar aditivos específicos que refuerzan su funcionalidad como antioxidantes, colorantes y antimicrobianos (Cagri *et al.*, 2004). Las películas y recubrimientos antimicrobianos han innovado el concepto de empaque activo y se han desarrollado para reducir, inhibir o detener el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de los alimentos (Appendini y Hotchkiss, 2002).

Las principales tareas que un empaque antimicrobiano debe cumplir son: inocuidad de los alimentos, mantenimiento de la calidad y extensión de la vida de anaquel del producto. Los agentes antimicrobianos pueden ser incorporados de manera directa en los materiales de envase en forma de películas, recubrimientos, charolas y contenedores, o insertos en las bolsas (Martínez-Tenorio y López-Malo *et al.*, 2011).

Los agentes antimicrobianos tienen diferente actividad y afectan a diferentes microorganismos, es por ello, que se tienen que caracterizar los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos y clasificarlos para cada tipo de microorganismo. Ademas el mecanismo de acción antimicrobiano de los agentes es muy importante para entender su eficacia, así como sus limitaciones. Algunos agentes antimicrobianos inhiben el metabolismo

esencial, mientras que otros alteran la estructura de las paredes de las células de los microorganismos (Martínez-Tenorio y López-Malo *et al.*, 2011). Entre los productos que se han incorporado a la formulación de recubrimientos con actividad antimicrobiana se encuentran los extractos vegetales de hojas, de semillas, de cáscaras, polisacáridos, ácidos orgánicos, entre otros (Hernández-Ochoa *et al.*, 2011).

4.2.5 Propiedades de recubrimientos

El uso de películas o recubrimientos en aplicaciones alimentarias y en especial en productos altamente perecederos, como los de la cadena hortofrutícola, se basa en ciertas características como costo, disponibilidad, atributos funcionales, propiedades mecánicas (tensión y flexibilidad), propiedades ópticas (brillo y opacidad), su efecto barrera al flujo de gases, resistencia al agua, a microorganismos y su aceptabilidad sensorial. Estas características son influenciadas por parámetros como el tipo de material implementado como matriz estructural (conformación, masa molecular, distribución de cargas), las condiciones bajo las cuales se preforman las películas (solvente, pH, concentración de componentes, temperatura), y el tipo y concentración de los aditivos (plastificantes, antimicrobianos, antioxidantes, emulsificantes) (Guilbert *et al.*, 1996; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

El espesor de los recubrimientos es un parámetro importante, ya que afecta directamente las propiedades biológicas y la vida útil de la fruta cubierta. La eficacia del recubrimiento depende principalmente del control de la difusión de los componentes del revestimiento, la cual se ve afectada por el espesor de la película (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

4.2.6 Formación de recubrimientos

La primera etapa en la elaboración de películas comestibles en la disolución del material (biopolímero) correctamente en algún disolvente como el agua, alcohol, soluciones de ácidos diluidos, o mezclas de disolventes; el material debe quedar dispersado. En algunos casos, es necesario calentar o ajustar el pH de la suspensión que contiene el biopolímero con el fin de disolver la macromolécula (Vazquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013).

La segunda etapa consiste en adicionar una sustancia con propiedades plastificantes. Ésta proporcionará al recubrimiento un buen comportamiento mecánico en términos de flexibilidad y resistencia a la rotura, reduciendo la fragilidad. Una vez dispersados los biopolímeros y adicionado el plastificante, es posible añadir otras sustancias como antimicrobianos, antioxidantes a la solución formadora de película, con el fin de conferir alguna propiedad funcional deseada (Abdollahi *et al.*, 2012; Vazquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013).

La tercera etapa consiste en la eliminación del disolvente en exceso, por lo cual se debe realizar un proceso de secado controlado. La velocidad de secado y las condiciones ambientales determinarán el espesor final y las características estructurales del recubrimiento (Campos *et al.*, 2011; Vazquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013).

4.2.7 Métodos de aplicación de recubrimientos en el fruto

Para las frutas con superficies irregulares, el método más adecuado es el de inmersión, debido a que se requiere un recubrimiento uniforme. La fruta debe ser lavada y secada previamente, luego se sumerge directamente en la emulsión formadora del recubrimiento, posteriormente se deja drenar el material sobrante y se procede al secado, éste método es frecuentemente aplicado en recubrimientos comestibles con cera en frutas enteras, garantizando un impregnado completo para formar una película membranosa delgada sobre la superficie de la fruta. En frutas con superficies lisas y uniformes, el método más utilizado es el de aspersión, ya que se obtienen recubrimientos más delgados y uniformes que los obtenidos por inmersión. La solución se aplica presurizada, mediante la regulación de la presión, para conseguir diferentes tamaños de gota. La aplicación del recubrimiento se realiza con aspersores de alta presión que permiten emplear menos material de recubrimiento. Otros métodos son la aplicación mecánica o manual con brochas (Baldwin *et al.*, 1997; Djioua *et al.*, 2010; Vazquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013)

4.2.8 Componentes de los recubrimientos biodegradables antimicrobianos

4.2.8.1 Biopolímeros

Las soluciones formadoras de recubrimientos pueden incluir polisacáridos, compuestos de naturaleza proteica, lipídica o una mezcla de los mismos para aprovechar las propiedades de cada compuesto y la sinergia entre ellos. Los polisacáridos son capaces de constituir una matriz estructural permitiendo obtener recubrimientos comestibles transparentes y homogéneos, sin embargo están limitados por su solubilidad en agua. Actualmente, han sido utilizados los derivados de celulosa (metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidropropinilmetilceululosa y carboximetilcelulosa), pectinas, derivados de almidón, alginatos, cartaginesa, gomas y recientemente quitosano (Vazquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013).

4.2.8.2 Quitina fuente de quitosano

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. Es el segundo polímero natural más abundante solamente superado por la celulosa (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltran, 2012; Valenzuela y Arias; 2012). Su gran distribución se debe a que es el principal componente estructural del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejo, camarón, langosta, calamar y camarón) y de la cutícula de insectos, también se encuentra en las algas, diademas marinas, y en la superficie estructural de hongos. Su producción industrial se basa principalmente en el tratamiento de los caparazones de crustáceos como camarones, langostas y cangrejos, los cuales se obtienen como desecho de las plantas procesadoras de estas especies (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltran, 2012).

Los caparazones de los crustáceos contienen gran cantidad de proteínas y de carbonato de calcio, estos compuestos envuelven a las microfibrillas de quitina (Kumar, 2000). El tratamiento de los caparazones de crustáceos, consiste principalmente en la eliminación de proteínas por una “desproteinización", que se realiza con una solución alcalina caliente al 10 %, por lo general, de hidróxido de sodio o potasio; acompañado por una

eliminación de minerales o “desmineralización” con lo que se elimina el carbonato de calcio, esto se lleva a cabo con ácidos diluidos (Castañeda *et al*., 2011).

Estructuralmente la quitina es un homopolímero, insoluble en solución acuosa, que presenta una estructura lineal compuesta de unidades repetitivas de formado por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosa (GlcNAc, N- acetil glucosamina), unidas por enlaces glicosídicos del tipo Ɓ-(1-4). La estructura de la quitina está altamente relacionada con la estructura de la celulosa, ya que esta presenta en la posición C-2 un grupo hidroxilo (-OH) mientras que la quitina presenta un grupo acetamida (-$NHCOCH_3$) en el mismo carbono. Cuando la quitina es desacetilada se produce el quitosano, la cual al igual que la forma aceitada presenta múltiples aplicaciones (Castañeda *et al.*, 2011).

4.2.8.2.1 Quitosano

Debido a la estructura de este polímero, es posible formar películas resistentes, flexibles y transparentes. El quitosano posee propiedades únicas, presenta una baja toxicidad, con un DL_{50} = 16 $ml \cdot kg^{-1}$, valor que sitúa al quitosano en un nivel similar al azúcar y lo hace menos tóxico que la sal (Romanazzi *et al.,* 2002). Este polisacárido, naturalmente no tóxico y biodegradable, ha sido ampliamente utilizado en la preparación de películas y recubrimientos antimicrobianos debido a su propiedad de inhibir o retrasar el crecimiento de hongos y de numerosas bacterias patógenas en la superficie del producto, extendiendo así su vida útil (Pereda *et al.*, 2014). Las películas de quitosano son bioadherentes (Henriksen *et al.,* 1996), altamente biocompatibles (Raafat y Sahl, 2009), transparentes e incoloras (Wiles *et al.,* 2000; Park *et al.,* 2002), lo que facilita su aplicación en la superficie de los alimentos.

El quitosano que se obtiene a partir de la quitina mediante un proceso de desacetilación química o enzimática de la quitina. Es un polisacárido lineal que consta de unidades repetitivas de β(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa (cuando está completamente desacetilado) (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltral,

2012) (Figura 1). La quitina se trata con solución alcalina concentrada (40 - 45 % de hidróxido de sodio) y temperatura de 120 °C/1-3 h (Kumar, 2000) Esta *N*-desacetilación casi nunca es completa y el quitosano es considerado como un derivado de la quitina parcialmente *N*-desacetilado. Resultado de lo anterior, es una clara distinción entre la quitina y quitosano proporcionada precisamente por el grado de *N*-desacetilación (Castañeda *et al.,* 2011).

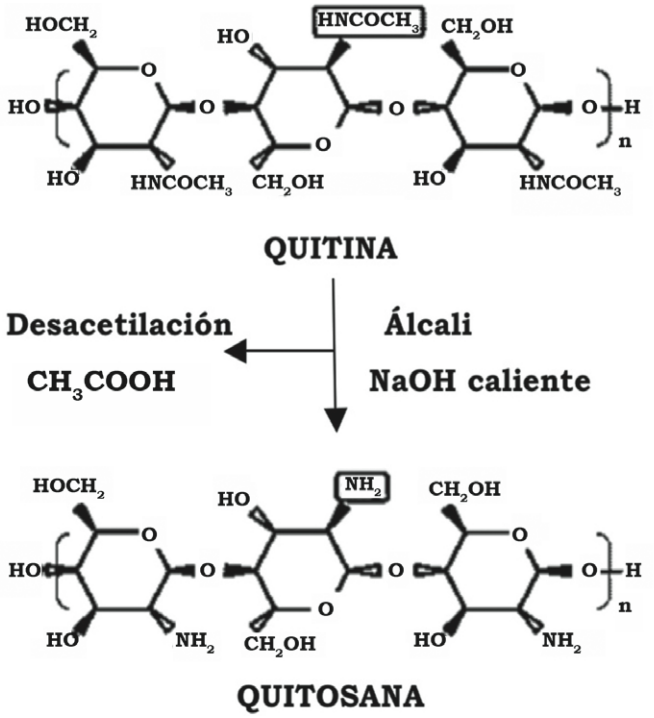


Figura. 1. Estructura química de quitosano y su producción a partir de quitina (tomado de Castañeda *et al.*, 2011).

La reacción de desacetilación, es decir, la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2, da lugar a un grupo amino en esa posición, y cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se obtiene una mezcla de cadenas que contienen residuos de unidades GlcNAc y 2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranosa (GlcN) unidos por enlaces glucosidicos β (1→4), cuya relación depende de las condiciones de reacción y que genera quitosanos con distintas propiedades estructurales, físicas, químicas, y funcionales (Majeti y Kumar, 2000).

La fuente y el método de obtención determinan la composición del quitosano, su grado de desacetilación y el peso molecular, son parámetros para la caracterización de este polímero, ya que influyen sobre sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y funcionalidad (Rhazi *et al.,* 2004).

4.2.8.2.2 Actividad antifúngica del quitosano

Los recubrimientos con quitosano forman una cubierta en la superficie de los frutos que actúa como una barrera mecánica para proteger al fruto de infecciones causadas por hongos, ayudando a disminuir las enfermedades causadas durante el almacenamiento. Su actividad fungicida ha sido reportada en varios estudios (Rivero, 2009; Alvarado, 2011; Cruañes, 2011; Rico, 2012), inhibiendo el crecimiento de los hongos causantes de enfermedades poscosecha, manifestándose esta inhibición en el crecimiento micelial y/o esporulación. Se ha mencionado que el efecto fungicida del quitosano está en función de la concentración utilizada, el peso molecular y grado de desacetilación del mismo (Ramos-García *et al.*, 2010).

En algunos hongos, el quitosano puede producir alteraciones en las funciones de la membrana, mediante su fuerte interacción con la carga electronegativa de su superficie, guiando cambios en la permeabilidad, disturbios metabólicos y eventualmente la muerte (Fang *et al.*, 1994).

El quitosano se adhiere a la membrana plasmática de los hongos gracias a las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del quitosano y a las cargas negativas de los fosfolípidos formadores de membrana (Ghaout y Arul, 1992), una vez adherido a la membrana, causa una filtración a través de ella hasta llegar al citosol; el quitosano utiliza energía para atravesar la membrana, sin embargo, este proceso no involucra al proceso de endocitosis. Los hongos normalmente mantienen en su citosol niveles muy bajos de Ca^{2+}, gracias a la barrera que forma la membrana plasmática, la cual posee reguladores herméticos que impiden el paso libre de gradientes de Ca^{2+}, este proceso también se involucra al mecanismo homeostático, donde dentro del citosol se regula la concentración de Ca^{2+}, enviando fuera de la célula al exceso de Ca^{2+}, o los almacena en organelos de la propia

célula. Por lo tanto, a al introducirse el quitosano al interior del citosol se transforma drásticamente el mecanismo homeostático, ya que al formar canales en la membrana permite el paso libre de gradientes de Ca^{2+}, ocasionando una inestabilidad en la célula y su muerte. Sin embargo, no todos los hongos presentan la misma sensibilidad al quitosano y esto puede ser debido a la composición de fosfolípidos de membrana y particularmente a la naturaleza de sus cargas (cargas neutras) (Palma-Guerrero *et al*., 2010).

4.2.8.2.3 Grado de desacetilación del quitosano

El grado de desacetilación es una de las propiedades más importantes en la caracterización del quitosano, pues dependiendo de su valor el polímero tendrá diferentes aplicaciones (Cocoletzi *et al*., 2009).

El grado de desacetilación se define como el contenido en grupos aminos (% NH_2) presentes en la cadena polimérica. Existen numerosos métodos para determinar el grado de desacetilación del quitosano basados en diversas técnicas. Entre estas técnicas destacan la espectroscopia de infrarrojo (IR), la espectroscopia de UV, La espectroscopia de RMN, la potenciometría y la conductimetría (García y Roca, 2008).

4.2.8.3 Plastificantes

Los plastificantes son líquidos hidrofílicos de bajo peso molecular que reducen la interacción entre las cadenas. La plastificación resulta de la capacidad de las moléculas del plastificante hidrofílico de compartir puentes de hidrógeno con la red polimérica (Mangavel *et al.*, 2003). El plastificante se asocia fisicoquímicamente con la estructura del biopolímero reduciendo la cohesión e interfiriendo con la asociación de las cadenas poliméricas facilitando su deslizamiento por lo que aumenta la flexibilidad del recubrimiento (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013). El resultado es un aumento del volumen libre y de la movilidad de las cadenas de polímero, lo que por otro lado reduce la temperatura de transición vítrea del material y lleva a obtener películas más flexibles aunque con menor resistencia mecánica (Pereda *et al.*, 2014).

Entre los plastificantes utilizados se encuentran los alcoholes polifuncionales, como el polietilenglicol, glicerol y sorbitol (Sothornvit y Krochta, 2000; Irissin-Mangata, 2001; Pommet, 2003; Pereda *et al*., 2008). El glicerol es uno de los más utilizados debido a su mayor estabilidad y compatibilidad con las cadenas biopoliméricas hidrófilas en comparación con el sorbitol, polietilenglicol y azúcares.

Las películas obtenidas a partir de quitosano resultan muy frágiles, esto ocurre por las fuertes interacciones entre las cadenas moleculares de quitosano (puentes hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, en el caso de las proteínas) (Gennadios, 2002). La técnica habitual para mejorar la flexibilidad y extensibilidad de las películas es agregar un plastificante.

8.2.8.4 Aditivos

Los recubrimientos se pueden utilizar como vehículo de aditivos, los cuales pueden proporcionar al producto vegetal funciones más especificas como actividad antimicrobiana, para evitar o reducir el crecimiento de microorganismos en su superficie (Valencia *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha observado que se requiere de aplicaciones pequeñas para que sus atributos de calidad no se vean afectados (Min y Krochta, 2005).

Entre los aditivos que se añaden a los recubrimientos se encuentran los colorantes, aromas, vitaminas, minerales, antioxidantes, probióticos, antimicrobianos (Quintero *et al.*, 2010). Dentro de los agentes antimicrobianos incorporados a los recubrimientos vegetales pueden considerarse a los aceites esenciales (Valencia *et al.*, 2005).

4.2.8.5 Aceites esenciales: aditivos antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos pueden ser compuestos sintéticos (agregados intencionadamente a los alimentos) o de origen natural. Entre las alternativas naturales se encuentran los aceites esenciales, los cuales presentan principios activos químicos como hidrocarburos terpénicos, aldehídos, ácidos, alcoholes, fenoles, ésteres, cetonas, entre otros. Algunos aceites

esenciales son reconocidos por su actividad antimicrobiana, y recientemente se propone incorporarlos en los empaques para alimentos (Hernández-Ochoa *et al.*, 2011).

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario de las plantas, están constituidos por compuestos volátiles (generalmente destilables por arrastre con vapor) que son responsables de los olores (Alzamora *et al*., 2001). Son líquidos oleosos, aromáticos y volátiles constituidos por una mezcla compleja de hasta más de 100 componentes de bajo peso molecular principalmente terpenos y alcoholes fenólicos (Alzate *et al.,* 2009; Alvarado *et al.*, 2011).

En particular, el epicarpio de los cítricos es una fuente importante de aceites esenciales. El género *Citrus* pertenece a la familia de las Rutáceas, en la que se incluyen al cual pertenecen la naranja común (*Citrus sinensis*), la naranja china (*Citrus japonica*), la naranja amarga (*Citrus aurantium*), la mandarina (*Citrus reticulata*), el limón (*Citrus limon*), el pomelo (*Citrus paradisi*), la lima (*Citrus aurantifolia*) o la toronja (*Citrus medica*) (Weiss, 1997).

El aceite esencial en cítricos se encuentra en sacos de forma ovalada en el flavedo o en la porción anaranjada de la cáscara y actúa como una barrera tóxica natural para muchos microorganismos e insectos. La recuperación del aceite se efectúa por varios métodos como presión en frío de la cáscara, hidrodestilación, destilación con vapor, hidrodestilación asistida por microondas, fluidos supercríticos (CO_2), entre otros (Navarrete *et al.*, 2010).

La calidad del aceite depende de factores que influyen sobre la composición como las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etc.), edad de la planta y estado fenológico, método de cultivo (uso de fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos, etc.), época de recolección, modo de manejo y almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, fermentado, etc.) y método de obtención del aceite (Cerón-Salazar y Cardona-Alzate, 2011).

4.2.8.5.1 Actividad antifúngica de aceites esenciales

Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (Burt, 2004; Borboa-Flores *et al.*, 2010), quizá es la fracción química de la planta de mayor actividad inhibitoria para el crecimiento y la supervivencia de organismos (Draughon, 2004). Aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en éste la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen y estudios recientes reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidias, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas (Alzate *et al.,* 2009).

La actividad antibacteriana de aceites esenciales depende de diversos factores como la temporada de cosecha, la fuente geográfica, el método de extracción, el índice de madurez de la fruta, la variedad, la estructura química de los componentes del aceite y su concentración, el tiempo y las condiciones en que se encuentre almacenado el aceite esencial, etc. (Burd, 2004; Consentino *et al.*, 1999).

Burd (2004) reporta que compuestos fenólicos son principalmente los responsables de las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales. Sin embargo, debido a una numerosa cantidad de compuestos encontrados en los aceites esenciales, su actividad antimicrobiana sea debido al producto de la sinergia entre sus componentes. Entre los compuestos encontrados en los aceites esenciales de cítricos se encuentra el limoneno, a y b-pineno, linalol, caracol (Figura 2).

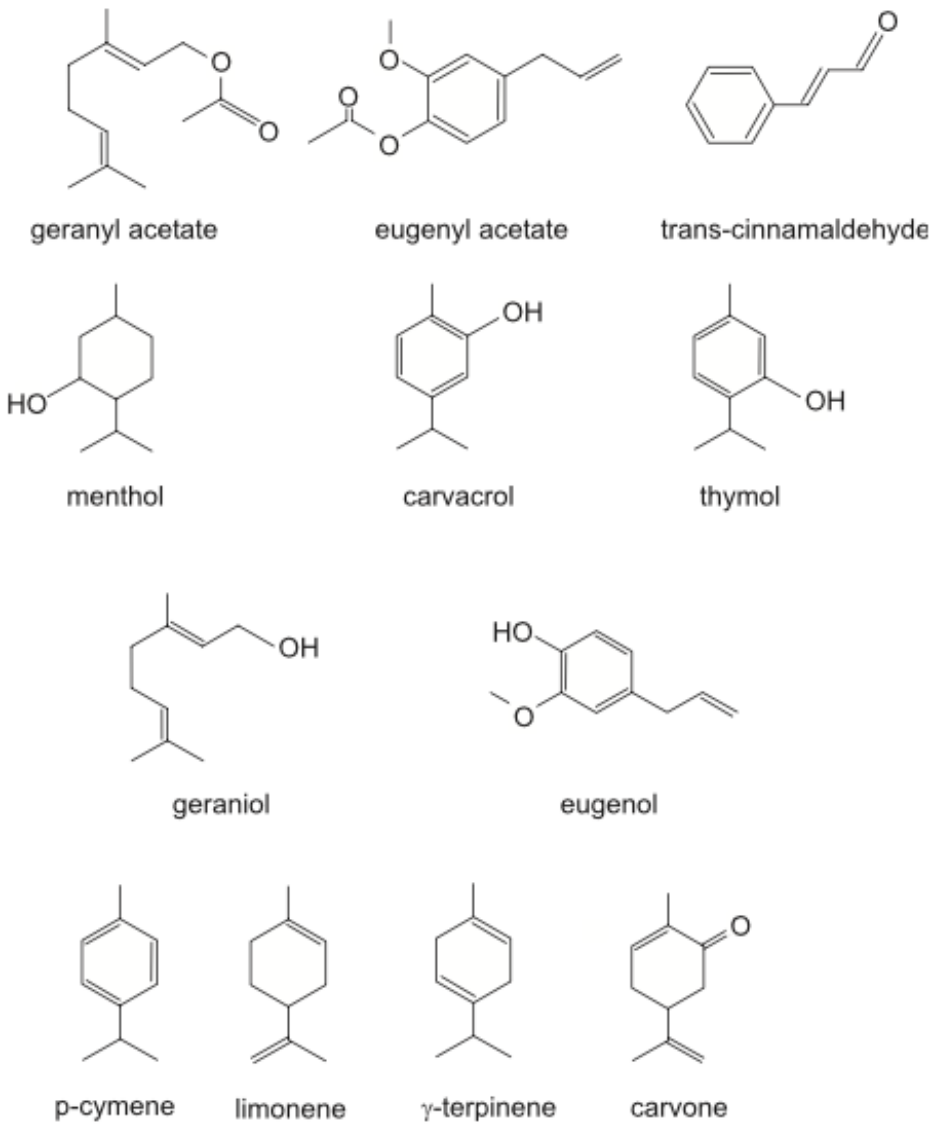


Figura 2. Formula estructural de compuestos encontrados en aceites esenciales (Tomado de Burd, 2004).

4.3. Uso de residuos agroindustriales para la elaboración de recubrimientos biodegradables

4.3.1 Residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social.

Existe una diferencia conceptual entre los términos: subproductos, residuos y desechos. Un "subproducto" es un producto secundario útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial. El término "residuos", se aplica a aquellos que pueden tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su utilización. El término "desecho" está referido a aquellos materiales que no tienen algún valor comercial, ni poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso, por lo que se consideran como basura (Saval, 2012).

El problema de los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo (Saval, 2012), representando uno de los problemas más preocupantes actualmente debido a que su acumulación en gran escala en el planeta se hace cada vez menos sostenible. Sin embargo, muchos de éstos residuos son de origen natural, para los cuales se ha desarrollado una amplia gama de procesos para su transformación en materiales con valor comercial (Escalante *et al.*, 2012).

4.3.2 Residuos de cítricos

La agroindustria citrícola en México genera un gran volumen de residuos sólidos (cáscara), resultado de la obtención de jugos, que generalmente, se envían a tiraderos a suelo abierto, por lo que genera un problema serio de contaminación (Chávez y Aguilar, 2012).

México se ubica como el quinto productor de cítricos en el mundo. La citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional y se destina aproximadamente medio millón de hectáreas para este propósito, las cuales se distribuyen en 23 estados con clima tropical y sub-tropical de la república. Los estados de mayor importancia en producción son Veracruz (226, 740.72 ha), San Luis Potosí (47, 743.5 ha), Tamaulipas (41, 746.63 ha), Michoacán (41, 283.97 ha), Nuevo León (30, 759.4 ha), Puebla (25, 959.5 ha) y Colima (21, 614 ha). Se estima que esta actividad

genera más de 6 millones de ton de frutos cítricos, con un valor superior a los 8 mil 50 millones de pesos (ASERCA, 2010).

México al pertenecer al grupo de los países productores líderes en cuanto al cultivo de cítricos, y teniendo en cuenta que una gran parte de su producción se destina a consumo interno, lo convierte en un generador importante de desechos sólidos de cítricos (por ejemplo, de cáscara), ya que se ha reportado que del 50 % e incluso 60 % del fruto corresponde sólo a la cáscara (Rojas *et al.,* 2009).

Los residuos generados durante el procesado de cítricos están constituidos por flavelos, alvedos, segmentos de membrana y semillas, que tienen potencialidad como material de partida para la elaboración de productos comerciales importantes; entre ellos son destacables los aceites esenciales.

4.3.3 Residuos de productos que contienen quitosano

La industria procesadora de mariscos (camarón, cangrejos, etc.), es altamente generadora de desechos sólidos debido a que del 75 al 85 % del peso vivo de estos son desechos (conchas, cabezas y patas) que contaminan el medio ambiente. Existen alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de estos desechos y su conversión en productos de utilidad como lo son la quitina y el quitosano. Los residuos del procesado del marisco contienen en general un 14-35 % de quitina asociada con proteínas (30-40 %), lípidos, pigmentos y depósitos de calcio (30-50 %), estimándose por tanto una producción mundial anual de quitina en los residuos de unas 120.000 toneladas (Mármol *et al.,* 2011).

En México la industria camaronícola puede generar hasta 60 mil toneladas de desechos anualmente (López-Mata *et al.*, 2011), ocasionando problemas medioambientales, sin embargo se ha documentado que estos residuos, pueden ser utilizados para la recuperación de componentes de alto valor comercial como pigmentos, proteínas y quitina (Cira *et al.*, 2002).

Actualmente, la quitina se obtiene principalmente del exoesqueleto 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 además de constituir la mayor fuente de contaminación en las zonas costeras (Valenzuela y Arias, 2012), se obtiene quitosano principalmente de los subproductos de las industrias pesqueras, fuente naturalmente renovable, no tóxica y no alergénica, además antimicrobiana y biodegradable (Pillai *et al.*, 2009).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Extracción de aceite esencial

Se realizó una colecta de frutas cítricas en Tuxpan, Veracruz, con el apoyo de la Asociación Agrícola Local de Productores de Cítricos del Municipio de Tuxpan, se eligieron tres especies de cítricos *Citrus sinensis, Citrus reticulata y Citrus paradisi* (naranja, mandarina y toronja respectivamente, (Figura 3), las frutas se seleccionaron sin daños físicos y/o presencia de enfermedades.

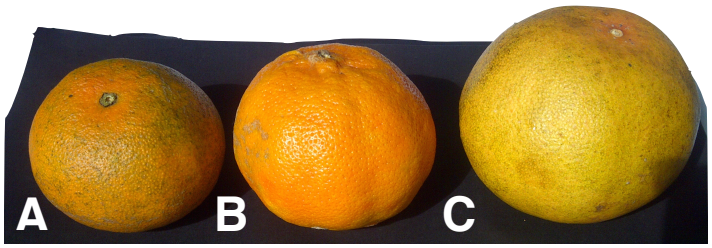


Figura 3. Especies de cítricos para extracción de aceite esencial: A) *C. sinensis;* B) *C. reticulata* y C) *C. paradisi*.

El material se trasladó en cajas de plástico con aislamiento térmico a temperatura de 5 ºC a la Universidad Autónoma Chapingo. Posteriormente, las frutas fueron sometidas a dos lavados, el primero con agua destilada estéril y el segundo con solución acosa de hipoclorito de sodio al 1 % (NaClO, comercial) durante 5 min. Inmediatamente se realizó un mondado manual de la corteza del fruto (flavedo). Una vez obtenida la cáscara (11.35 % para *C. sinensis*, 24.98 % *C. reticulata* y 11.56 % para *C. paradisi*, se sometió a la extracción del aceite esencial por arrastre de vapor durante 4 h en una trampa Clevenger (PYREX®. Distil APP, volatile oil, light. Water 29/42 JT) según lo establecido en la norma ISO 65-71:84 (ISO, 1984) (Figura 4).



Figura 4. Extracción de aceite esencial de cítricos por hidrodestilación con trampa Clevenger.

El aceite esencial obtenido (0.07 % de *C. cinensis*, 0.15 % de *C. reticulada* y 0.03 % de *C. paradisi*) se secó mediante la adición de sulfato de sodio anhidro aproximadamente 3 g por cada 10 mL de aceite esencial, el tiempo de contacto con agitación permanente entre el aceite esencial y el sulfato de sodio anhidro fue aproximadamente 15 a 20 min (Cerón-Salazar y Cardona-Alzate, 2010). Finalmente, el aceite esencial se filtró para separar las partículas de sulfato de sodio hidratadas. El aceite esencial se recuperó en un vial de vidrio color ámbar de 3 mL y se selló herméticamente con una tapa de plástico, conservándose en refrigeración a 4 ºC.

Para determinar el porcentaje de rendimiento (% R) se tomó en cuenta el volumen de aceite esencial extraído hasta agotamiento de la muestra, y se calculó la cantidad de muestra vegetal inicial de acuerdo a la fórmula:

$$\% R = \frac{\text{mL de aceite esencial extraído}}{\text{g de muestra vegetal inicial}} \times 100$$

5.2 Evaluación *in vitro* de los aceites esenciales

5.2.1 Aislamiento de *Colleotrichum gloeosporioides*

Se adquirieron frutas de papaya (*C. papaya* var. Maradol) en un mercado local en el municipio de Texcoco, Estado de México, se seleccionó la fruta que presentó síntomas de antracnosis (círculos concéntricos y mancha chocolate) (Figura 5) de acuerdo a lo descrito por Acosta *et al.* (2001).

El aislamiento del hongo se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Parasitología Agricola de la Universidad Autónoma Chapingo, se siguió la metodología descrita por Pérez *et al.* (2003) con modificaciones. A partir de fragmentos de tejidos de la fruta de papaya con presencia de lesión por *C. gloeosporioides*, se realizaron cortes de aproximadamente 5 mm. Las fracciones fueron sumergidas en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 1 min. Posteriormente, éstas fueron lavadas tres veces con agua destilada esterilizada y secadas con papel esterilizado (Figura 5). Cada uno de los fragmentos de tejido de la fruta fueron sembrados en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA, BD Bioxon®) para su crecimiento, incubándolos a una temperatura de 28 ºC durante 3 días (Acosta *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2003).



Figura 5. Aislamiento en laboratorio de *C. gloeosporioides in vitro* a partir de fruta de papaya con presencia de antracnosis.

Para multiplicar el hongo, se cortaron fracciones de aproximadamente 5 mm de la placa de agar con micelio previamente incubado. Cada fracción de agar se colocó en una nueva caja Petri con medio PDA y se incubaron durante 8 d a 28 ºC. Se tomó una muestra pequeña del hongo de una de las cajas Petri con la cepa, se colocó sobre un porta objetos y se observó al microscopio (Olympus CX3I), comparando la forma de micelios y de conidios con los reportados en la literatura (Barnett *et al.*, 1998), una vez identificado el hongo se procedió a purificar la cepa.

Posteriormente, se realizaron cultivos monospóricos con la finalidad de obtener el inóculo puro, para lo cual se siguió la técnica de dilución (CORPOICA, 2001). Se vertió agua destilada en una caja Petri que contenía la cepa de *C. gloeosporioides* y se realizó un raspado moderado para desprender los conidios del medio; se tomó 1 mL del agua destilada contenida en la caja Petri y se diluyó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada. Se realizaron 9 diluciones en total. Posteriormente, se tomó 1 mL de la última dilución y se sembró en cajas Petri con PDA mediante el método de extensión en placa. Se dejó en incubación a 28 ºC por 3 d y se realizó una resiembra de la primera colonia que comenzó a crecer. Finalmente se volvió a realizar una resiembra de la cepa para su multiplicación y posterior uso en el bioensayo.

5.3 Ensayos biológicos

Se siguió la metodología de Kirby-Bauer modificada (Bauer *et al.*, 1966). Se vertieron 10 mL de agua destilada en una caja Petri con la cepa de *C. gloeosporioides* y se realizó un raspado moderado del hongo para desprender los conidios del medio. Se realizó un conteo directo de esporas en la cámara Neubauer para determinar la concentración de esporas por mL que fueron utilizadas para las pruebas posteriores (Figura 6).



Figura. 6. Conteo de conidios de *C. gloeosporioides* en cámara Neubauer.

Posteriormente, se sembraron 100 µL de la suspensión de conidios de la cepa fitopatógena en las cajas Petri con medio PDA y se extendió homogéneamente en la superficie. Se utilizaron círculos de papel filtro esterilizados (filtro de membrana de 0.45 µL Whatman) de 6 mm de diámetro y se añadieron 15 µL de aceite esencial, se utilizó agua destilada para los testigos, y un fungicida químico (Amistar®) en el control positivo. Se colocaron cuatro círculos equidistantes por tratamiento en cada una de las cajas, cada caja representó un tratamiento. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento, en total fueron cinco tratamientos (tres aceites esenciales, un control negativo y un control positivo).

Finalmente, las cajas Petri se incubaron a 28 ºC durante 7 días (Avello *et al.*, 2012). Posterior al periodo de incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento (mm) utilizando un pie de rey (Vernier®), para lo cual se promediaron dos diámetros perpendiculares de cada uno de los discos. Se determinó el efecto de los aceites esenciales según la escala de Duraffourd: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (+++) si fue igual o superior a 20 mm (Alzamora *et al*., 2001). El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula: % I= (Área de crecimiento tratamiento/ Area de testigo) * 100. La efectividad biológica de los productos se calculó con la formula de Abbott (1925): ET= [(IT - it) / IT] * 100, donde: ET= Efectividad del tratamiento, IT= porcentaje de infección en el testigo, it= porcentaje de infección en cada tratamiento.

5.4 Elaboración de la película biodegradable

5.4.1 Obtención de materiales del recubrimiento

El aceite esencial que presentó mayor actividad antifúngica fue el de *C. reticulata* y se eligió para la elaboración del recubrimiento. El quitosano utilizado para la elaboración de las películas fue proporcionado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, Sonora, México) con características especificadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especificaciones de quitosano utilizado para la elaboración de los recubrimientos biodegradables.

Parámetros	Proporción
Materia seca	> 94.5 %
Contenido mineral	0.25 % ± 0.02
Grado de desacetilación	18.2% ± 2.9
Peso molecular	$127x10^3$ g mol^{-1}
Solubilidad	> 99.9 %
Tamaño de partícula	0.4 mm < ~ 50 % masa < 1 mm
Apariencia	Particulas amarillo claro
Sabor y olor	Insípido e inodoro
Fuente	Caparazón de Jaiba (*Callinectes sp*)

5.4.2 Determinación del grado de desacetilación del quitosano

El grado de desacetilación del quitosano se determinó por el método potenciométrico de titulación (Yuan *et al.*, 2011). Se pesaron 0.25 g de quitosano y se depositó en un matraz erlenmeyer de 125 mL, se agregaron 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0.3 M y la mezcla se agitó hasta disolver. La muestra se tituló utilizando como titulante hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N y se midió el cambio de pH por cada mL de añadido NaOH hasta un volumen igual a 50 mL. Se realizó una gráfica de pH vs mL de NaOH, y se calculó la diferencia entre los puntos de inflexión de la gráfica.

El porcentaje de desacetilación se determinó mediante la ecuación:

$$\% NH_2 = \frac{16.1 (y - x) * f}{w}$$

Donde:

y: punto de inflexión mayor en la gráfica de la primera derivada
x: punto de inflexión menor en la gráfica de la primera derivada
f: Normalidad de la solución de NaOH
w: peso en gramos de la muestra
16.1: factor cuyo valor está relacionado con el peso equivalente

5.4.3 Elaboración de la película biodegradable

Las películas se prepararon con base en los métodos propuestos por Chen *et al.* (1996), Hernández-Ochoa *et al.* (2011) y Pereda *et al.*, (2014) con modificaciones. Para obtener 100 mL de solución de la película, se preparó previamente una solución de ácido acético glacial (JT Baker®) al 1 % (v/v), glicerol 0.5 % (v/v) y quitosano 1 % (p/v) calentando la solución en una parrilla eléctrica (CORNING® modelo PC620D), a 60 ºC en agitación constante a 600 rpm durante 24 h. Posteriormente se bajó la temperatura a 35 ºC, y se añadió el aceite esencial (tres concentraciones 0.5, 1 y 1.5 %) disuelto con Tween® 80 al 0.1 % (v/v), la solución se mantuvo en agitación constante a 600 rpm y 35 ºC durante 7 h (Cuadro 2).

Cuadro 2. Componentes de los tratamientos formulados para la elaboración de recubrimientos biodegradables.

Componentes	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Glicerol (% v/v)	0.5	0.5	0.5
Ácido acético glacial (% v/v)	1.0	1.0	1.0
Quitosano (% p/v)	1.0	1.0	1.0
Aceite esencial[1] (% v/v)	0.5	1.0	1.5
Tween 80 (% v/v)	0.1	0.1	0.1

[1] aceite esencial de *C. reticulata*

Una vez que se obtuvo la emulsión, se colocaron 15 mL sobre una caja Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro y éstas se introdujeron en una estufa con convección de aire (BINDER®), a una temperatura de 35 ºC durante 24 h para su secado. La película fue desprendida de la caja Petri con unas agujas de disección y unas pinzas metálicas para su posterior caracterización.

5.5 Caracterización fisicoquímica de la película biodegradable

5.5.1 pH de la emulsión

Se determinó el pH de la emulsión de cada tratamiento con un potenciómetro (CORNING®, pH meter 430), previamente calibrado con soluciones buffer de pH 7.0 y 4.0 como lo establece la Norma Mexicana para determinación de pH en alimentos (NMX-F-317-NORMEX, 2013).

5.5.2 Grosor

El grosor de la película se midió con un micrómetro digital (Coolant proof IP65, Mitutoyo, Tokyo, Japón), con una resolución de 0.001 mm. El resultado se expresó en mm del promedio de 10 medidas tomadas aleatoriamente en las películas a lo largo de las mismas (Escobar *et al.*, 2009).

5.5.3 Humedad

Para determinar el contenido inicial de materia seca (%) se siguió el método utilizado por Escobar *et al.* (2009). Se cortaron discos de la película de 2 cm de diámetro y se pesaron. Posteriormente los discos se secaron a 90 °C en una estufa con circulación de aire por 24 h y se volvieron a pesar, con los datos de peso se calculó el % de humedad.

5.5.4 Solubilidad en agua

Para la determinación de solubilidad en agua se siguió la metodología propuesta por Gontard *et al.* (1994). Para su cálculo se utilizaron los discos de la película de 2 cm de diámetro secos, los cuales se colocaron en un vaso de precipitados con 50 mL de agua destilada y se calentaron en una parrilla con agitación constante a 20 °C y 62 rpm durante 24 h (Figura 7).

Finalmente, las muestras se sacaron de los vasos y se secaron en una estufa a 90 °C durante 24 h. Se calculó el peso de materia seca que se solubilizó en agua menos el valor del peso de materia seca inicial, se expresó como un porcentaje de la materia seca inicial. Se realizaron cinco ensayos por cada tipo de película elaborada (Escobar *et al.*, 2009).

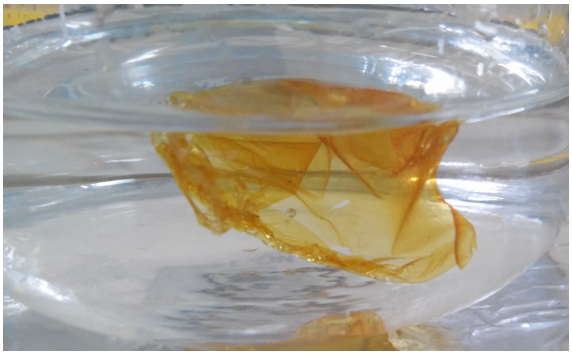


Figura 7. Prueba de solubilidad de la película por el método descrito por Gontard *et al.* (1994).

5.5.5 Color

Se determinó el color de las películas de cada uno de los tratamientos utilizando un colorímetro (HunterLab, MiniScan XE Plus, USA) se tomaron cinco mediciones por película y se reportó el promedio. Se obtuvieron los índices L*, a*, y b*, los cuales fueron utilizados para calcular los parámetros hue (h^o = arcotangente (b*/a*)) y croma ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) (Sahin y Sumnu, 2006) (Figura 8).



Figura 8. Medición de color de la película con colorímetro (HunterLab, MiniScan XE Plus, USA).

5.5.6 Biodegradabilidad

El proceso de degradación de las películas se evaluó siguiendo el método descrito por Pereda *et al.* (2014). Las películas se cortaron en forma circular con diámetro 5 cm y se colocaron en el interior de mallas de acero inoxidable (5 x 5 cm), las cuales fueron introducidas en una muestra de suelo contenida en una reja de plástico. El suelo se mantuvo húmedo mediante la aspersión periódica de agua destilada. Se calculó el porcentaje de degradación en función del área de la muestra de película inicial (Figura 9).



Figura 9. Prueba de biodegradación de películas con la metodología descrita por Pereda *et al.* (2014).

5.6 Evaluación *in vivo* de las películas como recubrimiento

5.6.1 Material biológico

La evaluación *in vivo* se realizó en frutas de papaya (*Carica papaya* var. Maradol) procedentes de un cultivo orgánico ubicado en el municipio de San Pedro Pochutla, Oaxaca, las cuales fueron seleccionadas asegurando la ausencia de daños físicos y/o enfermedades, uniformes en forma y tamaño con un peso aproximado entre 1000 y 1200 g, en estado de maduración 2 según la escala de maduración establecida por Santamaría *et al.* (2009b) (Figura 10). Previo a la aplicación de películas, las frutas fueron sumergidas en solución acuosa de hipoclorito de sodio (1 %) por 5 min y secados a temperatura ambiente (De la Cruz *et al.*, 2010).

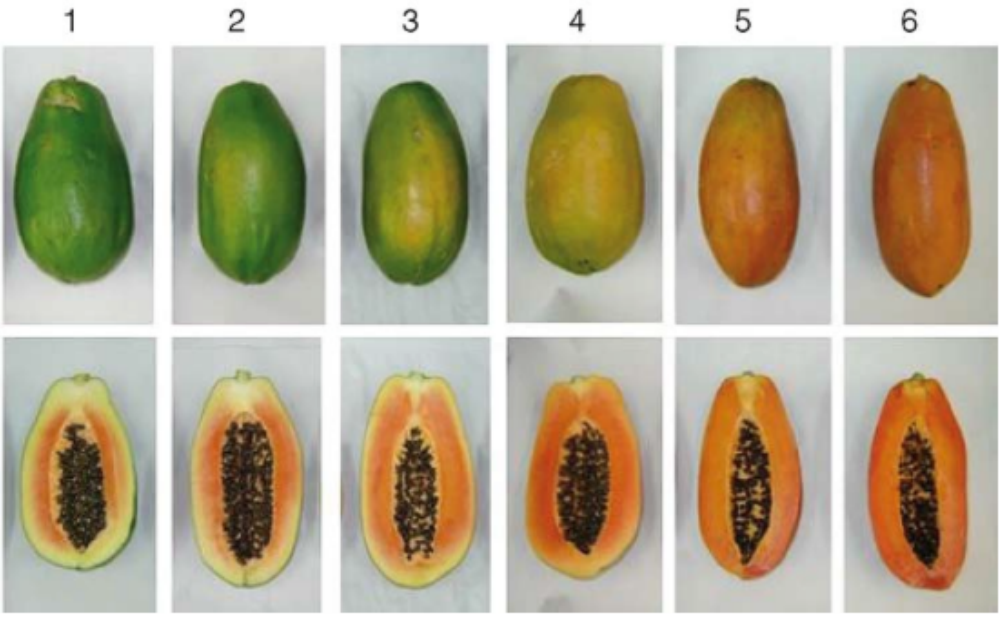


Figura 10. Escala de maduración de la fruta papaya Maradol descritos por Santamaría *et al.* (2009b).

5.6.2 Inoculación de *Colletotrichum gloeosporioides*

La inoculación se realizó de acuerdo al método utilizado por Baños *et al*. (2004). Se seleccionaron aleatoriamente cinco áreas en la superficie de cada fruta. Con un palillo estéril se realizó una punción de aproximadamente 2 mm de profundidad en la epidermis de la fruta y se inocularon 20 µL de la suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* ($1x10^8$ conidios mL^{-1}) cultivados previamente durante 7 d en PDA a 28 ºC.

*5.6.*3 Aplicación del recubrimiento

El recubrimiento biodegradable se aplicó 2 h después de haber inoculado la papaya con la cepa de *C. gloeosporioides*. Las frutas fueron cubiertas por la emulsión con una brocha (Camelus® 2”) en la epidermis y secadas con aire de un ventilador doméstico, identificándolas de acuerdo al tratamiento aplicado (Figura 12). Las frutas se colocaron sobre una mesa a temperatura ambiente (24 ºC) por 15 d. En total de tratamientos fueron cuatro (tres tratamientos con recubrimientos adicionado con aceite esencial al 0.5, 1.0 y 1.5 % y un tratamiento sin recubrimiento) con 6 repeticiones cada uno y se dispusieron con un diseño completamente al azar.



Figura 11. Aplicación manual de la emulsión formadora del recubrimiento en la superficie de la papaya.

5.7 Medición de parámetros físicos de la fruta tratada

5.7.1 Pérdida de peso

Se pesaron los frutos en una balanza (Ohaus® Scout Pro) con capacidad de 2 kg, se obtuvo un peso inicial y después se continuó pesando los frutos cada 3 d, hasta obtener un peso final y por diferencia se calculó el porcentaje de pérdida; los resultados se expresaron en porcentaje de pérdida de peso.

5.7.2 pH

El pH de la pulpa de la fruta se midió siguiendo la metodología establecida por la AOAC (1990) con un potenciómetro (HANNA, HI 98140 pH Meter).

5.7.3 Sólidos solubles totales

El contenido de sólidos solubles totales se determinó con un refractometro manual (Atago N1), a 20 ºC, y el resultado se reportó como porcentaje (%) de sólidos solubles.

5.7.4 Color de la cáscara

El color se determinó con un colorímetro (HunterLab, MiniScan XE Plus, USA). Se seleccionaron tres áreas diferentes de la epidermis de la fruta mismas que fueron medidas durante 10 d a temperatura ambiente (Figura 12). Las mediciones se realizaron cada tercer día registrando el promedio de las tres áreas evaluadas en cada fruta durante los 15 d del experimento.

Para medir el color se calculó la relación b*/a*, obteniendo el valor de hue (h^o = arcotangente (b*/a*)) y el croma ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) (Little, 1976)



Figura 12. Área en la epidermis de la fruta para medición de color .

5.7.5 Respiración

Se siguió la metodología descrita por Santamaría *et al.* (2009b). Se seleccionaron tres frutos por tratamiento. Diariamente cada fruto se colocó al interior de un frasco de vidrio durante 1 h sellando con una tapa de vidrio a la cual se adaptó un tapón de goma en un punto para permitir la extracción de gas desprendida por la muestra. Con una jeringa se extrajeron 5 mL del gas del interior del frasco y se guardó en frascos BD Vacutainer® de 5 mL en congelación hasta tu análisis. De cada muestra se tomó 1 mL la cual se inyectó a un Cromatografo de Gases (Varian® Star 3400), equipado con una columna Hayesep Q 100/120 (1.8 m longitud x 3.2 mm diámetro) y dos detectores en serie uno de conductividad térmica (TCD) para la cuantificación de CO_2, y uno de ionización de flama (FID) para la detección de etileno. Se utilizó helio como gas acarreador con flujo de 25 mL min^{-1}. Las condiciones de temperatura para cada corriente se mantuvieron a 70 ºC para el detector TDC y FID. Los resultados se calcularon a partir de curvas de calibración con estándares de concentración conocida de CO_2 y etileno. Los resultados se expresaron en mL de $CO_2 \cdot kg^{-1}\ h^{-1}$ y µL de etileno$\cdot kg^{-1}\ h^{-1}$.

5.7.6 Firmeza

La firmeza se determinó utilizando un texturómetro universal TA.XT2i (Stable Micro Systems UK, Surrey, RU) con una celda de 5 kg, una velocidad de compresión de 0.5 $mm.s^{-1}$ a una distancia de 10 mm. La fuerza se midió por el método de punción con una punta cónica de 6 mm de diámetro y base automática. Se eliminó la cáscara (exocarpio) del fruto y se midió en la parte ecuatorial central de la papaya (en ambos lados). Se registró la fuerza de oposición del tejido a la penetración del punzón, en cinco regiones del fruto; los resultados se reportaron en newtons (N) (Ramallo *et al.*, 2011).

5.7.7 Evaluación del daño causado por antracnosis

El porcentaje de incidencia se evaluó a los 10 días de almacenamiento y se calculó con la fórmula siguiente: Incidencia (%)= número de frutas enfermas* 100/total de frutas observadas (Cabrera *et al.*, 2013).

Los índices de severidad se avaluaron respecto a las características de la enfermedad de acuerdo a cinco grados de daño con base en una escala establecida por Santamaría *et al.* (2011) (Cuadro 3). Para calcular el porcentaje de severidad se utilizó la fórmula de Towsend y Heuberger (1943): P= [Σ(n*v)/(CM*N)]*100. Donde: P= media ponderada de severidad, n= número de lesiones por cada clase en la escala, v= valor numérico de cada clase, CM=categoría mayor y N= número total de lesiones evaluadas.

Cuadro 3. Escala para determinar el área afectada con antracnosis en frutos de papaya.

Índice de severidad	% daño
1	0-0.25
2	>0.25-0.5
3	>0.5-1.0
4	>1.0-1.5
5	>1.5-2.0
6	>2.0-2.5
7	>2.5

Santamaría *et al.,* 2011.

Para calcular la efectividad biológica de los productos se utilizó la formula de Abbott (1925): ET= [(IT - it) / IT] * 100, donde: ET= Efectividad del tratamiento, IT= porcentaje de infección en el testigo, it= porcentaje de infección en cada tratamiento.

5.8 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos para cada variable se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar y cuando la diferencia entre tratamientos resultó significativa se realizó una comparación de medias Tukey (α =0.05), usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, Inc., 2000).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus reticulata* (mandarina) y *Citrus paradisi* (toronja) presentaron apariencia semejante entre sí (Figura 13), es decir, de aspecto líquido, incoloro y olor característico de cada especie.

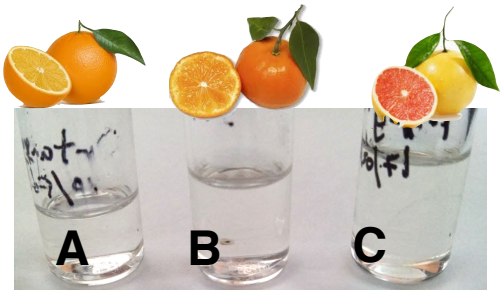


Figura 13. Aceites esenciales de: A)*C. sinensis* (Naranja), B) *C. reticulata* (Mandarina) y C) *C. paradisi* (Toronja).

El aceite esencial de *C. reticulata* presentó el mayor rendimiento por kg de fruta (0.15 %), seguido del aceite esencial de *C. sinensis* (0.07 %) y de *C. paradisi* (0.03 %).

Los datos obtenidos en el rendimiento de aceite esencial por kg de cáscara de la especie *C. sinensis* fueron mayores a los reportados por Blanco *et al.* (1995), Juárez *et al.* (2010) y Kamal *et al.* (2013) quienes reportaron rendimientos de 0.17, 0.4 y 0.24 % utilizando la misma especie y método de extracción.

Respecto la especie *C. reticulata,* Blanco *et al.* (1995) *y* Kamal *et al.* (2013) reportaron rendimientos de 0.21 y 0.3 % de aceite esencial. Por otro lado Lota *et al.* (2001) reportaron rendimientos de aceite esencial de 0.05 a 0.6 % evaluados en 15 variedades de *C. reticulata*, lo cual coincide con lo obtenido en esta investigación al obtener un 0.6 % de aceite esencial por kg de cáscara.

En cuanto a la especie *C. paradisi*, los rendimientos obtenidos de aceite esencial fueron similares con los reportados por Soto *et al.* (2013) y Kamal *et al.*, (2013) quienes reportaron rendimientos de 0.207 y 0.2 % de aceite esencial por kg de cáscara extraído de la misma especie por el mismo método.

Flores *et al.* (1999) encontraron variación en los rendimientos de aceite esencial extraído de otras especies de cítricos como *C. aurantium* (0.33 %), *C. nobilis* (0.27 %), *C. paradisii* (0.20 %) y *C. limetta* (0.10 %). Rojas *et al.* (2009) mencionan que la diferencia en los rendimientos de aceite esencial en cítricos se debe principalmente a la diferencia de especie de fruta y al método de extracción utilizado. Blanco *et al*. (1995) mencionan que la madurez de las frutas antes de la extracción de aceite esencial también es un factor determinante en el rendimiento de aceite esencial y en la variación de la composición de los aceites esenciales. Dado que los aceites esenciales son metabolitos secundarios, las características propias de éstos, están determinadas por diferentes factores como la temperatura, la época de producción y cosecha, especie, variedad, entre otros (Duarte *et al.*, 2007; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

El rendimiento de los aceites esenciales está determinado por dos factores, el primero en relación a la cantidad de aceite esencial por kg de cáscara y la segunda en relación al rendimiento de aceite esencial por kg de fruta. Estos factores son de gran importancia debido a que en México las industrias citrícolas varían el volumen de fruta procesada, épocas de producción y materia prima utilizada (especies y variedades) (Chávez y Aguilar, 2012).

6.2. Evaluación *in vitro* de los aceites esenciales

Los conidios de *C. gloeosporioides* propagados en medio PDA, son de forma ovalada con ambos extremos redondeados, su crecimiento en agar fue radial en círculos concéntricos lo que coincide con lo reportado por Oliveira *et al.* (2005) (Figura 14), con una coloración blanca mezclada con tonalidades naranja pálido en el centro, el tipo de micelio fue liso en los primeros días y

aéreo con aspecto algodonoso o denso a mayor edad de la colonia, como lo reportan Domínguez-Guerrero *et al*. (2012).

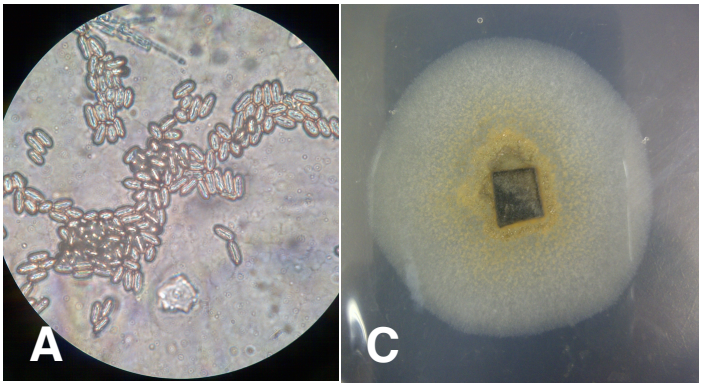


Figura 14. A) Conidios del hongo *C. gloeosporioides* vistos al microscopio. B) crecimiento del hongo *C. gloeosporioides* en medio PDA a los 7 d.

El análisis de varianza mostró diferencia significativa por efecto de los aceites esenciales sobre el porcentaje de inhibición del hongo *C. gloeosporioides*. El coeficiente de variación presentó un valor de 7.0 %, lo cual indicó confiabilidad aceptable en los resultados obtenidos. En el Cuadro 4 se muestran los resultados de la comparación de medias (Tukey, $\alpha \leq 0.05$), se observa que el mayor efecto antifúngico para el control de *C. gloeosporioides* fue el del producto comercial (Amistar®).

Cuadro 4. Halo de inhibición, porcentaje de inhibición y de eficacia *in vitro* de los aceites esenciales de *C. sinensis, C. reticulata* y *C. paradisi* contra *C. gloeosporioides*

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	% de inhibición	% de eficacia
Citrus sinensis	19.4375c[3]	23.65	47.5
Citrus reticulata	22.75b[4]	32.35	56.8
Citrus paradisi	15.3125d[3]	14.65	38.3
Control químico	25.75a[4]	41.44	64.3
Control negativo	0e[1]	0	0

Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, α=0.05).
[1]Valores de sensibilidad en el aromatograma según Duraffourd: [1]S. nula: ≤8 mm; [2] S. límite: 9-14 mm; [3] S. media: 15-19 mm; [4] Sumamente sensible: ≥20 mm.

El aceite esencial de *C. reticulata* fue el que mostró la mayor actividad antifúngica en el control de *C. gloeosporioides*, 11.7 % menor actividad en comparación con el control químico. Los aceites esenciales de *C. sinensis* y *C. paradisi* produjeron halos de inhibición menores al producido por el aceite esencial de *C. reticulata*, no obstante mostraron mayor efecto inhibitorio en comparación con el testigo negativo el cual no presentó inhibición en el crecimiento de *C. gloeosporioides*.

La actividad antifúngica de los tres aceites esenciales evaluados a una concentración de 100 % mostraron halos de inhibición superiores a 9 mm. De acuerdo con los valores de sensibilidad del aromatograma de Duraffourd, un extracto presenta actividad antifúngica positiva si su halo de inhibición es mayor a 9 mm (Alzamora *et al.*, 2001). El micelio de *C. gloeosporioides* evaluado en la presente investigación fue más sensible al tratamiento con aceite esencial de *C. reticulata*.

La diferencia observada en los resultados de la actividad antifúngica de los aceites esenciales puede deberse entre otras cosas a que la actividad biológica de un aceite esencial varia en la composición química del mismo, las variaciones pueden estar asociadas a las condiciones medio ambientales, especie, tiempo de cosecha, método de extracción, tiempo de extracción del aceite esencial, entre otros (Burd, 2004; Rojas *et al.,* 2014).

En otros estudios también se ha encontrado que los aceites esenciales del género *Citrus* han mostrado tener actividad antimicrobiana. Guédez *et al*. (2014), reportaron que el aceite esencial de *C. sinensis,* a concentraciones de 1 y 100 %, tuvo efecto inhibidor *in vitro* en el crecimiento de *C. gloeosporioides*, *Penicillium inducir, Fusarium solano, Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*. Velásquez *et al*. (2014) reportaron actividad antifúngica del aceite esencial de *C. reticulata* en el crecimiento de *Penicillium italicum*. Flores *et al*. (1999) reportaron actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Citrus aurantium, Citrus paradisii, Citrus nobilis* y *C. limetta* contra *Neurospora crassa.*

Aunque se ha demostrado que los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas, su mecanismo de acción no está definido (Velásquez *et al*., 2014). Algunos autores mencionan que un posible mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre el crecimiento de hongos es debido a su carácter hidrofóbico, el cual puede interferir en la membrana celular provocando un desequilibrio y muerte celular (Guerra *et al.,* 2014). Otros autores señalan que la actividad antimicrobiana se debe a la presencia de terpenoides como el limoneno. Soto *et al.* (2013) y Navarrete *et al*. (2010) encontraron en *C. reticulata* que el limoneno es el monoterpeno de mayor proporción, siguiendo el α y β-pineno, y en menor proporción linanol y terpineol. Juárez *et al.* (2010) identificaron al limoneno, β-linalol, decanal y 2(10)-pineno, como principales componentes del aceite esencial de *C. sinensis* responsables de la actividad antimicrobiana.

6.3. Caracterización de la película biodegradable

6.3.1 Grado de desacetilación de quitosano

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del grado de desacetilación de quitosano. Hernández *et al.* (2009) indicaron que el valor óptimo de desacetilación para el quitosano debe ser mayor al 50 % lo cual concuerda con el resultado obtenido de la muestra de quitosano analizado en el presente estudio al obtener un 57.1 % de desacetilación, el mismo autor destaca que el quitosano comercial presenta un porcentaje de desacetilación a partir de 60 %.

Cuadro 5. Resultados de la determinación del grado de desacetilación del quitosano por el método de titulación potenciométrica.

	1[1]	2	3
Peso quitosano muestra (g)	0.2547	0.2537	0.2517
Punto inflexion menor (mL)	13	12	13
Punto inflexión mayor (mL)	23	21	21
% NH_2	63.21	57.11	51.17

[1]Número de repetición

Araya y Meneses (2010) mencionaron que la variación del grado de desacetilación es debido a la presencia de grupos amino libres en quitosanos de diferentes crustáceos. El grado de desacetilación del quitosano, comprendido entre 60 y 98 %, es un parámetro determinante en la solubilidad o insolubilidad en medios acuosos, ya que se encuentra cargado positivamente en medios ácidos, siendo los grupos amino responsables de dicha densidad de carga (positiva) lo que favorece su solubilidad. El carácter hidrofílico e hidrofóbico del quitosano está determinado por la presencia de grupos de amino y N-acetilamino respectivamente, características estructurales que convierten al polímero en excelente estabilizador de emulsiones, además reduce la tensión superficial, actúa como espesante y puede formar películas con mejores propiedades viscoelásticas (Hernández, 2004; Calero *et al.*, 2010; Calero *et al.*, 2013).

6.3.2 Propiedades fisicoquímicas de la película biodegradable

Las emulsiones formuladas fueron estables al observar un sistema sin separación de fases. Las películas elaboradas tuvieron aspecto homogéneo, lisas y transparentes, sin presencia de burbujas de aire, ni partículas insolubles de quitosano. En las placas de vidrio su desprendimiento fue fácil y no presentaron cuarteaduras. Ziani *et al.* (2008) mencionan que el tiempo de secado de las películas aumenta al aumentar la concentración de glicerol. Debido al bajo contenido de glicerol en las películas evaluadas en esta investigación el tiempo de secado fue rápido. Cárdenas *et al.* (2010) reportaron que la adición de glicerol y polisorbato 80 modificaron la morfología y rugosidad de las películas de quitosano, dando como resultado películas más homogéneas y menos rugosas, lo cual concuerda con lo observado en las películas elaboradas en este estudio.

En el Cuadro 6 se muestra que las películas no presentaron diferencia significativa en el pH, grosor y % de solubilidad en agua, a excepción del % de humedad, el cual se observó que el tratamiento T2 superó 15 % a los tratamientos T1 y T3.

Cuadro 6. Efecto de la concentración de aceite esencial de *C. reticulata* en las propiedades de pH, grosor, % humedad y % de solubilidad de películas de quitosano.

Tratamiento	pH	Grosor (mm)	% Humedad	% Solubilidad
T1[1]	3.58a	0.093a	23.40b	35.97a
T2	3.57a	0.101a	45.27a	33.57a
T3	3.69a	0.091a	23.07b	32.40a

[1]Película de quitosano y aceite esencial: T1= aceite esencial al 0.5 %. T2 aceite esencial al 1.0 % y T3 = aceite esencial al 1.5 %
Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, α=0.05).

El grosor de las películas en promedio fue 0.095 mm, no existió diferencia significativa entre los Tratamientos analizados. Malí *et al.* (2004) recomiendan que las películas con buenas propiedades usadas en alimentos deben tener un grosor cercano a 0.11 mm, lo cual se aproxima con los resultados obtenidos.

Las emulsiones tuvieron un valor de pH entre 3.57 y 3.69. Pereda *et al.* (2014) reportaron valores de pH de 5.0 en emulsiones estables preparadas con caseinato de sodio y quitosano a concentraciones de 2.5 % (p/v) en ácido acético al 1 %. Hernández (2004) indicó que a valores de pH entre 4 y 6 se obtienen soluciones transparentes de quitosano, mientras que a pH cercanos a 7 se obtienen dispersiones con consistencia de gel. Kim *et al.* (2014) mencionaron que el quitosano al ser un biopolímero soluble en medio ácido, los valores óptimos de pH se encuentran en un rango entre 4.0 y 5.0. Lo anterior puede explicar la solubilidad completa del quitosano observada en el presente estudio, ya que todos los tratamientos fueron ácidos. En condiciones ácidas, los grupos amino del quitosano pueden protonizarse causando una repulsión entre las macrocadenas de carga positiva del mismo y permitiendo la difusión de las moléculas de agua y la solvatación de las moléculas de quitosano, mientras que a pH básico, el biopolímero tiende a precipitar (Albarracín-Hernández y Valderrama, 2014).

Respecto al porcentaje de humedad de las películas de quitosano, la media del tratamiento T2 con 1 % de aceite esencial fue mayor significativamente

(α ≤ 0.05) respecto a las medias de los tratamientos T1 y T3 con 0.5 y 1.5 % de aceite esencial, respectivamente. Algunos estudios (Mali *et al.*, 2004) han reportado que existe una relación directamente proporcional entre el grosor y el contenido de humedad de la película, es decir, a mayor grosor mayor contenido de humedad de la película y viceversa, lo anterior podría deberse a que al existir mayor grosor existe un número mayor de grupos hidrofílicos en la película susceptibles a interacciones con el agua. Hosseini *et al.* (2009) reportaron que la incorporación de aceites esenciales de tomillo y clavo en películas de quitosano, incrementa el contenido de humedad y solubilidad en agua.

Respecto a la solubilidad en agua de la película, no hubo diferencia significativa entre tratamientos mostrando un promedio de 33.98 % de solubilidad en agua. El resultado obtenido en el presente estudio difiere del reportado por Pereda *et al.* (2014) quienes reportaron una solubilidad parcial de películas de quitosano con un 16.2 %, mientras que en películas de caseinato, la solubilidad fue 100 %. Hosseini *et al.* (2009) mencionan que la incorporación de aceites esenciales en películas de quitosano incrementa su porcentaje de solubilidad en agua hasta 30.62 % el cual es aproximado al obtenido en esta investigación. Por su parte Kim *et al.* (2006) reportaron una solubilidad en agua de 15 a 22 % para películas de quitosano. Bourtoom (2008) menciona que el tipo y concentración de plastificante afecta directamente en la solubilidad de la películas de quitosano.

6.3.3 Color

Los valores de *hue* (hº) evaluados en las películas indican que todas las películas se encuentran en ángulo de los tonos verdes-amarillo (Cuadro 7). Pereda *et al.* (2014) mencionan que el color amarillento de las películas elaboradas con quitosano se atribuye a los grupos amino libres, que son susceptibles al pardeamiento mediante la reacción de Maillard.

Por otro lado, los valores de *chroma* muestran una diferencia significativa entre el tratamiento T2 respecto a los tratamientos T1 y T3, con mayor tendencia al amarillo que al verde. Los valores más altos *chroma* de indican

saturación de color más intensa, aunque para los tres casos fue menor a 1, lo cual corresponde a un verde más tenue en el color de las películas. Los resultados obtenidos de *chroma* muestran que el color de la película es casi transparente lo es deseable al aplicar en frutas ya que se espera que no interfiera con el color propio de la epidermis de las frutas.

Los valores de luminosidad (L*) de las películas evaluadas, se muestran en el Cuadro 7. No se presentó diferencia significativa entre tratamientos, presentando un valor promedio de L* de 23.46 %, lo cual indica que la variación en el contenido de aceite esencial en los tratamientos no influyó en los valores de L* de la película. Los valores de L* obtenidos en la presente investigación fueron menores que los reportados por Bourtoom (2008) quien obtuvo valores de L* superiores a 80 % en películas de quitosano y glicerol. De igual forma Joaquín *et al.* (2013) reportan valores de L* en películas de almidón de 83.92 y 87.89 %. Por su parte, Khoshgozaran *et al.* (2012) obtuvieron valores de L* menores que los obtenidos en la presente investigación en películas de quitosano y aloe vera de 3.72 a 18.6 %, indicando que los valores de L* dependen de los componentes de las películas.

Cuadro 7. Valores de L*, *hue* y *chroma* evaluados en películas de quitosano y aceite esencial de *C. reticulata*.

Tratamiento	L* (%)	*Hue* (Hº)	*Chroma* (C*)
T1[1]	22.23a	147.34b	0.43b
T2	24.04a	113.73a	0.83a
T3	24.11a	142.76b	0.42b

[1]Película de quitosano y aceite esencial: T1= aceite esencial al 0.5 %. T2 aceite esencial al 1.0 % y T3 = aceite esencial al 1.5 %
Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, α=0.05).

Mali *et al.* (2004) mencionan que la transparencia de las películas está influenciada por el grosor y el contenido de glicerol de las películas. El mismo autor menciona que contenido alto de glicerol provocan opacidad y un color amarillo en las películas. Por otro lado se ha comprobado que al

adicionar aceites esenciales en las películas se presenta una disminución del brillo y transparencia debido a la rugosidad superficial que se presenta por fenómenos de floculación producidos por las gotas de aceite esencial durante el secado (Sanchez-González *et al.*, 2011).

6.3.4 Biodegradabilidad

Se observó una degradación de las películas mayor del 70 % al primer mes (Cuadro 8). El contenido de aceite esencial en las películas no reflejó diferencia significativa en la degradación de las películas. Pereda *et al*. (2014) reportaron que las películas de caseinato se degradan en 4 d, mientras que Martucci y Ruseckaite (2009) mencionaron que la degradación se observa desde el día 8 en películas de glicerol, gelatina y almidón dialdehído. Por su parte, Domenek *et al.* (2004) reportaron que un bioplástico elaborado de gluten de trigo se degrada en suelo después de 50 d, mientras que Park *et al.* (2000) reportaron que la degradación de películas de gluten-proteína de soja y glicerol fue de 30 d.

Cuadro 8. Porcentaje de degradación de las películas en función del tiempo de contacto con el suelo.

	% degradado		
Tratamientos	Mes 1	Mes 2	Mes 3
T1[1]	74.8a	92.6a	98.3a
T2	77.9a	91.7a	97.8a
T3	78.2a	91.9a	97.9a

[1]Película de quitosano y aceite esencial: T1= aceite esencial al 0.5 %. T2 aceite esencial al 1.0 % y T3 = aceite esencial al 1.5 %
Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, α=0.05).

Pereda *et al*. (2014) mencionaron que la humedad absorbida por las películas favorece la proliferación microbiana en la tierra y en la película debido a la mayor disponibilidad de agua en el material, iniciando con ello el proceso de biodegradación. Los mismos autores mencionan que quitosano presenta un comportamiento biodegradativo lento debido a sus propiedades antimicrobianas.

6.4. Evaluación *in vivo* del recubrimiento biodegradable

6.4.1 Pérdida de peso

Se observó una tendencia gradual a aumentar la pérdida de peso durante el tiempo de almacenamiento, siendo mayor en las muestras sin el recubrimiento (Figura 15). Lo anterior concuerda con lo observado en otros estudios realizados con recubrimientos aplicados a papaya (Acosta *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2011; Téllez-Pichardo *et al.*, 2013). La pérdida de peso en frutas es debida principalmente a la pérdida de agua de las frutas, lo cual depende tanto de la actividad fisiológica de las frutas entre ellos la transpiración, o bien de factores externos como la temperatura y la humedad relativa (Kader, 1986; Acosta *et al.*, 2001).

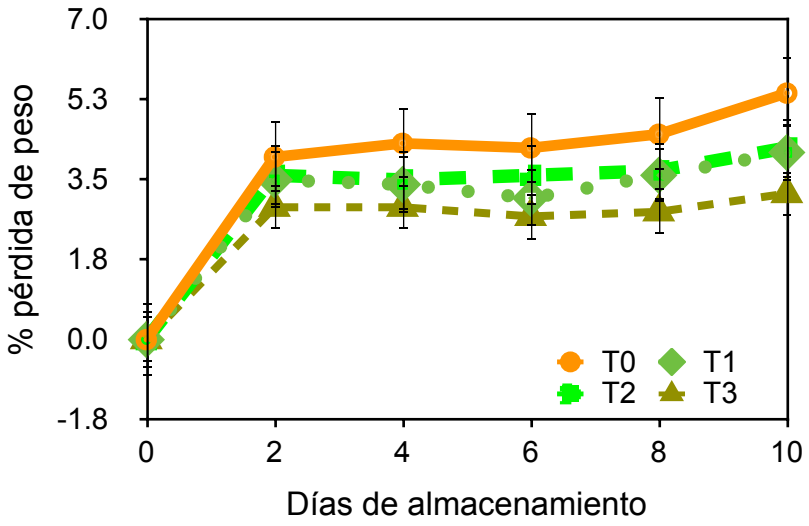


Figura 15. Pérdida de peso de frutas de papaya respecto al tiempo de almacenamiento.

La pérdida de peso observada en los días dos y cuatro fue estadísticamente igual en todos los tratamientos. A partir del día seis se observó diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3 respecto al tratamiento T1. Estadísticamente es a partir del día seis cuando se puede mencionar que los tratamientos con recubrimientos fueron mejores que los que no presentaron recubrimientos. Hagenmaier y Baker (1993) mencionan que las variaciones observadas en los tratamientos se deben principalmente a la capacidad de la película para formar una capa continua sobre la superficie de la fruta. Price

et al., 2000 señalaron que la deshidratación de las frutas se puede reducir por la presencia de una cubierta cérea externa o epicuticular que aumente la resistencia a la cutícula a la difusión de agua.

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que las papayas con recubrimiento almacenadas a temperatura ambiente permiten controlar pérdidas de peso en papaya hasta un 40 % en comparación con las papayas sin recubrimiento, lo cual supera a los resultados encontrados por Almeida *et al.* (2011) quienes evaluaron recubrimientos de almidón de yuca en papayas almacenadas a temperatura ambiente (25 ± 2 ºC) durante 6 d de almacenamiento. Tellez-Pichardo *et al.* (2013) evaluaron recubrimientos de cera y polifenoles de candelilla en papaya a temperatura ambiente, sin embargo obtuvieron resultados menores a los obtenidos en la presente investigación, ya que reportaron pérdidas de peso mayor a 5 % a partir del día seis y alcanzando hasta un 14 % en el día ocho. Por otra parte Miranda *et al.* (2013), obtuvieron pérdidas de peso de 1.68 % en el día tres y hasta 9.54 % en el día nueve aplicando recubrimientos a base de almidón de yuca en frutas de papaya almacenadas a temperatura ambiente.

La presencia de compuestos activos añadidos en los recubrimientos logran retardar la senescencia del fruto, lo cual se atribuye principalmente a: a) naturaleza hidrofóbica del recubrimiento, b) la barrera formada, c) la disminución de la concentración de O_2 e incremento de CO_2 que reduce el número de poros por el cual el vapor de agua y otros gases se intercambian, y d) la presencia de compuestos con actividad antioxidante y antifúngica (Tellez-Pichardo *et al.*, 2013).

Los tratamientos T1, T2 y T3 mantuvieron un porcentaje de pérdida de peso menor al 5 %. La aplicación del recubrimiento en papayas disminuyó la pérdida de peso. La pérdida de peso en frutas es un factor crucial para preservar la fruta. La pérdida de peso deprecia el valor comercial de los frutos, debido a que presentan una superficie arrugada. La papaya se comercializa por unidad de peso, y la pérdida del mismo resulta en un menor rendimiento (Almeida *et al*., 2011).

6.4.2 pH y ºBrix

Hubo una tendencia positiva en el contenido de sólidos solubles totales de la pulpa de la papaya proporcional a los días de almacenamiento, lo cual concuerda con lo reportado por Acosta *et al*. (2001), De la Cruz *et al.* (2010), Santamaría *et al.* (2009a). Santamaría *et al*. (2009a) mencionan que con la maduración de la papaya el contenido de sólidos solubles totales tiende a aumentar. El mismo autor menciona que la madurez de consumo de la papaya "maradol" se alcanza cuando la fruta tiene un contenido de sólidos solubles totales entre 10 y 11.5, lo cual concuerda con los valores de los tratamientos T0, T1 y T2 al día 10 de almacenamiento. El tratamiento T3 presentó el menor contenido de sólidos solubles al día 10 de almacenamiento (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de la concentración de aceite esencial de *C. reticulata* en el pH y ºBrix en pulpa de papaya a los 0 y 10 días de almacenamiento a 20 ºC ± 2.

	Tratamiento	pH	ºBrix
Día 0	T0	5.01a	7.91a
	T1	5.15a	7.71b
	T2	4.92a	7.80ab
	T3	5.1a	7.81ab
Día 10	T0	6.29a	11.46a
	T1	5.9a	10.46ab
	T2	6.17a	11.03ab
	T3	6.5a	9.61b

[1]Película de quitosano y aceite esencial: T0= sin aceite esencial, T1= aceite esencial al 0.5 %, T2 aceite esencial al 1.0 % y T3 = aceite esencial al 1.5 %
Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, α=0.05).

Respecto al pH observado, puede apreciarse que no existió diferencia significativa entre tratamientos evaluados en el día 10. Los resultados concuerdan con lo observado por Martínez-Tenorio y López-Malo (2011), ya que al día 10 obtuvieron valores de pH similares entre papayas sin recubrimiento y con recubrimiento, sin embargo entre el día 5 y 8 los mismos

autores obtuvieron un pH más alcalino en papayas con recubrimientos biodegradables con aceites esenciales en comparación con papayas sin recubrimiento. Los valores de pH al décimo día observados en el presente estudio fueron similares a los reportados por Azavedo *et al.* (2006), quienes evaluaron papaya con film comercial Xtend® y poliestireno de baja densidad; pero superiores a los reportados por Miranda *et al.* (2014), quienes reportan al día 9 valores de 5.3 a 5.6 en papayas con recubrimientos de almidón de yuca y cera comercial, los mismos autores mencionan que el aumento del pH a partir del día 9 puede ser atribuido a una reducción de los ácidos presentes en la fruta, lo cual puede deberse a la reducción de la actividad metabólica provocada por la menor difusión del oxígeno.

Los resultados demuestran que los recubrimientos biodegradables aplicados en papaya influyen en el contenido de azúcares totales en la pulpa, sin embargo no afecta en los niveles de pH de la pulpa de la papaya.

6.4.3 Color

Los valores de *hue* en la superficie de la papaya presentaron una tendencia decreciente, con una reducción de *hue* de aproximadamente 50º en las papayas sin recubrimiento (testigo) y de aproximadamente 27º, en general, en las papayas con recubrimiento del día 0 al día 10 de almacenamiento, lo cual corresponde a un cambio de color en la epidermis de la papaya de verde a anaranjado (Figura 16). El contenido de aceite esencial adicionado en los recubrimientos no afectó los valores de *hue* de los tratamientos con recubrimiento. La línea de tendencia de los valores de *hue* del testigo, muestra mayor pendiente (50 %) comparado con la línea de los tratamientos, lo cual corresponde a una mayor velocidad en el cambio de coloración verde a anaranjado en las papayas sin recubrimiento. La aplicación de recubrimientos en papayas retardó el proceso de maduración al mantener coloración verde en la epidermis de la papaya por más tiempo. Derivado del ejercicio de regresión lineal simple de los valores de *hue* se proyecta que aproximadamente a los 20 d de almacenamiento de la papaya con recubrimiento los valores de *hue* en la epidermis alcanzarían los valores reto (a obtener) que las papayas sin recubrimiento a los 10 d (Figura 17A).

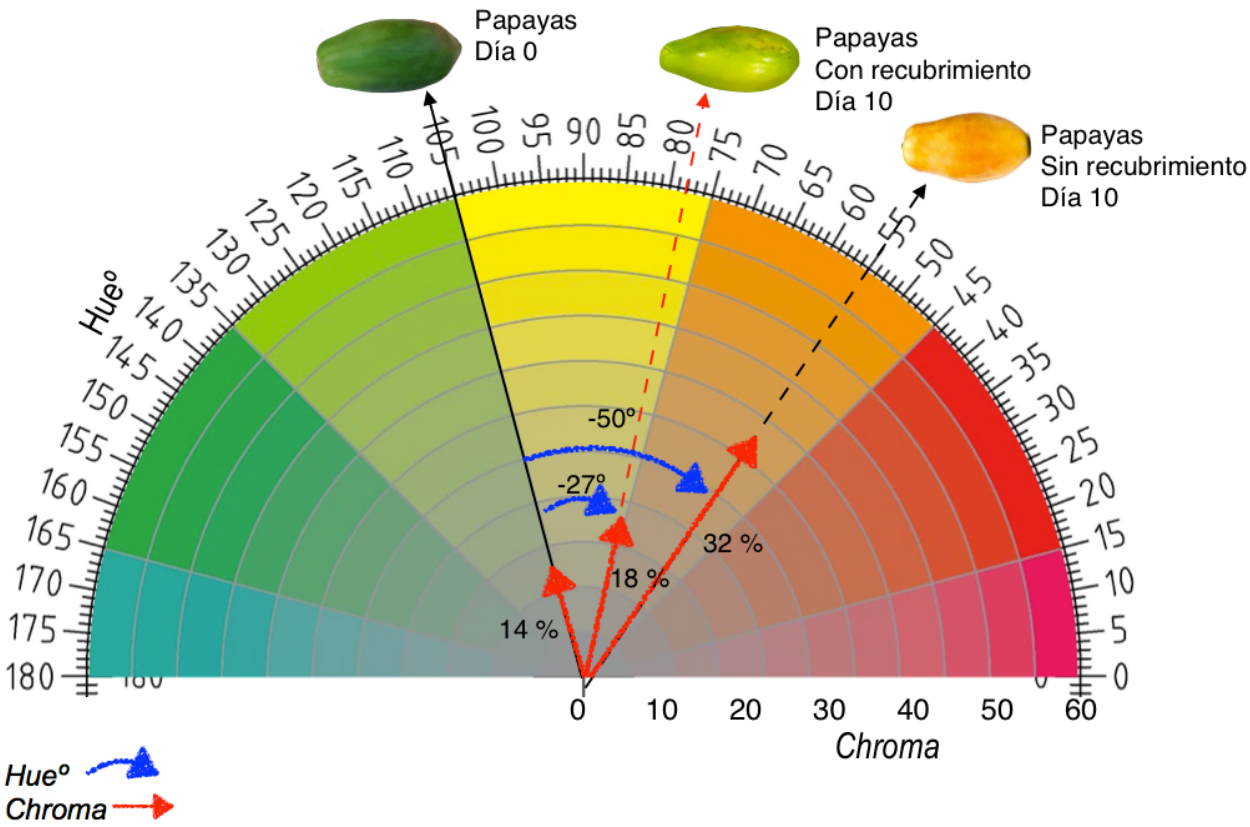


Figura 16. Variación en los indicadores de color (*hue y chroma*) en papaya con y sin recubrimiento a los 0 y 10 días de almacenamiento.

La saturación de color (*chroma*) en la epidermis de la papaya, fue significativamente menor en las frutas con recubrimiento (Figura 16). Las papayas sin recubrimiento alcanzaron un valor significativamente superior en comparación con las papayas con recubrimiento (10 % mayor) a partir del día 8 de almacenamiento. El contenido de aceite esencial en el recubrimiento no afectó los valores de *chroma* de la epidermis de la papaya. Los valores de los tratamientos T1 y T2, que corresponde a las papayas con recubrimiento muestran un cambio lento en chroma con el tiempo de almacenamiento. Los valores altos de *chroma* resultan ser más atractivos a los consumidores debido a que el color es de mayor intensidad, sin embargo los valores bajos observados en las papayas con recubrimiento no fueron menos atractivos. La tendencia de los valores de *chroma* derivado del ejercicio de regresión lineal simple permite estimar que se alcancen los valores reto (a obtener) de *chroma* que las papayas sin recubrimiento aproximadamente a los 20 días (Figura 17B).

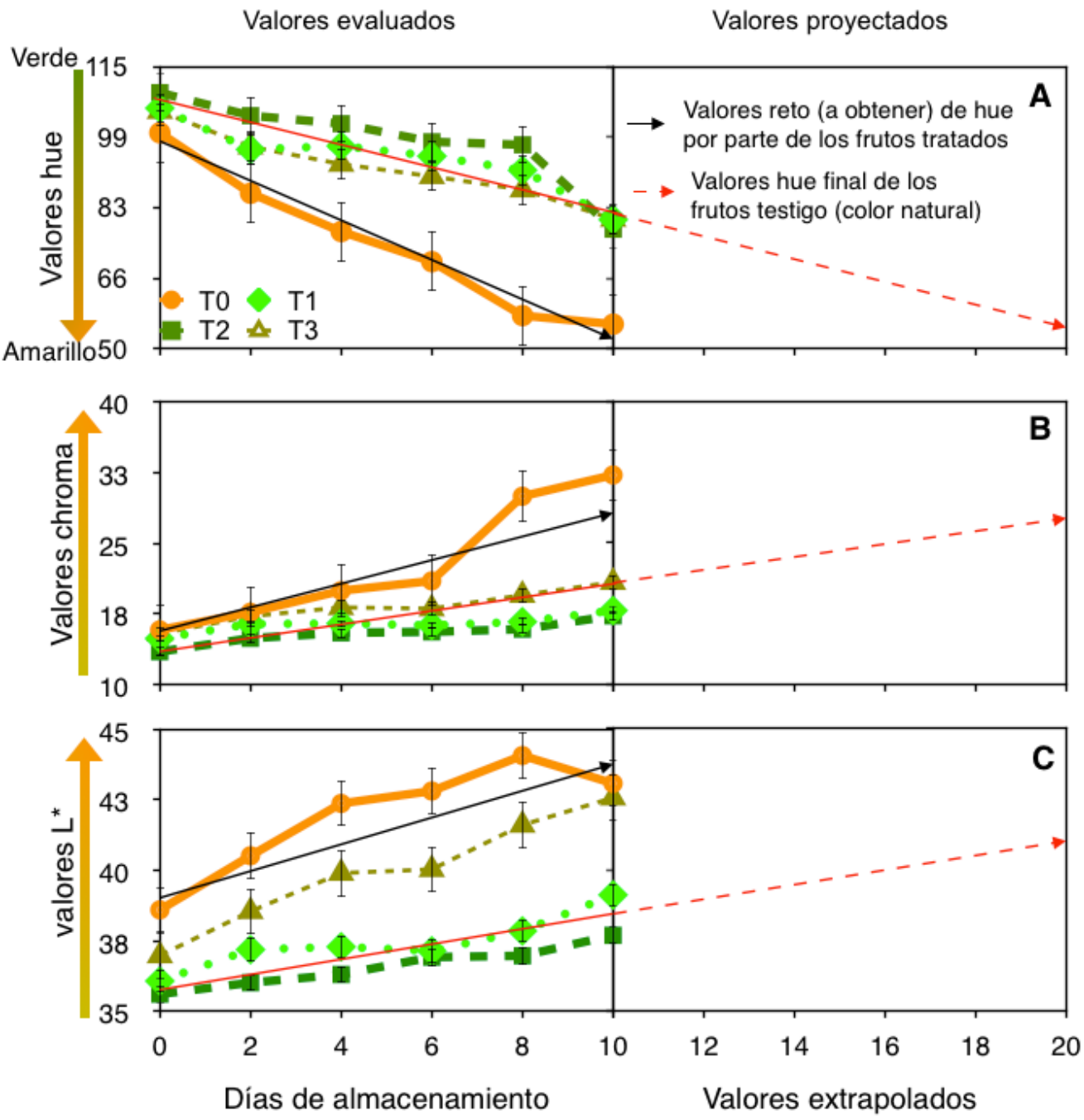


Figura 17. Variación en los indicadores de color en papaya durante 10 d de almacenamiento: A) Valores de *hue*; B) valores de *chroma; C*) Valores de L*.

Respecto a los valores de luminosidad (L*) observados en los tratamientos del presente estudio, se observó un incremento en los cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3) durante el tiempo de almacenamiento (Figura 16), resultados que concuerdan con Santamaría *et al.* (2009b). La variación en el contenido de aceite esencial (0, 0.5 y 1.0 %) en el recubrimiento aplicado en papaya no provocó diferencia significativa en los valores de L* a lo largo del

periodo de almacenamiento. Derivado del ejercicio de regresión lineal simple de los valores de L* se proyecta que aproximadamente a los 28 d de almacenamiento de la papaya con recubrimiento los valores de *hue* en la epidermis alcanzarían los valores reto (a obtener) que las papayas sin recubrimiento a los 10 d (Figura 17C).

Se pudo observar que el cambio de color fue más rápido en las frutas sin recubrimiento, estadísticamente es a partir del día 6 que puede apreciarse una diferencia significativa entre las frutas con recubrimiento en comparación con aquellas sin recubrimiento. El mejor tratamiento observado fue el T2. La manifestación del color naranja durante la maduración del fruto de papaya está relacionada con cambios en el contenido de pigmentos, principalmente por la degradación de clorofila, como consecuencia de procesos oxidativos, así como por la síntesis de otros pigmentos como los rojos y amarillos (carotenoides) (Sañudo *et al*., 2008; Almeida *et al*., 2011).

6.4.4 Respiración

El patrón respiratorio observado durante el periodo de almacenamiento de la papaya fue igual a lo reportado en otros estudios para frutas climatéricas, con un patrón oscilatorio en la producción de CO_2 y un aumento en la producción de etileno durante el periodo de almacenamiento (Sañudo *et al*., 2008; Velasco-Ulloa *et al*., 2012) (Figura 18). La tasa respiratoria de la papaya puede variar según lo establecido por (Kader, 2006) desde 6 a 60 mL de $CO_2 \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$ lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

El pico máximo de producción de CO_2 se alcanzó en el día 6 en las frutas sin recubrimiento con un valor de 45.6 mg de $CO_2 \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$. La producción de CO_2 fue menor en las papayas con recubrimiento, observando diferencias significativas principalmente entre los días 4 y 6. Se alcanzó una producción máxima de 27.9 mg de $CO_2 \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$ al décimo día en frutas con recubrimiento. Los valores de CO_2 concuerdan con lo reportado por Mercado-Ruiz *et al*., (2014) quienes evaluaron cera comestible aplicada a papaya almacenada a temperatura ambiente por 12 días. El mismo autor

menciona que la producción de CO_2 en papayas depende principalmente de la variedad y los componentes de los recubrimientos que se aplican.

Los resultados demuestran que la aplicación de recubrimientos de quitosano y aceite esencial de cítricos permiten controlar la tasa de producción de CO_2 (Figura 18A). no obstante no siempre la aplicación de recubrimientos mejora la vida de anaquel. Pontigo-Suarez *et al.* (2015) observaron una alta producción de CO_2 en papayas con recubrimiento a base de carboximetilcelulosa adicionado con aceite esencial de orégano, posiblemente debido al estrés que se provocó en la fruta al momento de la aplicación del recubrimiento.

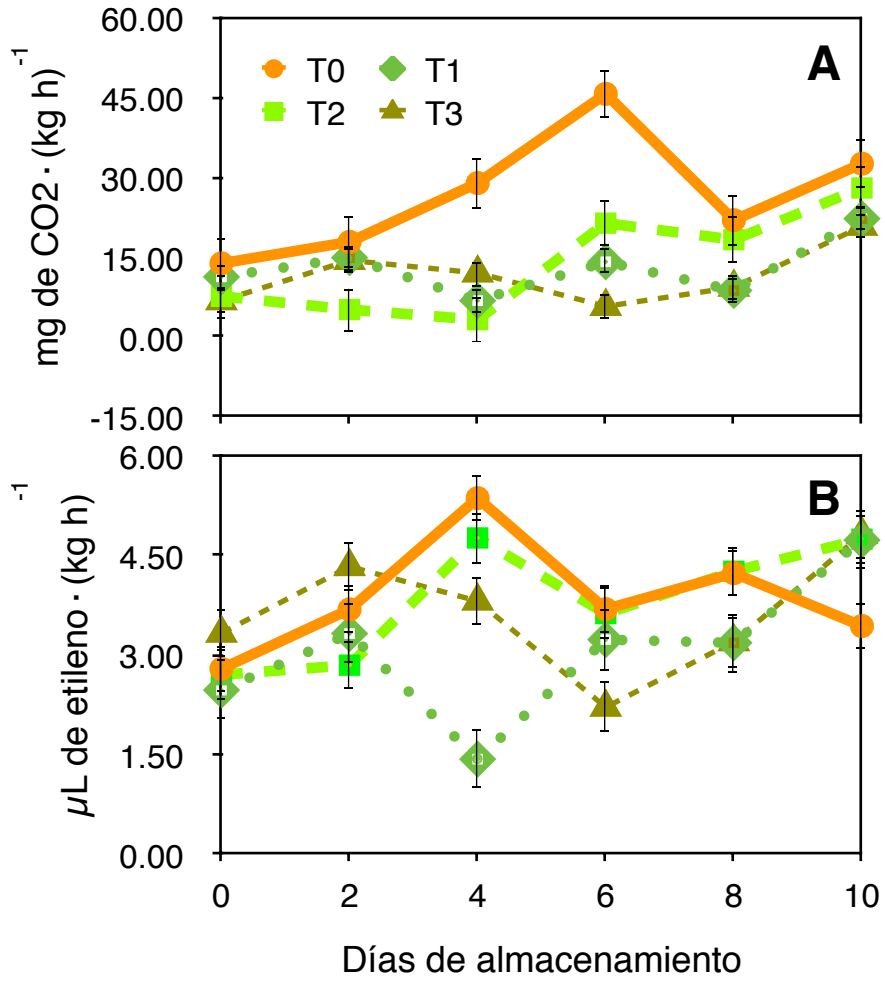


Figura 18. Respiración en papaya durante el almacenamiento: A) Producción de CO_2; B) Producción de etileno.

En respuesta a la producción de etileno (Figura 18B), no se observó diferencia significativa entre los tratamientos T0 y T2, en los cuales se observó un pico de producción de etileno en el día 2 con valores de 4.7 y 5.3 $\mu L \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$, respectivamente, observando un decremento en los siguientes días de almacenamiento. Se observó una diferencia significativa en la producción de etileno del tratamiento T1 en el cuarto día, 26.4 % menor en comparación con la fruta sin recubrimiento. La variación de la producción de etileno en papaya fue similar a lo reportado por Sañudo *et al*. (2008) y Santamaría-Basulto *et al.* (2009b).Los recubrimientos en frutas actúan como una barrera en la superficie, modificando el intercambio gaseoso del interior de la fruta con el medio exterior, el recubrimiento provoca una disminución en la tasa respiratoria y, por lo tanto, una prolongación de la vida poscosecha de producto (Vázquez-Biones y Guerrero-Beltrán, 2013).

6.4.5 Firmeza

La firmeza inicial de los frutos de papaya presentó valores de 148 N ± 2, que concuerda con lo reportado por Sañudo *et al*. (2008) quienes reportaron valores de 144 N de papaya con recubrimiento en estado de madurez fisiológica (Figura 19). Santamaría *et al*. (2009a) mencionan que la madurez de consumo de la papaya maradol se alcanza cuando la fruta tiene una firmeza de la pulpa de 4.7 a 6.9 N. Al día 10 se diferenciaron estadísticamente las frutas con recubrimiento respecto a las que no se les aplicó recubrimiento. Se observó una tendencia decreciente en los valores de firmeza en los cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3), siendo más rápida en las papayas sin recubrimiento, lo cual concuerda con lo reportado por Pontigo-Suárez *et al*. (2015). Numéricamente el tratamiento T3 fue el que mantuvo valores de firmeza más altos al día 10 de almacenamiento, sin embargo no se mostró diferencia significativa respecto a los otros tratamientos con recubrimiento. Sañudo *et al.* (2008) mencionan que el efecto inhibidor e inductor de la maduración en frutas de papaya puede ser observada a través de la velocidad de ablandamiento de los frutos.

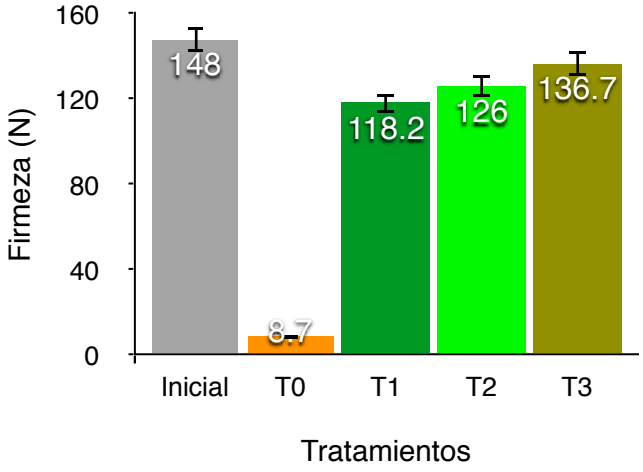


Figura 19. Firmeza en papaya al día 10 de almacenamiento.

Pontigo-Suárez *et al*. (2015) mencionan que uno de los mecanismos que provoca la reducción de la textura es el rompimiento enzimático de los polisacáridos durante la maduración, causando el debilitamiento de las paredes celulares provocando ablandamiento de la fruta.

6.4.6 Daño causado por antracnosis *in vivo*

La aplicación de los recubrimientos biodegradables en papayas inoculadas con *C. gloeosporioides* mostraron una reducción significativa en los síntomas de la enfermedad con porcentajes de severidad bajos. En las frutas sin recubrimiento se observó síntoma de antracnosis con alto porcentaje de severidad.

En el Cuadro 10 se observa que existió más del 80 % en la eficacia de los recubrimientos para el control de *C. gloeosporiodes* en frutas con recubrimiento biodegradable respecto a las frutas sin recubrimiento. El contenido de aceite esencial no reflejó diferencia estadísticamente significativa en cuanto al efecto sobre el porcentaje de severidad y eficacia en la inhibición de *C. gloeosporioides.*

Cuadro 10. Sintomatología, porcentaje de severidad, eficacia y control de *C. gloeosporioides* en papaya.

Tratamiento	Síntoma	% severidad	% eficacia	% control
T0[1]	Mancha hundida, redondeada y acuosa color gris-negra	97.14a	0a	0a
T1	Mancha superficial, irregular y seca color gris	17.14b	82.35b	60b
T2	Mancha superficial, irregular y seca color gris	17.14b	82.35b	60b
T3	Mancha superficial, irregular y seca color gris	14.29b	85.29b	60b

[1]Película de quitosano y aceite esencial: T0= sin aceite esencial, T1= aceite esencial al 0.5 %, T2 aceite esencial al 1.0 % y T3 = aceite esencial al 1.5 % Los valores muestran el promedio de 6 réplicas. Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, α=0.05).

Los porcentajes de control del hongo para los frutos con recubrimiento fueron de 60 %, los resultados son similares a lo reportado por Bosques-Molina *et al.* (2010), quienes lograron reducir un 60 % de antracnosis en papayas con recubrimiento adicionado con aceite esencial de limón mexicano al 0.1 %. Los mismos autores observaron que la concentración de aceite esencial utilizado en la formulación de recubrimientos no fue un factor determinante en la reducción del desarrollo del hongo. Landero *et al*. (2013) observaron que a dosis más altas de extracto de ajo aplicado en recubrimiento en papaya no se mostró mayor control sobre *C. gloeosporioides*, al contrario observó severidad más alta de daño conforme se incrementó la dosis de extracto. Los autores mencionan que ese efecto puede deberse a un posible fenómeno de toxicidad en el fruto que tendría como consecuencia el incremento de la severidad de la enfermedad.

Pontigo-Suárez *et al.* (2015) reportaron una disminución de 40 % en los síntomas de antracnosis en papaya con un recubrimiento a base de carboximetilcelulosa y 0.5 % de aceite esencial de orégano. El mismo autor explica que los recubrimientos funcionan disminuyendo el deterioro producido por hongos sobre la epidermis de la fruta.

6.4.7 Duración del recubrimiento

Se observó en las frutas con recubrimiento un desprendimiento del mismo al día 10 de almacenamiento (Figura 19). Probablemente debida a la pérdida de peso. Esta característica fue similar a lo encontrado por Pontigo-Suárez *et al.* (2015) quien observó desprendimiento de recubrimientos aplicados en papaya a base de carboximetilcelulosa y aceite esencial de clavo y canela, observando un mayor desprendimiento en aquellos recubrimientos con mayor contenido de aceite esencial en su formulación.

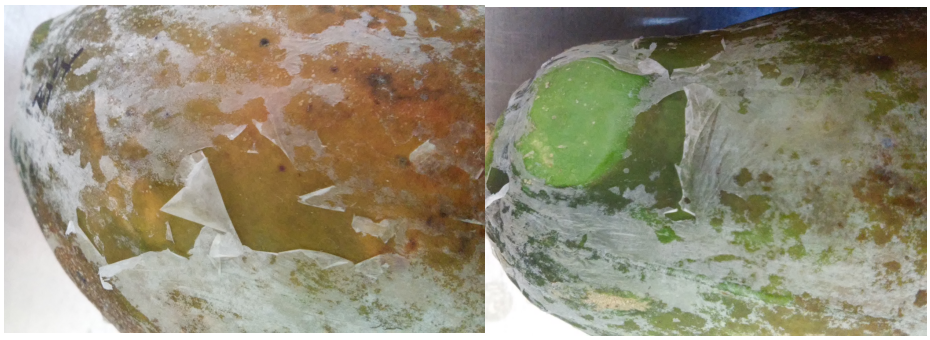


Figura 20. Desprendimiento del recubrimiento biodegradable de la superficie de papaya al día 10 de almacenamiento a temperatura ambiente.

7. CONCLUSIONES

Los rendimientos de aceite esencial de *C. sinensis* (naranja), *C. reticulata* (mandarina) y *C. paradisi* (toronja) fueron de 0.07 %, 0.15 % y 0.03 % por kg de fruta, respectivamente. Los aceites esenciales de las tres variedades evaluadas tuvieron efecto negativo en el crecimiento de *C. gloeosporioides in vitro* a una concentración de 100 %. El aceite esencial de *C. reticulata* presentó el mayor efecto antifúngico *in vitro* (32.35 %) en *C. gloeosporioides*.

Se obtuvieron películas de quitosano y aceite esencial de *C. reticulata* transparentes con grosor promedio de 0.095 mm, con 33.98 y 23 % de solubilidad y humedad respectivamente, y un porcentaje de degradación en suelo de 98 % a los 90 d.

Los recubrimientos biodegradables aplicados en papaya diminuyeron la pérdida de peso 32.6 % y no influyeron en el contenido de pH de la pulpa. El recubrimiento con 1.0 % de aceite esencial mantuvo valores de ºBrix bajos (9.6).

Los recubrimientos biodegradables retrasaron el cambio de coloración de verde a anaranjado en la epidermis de la papaya, bajaron la tasa de respiración (50 %), redujeron el porcentaje de severidad de daños de *C. gloeosporioides* (80 %) y mantuvieron altos índices de firmeza (90 %) en comparación con papayas sin recubrimiento.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Abdollahi, M.; Rezaei, M.; Farzi, G. 2012. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. International Journal of Food Science and Technology 47(4): 847-853.

Acosta R., M.; Nieto-Ángel, D.; Domínguez-Álvarez, J. L.; Delgadillo-Sánchez, F. 2001. Calidad y tolerancia en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) a la inoculación del hongo *Colletotricum gloeosporioides* Penz., en postcosecha. Revista Chapingo Serie horticultura 7(1): 119-130.

Aguilar-Alonso, P.; Navarro-Cruz, A. R.; Sánchez-Flores, A. B.; Menesses-Sánchez, M. C.; Ávila-Sosa, R. 2013. Efecto antifúngico de extractos de plantas originarias del estado de Puebla sobre *Colletotricum gloeosporioides*. CienciaUat 7(2): 6-11.

Albarracín-Hernández, W.; Valderrama B., N. 2014. Inclusión de compuestos químicos en matrices poliméricas de quitosano y su efecto en las propiedades de pellicoula. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 21(1): 49-59.

Almeida C., A.; Reis P., J. D.; Santos S., D.; Vieira de O., T.; de Costa O., M. 2011. Estudio de la conservación de la papaya (*Carica papaya L*.) asociado a la aplicación de películas comestibles. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2(1): 49-60.

Alvarado H., A. M.; Barrera N., L. L.; Hernández L., A. N.; Velázquez del V., G. M. 2011. Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. Rev. Colomb. Biotecnol 8 (2): 127-134.

Alzamora, L.; Morales, L.; Armas, L.; Fernández, G. 2001. Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina 62 (2): 156-161.

Alzate N., A.; López V., K.; Martín H., A.; Murillo A., W. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis, Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis, Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. Revista Tumbaga 4: 59-71.

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). 1980. Oficial Methods of Analysis. William Horwitz (ed.). 13th edition. Washington D.C., USA. 1023 p.

Appendini, P.; Hotchkiss J. H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science and Emerging Technologies 3: 113-126.

Araya, A.; Meneses L. 2010. Influencia de algunos ácidos sobre las propiedades fisico-quimicas de pellicoulas de quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo. Revista Tecnológica ESPOL-RTE 23(1): 143-148.

Arcas L., N.; Ruiz M., S. 1999. La comercialización de frutas y hortalizas en el entorno internacional. Distribución y Consumo 35: 55-88.

ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria).2010 Revista Claridades Agropecuarias. Número 197. Consultado en: Http:// www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/197/ca197-32.pdf (10/08/2015).

ASTM D5511 – 12. 2005. Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials Under High-solids Anaerobic-digestion Conditions. EE.UU. 7 p.

Ávalos G. A.; Pérez-Urria C., E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca. Serie Fisiología Vegetal 2(3): 119-145.

Avello L., M. A.; López C., C.; Gatica V., C.; Bustos C.,E.; Brieva C., A.; Pastene N., E.; Bittner B., M. 2012. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. Revista Cubana de Plantas Medicinales 17(1): 73-83.

Baldwin, E. A.; Nisperos, M. O.; Hagenmaier, R. D.; Baker, R. E. 1997. Use of lipids in coatings for food products. Food Technology 51(6): 56-64.

Baños G., P. E.; Zavaleta M., E.; Colinas L., M. T.; Luna R., I.; Gutiérrez A., J. G. 2004. Control biológico de Colletotricum gloeosporioides [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. Revista Mexicana de Fitopatología 22(2): 198-205.

Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición. Minesota. APS Press 218 p.

Bauer, A. W.; Kirby, M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standarized single disk method. Am J Clin Pathol 45: 493-496.

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

Beverlya, R. L.; Janes, M. E.; Prinyawiwatkula, W.; No, H. K. 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology 25: 534-537.

Blanco T., C.; Stashenko, E. E.; Combariza, M. Y.; Martínez, J. R. 1995. Comparative study of colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography 697:501-513.

Borboa-Flores, J.; Rueda-Puente, E. O.; Acedo-Félix, E.; Ponce, J. F.; Cruz-Villegas, M.; García-Hernández, J. L.; Ortega-Nieblas, M. M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana in *vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis.* Tropical And Subtropical Agroecosystems 12: 539-547.

Bourtoom, T. 2008. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. Songklanakarin Journal Science and Technology 30(1): 149-165.

Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.

Cabrera M., D.; García H., D.; Efraín G., J.; Portal, O. 2013. Manejo de epifitas del Virus de la mancha anular de la papaya utilizando barreras de *Zea mays* L. en *Carica papaya* L. Rev. Protección Veg. 28(2): 127-131.

Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. Journal of Food Protection 67: 833-848.

Calero, N.; Muñoz, J.; Ramírez, P.; Guerrero, A. 2010. Flow behaviour, linear viscoelasticity and surface properties of chitosan aqueous sotution. Food Hyfrocoloids 24: 659-666.

Calero, N.; Muñoz, J.; Guerrero. 2013. Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano. Grasas y Aceites 64(1): 15-21.

Campos, C.; Gerschenson, L.; Flores, S. 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. Food and Bioprocess Technology 4(6): 849-875.

Cano, J.; Guarro, J.; Josepa, G. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrocum* species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology 42(6): 2450-2454.

Cárdenas, G.; Anaya, P.; Del Río, R.; Schrebler, R.; von Pressing, C.; Schneider, M. 2010. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy of chitosan composite films. Journal of the Chilean Chemical Society 55(3): 352-358.

Castañeda R., C.; De la Fuente S., N. M.; Pacheco C., R. D.; Ortíz R., T.; Barboza C., J. E. 2011. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. Acta Universitaria 21 (3): 14-23.

Cerón-Salazar, I.; Cardona-Alzate, C. 2011. Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. Ingeniería y Ciencia 7 (13): 65–86.

Chávez G., M. L.; Aguilar, C. N. 2012. Aprovechamiento de la industria citrícola. Cienciacierta 8 (29): 23-25.

Chen, M. C.; Yeh, G. H. C.; Chiang, B. H. 1996. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. Journal of Food Processing and Preservation 20(5): 379-390.

Cifuentes B., M. C.; García J., D. J. 2006. *Colletotricum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. Investigaciones Andina 8(13): 73-80.

Cira, L. A.; Huerta, S.; Shirai, K. 2002. Fermentación láctica de cabeza de camarón (*Penaeu sp*) en un reactor de fermentación sólida. Revista Mexicana de Ingeniería Química 1: 45-48.

Cocoletzi, H. H., Almanza, E. Á., Agustin, O. F., Nava, E. V., & Cassellis, E. R. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. Superficies y Vacíos 22(3): 57-60.

Consentino, S.; Tuberoso, C.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology 29: 130-135.

CORPOICA. 2001. Manual de Procedimientos para Obtención de Cultivos Monospóricos. 89 p.

De la cruz, J.; Vela, G.; Dorantes, L., García, H. S. 2010. Efecto del etileno sobre el ACC y ACC oxidasa en la maduración de papaya “Maradol”. Re. Fitotecnia Mexicana 33(2): 133-140.

Djioua, T.; Charles, F.; Freire, M.; Filgueiras, H.; Ducamp-Collin, M.; Sallanon, H. 2010. Combined effects of postharvest head treatment and chitosan coating on quality of fresh cut mangoes (*Mangifera indica L.*). International Journal of Food Science and Technology 45(4): 849-855.

Domínguez-Guerrero, I. P.; Mohali-Castillo, S. R.; Marín-Montoya, M. A.; Pino-Menesini, H. B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en plantaciones de palma aceitera (Elaeis guineensis Jacq.) en Venezuela. Tropical Plant Pathology 37(2): 108-122.

Draughon, F. A. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. Food Technology 58 (2): 20-28.

Duarte R., S.; Cárdenas M., C. Y.; Martínez M. J.; Stashenko, E. E. 2007. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles ibtenidos por destilación - extracción con solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae). Ciencia et Technica 13(33): 83-85.

Escalante, M.; Santos, I.; Rojas, L. B.; Lárez-Velasquez, C. 2012. Aprovechamiento de deshechos orgánicos: 1. Extracción y caracterización del aceite de semillas de naranja colectadas en expendios ambulantes de jugos. Avances en Química 7(3): 181-186.

Escobar, D.; Sala, A.; Silvera, C.; Harispe, R.; Márquez, R. 2009. Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero láctico: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbito de potasio como conservador. Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay 4: 33-36.

Fang, S. W.; Li, C. F.; Shih, D. Y. C. 1994. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumwuat. Journal of Food Protection 56: 136-140.

FAO. 1987. Manual para el Mejoramiento del Manejo Poscosecha de Frutas y Hortalizas. Oficina Regional de la FAO para America Latina y El Caribe. Santiago, Chile. Ed. FAO. 100 p.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization, World Health Organization), 2003. Hazard characterization for pathogens in food and water. Microbiological Risk Assessment Series, No. 3. Food and Agriculture Organization of the United Nations, VialedelleTerme di Caracalla, Rome, Italy. 53 p.

Flores Q., E.; Velasco A., P.; Figueroa S., N.; Gimenez T., A. 1999. Aceites esenciales con propiedades antimicrobianas. Biofarbo 8: 5-8.

García Z., T.; Roca O., J. M. 2008. Industrialización de los crustáceos para la obtención de quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial 11(2):24-32.

García M., R.; Pérez P, R.; Rodríguez H., C.; Soto H., M. 2004. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. Revista Fitotecnia Mexicana 27(4): 297-303.

Gaviria-Hernández, V.; Patiño-Hoyos, L. F.; Saldarriaga-Cardona, A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotricum spp*., en mora de castilla. Corpoica Cienc. Tecno. Agropecu. 14(1): 67-75.

Gennadios A. 2002. Protein-Based Films and Coatings. CRC Press. U. S. 651 p.

Gontard, N.; Duchez, C.; Cuq, J. L.; Guilbert, S.1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. International Journal of Food Science and Technology 29: 39-50.

Guédez, C.; Cañizalez, L.; Avedaño, L.; Scorza, J.; Castillo, C.; Olivar, R.; Méndez, Y.; Sánchez, L. 2014. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). Rev. Soc. Venez. Microbiol. 34(2): 81-87.

Guerra, L.; Soto, L.; Medina, Z.; Ojeda de R., G.; Peña, J. 2014. Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos gram negativos. Rev. Fac. Agron. 31: 215-232.

Guilbert, S.; Gontard, N.; Gorris, L. G. M. 1996. Prolongation of the shelf-life of peris-hable food products using biodegradable films and coatings. Lebensmittel Wissenschaft und Technology 29: 10-17.

Hagenmaier, R. D.; Baker, R. A. 1993. Reduction in gas exchange of citrus fruits by wax coatings. J. Agric. Food Chem. 41: 283-287.

Henriksen, I.; Green, K.; Smart, J.; Smistad, G; Karlsen, J. 1996. Bioadhesion of hydrated chitosans: an *in vitro* and in vivo study. Int. J. Pharm. 145: 231-40.

Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B.; Gontard, N. 2001. New plasticizers for wheat gluten films. Eur. Polym. J. 37: 1533.

Hernández, I. 2004. La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. Cultivos tropicales 25(3):97-110.

Hernández C., H.; Águila A., E.; Flores A., O.; Viveros N., E. L.; Ramos C., E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. Superficies y Vacío 22(3): 57-60.

Hernández L., A. N.; Bautista B., S.; Velázquez V., M. G. 2007. Prospectivas de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 30(2): 119-123.

Hernández-Albiter, R.; Bravo-Luna, L.; Corona-Rangel, M.; Villa-Ayala, P.; Baños S.; Barrera-Necha L. 2005. Morphocultural and symptomatological characterization of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. from papaya (*Carica papaya L.)*. Revista Mexicana de Fitopatología 23(3): 223-231.

Hernández-Ochoa, L.; Gonzáles-Gonzáles, A.; Gutiérrez-Mendez, N.; Muñoz-Castellanos, L. N.; Quintero-Ramos, A. 2011. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. Revista Mexicana de Ingeniería Química 10(3): 455-463.

Hosseini, M. H.; Razavi, S. H.; Mousavi, M. A. 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated whit thyme, clove and cinnamon essential oils. Journal of Food Processing and Preservation 33: 727-743.

Huerta-Palacios, G.; Holguín-Meléndez, F.; Benítez-Camillo, F. A.; Toledo-Arreola, J. 2009. Epidemiología de la Antracnosis [Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (Mangifera indica L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27(2): 93-105.

IICA. 1986. Conservación de Frutas y Hortalizas. Programa Nacional de Capacitación Agropecuaria. Colombia 46 p.

International Standarization Organization. ISO 6571. Spices, Condiments and Herbs-Determination of Volatile Oil Content. 1984; (Norma ISO). 9 p.

Jeffries, P.; Dodd, J. C.; Jeger, M. J.; Plumbley, R. A. 1990. The biology and control of Colletotrichum species on tropical fruit crops. Plant Pathology 39:343-366.

Juárez, J. R.; Castro, A. J.; Jaúregui, J. F.; Lizano, J. V.; Carhuapoma, M.; Choquesillo, F. F.; Félix, L. M.; Cotillo, P. A.; López, J. P.; Jaramillo, M. R.; Córdova, A. I.; Ruíz, J. R.; Ramos, N. J. 2010. Composición química, actividad antibacterniana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación 13(1): 9-13.

Kader, A. A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. Food Technology 40(5): 99-104.

Kader, A. A. 2006. Recomendaciones para mantener la calidad poscosehca. University of California, Davis. Postharvest Technology Research & Information Center. USA. 2 p.

Kader, A. A. 2011. Biología y Tecnología Poscosecha: Un panorama. *In*: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas. Universidad de California. Kader, A. A. Estados Unidos. pp 45-55.

Kamal, G. M.; Ashraf, M. Y.; Hussain, A. I.; Shahzadi, A.; Chunghtai, M. I. 2013. Antioxidant potential of peel essential oils of three pakistani citrus species: *Citrus reticulata, Citrus sinensis* and *Citrus paradisii*. Pak. J. Bot. 45(4): 1449-1454.

Kim, Y. K.; Kawano, T.; Li, D.; Kolattukudy,, P.E. 2000. Mitogen-activated protein kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. The Plant Cell 12:1331-1343.

Kim, K. M.; Son, J. H.; Kim, S. K.; Weller, C. L.; Hanna, M. 2006. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. Food Engineering and Physical Properties 71(3): 119-124.

Krotcha, J. M.; De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer Films: challenges and opportunities. Food Technology 1997, 51(2): 61-74.

Kumar, M. N. V. R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. React. Funct. Polym. 46: 1-27.

Kyrikou, I.; Briassoulis D. 2007. Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. Journal of Polymer Environment 15: 125-50.

Landero V., N.; Nieto A., D.; Téliz O., D.; Alatorre R., R.; Orozco S., M.; Ortiz G., C. F. 2013. Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotricum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 4(1): 47-62.

Little, A.C. 1976. Pysical measurements as predictor of visual appereance. Food Tech. 30(10): 76-82.

López-Mata, M. A.; Ruíz-Cruz, S.; Silva-Beltrán, N. P.; Gassos-Ortega, L. E.; Ornelas-Paz, J. J. 2011. Aprovechamiento del residuo de camarón para la elaboración de recubrimientos comestibles. Ide@sCONCYTEG 6(71): 552-560.

Lota, M. L.; Serra, D. R.; Tomi, F.; Casanova, J. 2001. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. Journal of Applied Polymer Science 112: 2166-2178.

Majeti, N.; Kumar, R. 2000. A review: chitin and chitosan applications. React. Funct. Polym. 46(1): 1-27.

Mali, S.; Grossmann, M. V. E.; García, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. 2004. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. Carbohydrate Polymers 56:129-135.

Mangavel, C.; Barbot, J.; Guéguen, J.; Popineau, Y. 2003. Molecular determinants of the influence of hydrophilic plasticizers on the mechanical properties of cast wheat gluten films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1447-1452.

Mármol, Z.; Páez, G.; Rincón, M.; Araujo, K.; Aiello, C.; Chandler, C.; Gutierrez, E. 2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Revista Tecnocientífica URU 1: 53-58.

Martínez-Tenorio, Y; López-Malo, V. 2011. Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos. Temas selectos de Ingenieria de Alimentos 5 (2): 1-12.

Martucci, J. F.; Ruseckaite, R. A. 2009. Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression-molded gelatin-dialdehyde starch films. Journal of Applied Polymer Science 112(4): 2166-2178.

Mercado-Ruiz, J. N.; Guzmán-Reyes, I. C.; García-Robles, J. M.; Salinas-Hernández, R. M.; Báez-Sañudo, R. 2014. Efecto del recubrimiento con ceras comestibles en fruto de papaya (*Carica papaya* L.) sobre su calidad

durante el almacenamiento. Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha 15(1): 31-40.

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

Miranda, A. D.; Alvis, A.; Arrazola, G. 2014. Efectos de dos recubrimientos sobre la calidad de la papaya (*Carica papaya* L.) variedad Tainung. Temas Agrarios 19(1): 7-18.

Navarrete, C.; Gil, J.; Durango, D.; García, C. 2010. Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. DYNA 77 (162): 85-92.

NMX-F-317-NORMEX-2013. Alimentos-Determinación de pH en Alimentos y Bebidas No Alcohólicas- Método Potenciométrico - Método de Prueba.

Oliveira, R.; Moral, J.; Bouhmidi, K.; Trapero, A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotricum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. Bol. San. Veg. Plagas 31: 531-548.

Osuna-García, J. A.; Perez-Barraza, M. H.; Vázquez-Valdivia, V.; Urías-López, M. A. 2009. Alternativa comercial para extender vida de anaquel de papaya “maradol”. Revista Chapingo Serie Horticultura 15(2): 199-204.

Park, S. K.; Hettiarachchy, N. S.; Were, L. 2000. Degradación behavior of soy protein-wheat gluten films in simulated soil conditions. J. Agric. Food. Chem. 48: 3027-3031.

Park, S.; Marsh, K.; Rhim, J. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. J. Food Sci. 67(1): 194-197.

Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. 2008. Characterization of chitosan/ caseinate films. Journal of Applied Polymer Science 107: 1080-1090.

Pereda, M.; Moreira, M. del R.; Roura, S. I.; Marcovich, N.; Aranguren, M. I. 2014. Bio-películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos. Ciencia e Investigación 64 (2): 35-50.

Pérez C., L. M.; Saquero, M. J.; Beltrán H., J. D.; 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotricum sp.* como agente causal de la antracnosis en ñame *Discorea sp.* Revista Colombiana de Biotecnología 1(1): 24-35.

Pillai, C. K. S.; Willi, P.; Sharma, C. P.; 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science 34(7): 641-678.

Pineda C., M. A. 2011. El productor. Frutas y hortalizas. Revista de la Asociación Hortofrutícola de Colombia15: 13

Pommet, M.; Redl, A.; Morel, M. H.; Guilbert, S. 2003. Study of wheat plasticization with fatty acids. Polymer 44: 115–122**.**

Pontigo-Suárez, A. G.; Trejo-Márquez, M. A.; Lira-Vargas, A. A. 2015. Desarrollo de un recubrimiento con efecto antifúngico y antibacterial a base de aceite de orégano para conservación de papaya maradol. Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha 16 (1): 58-63.

Price, W. E.; Sabarez, H. T.; Storey, R.; Back, P. J. 2000. Role of the waxy skin layer in the moisture loss during dehydration of prunes. J. Agr. Food Chem. 48: 4193-4198.

Prusky, D.; McEvoy, J.; Leverentz, R.; Conway, W. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. Phytopathology 9: 1105–1113.

Quintero, C. J.; Falguera, V.; Aldemar, H. 2010. Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. Revista Tumbaga 5: 93-118.

Raafat, D.; Sahl, H. 2009. Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey. Microb. Biotechnol. 2: 186-201.

Ramallo, L. A.; Liotta, T. 2011. Efecto de las condiciones de elaboración en la incorporaciónn de calcio y la firmeza del mamón (C*arica papaya* L.) en almíbar. Rev. Cienc. Tecnol. 13(16): 58-63.

Ramos-García, M. L.; Bautista-Baños, S.; Barrera-Necha, L. L.; Bosques-Molina, E.; Alia-Tejacal, I.; Estrada-Carrillo, M. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. Revista Mexicana de Fitopatología 28(1): 44-57.

Rhazi, M.; Desbrieres, J.; Tolaimate, A.; Alagui, A.; Vottero, P. 2004. Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. Polymer Int. 49(4): 337-344.

Rico R., F.; Gutiérrez C., C.; Díaz-Moreno, C. 2012. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales en la calidad microbiológica de mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente procesado. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal 19(1):117-119.

Rivero, D.; Cruz, A.; Martínez, B.; Rodríguez, A. T.; Ramírez, M. A.2008. Actividad antifúngica in vitro de las quitosanas K1 y sigma frente a *Bipolaris oryzae* (B. de Haan) Shoem. Rev. Protección Veg. 23(1): 43-47.

Rodríguez-López, E. S.; Cárdenas-Soriano, E.; Hernández-Delgado, S.; Gutiérrez-Diez, A.; Mayek.Pérez, N. 2013. Análisis de la infección de *Colletrotricum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. Revista Brasileira de Frutitultura 35(3): 898-905.

Roca M., M. G.; Graças O., M.; Chamma D., L.; Mendes-Costa, M. C. 2000. Ultrastructural aspects un perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata F. sp. phaseoli*. Brazilian Journal of Microbiology 31: 223-225.

Rojas F., M. M.; Corzo L., M. ; Sánchez P., Y.; Brito, D.; Montes O., R.; Martínez, Y.; Pino P., O. 2014. Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum subbsp. carotovorum*. Rev. Protección Veg. 29(3): 197-203.

Rojas-Graü, M. A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. 2009. Edible coatings to in- corporate active ingredients to freshcut fruits: a review. Trends in Food Science and Technology 20: 438 – 447.

Rojas, J. P.; Perea, A., Stanshenko, E.E. 2009. Obtención de aceites esenciales y pectina a partir de subproductos de jugos cítricos. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía Colombia. 16 (1): 110-115.

Romanazzi, G.; Nigro, F.; Ippolito, A.; Divenere, D.; Salerno, M. 2002. Effect of pre- and post harvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. J. Food Sci. 67(5): 1862- 1867.

Rubio-Anaya, M.; Guerrero-Beltrán, J. A. 2012. Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 6 (2): 173-181.

SAGARPA, (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Comunicado de prensa. Num 260/12. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Coordinación General de Comunicación Social. Consultado en: www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/chiapas/boletines/…/BO2602015.pdf (05/08/2015).

Sahin, S.; Sumnu, S. G. 2006. Physical Properties of Foods. Ed. Board. E. U. A. 251 p.

Sanchez-González, L.; Chiralt, A.; González-Martínez, C.; Cháfer, M. 2011. Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. Journal of Food Engineering 105(2): 246-253.

Sandhya. 2010. Modificied atmosphere packaging of fresh produce: curent status and future needs. Food Sience and Technology 43 (3): 381-392.

Santamaría B., F.; Díaz P., R.; Gutiérrez A., O.; Santamaría F., J.; Larqué S., A. 2011. Control de dos especies de *Colletotricum* causantes de antracnosis

en frutos de papaya maradol. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(5): 631-643.

Santamaría B., F.; Díaz P., R.; Sauri D., E.; Espadas G., F.; Santamaría F., J. M.; Larqué S., A. 2009a. Características de calidad de frutos de papaya maradol en la madurez de consumo. Agricultura Técnica en México 35(3): 347-353.

Santamaría B., F.; Sauri D., E.; Espadas G., F.; Díaz P., R.; Larqué S., A.; Santamaría, J. M. 2009b. Postharverst ripening and maturity indices for maradol papaya. Interciencia 34(8): 583-588.

Sañudo B., J. A.; Siller C., J.; Osuna E., T.; Muy R., D.; López A., G.; Labavitch, J. 2008. Control de la maduración en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) con 1-metilciclopropeno y ácido 2-cloroetil fosfónico. Revista Fitotecnia Mexicana 31(2): 141-147.

SAS. 2000. Institute. SAS/STAT. User´s Guide. Release 9.1.3. ed. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina.

Saval, S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. BioTecnología 16 (2): 13-46.

Sierra S., C. A.; Gutiérrez C., L. A.; Martínez, S. M. 2011. Desarrollo de empaques poliméricos apropiados para la comercialización de gulupa en fresco (*Passiflora edulis* Sims). En Poscosecha de la Gupula (*Passiflora edulis* Sims). Melgarejo, L. M.; Hernández, M. S. (eds). Universidad Nacional de Colombia. República de Colombia pp: 23-32.

Sothornvit, R.; Krochta, J.M. 2000. Plasticizer effect on oxygen permeability of b-lactoglobulin films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 6298-6302.

Soto, L.; Ojeda de R., G.; Rojas, L.; Sulbarán, B.; Peña, J.; Berradre, M.; Fernández, V. 2013. Caracterización química del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi* L.). Rev. Fac. Agro. 30: 266-283.

Suzuki, T.; Tanaka-Miwa, C.; Ebihara, Y.; Ito, Y.; Uematsu, S. 2010. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry *(Fragaria* X *ananassa* Duchesne). Journal of Genetic Plant Pathology 76(I): 247-253

Tang, X.; Kumar, P.; Alavi, S.; Sandeep, K. 2012. Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposite for food packaging materials. Food Science and Nutrition 52(2): 426-441.

Télles-Pichardo, R.; Cruz-Aldaco, K.; Ochoa-Reyes, E.; Aguilar, C. N.; Rojas, R. 2013. Cubiertas comestibles de cera y polifenoles de candelilla: una alternativa de conservación de papaya (*Carica papaya* L.). Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila 5(10): 1-7.

Tharanathan R. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Food Science and Technology 14: 71-78.

Townsend G., R. y Heuberger J., W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Dis. Rep. 27: 340-343.

Tripathi, P.; Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control post harvest fungal rotting of fruit and vegetables. Post harvest Biology and Technology 32(3): 235-245.

Valencia, M. E.; Robles S., A. E.; Martínez T., M. A.; Vargas, I.; Cuamea, F.; Morón, C.; Silva, E. O.; Tapia, M. S.; Martín B., O.; González, M.; Cano, P.; Gil, M. I.; Mercado-Silva, E.; Díaz-Cinco, M. E.; Acedo-Félix, E.; García-Galaz, A.; Bhagwat, A. A.; González, R. J.; Ruíz, S.; Ayala Z., F.; Villegas-Ochoa, M.; González A., G. A.; Álvarez, E.; Rodríguez, M. S.; Elesbao A., R.; Catalá R.; Rodríguez F., A.; Rivera D., M.; Soto V., H.; Martínez, A.; Fiszman, S.; Artés H., F. 2005. Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. Editorial Logiprint. México. 558 p.

Valenzuela V., C.; Arias, J. I. 2012. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. Avances en Ciencias Veterinarias 27 (1): 33-47.

Vázquez-Briones, M. C.; Guerrero-Beltrán, J. A. 2013. Recubrimientos de frutas con biopelículas. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 7(2): 5-14.

Velasco-Ulloa, B.; Mercado-ruiz, J. N.; García-Robles, J. M.; Báez-Sañudo, R. 2012. Respuesta física y fisiológica a la aplicación de cera comestible en mangos (*Magnifera indica* L.) cvs. Tommy Atkins y Keitt. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 13(2): 130-139.

Velásquez, M. A.; Álvarez, R. M.; 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. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 15(1):7-14.

Viuda, M.; Ruiz, Y.; Fernández, J.; Pérez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. Food Control 19 (12): 1130–1138.

Wei, Y.; Shih, J.; Li, J.; Goodwin, P. H. 2002. Two pectin lyase genes, phl-1 and pnl-2, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. Microbiology 148: 2149-2157.

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

Wiles, J.; Vergano, P.; Barron, F.; Bunn, J.; Testin, R. 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. J. Food Sci. 65(7): 1175-1179.

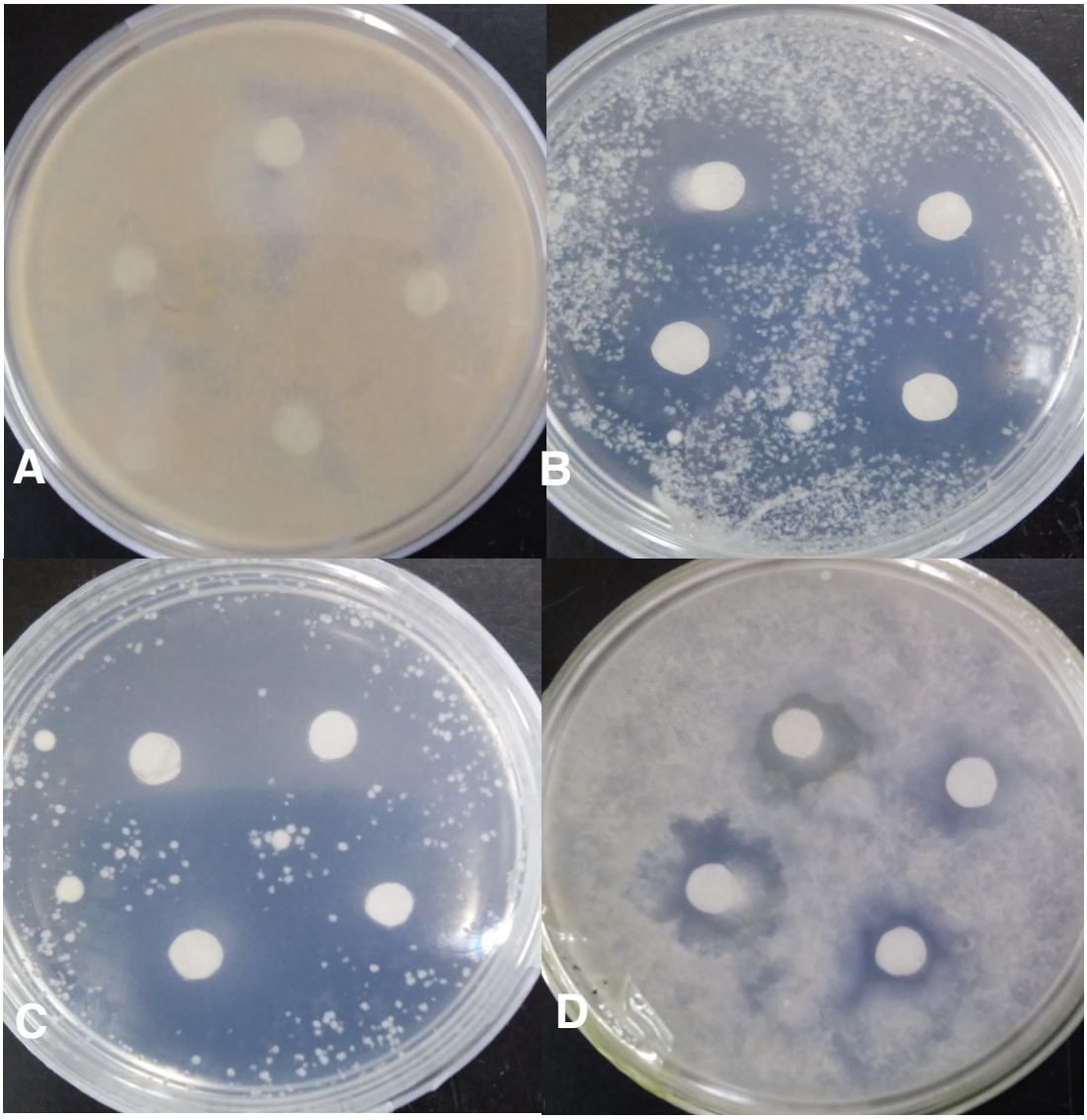
Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Haggard, W. O.; Bumgardner, J. D. 2011. Deacetylation of chitosan: material characterization and *in vitro* evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. Materials 4: 1399-1416.

Zavala-León, M. J.; Tun-Suárez, J. M.; Cristóbal-Alejo, J.; Ruiz-Sánchez, E.; Gutiérrez-Alonso, O.; Vázquez-Calderón, M.; Méndez-González, R. 2005. Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de Colletotricum gloeosporioides (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. Revista Chapingo Serie Horticultura. 11(2): 251-255.

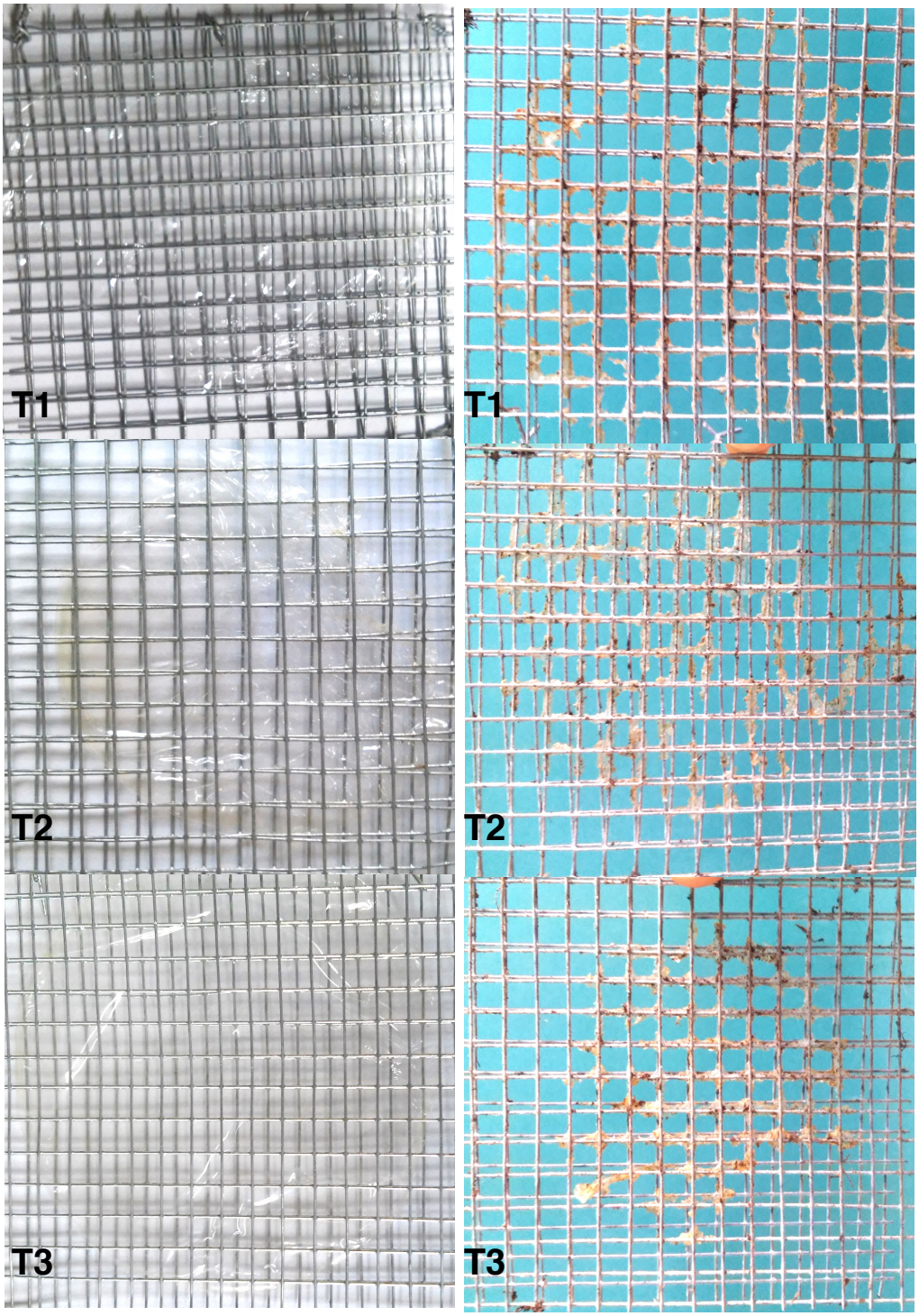
Ziani, K.; Oses, J.; Coma, V.; Maté, J. I. 2008. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. Food Science and Technology 41: 2159-2165.

9. ANEXOS

Anexo 1. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de aceites esenciales en el crecimiento de *C. gloeosporioides*: A) sin aceite esencial; aceite esencial: B) *C. cinensis*, C) *C. reticulata* y D) *C. paradisi.*



10. Anexo 2. Deterioro macroscópico de películas de quitosano a los 90 días de la exposición en el medio de biodegradación.



11. Anexo 3. Incidencia de C. gloeosporioides en papaya almacenada a temperatura ambiente (20 º C ± 2): A), B) y C) Papayas con recubrimiento biodegradable de quitosano y aceite esencial de *C. reticulata* al 0.5, 1.0 y 1.5 % respectivamente; D) Papayas sin recubrimiento.

