

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DESARROLLO DE CUBIERTAS COMESTIBLES NANOLAMINADAS CON RESINAS ANTIMICROBIALES DE *Flourensia* spp. Y SU APLICACIÓN PARA EXTENSIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE FRUTOS EN POSTCOSECHA.

Tesis

Que presenta ESPERANZA DE JESÚS SALAS MÉNDEZ
Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

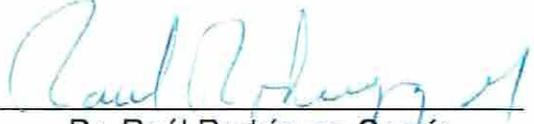
DESARROLLO DE CUBIERTAS COMESTIBLES NANOLAMINADAS CON RESINAS ANTIMICROBIALES DE *Flourensia* spp. Y SU APLICACIÓN PARA EXTENSIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE FRUTOS EN POSTCOSECHA.

Tesis

Elaborada por ESPERANZA DE JESÚS SALAS MÉNDEZ como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



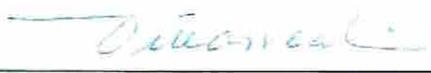
Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor Principal



Dr. Raúl Rodríguez García
Asesor



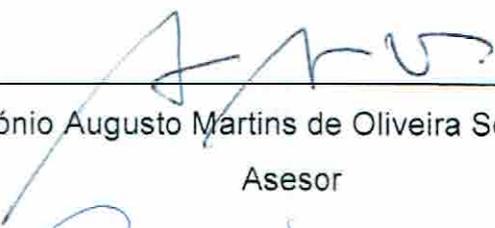
Dr. Francisco Daniel Hernández
Castillo
Asesor



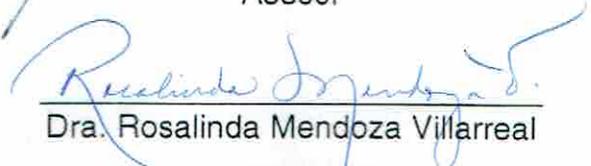
Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Asesor



Dra. María de Lourdes Virginia Díaz
Jiménez
Asesor



Dr. António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Agradecimientos

¡A **Dios** por darme la vida y todo lo que en ella he recibido!

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para desarrollar el presente trabajo.

Al **Departamento de Parasitología Agrícola** de la **UAAAN**, por la oportunidad que me brindó para realizar mis estudios de Doctorado en esta institución y por todo el apoyo tanto económico como profesional, otorgado en el transcurso de mis estudios.

Al **Centro de Ingeniería Biológica** de la **UMinho**, especialmente al **LIP**, por la oportunidad de realizar la estancia de investigación.

Al **Departamento de Dirección General Académica** de la **UAAAN** y al **M.C. Victor Manuel Sánchez Valdéz**, por el apoyo académico y económico brindado, para realizar la estancia de investigación en Braga, Portugal.

Un agradecimiento especial a mi asesora, la **Dra. Diana Jasso Cantú**, por el gran apoyo que desde siempre he recibido de usted, ayudando a abrir puertas para llevar a cabo el presente trabajo de investigación; agradezco además sus consejos y paciencia, sobretodo por compartir conmigo su experiencia en este campo de la ciencia.

A mis asesores: **Dr. Raúl Rodríguez García**; por el apoyo recibido, por sus comentarios y observaciones que han nutrido bastante esta investigación. **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo**; por transmitir sus conocimientos y el fascinante mundo de los hongos, motivándome a seguir aprendiendo, es usted un gran profesor. **Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla**; por la aportación de sus conocimientos para la identificación de las especies de plantas, pero sobretodo por ser guía para mí en esta parte del trabajo, he aprendido mucho. **Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez**; por sus conocimientos, comprensión y apoyo; así como la facilitación de instalaciones. **Dr. Antonio Vicente**; por darme la oportunidad de realizar la estancia de investigación en su laboratorio, por compartir su amplia experiencia conmigo, por la confianza recibida y por impulsar siempre la unión y amistad en todos sus alumnos.

Agradezco también a la **Dra. Liliana Flores** por su asesoría y consejos en la parte medular de esta investigación, además de orientarme con respecto a la estancia y

supervivencia en Braga. Al **M.C. Fidel Peña Ramos** por su ayuda en el análisis e interpretación de datos y por todos los consejos.

A la **Dra. Aidé Sáenz Galindo** y la **Dra. Susana González Morales**, por el apoyo brindado para la realización de esta investigación, su asesoría y amabilidad.

A la **Dra. Desiré Dávila Medina**, gracias por tu ayuda, asesoría y confianza, en especial por tu amistad.

Agradeço à **Dra. Ana Cristina Pinheiro** pelo seu inestimável apoio e aconselhamento durante a realização dos experimentos, assim como sua grande amizade e compreensão.

A la **Dra. Lina F. Ballesteros**, por la gran paciencia y la aportación de sus conocimientos, sobretudo por la amistad brindada.

Agradezco al equipo de trabajo del Laboratorio de Fitoquímica de la UAAAN a la **T.A. María Guadalupe Moreno Esquivel**, **T.A. Ma. Leticia Rodríguez González**, **T.A. Olga Leticia Solís Hernández**, **T.A. Edith E. Charles Colunga** y **Juan José Valenzuela Cabrera**, por su apoyo para la realización de esta investigación.

A **Dra. Yisa María Ochoa**, **Dra. Rosa María Garza**, **Dra. Rosalinda Mendoza**, **Dr. Ernesto Cerna**, **Zulema Piedra** y **Cecilia Herrera**; por todo el apoyo brindado en la realización de trámites, participaciones en congresos; por la amabilidad y atención.

Agradeço à **Ing. Madalena Alves**, **Sr. Santos**, **Paula**, **Tina Genisheva**, **Eduardo Gudiña** e à **Profa. Cristina Rocha**, por fornecer um apoio inestimável à realização dos experimentos.

A la **Dra. Abril F. Maltos** y a la **M.C. Alejandra Cabello G. (Yinyu)** por ser mi familia mexicana en Portugal y ser de gran ayuda en los momentos más complicados de la tesis; especialmente y por sobre todas las cosas, por su valiosa amistad, haciendo de mi estancia en Portugal, una de las mejores experiencias de mi vida; de todo corazón, gracias.

A todos mis compañeros de generación y de laboratorio, por los momentos y aprendizajes compartidos, sobretudo por la amistad naciente: **Nubia Gaytán**, **Fabiola Garrido**, **Gibrán Alejandro**, **Herme Torres**, **Óscar Sánchez**, **Liz Martínez**, **Oswaldo Aguilar**, **Paty Fernandez**, **Toño Morales**, **César Alonso**, **Gloria Puente**.

A la **M.C. Bertha Perez**, por ser mi motivación en este camino de la ciencia y por la gran amistad sin fronteras, que hemos podido forjar.

Aos **LIPINHOS**, por me fazerem parte do grupo, pelos momentos divertidos e sua grande amizade: **Pedro Silva, Tina, Laylla, Paulo Berni, Leilson, Daria, Raquel, Filipe, Ana Cristina, Joana, Lina, Bruno, Livia, Artur, Ana Isabel, Clarisse, Rui, Daniel, Maria Kiki, Bia, Phillipe, Ricardo, Luis L., Luiz Henrique, Luis Rodrigues, Pedro.**

A los que conforman **Misiones Notetlazotlaliz**, especialmente **Fam. Martínez Hernández** y **Christian Reyes**; por siempre considerarme parte de la familia y darme la oportunidad de reconocer mi humanidad y compartir el amor.

A ustedes, mi familia que he elegido y con quienes he aprendido y vivido grandes experiencias... **Brenda, Marce, Lydia, Norma, Maggie, Maru** por brindarme su amistad. Especialmente a **Fito**, por conservar y cuidar nuestra amistad, apoyarme, soportarme y hacerme reír para aligerar el estrés... los quiero mucho.

A **Fernando Dimas**, por toda la ayuda brindada en los experimentos, escritura de tesis, diseño de figuras y esquemas, presentaciones en congresos, etc.; sobretodo por tu comprensión y gran amor inigualable... sabes que es recíproco.

A **mi familia**, mis padres **María y Martín**, mis hermanas **Claudia** (por tu ayuda en el laboratorio y por el esfuerzo de ir a visitarme a Portugal) y **Brenda**, mi tío **Enrique** y mi sobrino **Mateo** que gracias a su apoyo y amor incondicional, he llegado hasta este punto en mis logros profesionales. Y a mi **familia extensa**: Mi abue **Victoria**, tía **Celia**, familia **Salas Cepeda**, especialmente a **Fátima**, por su ayuda en el laboratorio; **Salas González; Salas Zarate, Salas Uribe y Montesantos Cabello**; por todas las porras y ánimos!

Dedicatoria

A Dios, por darme la oportunidad de existir, por ser mi fortaleza y mi guía, especialmente por hacer palpable su amor a través de cada uno de los que me rodean.

A mis padres **Martín Alberto Salas** y **María Cruz Méndez**, a quienes amo demasiado y que sin esperar nada a cambio, han sido pilares en mi camino y así, forman parte de este logro que me abre puertas inimaginables en mi desarrollo profesional. De igual manera a mis hermanas: **Claudia**, quien con su vida ha sido un gran ejemplo para mí, además de ser quien me escucha y aconseja; y **Brenda**, la peque que me motiva a ser mejor persona... las amo! A mi hermoso sobrino **Mateo**, quien ha llenado de alegría y esperanza mi vida. A mi tío **Enrique** por todo el cariño y apoyo que me brinda. Con mucho cariño, hasta el cielo, para mi dulce **abuela Pera**.

Índice General

Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	vi
Índice General.....	vii
Lista De Cuadros	xi
Lista De Figuras.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Parámetros Involucrados en las Pérdidas Postcosecha de Frutas y Vegetales	4
Recubrimientos Comestibles para Incrementar la Calidad y la Vida de Anaquel de Frutas y Hortalizas	8
Materiales estructurales de los recubrimientos comestibles	9
Tecnologías Emergentes: Desarrollo de Cubiertas Nanolaminadas	12
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Obtención de Extracto	15
Colecta de plantas.....	15
Elaboración de extractos de etanol y acuosos	15
Caracterización Fitoquímica	16
Cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante.....	16
Contenido de fenoles totales	16
Actividad antioxidante	17
DPPH.....	17
FRAP	17
Composición Química.....	18

Análisis de composición química de extractos de <i>F. cernua</i> , <i>F. microphylla</i> y <i>F. retinophylla</i> por Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (GC–MS).....	18
Actividad Antifúngica <i>in vitro</i> de Extractos de <i>Flourensia</i> spp. en Hongos Postcosecha	18
Aislamiento de hongos: <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	18
Identificación de <i>F. oxysporum</i> y <i>R. stolonifer</i> por PCR.....	19
Efecto de las concentraciones de extractos de <i>Flourensia</i> spp. en <i>F. oxysporum</i> y <i>R. stolonifer</i>	19
Análisis estadísticos de la actividad antifúngica <i>in vitro</i>	20
Cubiertas Comestibles Nanolaminadas	20
Formulación y desarrollo de cubiertas comestibles nanolaminadas con resinas de <i>F. cernua</i>	20
Materiales	20
Aminólisis de la superficie del tereftalato de polietileno	21
Formulación y preparación de soluciones de polielectrolito con resinas de <i>F. cernua</i>	21
Procedimiento de recubrimiento de PET A/C	22
Caracterización de cubiertas nanolaminadas sobre PET	23
Potencial Zeta	23
Mediciones del ángulo de contacto	23
Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO ₂).....	24
Microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada con análisis de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).	25
Análisis estadísticos de la caracterización de nanocapas	26
Efecto de Cubiertas Nanolaminadas en la Vida de Anaquel de Frutos de Tomate a 20 °C/85% HR y 11 °C/90% HR	26
Diseño experimental	26
Recubrimiento de frutos de tomate	27
Análisis fisicoquímicos.....	28
Pérdida de peso.....	28
Contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT) y pH	29
Color	29

Firmeza	30
Análisis microbiológicos	30
Tasa de transferencia de gas y producción de etileno	31
Análisis estadístico prueba vida de anaquel	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Caracterización Fitoquímica	34
Contenido de fenoles totales	34
Actividad antioxidante	35
Composición Química de Extractos	37
<i>Flourensia cernua</i>	37
Extractos de etanol de hojas	37
Extracto de etanol de ramas	39
Extractos acuosos de hojas	39
Extractos acuosos de ramas	40
<i>Flourensia microphylla</i>	40
Extractos de etanol de hojas	41
Extractos de etanol de ramas	41
Extractos acuosos de hojas	42
Extractos acuosos de ramas	42
<i>Flourensia retinophylla</i>	43
Extractos de etanol de hojas	43
Extractos de etanol de ramas	43
Extractos acuosos de hojas	44
Extractos acuosos de ramas	44
Efecto de las concentraciones de extractos de <i>Flourensia</i> spp. en hongos postcosecha <i>in vitro</i>	45
Identificación de hongos: <i>F. oxysporum</i> y <i>R. stolonifer</i>	45
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en <i>F. oxysporum</i> y <i>R. stolonifer</i>	45
Efecto de <i>Flourensia</i> spp. en <i>F. oxysporum</i>	45
Efecto de <i>Flourensia</i> spp. en <i>R. stolonifer</i>	49
Caracterización de cubiertas nanolaminadas sobre PET	54

Potencial zeta.....	54
Ángulo de contacto.....	55
Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO ₂).....	57
Microscopía electrónica de barrido (SEM) con detector EDS.....	59
Efecto de Cubiertas Nanolaminadas en la Vida de Anaquel de Frutos de Tomate a 20 °C/85% HR y 11 °C/90% HR	62
Pérdida de peso.....	62
Contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT) y pH.....	64
Contenido de sólidos solubles (CSS).....	64
Acidez titulable (AT)	65
pH.....	66
Color	67
Firmeza	69
Análisis microbiológicos	70
Hongos y levaduras.....	70
Microorganismos Mesófilos.	72
Tasa de transferencia de gas y producción de etileno.....	74
Etileno.....	76
Evaluación visual de frutos de tomate	78
CONCLUSIONES.....	81
REFERENCIAS	83

Lista De Cuadros

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos y cubiertas nano-laminadas aplicadas a frutos de tomate.....	28
Cuadro 2. Clasificación de las etapas maduras de la fruta de tomate según los valores de enrojecimiento. Adaptado de Batu (2004).	30
Cuadro 3. Contenido de fenoles totales (<i>CFT</i>) y actividad antioxidante de extractos de <i>Flourensia</i> spp.....	36
Cuadro 4. Compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de <i>F. cernua</i>	38
Cuadro 5. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de hojas y ramas de <i>F. cernua</i>	40
Cuadro 6. Compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de <i>F. microphylla</i>	41
Cuadro 7. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de hojas y ramas de <i>F. microphylla</i>	42
Cuadro 8. Compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de <i>F. retinophylla</i>	43
Cuadro 9. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de hojas y ramas de <i>F. retinophylla</i>	44
Cuadro 10. Medias de inhibición porcentual de <i>F. oxysporum</i> evaluados en siete tiempos de incubación con extractos de <i>F. cernua</i>	46
Cuadro 11. Comparación de medias de inhibición porcentual de <i>F. oxysporum</i> en diferentes tiempos de incubación con extractos de <i>F. microphylla</i>	47
Cuadro 12. Comparación de medias de inhibición porcentual de <i>F. oxysporum</i> evaluados en siete tiempos de incubación con extractos de <i>F. retinophylla</i>	47
Cuadro 13. Concentración mínima inhibitoria 50 y 90 de extractos <i>Flourensia</i> ssp. para inhibir el crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> a 168h de incubación.....	48
Cuadro 14. Comparación de medias de inhibición porcentual de <i>R. stolonifer</i> evaluados con extractos en etanol y acuosos de hojas y ramas de <i>F. cernua</i> ..	50
Cuadro 15. Comparación de medias de inhibición porcentual de <i>R. stolonifer</i> evaluados con extractos en etanol de hojas y ramas de <i>F. microphylla</i>	51
Cuadro 16. Comparación de medias de inhibición porcentual de <i>R. stolonifer</i> evaluados con extractos en etanol de hojas y ramas de <i>F. retinophylla</i>	51

Cuadro 17. Concentración mínima inhibitoria 50 y 90 de <i>extractos F. cernua, F. microphylla</i> y <i>F. retinophylla</i> para inhibir el crecimiento micelial de <i>R. stolonifer</i> en diferentes tiempos de incubación.	52
Cuadro 18. Potencial zeta de las soluciones polielectrolito	55
Cuadro 19. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y permeabilidad al oxígeno (PO ₂) del soporte PET A/C; PET A/C con nanocapas y de las nanocapas solas.	58
Cuadro 20. Resultados del microanálisis químico realizado sobre las muestras de CNL y CNL+Fc.	61
Cuadro 21. Propiedades fisicoquímicas de frutos de tomate, durante el almacenamiento a 20°C y 85%HR.	66
Cuadro 22. Propiedades fisicoquímicas de frutos de tomate, durante el almacenamiento a 11°C y 90% HR.	67

Lista De Figuras

- Figura 1.** Efecto de extractos de *F. cernua* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a 168 horas. a) Testigo absoluto; b) Hojas etanol 2000 mg/L; c) Hojas etanol 3000 mg/L.7
- Figura 2.** *F. cernua* en su lugar nativo en Coahuila, México y extracto de etanol de hojas..... 15
- Figura 3.** Identificación de *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, mediante PCR en gel de agarosa al 2%. 45
- Figura 4.** Ángulo de contacto medido en PET original, soporte PET A/C y en cada una de las cinco capas sucesivas que contienen: CNL y CNL+ Fc, después de 15 s de aplicación de la gota. Cada punto es la media de 15 mediciones y las barras indican el error estándar..... 56
- Figura 5.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie más externa de las cinco capas adsorbidas, a) PET A/C CNL y c) PET A/C CNL CNL+Fc; así como la imagen de múltiples capas de b) CNL y d) CNL+Fc. 60
- Figura 6.** CNL, a) Imagen obtenida mediante SEM de la superficie del sustrato con la región donde se realizaron mediciones de EDS; b) Gráfica de intensidades Vs. energía característica de los elementos que constituyen el sustrato. 60
- Figura 7.** CNL+Fc, a) Imagen obtenida mediante SEM de la superficie del sustrato con la región donde se realizaron mediciones de EDS; b) Gráfica de intensidades Vs. energía característica de los elementos que constituyen el sustrato..... 61
- Figura 8.** Pérdida de peso (%) de frutos de tomate: sin cubierta (SC), con cubierta nanolaminada (CNL) y con CNL+Fc; almacenados a) 20 °C y 85% HR; b) 11 °C y 90% HR. Cada punto es el promedio de cinco determinaciones, las barras indican la desviación estándar. 64
- Figura 9.** Enrojecimiento (a^*/b^*) de frutos de tomate almacenados (a) 15 días a 20 °C/85% HR y (b) 25 días a 11 °C/90% HR. Los valores son la media y las barras de error muestran la desviación estándar..... 68
- Figura 10.** Firmeza (N) de frutos de tomate: sin cubierta (SC), con cubierta nanolaminada (CNL) y con CNL+Fc; durante el almacenamiento a 20 °C/85% HR y 11 °C/90% HR. Los valores son la media de 7 repeticiones y las barras de error muestran la desviación estándar. 70
- Figura 11.** Conteo microbiológico de hongos y levaduras, durante el tiempo de almacenamiento de los frutos de tomate: sin cubierta (SC); con cubierta nanolaminada CNL y con CNL+Fc a 20 °C/85% HR (a) y 11 °C/90% HR (b). Cada

punto indica el promedio de 4 repeticiones, las barras indican el error estándar. 72

Figura 12. Conteo microorganismos mesófilos, durante el tiempo de almacenamiento de los frutos de tomate: sin cubierta (SC); con cubierta nano-laminada CNL y con CNL+Fc a 20 °C/85% HR (a) y 11 °C/90% HR (b). Cada punto indica el promedio de 4 repeticiones, las barras indican el error estándar. 74

Figura 13. Tasa de transferencia de O₂ y CO₂ en frutos de tomate: sin cubierta (SC), con cubierta nano-laminada CNL y con CNL+Fc a 20 °C/85% HR (a) y 11 °C/90% HR (b). Las barras de error indican la desviación estandar. 76

Figura 14. Tasa de producción de etileno en frutos de tomate: sin cubierta (SC); con cubierta nano-laminada (CNL) y con CNL+Fc. Las barras de error indican la desviación estandar. Las letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia estadística ($p>0.05$) entre los tratamientos de almacenamiento a 20 °C/85% HR y letras minúsculas iguales indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos a 11 ° C / 90% de HR ($p>0.1$) 77

Figura 15. Cambio gradual de los frutos de tomate, durante el tiempo de almacenamiento transcurrido (de cero a 15 d), a 20°C y 85% HR. 79

Figura 16. Efecto de los tres tratamientos sobre frutos de tomate, a los días 20 y 25 del almacenamiento a 11°C y 90% HR. 79

RESUMEN

DESARROLLO DE CUBIERTAS COMESTIBLES NANOLAMINADAS CON RESINAS ANTIMICROBIALES DE *Flourensia* spp. Y SU APLICACIÓN PARA EXTENSIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE FRUTOS EN POSTCOSECHA.

POR

ESPERANZA DE JESÚS SALAS MÉNDEZ

DOCTORADO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO

DRA. DIANA JASSO CANTÚ- ASESOR

Saltillo, Coahuila. Julio, 2018

El tomate es el segundo cultivo más importante del mundo, después de la papa; en México, es una de las principales hortalizas cultivadas, debido a la superficie sembrada y los niveles de producción, sin embargo, presenta grandes pérdidas en postcosecha, tanto por factores físicos como biológicos. Para prolongar la vida útil del tomate, se han implementado varias técnicas. El tratamiento químico es uno de los más utilizados, sin embargo, puede originar resistencia de los patógenos y afecta al medio ambiente y la salud humana. Existen alternativas naturales antimicrobiales, por ejemplo ha sido reportado que los extractos de *Flourensia spp*, presentan actividad antifúngica. Además, estudios del uso de cubiertas comestibles nanolaminadas en frutos de postcosecha, recientemente están recibiendo un creciente interés por la industria alimentaria, por sus ventajas con respecto a los films y cubiertas tradicionales. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar y evaluar la eficacia de cubiertas comestibles nanolaminadas con resinas antimicrobiales de *Flourensia cernua*, para alargar la vida de anaquel de frutos de tomate en postcosecha. Se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos de etanol y acuosos de hojas y ramas en hongos de postcosecha, que se llevó a cabo por el método de dilución de agar y se prepararon concentraciones de 50 a 6000 mg/L. La composición química se determinó por Cromatografía de Gases acoplado a Masas (GC-MS). Se formularon y desarrollaron cubiertas nanolaminadas a las que se les agregó el extracto de etanol de hojas de *F. cernua* a una concentración de 5000 mg/L. El recubrimiento de cinco nanocapas fue construido inicialmente en una película soporte de tereftalato de polietileno (PET), aminolizada/cargada (PET A/C). Se utilizaron soluciones polielectrolito de alginato (0.2% p/v) y quitosán (0.6% p/v) añadiendo a cada solución glicerol y Tween 80 a 0.05% (p/v) y 0.1% (p/v), respectivamente. Se realizó la caracterización de la cubierta nanolaminada, mediante diferentes pruebas; potencial zeta, análisis de ángulo de contacto, permeabilidad de vapor de agua, permeabilidad al oxígeno y análisis SEM. Se evaluó la vida de anaquel en frutos de tomate, la prueba se realizó a dos diferentes condiciones: a 20°C/85% HR durante 15 días y 11 °C/90%HR durante 25 días. El experimento se estableció con un diseño completamente al azar, con

3 tratamientos: frutos sin cubierta (SC), con cubierta nanolaminada de alginato y quitosano (CNL) y con CNL + *F. cernua* (CNL+Fc). Se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos y tasa de transferencia de gases. Los extractos de etanol de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla*, mostraron en general, mayor actividad antifúngica que los extractos acusos, en la inhibición *in vitro* de *F. oxysporum* y *R. stolonifer*. El extracto de etanol de hojas de *F. cernua* presentó los valores más bajos de concentración mínima inhibitoria 50 y 90 (CMI₅₀ y CMI₉₀) de 619.94 y 2163 mg/L, respectivamente, para inhibir a *F. oxysporum*. Por otra parte, el extracto de etanol de hojas de *F. retinophylla* presentó los valores más bajos de CMI₉₀ (573.97 mg/L) para inhibir a *R. stolonifer*. El número de compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas fueron: 17 y 10 en *F. cernua*, respectivamente; siete y nueve en *F. microphylla*, respectivamente; y siete en ambos tejidos para *F. retinophylla*. El tratamiento de CNL+Fc presentó los mejores resultados en las dos condiciones evaluadas, el crecimiento microbiológico se redujo después de 15 d y 25 d a 20°C/85% HR y 11°C/90% HR, respectivamente, comparado con los frutos SC. Además los frutos con CNL+Fc mantuvieron la firmeza y una mejor apariencia que los frutos SC y con CNL. Las cubiertas nanolaminadas con extracto de *F. cernua* alargaron la vida de anaquel de los frutos de tomate. El extracto de etanol de hojas de *F. cernua* inhibió el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *R. stolonifer*. Esta actividad antifúngica se puede atribuir a la sinergia entre los compuestos químicos identificados, así como con las concentraciones de polifenoles.

Palabras clave: Extracto de etanol, *Flourensia cernua*; *Flourensia microphylla*; *Flourensia retinophylla*; *Fusarium oxysporum*; *Rhizopus stolonifer*; Tomate en postcosecha, Actividad antifúngica *in vitro*; Cubiertas nano-laminadas; Técnica capa por capa (layer-by-layer).

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF EDIBLE NANOLAMINATED COATINGS WITH
ANTIMICROBIAL RESINS OF *Flourensia* spp. AND THEIR APPLICATION TO
EXTEND THE SHELF-LIFE OF POSTHARVEST FRUIT.

BY

ESPERANZA DE JESÚS SALAS MÉNDEZ

DOCTOR OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

PhD. DIANA JASSO CANTÚ- ADVISOR

Saltillo, Coahuila. July, 2018

Tomato is the second most important crop in the world, after the potato; in Mexico, it is one of the main cultivated vegetables, due to the planted surface and production levels, however, it presents great postharvest losses, both physical and biological factors. To prolong the tomato' life, several techniques have been implemented. Chemical treatment is one of the most used, however, can cause resistance of pathogens and affects the environment and human health. There are natural antimicrobial alternatives, *Flourensia* spp extracts have reported antifungal activity. In addition, postharvest treatments' recent studies, particularly the use of nanolaminated edible coatings, have reported a growing interest in food industry, due to its advantages over traditional films and coatings. The objective of the present investigation was to develop and evaluate the effectiveness of nanolaminated edible coatings with *Flourensia cernua* antimicrobial resins, to extend the tomato fruits' shelf life in post-harvest. The inhibitory effect of the ethanol and aqueous extracts of leaves and branches was evaluated, which was carried out by the agar dilution method and concentrations of 50 to 6000 mg/L were prepared. The chemical composition was determined by Gas Chromatography coupled to Mass. Nanolaminated coatings were formulated and developed, to which the ethanol extract of *F. cernua* leaves was added at a concentration of 5000 mg/L. The coating of five nanolayers was initially constructed on a support film of polyethylene terephthalate (PET), aminolized/charged (A/C PET). Alginate polyelectrolyte solutions (0.2% w/v) and chitosan (0.6% w/v) were used, adding glycerol and Tween 80 to each solution at 0.05% (w/v) and 0.1% (w/v), respectively. The nanolaminated coatings' characterization was carried out by different tests; zeta potential, contact angle analysis, water vapor permeability, oxygen permeability and SEM analysis. Tomato fruits' shelf life was evaluated, the test was carried out at two different conditions: at 20 ° C/85% RH for 15 days and 11 ° C/90% RH for 25 days. The experiment was established with a completely randomized design, with 3 treatments: uncoated fruits (SC), with nanolaminated coatings of alginate and chitosan (CNL) and with CNL+*F. cernua* (CNL+Fc). Physicochemical, microbiological analysis and gas transfer rate were performed. The ethanol

extracts of *F. cernua*, *F. microphylla* and *F. retinophylla* showed, greater antifungal activity than the aqueous extracts, in the in vitro inhibition of *F. oxysporum* and *R. stolonifer*. The *F. cernua* leaves ethanol extract presented the lowest values of MIC 50 and 90 (619.94 and 2163 mg / L, respectively), to inhibit *F. oxysporum*. On the other hand, the *F. retinophylla* leaves ethanol extract presented the lowest values of MIC90 (573.97 mg / L) to inhibit *R. stolonifer*. The number of chemical compounds identified in the ethanol extracts of leaves and branches were: 17 and 10 in *F. cernua*, respectively; seven and nine in *F. microphylla*, respectively; and seven in both tissues for *F. retinophylla*. The CNL+Fc treatment presented the best results in the two conditions evaluated, the microbiological growth was reduced after 15 d and 25 at 20 ° C / 85% RH and 11 ° C / 90% RH, respectively, compared with SC fruits. In addition, the fruits with CNL+Fc maintained the firmness and a better appearance than the SC fruits and with CNL. The nanolaminated covers with *F. cernua* extract lengthened the shelf life of the tomato fruits. The *F. cernua* leaves ethanol extract inhibited *F. oxysporum* and *R. stolonifer* mycelial growth. This antifungal activity can be attributed to the synergy between chemical compounds identified, as well as to the polyphenols concentrations.

Keywords: Ethanol extract, *Flourensia cernua*; *Flourensia microphylla*; *Flourensia retinophylla*; *Fusarium oxysporum*; *Rhizopus stolonifer*; Postharvest tomato, *In vitro* antifungal activity; Nanolaminated coatings; Layer-by-layer technique.

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la cadena agroalimentaria las frutas y verduras en postcosecha, se ven afectados por la incidencia de enfermedades causadas principalmente por hongos (Ramos-García et al., 2010). En algunos casos, los hongos 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 (Ogden et al., 2005). Hahn (2002), reportó que la podredumbre de *Fusarium* y *Rhizopus* aparece durante la etapa de postcosecha, produciendo grandes pérdidas. Estos hongos son la principal causa de enfermedades en los cultivos de tomate (Ascencio-Álvarez et al., 2008). México es uno de los productores de tomate más grandes del mundo y el primero en la exportación de este fruto (FIRA, 2016). Sin embargo, este cultivo presenta pérdidas, de hasta el 50% de la producción total (Bombelli y Wright, 2006). Para prolongar la vida postcosecha de los productos hortícolas, se han implementado diferentes tecnologías (Quezada et al., 2003), sin embargo, estas prácticas no siempre garantizan la integridad del producto, lo que obliga a los productores a aplicar diferentes tratamientos durante la conservación postcosecha (Yahia et al., 2005). Los fungicidas sintéticos se han usado de forma intensiva para controlar las enfermedades de la fruta en postcosecha (Jasso De Rodríguez et al., 2011). Sin embargo, la falta de regulación en los países menos desarrollados permite el uso indiscriminado de plaguicidas, que causan resistencia a patógenos y efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana (Calvo et al., 2007). Actualmente, los extractos herbales de varias plantas endémicas del semidesierto mexicano han sido evaluados como un método alternativo contra los hongos postcosecha, debido a sus efectos dañinos mínimos (Cueto Wong et al., 2010; Hernández-Castillo et al., 2011). Se ha reportado actividad antifúngica de extractos de *Flourensia cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* contra *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer* (Jasso de Rodríguez et al., 2017, 2007).

Por lo anterior y en la búsqueda de tecnologías apropiadas para reducir las pérdidas postcosecha en cantidad y calidad, y que garanticen además la inocuidad de los alimentos desde la cosecha hasta el consumo de los productos, se ha reportado en estudios recientes el uso en la industria alimentaria de cubiertas comestibles nanolaminadas a partir de materiales biodegradables. Estos recubrimientos mejoran las propiedades de transporte, sugiriendo que estos materiales pueden presentar una funcionalidad mejorada cuando se utilizan a nanoescala (Jang et al., 2008). También se ha demostrado su capacidad para incorporar compuestos bioactivos con una liberación controlada del agente activo y así prolongar su bioactividad durante el tiempo de almacenamiento (Fabra et al., 2016). El uso de la técnica de deposición capa por capa (Layer by Layer) permite el desarrollo de cubiertas nanolaminadas con películas delgadas funcionales (<1 μm de espesor). Estas películas delgadas se construyen exponiendo de forma alterna un sustrato con moléculas o partículas con cargas positivas y negativas (Zhong et al., 2006). Uno de los polisacáridos más utilizados en la construcción multicapa es el quitosano, que es un polímero muy interesante para numerosas aplicaciones debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, así como a su actividad antimicrobiana. Como un polímero catiónico, el quitosano puede estar asociado con polielectrolitos aniónicos tales como alginato de sodio, que conduce a la formación de una multicapa de polielectrolito (Carneiro-da-Cunha et al., 2010)

Por lo anterior, la aplicación de recubrimientos nanolaminados puede proporcionar una cubierta protectora adicional para frutos de tomate frescos, extendiendo su vida de anaquel.

Objetivo general

Desarrollar y evaluar la eficacia de cubiertas comestibles nanolaminadas con resinas antimicrobiales de *Flourensia cernua*, para alargar la vida de anaquel de frutos de tomate en postcosecha.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla*, en dos hongos de postcosecha
2. Realizar el análisis fitoquímico de los extractos: contenido de fenoles totales, y actividad antioxidante.
3. Determinar la composición química de los extractos e identificar las moléculas bioactivas.
4. Formular y desarrollar cubiertas nano-laminadas con resinas de *Flourensia cernua*.
5. Caracterizar las cubiertas nano-laminadas.
6. Evaluar los recubrimientos comestibles nanolaminados en frutos de tomate en postcosecha, para alargar la vida de anaquel.

Hipótesis

Las cubiertas comestibles nanolaminadas con extractos de *F. cernua*, contienen metabolitos secundarios bioactivos que inhiben el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos y alargan la vida de anaquel de los frutos de tomate.

REVISIÓN DE LITERATURA

Parámetros Involucrados en las Pérdidas Postcosecha de Frutas y Vegetales

Al momento de ser cosechados, los productos agrícolas, continúan con sus procesos fisiológicos, como es la respiración durante un periodo de tiempo. En postcosecha el proceso más importante es el de la respiración. El manejo en postcosecha de productos agrícolas perecederos es básicamente el control de los factores internos y externos que contribuyen a intensificar el proceso de respiración y por ende de maduración.

La respiración es el proceso por el cual el oxígeno atmosférico es aprovechado para metabolizar compuestos de almacenamiento (azúcares y almidón) para formar diversos productos derivados como: CO₂, agua y energía (calor).

Además, el proceso de transpiración ocurre con el movimiento del vapor de agua de la superficie de los órganos de la planta al aire circundante (Van Hung et al., 2011; Datta, 2003). Como consecuencia de la respiración y los procesos metabólicos involucrados, se pueden reconocer diferentes formas de cambios o pérdidas en los productos agrícolas almacenados, como: pérdida de peso (alrededor del 5-10% de su peso) (FAO, 1989); redistribución de carbohidratos (degradación de las reservas acumuladas de almidón y sacarosa en azúcares) y cambios nutricionales (pérdida de vitamina C).

Tanto los procesos de respiración como los de transpiración se consideran las principales causas de las pérdidas postcosecha e inciden directamente en una reducción substancial de los atributos de calidad que caracterizan a todo producto, y su control es importante para prolongar la vida de anaquel del producto (Ben-Yehoshua y Rodov, 2003).

El control de la humedad relativa (HR) y la temperatura de almacenamiento también es importante, ya que estos son factores que juegan un papel trascendental en el mantenimiento de la calidad del producto debido a la influencia directa que tienen en los procesos de transpiración y respiración, así

como en el gradiente de vapor entre el producto y la atmósfera de almacenamiento.

Por lo tanto, cuando el producto se mantiene a una temperatura similar a la del ambiente de almacenamiento, la tasa de transpiración está altamente correlacionada con la HR durante el almacenamiento (Van Hung et al., 2011). Se ha demostrado que altos valores de HR durante el almacenamiento pueden reducir las pérdidas de humedad y posteriormente mantener la firmeza de la fruta al disminuir la tasa de transpiración de las frutas, principalmente a velocidades reducidas de aire y baja temperatura (Henriod, 2006). Además, la baja temperatura (4-8 °C) puede reducir la tasa de respiración, aumentar la resistencia del tejido a la acción del etileno, retrasar la descomposición de las macromoléculas, retrasar la senescencia y controlar el desarrollo de microorganismos putrefactos (Yahia et al., 2004). Sin embargo, a tales temperaturas, algunas frutas y verduras tropicales nativas pueden presentar lesiones por frío. Por ejemplo, el tomate se almacena a temperaturas de 10-15 °C con la finalidad de prolongar su vida de anaquel. Sin embargo, por debajo de los 12.5 °C, los tomates pueden ser afectados por daño por enfriamiento. La severidad de este daño es mayor en los tomates verdes que en los rojos y aumenta conforme al tiempo de almacenamiento y temperatura (Lu et al., 2010). Debido a la influencia de estos factores (es decir, HR y temperatura), cada producto tiene su propio conjunto ideal de condiciones que permite un almacenamiento exitoso durante el tiempo máximo, aunque los niveles de HR alrededor del 85-95% son comúnmente recomendados para el almacenamiento de frutas y verduras frescas (Van Hung et al., 2011).

Por otro lado, la disminución en rendimiento y calidad de frutas y verduras causadas por plagas (especialmente por hongos) durante el almacenamiento, pueden ser incluso mayores que las pérdidas que ocurren en el campo, y se favorecen cuando el producto no se enfría rápidamente o no es transportado y almacenado en condiciones apropiadas (Batta, 2007). El tratamiento químico es una de las técnicas que normalmente se utiliza después de la cosecha para

prolongar la vida de anaquel y reducir el deterioro de los alimentos (Eshel et al., 2009). Sin embargo, la falta de regulación en los países menos desarrollados ha generado el uso indiscriminado de plaguicidas en frutas y verduras que origina resistencia de los patógenos, y a su vez afecta al medio ambiente y la salud humana.

El uso de bioplaguicidas ha surgido como un sustituto alternativo para los pesticidas químicos. Los bioplaguicidas son ciertos tipos de pesticidas fabricados a partir de microorganismos vivos (por ejemplo, bacterias, hongos o virus) o extractos de plantas (incluidos metabolitos secundarios y aceites esenciales) y otros productos bioquímicos (por ejemplo, feromonas sexuales de insectos) (Chandler et al., 2011; Bailey et al., 2010).

Dentro de los bioplaguicidas basados en microorganismos, el uso de antagonistas, principalmente bacterias y hongos, han demostrado su eficacia para controlar diferentes patógenos postcosecha de cerezas dulces y uvas de mesa (Schena et al., 2003), cítricos (Cañamás et al., 2008), piña (Wijesinghe et al., 2008), manzana (Mari et al., 2012; Spadaro et al., 2002), durazno (Qin et al., 2012), tomate (Li et al., 2012) y mandarina (Hong et al., 2014), entre otros. Sin embargo, este tipo de bioplaguicidas presenta algunas desventajas según los ensayos realizados en condiciones comerciales o semicomerciales. Más detalladamente, el uso de preparados formulados de bioplaguicidas, conduce a inconsistencias y variabilidad en el nivel de control de la enfermedad, siendo esta la barrera más importante que impide la implementación generalizada de la tecnología de control biológico (Droby et al., 2009; Eshel et al., 2009).

Otra alternativa prometedora a los pesticidas químicos es el uso de bioplaguicidas basados en extractos de plantas y aceites esenciales de plantas aromáticas (Kotan et al., 2014). Estos se denominan pesticidas verdes ya que se obtienen empleando principalmente disolventes orgánicos (por ejemplo, agua, etanol, metanol y hexano). Se sabe que la actividad antimicrobiana depende de las especies de plantas, así como de la naturaleza del extracto, del disolvente utilizado; en este orden, varios trabajos se han enfocado en la obtención de

nuevos extractos de plantas y aceites esenciales con actividad antimicrobiana (Castillo et al., 2011). En este contexto, Jasso de Rodríguez et al. (2007; 2017) han reportado actividad antifúngica *in vitro* de extractos de etanol de *Flourensia cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla*, plantas endémicas del estado Coahuila, contra *Alternaria* sp., *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum* (Fig. 1), hongos causantes de enfermedades en el tomate; los autores informaron que la efectividad de los extractos fue promovida por la sinergia entre los compuestos identificados y las elevadas concentraciones de polifenoles.

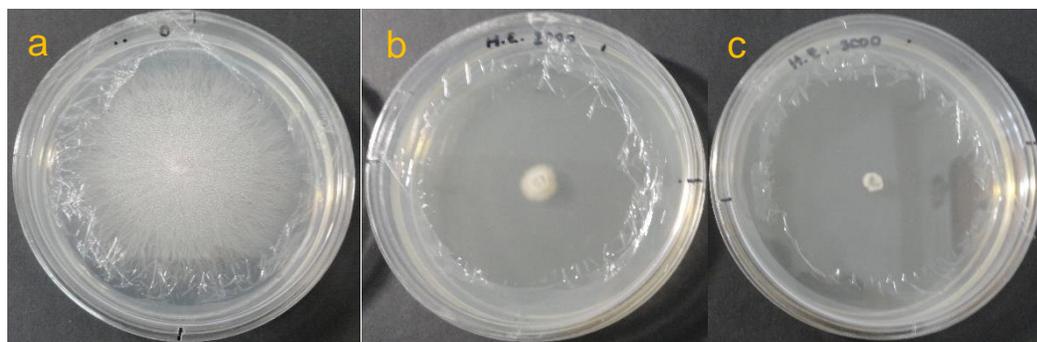


Figura 1. Efecto de extractos de *F. cernua* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a 168 horas. a) Testigo absoluto; b) Hojas etanol 2000 mg/L; c) Hojas etanol 3000 mg/L.

Los bioplaguicidas son aceptados en todo el mundo, sin embargo su utilización todavía enfrenta algunos desafíos importantes, tales como: 1) estabilidad deficiente: este es el mayor inconveniente de estos productos, que necesitan mejorar sus formulaciones para una mejor aceptación en el mercado; 2) embalaje: debe diseñarse de tal manera que la estabilidad de los productos envasados se pueda mantener durante el almacenamiento (por ejemplo, sin hinchamiento del recipiente debido al crecimiento de microorganismos); 3) vida útil: la vida útil de los bioplaguicidas suele ser baja; 4) actividad altamente específica, que hace que los bioplaguicidas sean productos nicho (por lo tanto, con ventas significativamente menores) en comparación con los productos químicos, con un amplio espectro de actividad; y 5) distribución - siendo el principal obstáculo debido a un mayor costo, lo que lleva a márgenes más bajos

y una capacitación limitada para vendedores, distribuidores y agricultores (Villaverde et al., 2014).

Una alternativa atractiva para superar estas desventajas y generar nuevas tecnologías postcosecha puede ser la incorporación de agentes activos utilizados en la formulación de bioplaguicidas en recubrimientos comestibles. El uso de recubrimientos comestibles puede aumentar la estabilidad de los bioplaguicidas y la vida útil y al mismo tiempo añadir nuevas funcionalidades al producto final (por ejemplo, disminuir las tasas de transferencia de gas de envasado). En este momento, solo hay unos pocos productos basados en bioplaguicidas que se aplican en la etapa posterior a la cosecha, ya que la mayoría de ellos están destinados a controlar las plagas antes de la cosecha. Además, se sabe que la mayoría de las empresas productoras de bioplaguicidas son pequeñas y medianas empresas, por lo que cuentan con recursos limitados para I + D, registro y promoción de productos (Chandler et al., 2011); esto resalta la importancia de desarrollar tecnologías nuevas y baratas, como las tecnologías basadas en recubrimientos.

Recubrimientos Comestibles para Incrementar la Calidad y la Vida de Anaquel de Frutas y Hortalizas

Los recubrimientos comestibles aplicados a productos hortofrutícolas tanto frescos como mínimamente procesados han generado recientes avances respecto al efecto sinérgico de los componentes sobre la vida de anaquel de dichos alimentos. Esto incluye la incorporación de ingredientes activos en la matriz polimérica, el aumento de la vida de anaquel y seguridad alimentaria y el mejoramiento de atributos sensoriales y nutricionales (Rojas-Graü et al., 2009). De acuerdo a las condiciones de almacenamiento de frutas y hortalizas se deben considerar algunos factores tanto mecánicos y químicos que se involucran en el diseño de las cubiertas comestibles (Miranda, 2003). Las cubiertas comestibles pueden ser elaboradas a partir de biopolímeros, como polisacáridos, proteínas y lípidos (Lin y Zhao, 2007), los cuales presentan bondades como su biodegradabilidad, comestibilidad, apariencia estética, buenas propiedades de

barreras contra el oxígeno y vapor de agua, además de que en muchas ocasiones son obtenidos de residuos, lo que los hace altamente redituables (Pavlath y Orts, 2009; Souza et al., 2010).

Materiales estructurales de los recubrimientos comestibles

Con base en su composición, las cubiertas pueden ser clasificadas en tres categorías, las hidrocoloidales, las lipídicas y las compuestas. Las hidrocoloidales son elaboradas a base de polisacáridos o proteínas, los cuales presentan baja permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y lípidos, pero alta permeabilidad al vapor de agua, debido a la naturaleza hidrofílica (Krochta et al., 1994).

En estudios recientes las tecnologías de películas comestibles y biodegradables contemplan la producción de recubrimientos comestibles mediante la combinación de diversos polisacáridos, proteínas y lípidos, con la tarea de aprovechar las propiedades de cada compuesto y la sinergia entre los componentes implementados, ya que las propiedades mecánicas y de barrera dependen de los compuestos que integran la matriz polimérica y de su compatibilidad (Altenhofen et al., 2009).

A continuación se referencian algunos polisacáridos, así como hidrocoloides de naturaleza proteica que han sido objeto de investigación como películas y recubrimientos comestibles, estos son: carboximetilcelulosa, caseína (Ponce et al., 2008), pectina, así como su mezcla junto a alginato de sodio y el efecto de la adición de CaCl_2 , como material entrecruzante (Maftoonazad et al., 2007, Altenhofen et al., 2009), goma tragacanto, goma guar, etilcelulosa (Shresta et al., 2003), goma de mezquite (Bosquez-Molina et al., 2010), gluten de trigo (Tanada-Palmu y Grosso, 2005), gelatina adicionada con glicerol, sorbitol y sucrosa como plastificantes (Arvanitoyannis et al., 1997; Sobral et al., 2001) y película comestible multicomponente de gelatina-caseína entrecruzadas con transglutaminasa (Chambi y Grosso, 2006).

Almidones de interés como el de yuca plastificado con glicerol, polietilenglicol (Parra et al., 2004), e incorporado con compuestos antimicrobianos naturales

(Kechichian et al., 2010), y almidón de maíz estándar y pre-gelatinizado hacen parte de los biopolímeros de interés por su bajo precio y accesibilidad (Pagella et al., 2002). También se han empleado compuestos como, quitosano, derivados de celulosa y carragenina, entre otros (Carneiro da Cunha et al., 2009; Cerqueira et al., 2010; Del-Valle et al., 2005; Dutta, et al., 2009; Hambleton et al., 2009; Mali et al., 2005; Rodriguez et al., 2006)

Los polisacáridos y las proteínas son buenos materiales para la formación de recubrimientos comestibles, ya que muestran excelentes propiedades mecánicas y estructurales, pero presentan una pobre capacidad de barrera frente a la humedad. Este problema no se encuentra en los lípidos dadas sus propiedades hidrofóbicas, especialmente los que poseen puntos de fusión altos tales como la cera de abeja y la cera carnauba (Morillon et al., 2002; Shellhammer y Krochta, 1997).

En los frutos de tomate, se ha demostrado la efectividad del uso de cubiertas a base de polisacáridos, como el quitosano y la goma arábiga, para retardar la maduración del fruto y reducir la incidencia de su pudrición (Ghaouth et al., 1992; Casariego et al., 2008). Sin embargo, en el caso de la goma arábiga, se requiere de mayores estudios sobre el intercambio de gases en el fruto, además de establecer la influencia de la cubierta sobre el crecimiento microbiano y sobre los procesos fisiológicos relacionados con el tomate (Ali et al., 2010). Por su parte, las cubiertas lipídicas, gracias a su hidrofobicidad, presentan baja permeabilidad al vapor de agua, por lo cual resultan efectivas para preservar la calidad de los tomates (Dávila Aviña et al., 2004).

Dentro del estudio de recubrimientos, la mejora de las propiedades mecánicas y de transporte mediante la incorporación de otros compuestos (es decir, plastificantes y lípidos) ha sido un tema constante de interés (Bergo y Sobral, 2007). Se han incorporado plastificantes para mejorar la flexibilidad y la elasticidad de los recubrimientos (Sothornvita y Krochtab, 2005) y disminuir la presencia de grietas y poros (Garcia et al., 2000). Como el plastificante actúa al disminuir la atracción intermolecular entre las cadenas poliméricas, lo que

permite la penetración de moléculas de vapor de agua polar (Kester y Fennema, 1986), influye mucho en la permeabilidad del recubrimiento final. El glicerol es uno de los plastificantes más usados; es una molécula hidrófila (polar) y el aumento de su concentración provoca un aumento de la transferencia de masa de vapor de agua. Cerqueira et al. (2012) evaluaron la influencia del glicerol y del aceite de maíz sobre las propiedades fisicoquímicas del galactomanano de *Gleditsia triacanthos* y recubrimientos a base de quitosano, y confirmaron que la presencia de glicerol y aceite de maíz originaba una estructura más hidrófila y una disminución de la afinidad del recubrimiento para el agua en ambos polisacáridos, respectivamente.

Por otra parte, los recubrimientos comestibles tienen la particularidad de actuar como vehículos para una amplia gama de aditivos alimentarios, como antioxidantes, nutracéuticos, aromatizantes y antimicrobianos (Rojas-Graü et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006). Se pueden incorporar varios antimicrobianos en recubrimientos comestibles, incluidos ácidos orgánicos (por ejemplo, cítrico, láctico, acético, benzoico, tartárico, propiónico y ácido sórbico), polipéptidos (por ejemplo, lisozima, lactoferrina, natamicina, nisina y peroxidasa), extractos de plantas y aceites esenciales (p. ej. canela, pimienta, ajo, carvacrol y orégano), sales minerales (p. ej., bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio y carbonato de sodio), parabenos, oligosacáridos (quitoligosacáridos), entre otros (Paladines et al., 2014; Ramos et al., 2012; Valencia-Chamorro et al., 2011; Raybaudi-Massilia et al., 2008). Varios autores observaron a través de estudios *in vitro* que la inclusión de antimicrobianos en recubrimientos comestibles mejora el control de las podredumbres que causan deterioro en frutas y verduras. Esta incorporación de agentes antimicrobianos ha sido reportada como moderadamente efectiva (McCormick et al., 2005), hasta muy exitosa (Dutta et al., 2009; Kristo et al., 2008; Lungu y Johnson, 2005), dependiendo de los alimentos estudiados, el material biopolimérico en contacto con el alimento y el agente antimicrobiano utilizado. Sin embargo, es necesario realizar más estudios de incorporación para comprender cómo mantener las propiedades del

recubrimiento estables después de la incorporación bioactiva (por ejemplo, barrera a los gases, propiedades mecánicas y apariencia) (Sánchez-González et al., 2010).

Tecnologías Emergentes: Desarrollo de Cubiertas Nanolaminadas

La coordinación entre el carácter comestible del envase primario y la nanotecnología en el secundario, se potencia para mejorar las propiedades de barrera manteniendo intactas las propiedades sensoriales del alimento evitando la pérdida de aromas al exterior y el ingreso de gases, vapores o compuestos aromáticos desde el exterior (Brody, 2006).

Existen varias ventajas esperadas cuando se utiliza un enfoque nanotecnológico en el campo de los materiales de envasado, con respecto a las cubiertas y films tradicionales, es decir, en términos de cantidades mucho más bajas de ingredientes funcionales necesarios, un menor impacto en los atributos sensoriales de los alimentos, y las mejoras tanto en la mecánica como en las propiedades de transporte de gases y solutos (Medeiros et al. 2012a). El trabajo de diseño con multicapas es un procedimiento que ha demostrado gran eficiencia para la obtención de las propiedades funcionales (Phan et al., 2008; Rudra, Dave y Haynie, 2006).

Aunque estas tecnologías aún tienen escasa aplicación en alimentos, están siendo estudiadas, como es el caso de la electrodeposición capa por capa, la cual se realiza alternando la inmersión de sustratos en soluciones de polielectrolitos de carga opuesta con pasos de enjuagues intermedios, lo cual produce capas ultrafinas de polielectrolitos sobre las superficies cargadas (Labouta y Schneider, 2010; Zhang et al., 2007; Decher y Schlenoff, 2002). La técnica de capa por capa es bastante simple y permite el uso de una amplia gama de materiales (por ejemplo, proteínas, polisacáridos, lípidos y nano-partículas). Estos materiales son capaces de interactuar ya sea mediante interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes, emparejamiento de bases complementarias y enlaces hidrofóbicos. Además, dependiendo de la plantilla utilizada (por ejemplo, plana o coloidal), es posible diseñar una variedad

de sistemas nanolaminados que incluyen nanoemulsiones, nanofilms y nanocápsulas (Cerqueira et al., 2014). Las propiedades resultantes de los revestimientos nanolaminados tales como las propiedades mecánicas, la permeabilidad a los gases y las características de hinchamiento y humectación están influenciadas por el tipo de materiales de adsorción utilizados y también por la secuencia, el número total de capas y las condiciones usadas para la preparación, por ejemplo, temperatura, pH y fuerza iónica (Weiss et al., 2006). Esto conduce a un gran número de posibilidades, permitiendo así adaptar las propiedades finales del recubrimiento para asegurar la funcionalidad deseada.

Una de las ventajas de estos nanosistemas son sus propiedades de barrera a los gases en comparación con los recubrimientos comestibles convencionales. Se sugiere que las propiedades de barrera de los recubrimientos nanolaminados se mejoran debido a su nanoestructura, que tiene una mayor tortuosidad resultante de las interacciones electrostáticas entre los componentes del nanolaminado y también de la interpenetración de las capas sucesivamente depositadas que dificultan la migración de las moléculas de gas a través de la estructura (Pinheiro et al., 2012; Medeiros et al., 2012; Jang et al., 2008). Esta nueva generación de recubrimientos comestibles está siendo diseñada especialmente para permitir la incorporación y/o liberación prolongada de antioxidantes, vitaminas, nutraceuticos y agentes antimicrobianos. La aplicación de la técnica de capa por capa en frutas y verduras es muy reciente y solo se han efectuado pocos estudios por lo novedoso de la técnica, pero han mostrado un efecto favorable al aumentar la vida de anaquel. Uno de los primeros pasos en la aplicación de la técnica de capa por capa en los productos, es demostrar su éxito (mediante técnicas de microscopía o mediciones de ángulo de contacto; o ambas).

Estudios recientes mostraron aplicaciones exitosas de recubrimientos nanolaminados en productos básicos, describiendo las condiciones de aplicación, tales como el número de capas, el tiempo de inmersión, los pasos de lavado y secado. Medeiros et al. (2012) evaluaron un recubrimiento nanolaminado basado en cinco capas de pectina y quitosano (a una

concentración de 0.2%, p/v) en mangos enteros 'Tommy Atkins' aplicados por inmersión de 15 min en cada solución de polielectrolito y un procedimiento de lavado con agua destilada a pH 7.0 y 3.0 para pectina y quitosano, respectivamente. Después de 45 días, los mangos recubiertos presentaron una mejor apariencia, reducción en la pérdida de agua y ausencia de crecimiento fúngico que los mangos sin recubrimiento; también, se observó una reducción del flujo de gas y como resultado se incrementó la vida de anaquel de los mangos. Más recientemente, Souza et al. (2015) estudiaron un recubrimiento nanolaminado basado en cinco capas alternas de alginato y quitosano (cada uno a concentraciones de 0.2%, p/v) para extender la vida de anaquel de mangos recién cortados y almacenados en refrigeración (8 °C) durante 14 días. Las soluciones de polielectrolito se aplicaron por inmersión durante 15 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada con pH 7,0 y 3,0 para alginato y quitosano, respectivamente. Se usó una etapa de secado adicional con flujo de nitrógeno a 25 °C durante 15 minutos entre cada capa. El nanolaminado permitió la reducción del contenido de malondialdehído (una indicación de que la aplicación del recubrimiento previene la senescencia). De acuerdo con los análisis microbianos, la vida de anaquel de los mangos recién cortados aumentó hasta 8 días a 8 °C en comparación con los mangos recién cortados sin recubrimiento (<2 días).

La aplicación de nanocompuestos de grado alimenticio en las películas comestibles, tiene un futuro promisorio debido a que se ha encontrado que impactan positivamente en las propiedades mecánicas, con el aumento de la resistencia de las películas y también mejorando las propiedades de barrera (Moura et al., 2009; Sothornvit et al., 2009). También las nanopartículas pueden ser utilizadas como portadores de agentes antimicrobianos y aditivos (Sorrentino, et al., 2007; Sothornvit, et al., 2009). Sin embargo, la eficacia de los sistemas de nanocapas con una variedad de características (por ejemplo, antioxidante, antimicrobiano y reducción del intercambio gaseoso) aún permanece poco estudiada y es importante porque se ha contribuido con la información científica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Extracto

Colecta de plantas

Las muestras de hojas y ramas de arbustos de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* (20 arbustos por especie), fueron identificadas *in situ* (Fig. 2) por el Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla, y recolectadas al azar en sitios silvestres de la región semiárida ubicada en la parte sur del estado de Coahuila, México (Jasso de Rodríguez et al., 2007). Las muestras fueron transportadas en bolsas de plástico al Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Inmediatamente se separaron las hojas de ramas y se colocaron en una estufa Mapsa a 60 °C por 48 horas. A continuación las hojas y ramas se molieron por separado en un molino de cuchillas marca Thomas Wiley, con un tamiz de 2 mm de diámetro y se conservaron en un sitio seco hasta su uso en la obtención de extractos. Los vouchers de *F. cernua* (No. 96035), *F. microphylla* (No. 43362) y *F. retinophylla* (No. 82956), se depositaron en el Herbario (ANSM) de la UAAAN.

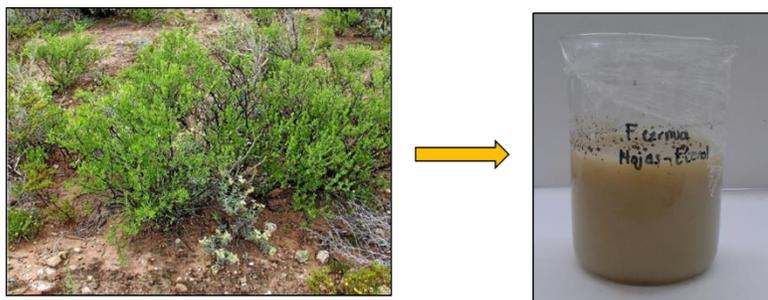


Figura 2. *F. cernua* en su lugar nativo en Coahuila, México y extracto de etanol de hojas.

Elaboración de extractos de etanol y acuosos

Los extractos de hojas y ramas se elaboraron en extractor Soxhlet usando como solventes etanol grado reactivo al 100% y agua destilada. En un papel filtro Watman #1 se colocaron 14 gr de muestra molida (hojas y ramas separadamente) y se pusieron en extracción con 200 mL de los solventes durante

72 horas. Al final de la extracción los solventes fueron evaporados en un rotaevaporador (Buchii R-200) hasta sequedad. En seguida los matraces se colocaron en estufa de secado a 50 °C por 24 horas para evaporar el solvente remanente. Los extractos se colocaron en frascos color ámbar perfectamente cubierto y colocados en un desecador a 25 °C y 0% de HR, hasta su uso en los bioensayos.

Caracterización Fitoquímica

Cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante

Los solventes utilizados fueron grado reactivo analítico. 2,2-2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), carbonato de sodio (Na_2CO_3), etanol, ácido acético glacial, trolox (6-Hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), TPTZ (2, 4,6-tri (2-piridil)-s-triazina) y Folin-Ciocalteu, adquiridos en Sigma (USA).

Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales de los extractos acuosos y de etanol de hojas y ramas se evaluó con el reactivo Folin-Ciocalteu siguiendo el método IFC (Reglamento (CEE) nº 2676/90 de la Comisión). Se colocaron 20 μL de muestra en los pocillos de la microplaca y se mezcló con 20 μL del reactivo Folin-Ciocalteu, dejando reposar por 5 minutos, después se le adicionaron 120 μL de la solución de carbonato de sodio y se dejó reaccionar por 5 minutos a 50 °C. Finalmente se adicionó 125 μL de agua destilada y se leyó a una absorbancia de 790 nm usando un espectrofotómetro (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU). Se preparó una curva de calibración usando ácido gálico a diferentes concentraciones (100, 200, 400, 600, 800 mg/L, $R^2= 0.9919$). La prueba se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g muestra).

Actividad antioxidante

DPPH

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó por medio de la capacidad de la muestra para captar el radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidracil), siguiendo el método de Rodríguez-Jasso et al. (2014). Se preparó el radical DPPH a una concentración de 60 mM en etanol. Se colocaron en microplaca por triplicado 7 μL de muestra y 193 μL de la solución DPPH dejando reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Para el blanco, se usó el solvente empleado en las muestras, sin la solución DPPH, finalmente se leyó a una absorbancia de 517 nm. Los valores fueron reportados como porcentaje de inhibición, calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left| \frac{1 - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{1 - \text{Abs}_{\text{control}}} \right| \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

FRAP

La capacidad de reducción de extractos de etanol y acuosos fueron determinados por el ensayo FRAP, como lo describe Benzie y Strain (1996), usando 10 mM TPTZ en 40 mM de HCl, y 20 mM FeCl_3 en una relación 10:1:1 (v/v/v) a pH de 3.6. Se tomaron 10 μL de muestra y se colocaron en una microplaca con 290 μL del reactivo FRAP, incubando a 37 °C por 15 minutos. La absorbancia se leyó a 593 nm. La curva de calibración se preparó con Trolox a diferentes concentraciones desde 250 mg/L a 1000 mg/L y se usó agua destilada como blanco. La capacidad antioxidante se reportó como microgramo de Fierro II por 100 miligramos de muestra ($\mu\text{gFeII}/100 \text{ mg muestra}$).

Composición Química

Análisis de composición química de extractos de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* por Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (GC–MS)

El análisis de GC–MS fue llevado a cabo en un equipo Agilent Technologies 6580 GC unido a un 5975 B MSD usando una columna HP-5MS (30 x 0,25 mm 1D X 0,25) y un sistema de ionización con energía de 70 eV. Se utilizó un flujo constante a 1.1 mL/ min y un volumen de inyección de 1 µL, la temperatura de inyección fue de 250 °C. El programa de calentamiento del horno fue isotérmico durante 5 min a 60°C seguido de un calentamiento de 5°C/min hasta 100°C/min (2 min) y de 10°C/min hasta 250°C/min (5 min). La interpretación de los espectros de masas de los compuestos se realizó utilizando la biblioteca del NIST (National Institute of Standard and Technology).

Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos de *Flourensia* spp. en Hongos Postcosecha

Aislamiento de hongos: *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer*

Los hongos fitopatógenos usados en el presente estudio se obtuvieron de frutos y raíces de plantas de tomate con síntomas de enfermedades causadas por *R. stolonifer* y *F. oxysporum*, tomando tejido sano y enfermo, los cuales se desinfectaron siguiendo la metodología de Ascencio et al. (2008). El tejido fue puesto en una solución de hipoclorito al 1 % por 3 minutos y se enjuagó con agua destilada estéril por 5 minutos, se secó en papel estéril y se sembró en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA). Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C. Se hicieron preparaciones microscópicas con lactofenol azul, y los hongos se identificaron por las características morfológicas con la ayuda de un microscopio; los patógenos se identificaron a nivel morfológico con la ayuda de claves taxonómicas de Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium*; y de Hernández-Lauzardo et al. (2006) y Lima et al. (2014) para *Rhizopus*.

Identificación de *F. oxysporum* y *R. stolonifer* por PCR

Para la identificación molecular, se seleccionaron hongos aislados, purificados e identificados morfológicamente, posteriormente se extrajo ADN de las cepas y se realizaron pruebas moleculares con la técnica de PCR en tiempo final siguiendo el método de González et al. (2011). Se utilizaron los primers CNL12 (5'-C TGAACGC CTCTAAGTCAG- 3') y CNS 1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG- 3') que codifican para un fragmento de la región intergénica ribosomal (IGS) ubicada entre la subunidad pequeña y la subunidad grande. La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 1 min, seguida de la temperatura de anillamiento de 54 °C por 1 min y la temperatura de extensión a 72 °C por 2 min. Los productos de PCR obtenidos (2.6 kb) fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%. Se enviaron a secuenciar a Macrogen (USA) y por medio del GenBank se identificó a nivel de especie.

Efecto de las concentraciones de extractos de *Flourensia* spp. en *F. oxysporum* y *R. stolonifer*

Se realizaron los bioensayos contra los dos patógenos mediante la técnica de dilución en agar, siguiendo el método de Zabka et al. (2011). A partir de una solución madre a 10,000 mg/L. Los extractos de etanol se diluyeron con 10% de etanol y se filtraron con filtros Whatman No. 1; se esterilizaron bajo un sistema de vacío para retener bacterias. Se emplearon concentraciones de 0 (control), 50, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 mg/L para el bioensayo de *F. oxysporum* y la concentración de 6000 mg/L se incluyó para el bioensayo de *R. stolonifer* de extractos de etanol y acuosos de hojas y ramas de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla*.

Se preparó medio PDA y se le adicionaron los extractos a las diferentes concentraciones y una vez solidificado se inoculó un disco de 4mm de diámetro que contenía al hongo y se incubó a una temperatura de 28 ± 2 °C, las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Se midió la cinética de crecimiento cada 24 horas a siete y tres tiempos para *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, respectivamente, utilizando un vernier digital Stainless Hardened (mm) midiendo en forma de cruz

(dos puntos), hasta que el control absoluto llenara la caja por completo. El porcentaje de inhibición del hongo con los extractos se calculó con la siguiente ecuación tomando como referencia el control absoluto:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{DC-DT}{DC} \right] \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde DC es el diámetro del control y DT es el diámetro del tratamiento de las diferentes concentraciones evaluadas.

Análisis estadísticos de la actividad antifúngica *in vitro*

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Los resultados se evaluaron con análisis de varianza (ANVA) y con pruebas de comparación de medias por Tukey ($p=0.05$). El análisis Probit ($p<0.05$) se aplicó para calcular la concentración mínima inhibitoria 50 y 90 de extractos, resultando una inhibición del 50 % y 90 % del crecimiento del patógeno en comparación con el control absoluto (CMI₅₀ y CMI₉₀). Los datos se analizaron usando el software SAS versión 9.0.

Cubiertas Comestibles Nanolaminadas

Esta etapa experimental se llevó a cabo en el Centro de Ingeniería Biológica de la Universidad de Minho en Braga, Portugal.

Formulación y desarrollo de cubiertas comestibles nanolaminadas con resinas de *F. cernua*

La metodología (Medeiros et al., 2012a) establece que las pruebas de caracterización de las cubiertas nanolaminadas se efectuen sobre películas de tereftalato de polietileno (PET), antes de las pruebas biológicas.

Materiales

Las películas de tereftalato de polietileno (PET) se obtuvieron de Canson (Francia). El alginato de sodio se obtuvo de Manutex RSX (Kelco International, Ltd., Portugal) y se adquirió quitosano (grado de desacetilación 91.23% y alto

peso molecular) de Golden-Shell Biochemical Co., Ltd (China). El ácido láctico con un 90% de pureza se adquirió en Merck (Alemania). Tween 80 se adquirió de Acros Organics (Bélgica). El hidróxido de sodio se obtuvo de Riedel-de Haën (Alemania). La 1,6-hexanodiamina (> 98% de pureza) se adquirió en Sigma-Aldrich (Alemania).

Dichloran-rose Bengal-cloranfenicol (DRBC), glicerol y cloruro de sodio fueron suministrados por Panreac (España). El agar con conteo de placa (PCA) y la peptona bacteriológica se adquirieron en HiMedia Laboratories (India).

Aminólisis de la superficie del tereftalato de polietileno

Las películas de PET se cortaron en piezas rectangulares de 0.8 x 5.0 cm de diámetro y piezas circulares de 5.0 cm de diámetro y se aminolizaron de acuerdo con Fu et al. (2005). Brevemente, las películas de PET se limpiaron en solución de etanol/agua (1:1, v/v) durante 3 h, seguido de un enjuague a fondo con agua destilada y se secaron a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, las películas se sumergieron en solución de 0.06 g/mL 1,6-hexanodiamina/propanol a 37 °C durante 4 h, se lavaron a fondo con agua destilada para eliminar 1,6-hexadiazina libre y finalmente se secaron a 37 °C durante 24 h. Las películas de PET aminolizadas se trataron con solución de HCl 0.1 mol/L durante 3 h a temperatura ambiente (20 °C), y luego se lavaron con una gran cantidad de agua destilada, se secaron a 30 °C durante 24 h y se denominaron "PET aminolizado/cargado" (PET A/C). Este procedimiento fue necesario para cargar (positivamente) la superficie PET que de otro modo sería neutra, con el objetivo de una interacción más fuerte con el alginato con carga negativa.

Formulación y preparación de soluciones de polielectrolito con resinas de *F. cernua*

La solución de alginato (Alg) se preparó disolviendo alginato de sodio al 0.2% (p/v) en agua destilada y se agitó mediante agitación magnética, a temperatura ambiente, hasta su disolución completa (aproximadamente 3 h). Se añadió glicerol al 0.05% (p/v) y Tween 80 al 0.05% (p/v) como plastificante y como

tensioactivo, respectivamente y se agitó nuevamente por 1h. El pH de la solución formadora de película se ajustó a 7.0 con una solución de hidróxido de sodio de 1 mol/L. Se disolvió quitosano (0.6%, p/v) (Qui) en una solución acuosa de ácido láctico (1.0%, v/v) bajo agitación magnética hasta que se disolvió completamente a temperatura ambiente (aproximadamente 10 h). Se añadió glicerol al 0.1% (p/v) y Tween 80 al 0.1% (p/v) como plastificante y tensioactivo, respectivamente y se agitó nuevamente por 1h. Finalmente, la solución de quitosano se ajustó a pH 3.0 con una solución de ácido láctico de 1 mol/L. Posteriormente, se añadió extracto de etanol de *F. cernua* (Fc), a una concentración de 5000 mg/L, a soluciones de recubrimiento de quitosano (Qui + Fc) y alginato de sodio (Alg + Fc) para alcanzar una concentración final de 0.6 o 0.2% (p/v), respectivamente, y se mezclaron durante 3 h mediante agitación magnética a temperatura ambiente para la homogeneización.

Las soluciones se emplearon para formar las cubiertas en los soportes PET A/C para la caracterización de las mismas; y en los frutos de tomate para la evaluación de la vida de anaquel.

Procedimiento de recubrimiento de PET A/C

Las piezas de PET A/C se sumergieron en las soluciones de Alg o Alg+Fc durante 20 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada con el mismo pH (7.0). Las muestras se secaron colgándolas dentro de una cámara con un flujo de nitrógeno para acelerar el proceso. Este procedimiento se repitió con las otras soluciones de polielectrolito (quitosano, quitosano+Fc) pero, en este caso, las muestras se enjuagaron con una solución acuosa a pH 3.0. Este procedimiento se repitió con la deposición alterna de un total de cinco nanocapas con diferentes secuencias (Alg—Qui—Alg—Qui—Alg denominado CNL) y (Alg+Fc—Qui+Fc—Alg+Fc—Qui+Fc—Alg+Fc denominado CNL+Fc). Como resultado, se produjeron dos tipos de recubrimientos nanolaminados en soportes PET A/C y mantuvieron a 20 ± 2 °C y $50 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR).

Caracterización de cubiertas nanolaminadas sobre PET

Potencial Zeta

El potencial zeta (ζ -potencial) de cada solución de polielectrolito se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) (Zetasizer Nano ZS-90, Malvern Instruments, Reino Unido), para confirmar su carga opuesta. Cada muestra se analizó en una celda capilar plegada (DTS 1060, Malvern Instruments) para las mediciones a temperatura ambiente (Silva et al., 2015). Además, se evaluó el efecto de la adición de Fc en las soluciones de revestimiento. Se llevaron a cabo tres réplicas verdaderas, con tres lecturas para cada una de ellas.

Mediciones del ángulo de contacto

Las mediciones de ángulo de contacto son una herramienta útil para determinar la naturaleza hidrófoba o hidrofílica de la superficie de la cubierta: valores más bajos ($\theta < 20^\circ$) están estrechamente relacionados con superficies humectables, por el contrario, las superficies hidrófobas muestran valores altos ($\theta > 70^\circ$) del ángulo de contacto. Por lo tanto, la deposición de capas sucesivas sobre PET A/C puede ser seguida por mediciones de ángulo de contacto debido a las diferentes propiedades de humectabilidad de las soluciones polielectrolito utilizadas para la formación de cubiertas nanolaminadas.

Los ángulos de contacto (θ°) del PET original, el PET A/C y la subsiguiente superficie de los recubrimientos nanolaminados se midieron mediante el método de gota sésil (Newman y Kwok, 1999), en el que se colocó una gota de agua ultrapura en una superficie en posición horizontal utilizando un medidor de ángulo de contacto (OCA 20, Dataphysics, Alemania), equipado con un software de análisis de imágenes. La gota de agua (2 μL) se colocó en la superficie horizontal con una jeringa de 500 μL (Hamilton, Suiza) con una aguja de 0.75 mm de diámetro. Las mediciones se realizaron a los 15 s, para cada tipo de superficie, se usaron tres muestras de película. Para cada muestra de película, se realizaron quince mediciones de ángulo de contacto a $20.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO₂)

La metodología utilizada se basó en el método ASTM E96-92 (ASTM E96-92, 1990). Las películas se sellaron en la parte superior de una celda de permeación que contenía 50 mL de agua destilada (100% de HR, 2337 Pa de presión de vapor a 20 °C). Posteriormente, las celdas se pesaron usando una balanza analítica (Marca, País) y luego se colocaron en un desecador que contenía sílice previamente seco (105 °C durante la noche), a temperatura constante de 20 °C, con 0% de HR y 0 Pa de presión vapor de agua, estas condiciones se mantuvieron debido a la constante circulación de aire por un ventilador instalado dentro del desecador. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y el peso de las celdas se midió cada 2 h durante 10 h, suponiendo condiciones de presión de agua constantes y uniformes (Ziani, Oses, Coma y Maté, 2008). Para garantizar una humedad relativa uniforme, las velocidades del ventilador se instalaron dentro de los desecadores. Se obtuvieron tres réplicas para cada muestra y se determinó la permeabilidad al vapor de agua (PVA) mediante la ecuación (3) (Cooksey et al., 1999), Donde: L corresponde al grosor de las cubiertas (en mm) y PVA la permeabilidad al vapor de agua (en g/ m s Pa). El subíndice “a” representa soporte PET A/C; el “b” nanocapas y el “t” resultante de soporte PET A/C recubierto con nanocapas.

$$PVA_b = \frac{L_b}{\left(\frac{L_t}{PVA_t}\right) - \left(\frac{L_a}{PVA_a}\right)} \quad \text{Ec. (3)}$$

La permeabilidad al oxígeno (PO₂) se determinó de acuerdo con la prueba estándar ISO 15105-2: 2003 y con Fernandes et al. (2018). Las películas se sellaron entre dos cámaras verticales, teniendo cada una dos canales (para la entrada y salida de los flujos). La cámara superior se suministró con un caudal de oxígeno controlado de 25 mL/min para mantener la presión constante en ese compartimento. La cámara inferior se purgó con una corriente de nitrógeno, a una velocidad de flujo controlada de 5 mL/min, que actúa como el gas portador para el oxígeno. Las mediciones de la concentración de O₂ se llevaron a cabo

recogiendo 500 μl de muestra con una jeringa adecuada para la cromatografía de gases (Hamilton, Suiza) a partir del flujo de nitrógeno que sale de la cámara inferior. Posteriormente, el gas de muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases (Bruker Scion 456, Canadá), equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) a 130 ° C, una columna Molsieve y argón (60 mL/min) como gas portador. Se usó una mezcla que contiene 10% de CO_2 , 20% de O_2 y 70% de N_2 como la muestra estándar para la calibración. La presión en las celdas se midió para asegurar que se ejerciera 1 atm de presión en ambas cámaras. Como el O_2 se transportó continuamente por el flujo de nitrógeno, se consideró que la presión parcial de O_2 en el compartimiento inferior es nula, por lo tanto, ΔP es igual a 1 atm. Se obtuvieron tres réplicas para cada muestra, y la PO_2 para las cinco nanocapas se determinó mediante la siguiente ecuación (Cooksey et al.1999)

$$PO_{2b} = \frac{L_b}{\left(\frac{L_t}{PO_{2t}}\right) - \left(\frac{L_a}{PO_{2a}}\right)} \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde: L corresponde al grosor de las cubiertas (en mm) y PO_2 a la permeabilidad al oxígeno (en g/m s Pa). El subíndice “a” representa soporte PET A/C; el “b” nanocapas y el “t” soporte revestido de PET A/C resultante (PET A/C + cinco nanocapas).

Microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada con análisis de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

Las cubiertas nanolaminadas CNL y CNL+Fc se caracterizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM), acoplado con un análisis de espectroscopía de rayos X (EDS), de energía dispersiva (Phenom ProX con detector EDS (Phenom-World BV, Holanda)). Todos los resultados fueron adquiridos utilizando el software ProSuite integrado con el software de identificación de elementos Phenom, permitido para la cuantificación de la concentración de los elementos presentes en las cubiertas nanolaminadas, expresado en peso o concentración atómica.

Muestras liofilizadas de PET A/C con CNL y CNL+Fc se fijaron a los portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de carbono eléctricamente conductora (PELCO Tabs™), las cuales fueron previamente cortadas en tiras y se colocaron verticalmente en el portamuestras. Las muestras fueron fotografiadas sin recubrimiento. El portamuestra de aluminio se colocó dentro de un Phenom Standard Sample Holder, y se analizaron para la composición elemental al menos 3 puntos o áreas diferentes para cada muestra de CNL y CNL+Fc. El análisis de EDS se realizó a 15 kV con punto de intensidad.

Análisis estadísticos de la caracterización de nanocapas

Las pruebas se llevaron a cabo bajo un diseño completamente al azar y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando análisis de varianza (ANOVA), prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0,05$), utilizando StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (sistema de software de análisis de datos), versión 10.

Efecto de Cubiertas Nanolaminadas en la Vida de Anaquel de Frutos de Tomate a 20 °C/85% HR y 11 °C/90% HR

Los tomates utilizados en el experimento (*Solanum lycopersicum* L.) se compraron en un supermercado local en Braga, Portugal. Los frutos fueron seleccionados visualmente por la uniformidad en tamaño, color y ausencia de infección por hongos. Antes de aplicar los tratamientos, las frutas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio (0.05%), durante 3 minutos y se secaron al aire a temperatura ambiente.

Diseño experimental

Se llevaron a cabo dos ensayos de vida de anaquel bajo las siguientes condiciones: a temperatura ambiente del mercado (20 °C / 85% HR) y de almacenamiento en frío (11 °C / 90% HR). En ambos ensayos se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos. Los tratamientos fueron: frutos sin cubierta (SC) como control, frutos con cubierta nanolaminada de alginato y quitosano (CNL) y frutos con cubierta nano-laminada con extracto de etanol de

hojas de *Flourensia cernua* (CNL+Fc) (Cuadro 1). Los análisis fisicoquímicos fueron: pérdida de peso; pH, acidez titulable (AT), contenido de sólidos solubles (CSS), color; firmeza; transferencia de gases y producción de etileno y análisis microbiológicos.

Para evaluar pérdida de peso, se utilizaron 5 tomates por tratamiento, para el almacenamiento a temperatura ambiente las mediciones en los mismos frutos se realizaron a intervalos regulares de 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días. En el almacenamiento en frío las mediciones se realizaron a intervalos de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días. El número de frutos utilizados fue 30 (2 ensayos x 3 tratamientos x 5 frutos por tratamiento). En ambos ensayos se midió el color del fruto a los mismos intervalos. La evaluación de las variables CSS, AT, pH y análisis microbiológico (conteo de hongos y levaduras y microorganismos mesófilos) se efectuó en cada ensayo a partir de tres frutos por tratamiento en cada uno de los intervalos de tiempo. El número de frutos fue de 108 (2 ensayos x 3 tratamientos x 3 frutos por tratamiento x 6 intervalos)

La prueba de firmeza se efectuó utilizando 7 frutos por tratamiento en cada ensayo que se evaluaron al inicio y al final de los intervalos (0-15; 0-25). El número de frutos utilizados fue de 84 (2 ensayos x 3 tratamientos x 7 frutos x 2 intervalos)

La prueba de transferencia de gases (oxígeno; dióxido de carbono y etileno se efectuaron las mediciones diariamente durante 10 días en el mismo fruto, se emplearon dos frutos por tratamiento en cada ensayo.

Recubrimiento de frutos de tomate

Las cubiertas se aplicaron en los grupos de prueba mediante la técnica de deposición de capa por capa, tal como se presenta en la Cuadro 1; no se aplicó ninguna cubierta al grupo de control (sin cubierta).

Los tomates se sumergieron en una solución de (Alg) o (Alg+Fc) a pH 7.0 durante 10 s, el tiempo se seleccionó con base a trabajos previos (Olivas et al., 2007; Singh et al., 2010) y la idoneidad para su aplicación en la industria (es decir, se prefieren tiempos de aplicación más bajos); posteriormente, los frutos se

enjuagaron con agua destilada con el mismo pH (7.0). Las muestras se secaron a 30 °C durante 20 min en un horno con circulación de aire (Binder, EE. UU.); el procedimiento se repitió utilizando una solución de (Qui) o (Qui+Fc) a pH 3.0 y enjuague con agua destilada al mismo pH. Este proceso se repitió con la deposición alterna de un total de cinco nanocapas (Cuadro 1). Las muestras de cada grupo se colocaron en bandejas que se dejaron dentro de una cámara de temperatura y humedad controlada (Binder, EE. UU.) En las condiciones descritas para el almacenamiento.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos y cubiertas nano-laminadas aplicadas a frutos de tomate

Tratamientos	Capas				
	1	2	3	4	5
1. Frutos sin cubierta (SC)	—	—	—	—	—
2. Frutos con cubierta nano-laminada (CNL)	Alg	Qui	Alg	Qui	Alg
3. Frutos con CNL+F. <i>cernua</i> (CNL+Fc)	Alg+Fc	Qui+Fc	Alg+Fc	Qui+Fc	Alg+Fc

Análisis fisicoquímicos

Pérdida de peso

La pérdida de peso se evaluó pesando 5 tomates por tratamiento en balanza de precisión (Mettler AE200, Alemania), al comienzo del almacenamiento (día 0) y durante los intervalos de tiempo establecidos para los dos ensayos. El porcentaje de pérdida de peso se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde: P_i es el peso de muestra inicial y P_f es el peso de muestra final.

Contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT) y pH

Las pruebas se realizaron al comienzo del almacenamiento (día 0) y durante los intervalos de tiempo establecidos para los dos ensayos. Se emplearon 3 frutos de tomate de cada tratamiento, se trituraron en un mezclador y se filtraron (50 g) al vacío a través de papel de filtro Whatman N° 1.

El contenido de sólidos solubles (CSS) es un índice de concentración de sólidos solubles. El jugo de la fruta (grupos de prueba y control) se usó para determinar el CSS según el método AOAC 932.12 (AOAC, 1997) usando un refractómetro (HI 96801, Hanna Instruments Inc., Rumania) previamente estandarizado con agua. Los resultados se expresaron como porcentaje (%).

La acidez titulable (AT) se determinó usando el método AOAC 942.15 (AOAC, 1997), específico para los derivados de fruta, midiendo la cantidad de NaOH 0.1 mol/L necesario hasta el vire de color de la muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) en gramos de ácido cítrico equivalente por 100 g de tomate.

La determinación del pH se realizó usando un medidor de pH (Hanna Instruments Inc., Rumania). Después de la homogeneización de las muestras, el pH se midió por inmersión directa del electrodo.

Color

Los valores del color de la piel del tomate se midieron usando un colorímetro Minolta (CR 400, Minolta, Japón) y se registraron las lecturas promedio en tres puntos en la circunferencia de los frutos, las mediciones se realizaron al comienzo del almacenamiento (día 0) y durante los intervalos de tiempo establecidos para los dos ensayos.. El instrumento fue calibrado contra una placa de color blanco estándar. En un colorímetro Minolta, el valor a^* corresponde al grado de enrojecimiento, mientras que el valor b^* representa el amarillo. En este estudio, los resultados presentan como valores de enrojecimiento para frutos de tomate de acuerdo con la escala propuesta por Batu (2004) (Cuadro 2). El enrojecimiento se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Enrojecimiento} = \frac{a^*}{b^*} \quad \text{Ec. (6)}$$

Cuadro 2. Clasificación de las etapas maduras de la fruta de tomate según los valores de enrojecimiento. Adaptado de Batu (2004).

Valores de enrojecimiento (a*/b*)*	Etapas de color de tomate USDA
-0.59 to -0.47	Verde
-0.47 to -0.27	Amarillo-verdoso
-0.27 to 0.08	Torneado
0.08 to 0.60	Rosado
0.60 to 0.95	Rojo claro
0.95 to 1.21	Rojo

Firmeza

La firmeza de los frutos se determinó al inicio y al final de la vida de anaquel, se emplearon 7 tomates al inicio y 7 al final. Se utilizó un analizador de textura (TA.XT, Stable Micro Systems, Reino Unido). El tomate se colocó en el centro de la plataforma y se midió la fuerza (N) necesaria para penetrar 20 mm en la fruta en el punto de ruptura (el punto de ruptura se determinó mediante el tipo de disparador de fuerza automática, con una fuerza de disparo de 0.049 N) con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de cabeza plana de 5 mm (sonda P/5) con una velocidad de prueba previa de 1.50 mm/s, una velocidad de prueba de 5 mm/s y una velocidad de prueba posterior de 10.00 mm/s. Se realizaron 3 mediciones por tomate y los resultados fueron la media \pm SE (n = 21) y se expresaron en Newton (N).

Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron contando los microorganismos mesófilos aeróbicos totales y los hongos y levaduras durante el almacenamiento a temperatura ambiente y en frío, según Olivas et al. (2007). Se retiraron 3 tomates por cada tratamiento de la cámara de almacenamiento, los cuales fueron molidos utilizando un procesador de alimentos, se colocaron 10 g de muestra en

una bolsa stomacher con filtro, estéril (VWR Scientific, EE. UU.), que contenía 90 mL de agua peptonada estéril (0.1%). Esto se mezcló durante 120 s usando un mezclador Stomacher (3500, Reino Unido), en seguida se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-5}), y 1 mL de las diluciones decimales seriadas del filtrado en peptona al 0.1% (de cada tratamiento) se vertió por duplicado en placas Petri y posteriormente se agregó el medio de cultivo agar de recuento en placa (PCA) (Ruelas-Chacón et al., 2017); después de agregar el medio, se hacían girar las placas Petri a la derecha y a la izquierda; se dejaron solidificar y se incubaron a 37 °C durante 2 días para contar los microorganismos mesófilos aerobios. Las mismas diluciones decimales se extendieron con agar dichloran-rose Bengal-cloranfenicol (DRBC) y se incubaron durante 5 días a 25 °C para contar hongos y levaduras. Los análisis se realizaron con tres repeticiones. Los resultados se expresaron en logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo (log CFU/g).

Tasa de transferencia de gas y producción de etileno

Las mediciones de las tasas de transferencia de O₂, CO₂ y producción de etileno de los tomates (con y sin cubierta) se llevaron a cabo utilizando el método de sistema cerrado con aire como atmósfera inicial según Cerqueira et al. (2009) con algunas modificaciones. Brevemente, se colocó cloruro de potasio y cloruro de bario en solución salina saturada para las condiciones de HR = 85% a 20 °C y HR = 90% a 11 °C, respectivamente, en el fondo de un recipiente de vidrio de 2 L para lograr la humedad relativa deseada. Más tarde, se colocó una muestra entera de fruta intacta dentro del recipiente, separándose de la solución salina saturada mediante una malla. El sistema se cerró y se almacenó a 20 °C y 85% de HR u 11°C y 90% HR. Las concentraciones de O₂, CO₂ y etileno dentro del contenedor se midieron extrayendo muestras de gas con una jeringa de 500 µl, adecuada para la cromatografía de gases (Hamilton, Suiza) a través de un septo de silicona instalado en la tapa del contenedor.

El contenido de etileno en los recipientes de vidrio se determinó utilizando un cromatógrafo de gases (Varian Star 3400 CX, EE. UU.) Equipado con un detector

de ionización de llama (FID) a 280 °C, una columna no polar Varian y helio (1 ml/min) como gas portador. Se usó una muestra estándar de etileno (500 ppm) para la calibración. Por otro lado, el contenido de O₂ y CO₂ en los envases de vidrio se midió empleando un cromatógrafo de gases (Bruker Scion 456, Canadá), equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) a 130 °C y dos canales para separar O₂ y CO₂. Por lo tanto, la columna Molsieve y el argón (60 ml/min) como gas portador se usaron para separar el O₂, mientras que el CO₂ se separó a través de una columna Poraplot y el helio (4 ml/min) como gas de arrastre. Se usó una mezcla que contenía 10% de CO₂, 20% de O₂ y 70% de N₂ como muestra estándar para la calibración. Se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento de fruta y se tomaron tres muestras de inyección de cada recipiente. El contenido de gases (O₂, CO₂ y etileno) en los contenedores se midió diariamente hasta que se mantuvo constante.

La tasa de consumo de O₂ se calculó mediante la Ec. (7), Mientras que las tasas de producción de CO₂ y etileno se determinaron aplicando la ecuación (8) y la ecuación (9), respectivamente (Salvador et al., 2002). Estos modelos fueron desarrollados para un sistema cerrado impermeable a los gases, donde R_{O_2} , R_{CO_2} y $R_{etileno}$ representan la tasa de consumo de O₂ y las tasas de producción de CO₂ y etileno (cm³/Kg h), respectivamente, P_{tomate} es el peso de la fruta (Kg), y V_f representa el volumen libre del contenedor (mL).

$$dy_{O_2} = - R_{O_2} \frac{P_{tomate}}{V_f} dt \quad \text{Ec. (7)}$$

$$dy_{CO_2} = R_{CO_2} \frac{P_{tomate}}{V_f} dt \quad \text{Ec. (8)}$$

$$dy_{etileno} = R_{etileno} \frac{P_{tomate}}{V_f} dt \quad \text{Ec. (9)}$$

El volumen libre se calculó con la ecuación (10), donde V_P es el volumen total del contenedor (ml), P_{tomate} es el peso de la fruta (kg) y ρ_{tomate} , es la densidad del tomate.

$$V_f = V_P - \frac{P}{\rho_{\text{tomate}}} \quad \text{Ec. (10)}$$

Los gráficos de O_2 consumido y CO_2 y etileno producidos contra el tiempo se usaron para calcular las pendientes, que corresponden a las derivadas, dy/dt de cada gas.

La tasa de respiración (consumo de O_2 y la producción de CO_2) es un aspecto importante a tener en cuenta, pues en la medida en que la fruta presente una alta intensidad respiratoria, las reservas alimenticias se agotarán pronto y la fruta iniciará la etapa de senescencia o muerte. Este factor está fuertemente ligado con las condiciones de temperatura y concentración de los gases circundantes. Por lo tanto, deben buscarse las condiciones que conduzcan a reducir la tasa de respiración de la fruta para prolongar su vida útil (García, 2008).

Análisis estadístico prueba vida de anaquel

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) para los ensayos a temperatura ambiente y para los ensayos en frío, el análisis se realizó a ($p < 0.1$). Para las variables de análisis fisicoquímicos se utilizó el programa estadístico StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (sistema de software de análisis de datos), version 10. Para los análisis microbiológicos se empleó SAS-PC System® software (version 9.1.3) para Windows. Mientras que para los datos de transferencia de gases fue el programa GraphPad Prism (versión 6.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Fitoquímica

Contenido de fenoles totales

Los resultados del análisis estadístico de contenido de fenoles totales (CFT) de *F. cernua* mostraron que los extractos acuosos, para ambos tejidos, eran más ricos en contenido fenólico ($p < 0.05$) que los extractos de etanol. El extracto acuoso de las ramas presentó el contenido más alto ($p < 0.05$) con 12.91 mg GAE/100 mg de extracto en comparación con el resto de los extractos de esta planta (Cuadro 3). En el caso de *F. microphylla*, el extracto de etanol de hojas presentó el mayor contenido ($p < 0.05$) con 31.46 mg GAE/100 mg de extracto (Cuadro 3); además, para *F. retinophylla*, el extracto de etanol de hojas fue el más alto ($p < 0.05$) con 32.53 mg de GAE/100 mg de extracto; los contenidos de los extractos acuosos de hojas y ramas, fueron aproximadamente 50% más bajos que las hojas de extracto de etanol (Cuadro 3). Los resultados presentados en este estudio para *F. cernua* son diferentes a los reportados por otros investigadores, esto podría estar en función de los factores ambientales, tales como temperatura, precipitación (estrés hídrico), condiciones de luz y desarrollo fenológico de la planta, en los sitios donde las muestras fueron recolectadas (Silva et al., 2012). Wong-Paz et al. (2015), reportaron 0.79 mg GAE/100 mg de CFT en una extracción de *F. cernua* realizada durante 2 h, estos autores también reportaron para el extracto de etanol/agua de *F. cernua* en concentraciones de 0%, 35% y 70%, resultados CFT de 0.209 mg GAE/100 mg, 1.024 mg GAE/100 mg y 0.795 mg GAE/100 mg, respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a los obtenidos en este estudio. Salazar et al. (2008) reportaron para hojas, tallos, raíces y flores de *F. cernua* un CFT de 1.5 mg GAE/100 mg, 5.1 mg GAE/100 mg, 2.9 mg GAE/100 mg, y 4.6 mg GAE/100 mg, respectivamente, valores que son inferiores a los reportados en este estudio. Martins et al. (2012) reportaron en las hojas de *Larrea tridentata* (arbusto de creosota) valores de CFT que varían de 33.4 a 20.1 mg de GAE/100 mg. Estos valores están de acuerdo con los

resultados obtenidos para *F. microphylla* y *F. retinophylla* de extractos de etanol de hojas, en este estudio. Estos resultados son interesantes debido a las aplicaciones biológicas que los extractos podrían tener.

El contenido fenólico presente en los extractos de hojas de *F. microphylla* y *F. retinophylla* en etanol es notablemente mayor en comparación con el CFT que se ha notificado para *F. cernua*, además de que no hay informes científicos con respecto a CFT de estas dos especies. De acuerdo con los resultados obtenidos, *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* son fuentes naturales de compuestos fenólicos con efectos inhibidores viables contra patógenos que afectan a las plantas.

Actividad antioxidante

El ANVA para la actividad antioxidante de *F. cernua* mostró el contenido más alto ($p < 0.05$) de DPPH% y FRAP para las hojas (79.74% y 22.85 mEqTrolox/100 mg de extracto, respectivamente) y ramas (51.88% y 20.77 mEqTrolox / 100 mg de extracto, respectivamente), ambos tejidos en extractos acuosos (Cuadro 3). Para *F. microphylla*, la actividad antioxidante más alta ($p < 0.05$) por DPPH% y FRAP fue para extracto de etanol de hojas con 94.98% y 71.98 mEqTrolox/100 mg de extracto, respectivamente (Cuadro 3). En relación con *F. retinophylla*, los extractos acuosos de hojas y ramas mostraron la mayor actividad antioxidante ($p < 0.05$) por DPPH%; y para el método FRAP, la mayor actividad antioxidante se observó en el extracto acuoso de las ramas. Las tres especies de *Flourensia* presentaron una alta actividad antioxidante, destacando *F. microphylla* con 94.98% para el extracto de hojas en etanol y 82.35% para el extracto acuoso de las ramas. Salazar et al. (2008) reportaron actividad antioxidante para *F. cernua* en hojas, tallos, raíces y flores de 27.9%, 88.1%, 85.1% y 51.3%, respectivamente. Los resultados reportados por estos autores son inferiores a los resultados obtenidos en este estudio para las hojas de extractos de etanol de *F. cernua*, así como para *F. microphylla* y *F. retinophylla*. La diferencia en los resultados podría atribuirse al solvente y al proceso de extracción utilizado, así como el sitio y la temporada de muestreo donde se recolectaron las plantas, lo

que impacta en la biosíntesis de compuestos químicos (Silva et al., 2012). De León-Zapata et al. (2016) determinaron la actividad antioxidante de *F. cernua* por DPPH% a diferentes concentraciones de extractos acuosos obteniendo resultados de 21.37% (500 mg/ L) a 89.45% (4000 mg/L), la actividad de mayor concentración mencionada, está de acuerdo con lo reportado en este estudio para el extracto acuoso de hojas de *F. cernua*.

Cuadro 3. Contenido de fenoles totales (*CFT*) y actividad antioxidante de extractos de *Flourensia* spp.

Extracto	<i>CFT</i> (mg ácido gálico/100 mg extracto)	Actividad antioxidante	
		<i>DPPH</i> (%)	<i>FRAP</i> (mEqTrolox/ 100 mg extracto)
FcEAH	10.82 ± 0.85b	79.74 ± 4.09a	22.85 ± 1.02a
FcEEH	8.99 ± 0.57c	36.38 ± 0.57c	9.28 ± 0.39d
FcEAR	12.91 ± 0.44a	51.88 ± 4.98b	20.77 ± 0.47b
FcEER	8.63 ± 0.41c	38.22 ± 1.69c	13.11 ± 1.06c
FmEAH	13.13 ± 0.83c	51.83 ± 3.88d	23.31 ± 1.22c
FmEEH	31.46 ± 2.54a	94.98 ± 6.85a	71.98 ± 2.54a
FmEAR	17.80 ± 0.68b	82.35 ± 0.57b	37.53 ± 2.67b
FmEER	11.92 ± 0.41c	70.17 ± 3.72c	21.03 ± 0.88c
FrEAH	14.27 ± 0.67b	25.36 ± 0.86b	11.15 ± 0.57b
FrEEH	32.53 ± 1.18a	50.09 ± 0.72a	10.60 ± 0.76b
FrEAR	16.54 ± 1.84b	50.53 ± 0.40a	26.19 ± 1.02a
FrEER	7.82 ± 0.89c	23.06 ± 2.47b	7.32 ± 0.19c

Fc: *F. cernua*; Fm: *F. microphylla*; *F. retinophylla*; **EEH**: extracto etanol hojas; **EER**: extracto etanol ramas; **EAH**: extracto acuoso hojas; **EAR**: extracto acuoso ramas. Los datos representan la media ± SD de tres determinaciones. Diferentes literales en la misma columna indican diferencia estadística entre la misma especie de *Flourensia* ($p \leq 0.05$).

El resultado reportado para la actividad antioxidante por DPPH% del extracto de etanol de *F. microphylla* en este estudio, es el mismo que el reportado para las hojas de *L. tridentata* en etanol al 90%. Este resultado confirma el potencial biológico de *F. microphylla*, ya que se ha informado que la creosota es una fuente de compuestos naturales con actividades biológicas de gran interés en el área de la salud, así como actividades antivirales, antifúngicas, antimicrobianas y antitumogénicas (Martins et al., 2012).

Composición Química de Extractos

Los resultados de la composición química obtenida de los extractos de *Flourensia* spp. por GC-MS se presentan en los Cuadros 4-9. La información presentada es: tiempo de retención (TR), nombre del compuesto, fórmula molecular, peso molecular (PM) y concentración (% del área). Solo se presentan los compuestos mayoritarios. El número del compuesto corresponde al orden de aparición en el cromatograma.

Flourensia cernua

Los resultados del análisis GC-MS de extractos de etanol y acuosos de hojas y ramas de *F. cernua* se muestran en los Cuadros 4 y 5, respectivamente. Los compuestos identificados en los extractos de etanol fueron 17 en hojas y 10 en ramas, y los identificados en los extractos acuosos fueron 8 en hojas y 6 en ramas.

Extractos de etanol de hojas

La mayoría de los compuestos identificados se muestran en el Cuadro 4, y en orden de abundancia fueron: epóxido de isoaromadendreno, de naturaleza sesquiterpénica oxigenada, seguido de α -curcumeno, de naturaleza sesquiterpénica. Estos dos compuestos han sido reportados por sus actividades antimicrobianas e insecticidas (Pérez-Hernández et al., 2009). Además, el ácido pterin-6-carboxílico, que es de naturaleza pirazina; seguidos de β -cariofileno y β -eudesmol, ambos compuestos sesquiterpenos oxigenados con actividades

antimicrobianas, insecticidas, antiinflamatorias y antimutagénicas (Goren et al., 2011; Szöke et al., 2003); y etil-iso-allocholate, de naturaleza esteroidea, con actividades antimicrobianas, antiinflamatorias y antiasmáticas (Muthulakshmi et al., 2012).

Cuadro 4. Compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de *F. cernua*

No	TR (min)	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM	% Área
Hojas					
1	7.36	Pterin-6-ácido carboxílico	C ₇ H ₅ N ₅ O ₃	207	8.90
2	2.51	β-Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204	7.99
4	13.25	α-Curcumeno	C ₁₅ H ₂₂	202	10.97
12	15.62	β-eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	7.21
14	16.85	Epóxido de isoaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄ O	220	22.26
17	19.71	Etil-iso-allocholate	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	436	4.68
Ramas					
3	20.54	2-methyl-2-[2-[2,6,6-trimethyl-3-methylenecyclohex-1-enyl)-vinyl-[1,3]dioxolane	C ₁₆ H ₂₄ O	248	10.01
5	21.04	S-indacene-1,7-dione,2,3,5,6-tetrahydro-3,3,4,5,5,8-hexamethyl	C ₁₅ H ₂₄	270	4.61
6	21.82	Ethyl iso-allocholate	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	436	2.54
7	22.15	5H-Cyclopropa[3,4]benz[1,2-e]azulen-5-one, 1,1a,1b,4,4a,7a,7b,8,9,9a-decahydro-7b,9,9a-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	348	7.67
8	23.42	1,4-hexadien-3-one,5-methyl-1-[2,6,6-trimethyl-2,4-cyclohexadien-1-yl]	C ₁₆ H ₂₂ O	230	19.87
9	24.11	Phorbol	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	364	8.24
10	25.26	8,8-Dimethyl-3-(4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yloxymethylene)-3a,4,6,7,8,8b-hexahydro-3H-indeno[1,2-b]furan-2,5-dione	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	344	11.84

TR: Tiempo de retención; PM: Peso molecular.

Extracto de etanol de ramas

La mayoría de los compuestos identificados se muestran en el Cuadro 4, y en orden de abundancia fueron: 1,4-hexadien-3-ona, 5-metil-1- [2,6,6-trimetil-2,4-ciclohexadien-1-il]; seguido de 8,8-dimetil-3- (4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-ilo) ximetileno) -3a, 4,6,7,8,8b-hexahidro-3H-indeno [1, 2-b] furan-2,5-diona, la naturaleza y la actividad de ambos compuestos no se han informado.

El tercer compuesto en abundancia fue 2-metil-2- [2- (2,6,6-trimetil-3-metilenciclohex-1-enil) -vinil- [1,3] dioxolano, de naturaleza dioxolano; seguido de forbol, de naturaleza diterpenoide, reportado con actividad antiinflamatoria (Igwe y Mgbemena, 2014); 5H-ciclopropa [3,4] benz [1,2-e] azuleno-5-ona, 1,1a, 1b, 4,4a, 7a, 7b, 8,9,9a-decahydro-7b, -9,9a -trihidroxi-3- (hidroximetil) -1,1,6, la naturaleza y actividad de este compuesto no se han informado; S-indaceno-1,7-diona, 2,3,5,6-tetrahydro-3,3,4,5,5,8-hexametilo, de naturaleza aromática, cuya actividad no se ha informado. El etil-iso-allocholate también identificado en las hojas, fue uno de los principales compuestos identificados en las ramas.

Estell et al. (2016) reportaron sobre el extracto de etanol de hojas de *F. cernua*, 102 compuestos (incluidos 19 compuestos desconocidos). Estos autores, también identificaron la presencia de β -eudesmol y β -cariofileno, compuestos reportados en este estudio. En estudios previos sobre composición química en hojas de *F. cernua*, los compuestos identificados fueron principalmente terpenos (Estell et al., 2013), además de la presencia de flavonoides (Dillon et al., 1976), sesquiterpenoides y monoterpenoides (Tellez et al., 2001), acetilenos, p-acetofenonas, benzopiranos y benzofuranos (Bohlmann y Grenz, 1977) y compuestos polifenólicos como taninos, ácido elágico, catequina, quercetina, galato de metilo, ácido cinámico y ácido 2-hidroxicinámico (Ruíz-Martínez et al., 2011).

Extractos acuosos de hojas

La mayoría de los compuestos identificados se muestran en el Cuadro 5, y en orden de abundancia fueron: metoxi-fenil-oxima, de naturaleza oxima, con actividades antioxidantes y antimicrobianas (Al-Tameme et al., 2015);

isoproturón, de naturaleza amida, con actividad herbicida (Badr y Elkington, 1982); 3', 8,8'-Trimetoxi-3-piperidil-2,2'-binaftaleno-1,1', 4,4'-tetrona y Eudesma-5,11 (13) -dien-8,12-olido, ambos compuestos son de naturaleza sesquiterpénica, con actividades antiinflamatorias y anticancerígenas (da Silva et al., 2007).

Extractos acuosos de ramas

La mayoría de los compuestos identificados se muestran en el Cuadro 4, y en orden de abundancia fueron: isoproturón seguido de metoxi-fenil-oxima, estos compuestos también se identificaron en los extractos acuosos de hojas; 2,3 butanodiol, de naturaleza glicol, cuya actividad no se ha informado; y ácido acético, de naturaleza ácido carboxílico, con actividad antibacteriana (Madhusudhan, 2015).

Cuadro 5. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de hojas y ramas de *F. cernua*.

No	TR (min)	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM	% Área
Hojas					
1	6.69	Metoxi-fenil-oxima	C ₈ H ₉ NO ₂	151	20.28
4	9.89	Isoproturón	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206	16.29
7	21.54	Eudesma-5,11 (13) -dien-8,12-olido	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232	2.14
8	27.48	3', 8,8'-Trimetoxi-3-piperidil-2,2'-binaftaleno-1,1', 4,4'-tetrona	C ₂₈ H ₂₅ NO ₇	487	2.59
Ramas					
1	4.43	Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60	6.99
4	5.71	2,3 butanodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	8.41
5	7.12	Metoxi-fenil-oxima	C ₈ H ₉ NO ₂	151	42.60
6	9.97	Isoproturón	C ₈ H ₁₈ N ₂ O	206	28.538

TR: Tiempo de retención; PM: Peso molecular.

Flourensia microphylla.

Los resultados del análisis GC-MS del etanol y extractos acuosos de hojas y ramas de *F. microphylla* se muestran en los Cuadros 6 y 7. Los compuestos

identificados en los extractos de etanol fueron 7 en hojas y 9 en ramas. Los identificados en los extractos acuosos fueron 7 en hojas y 3 en ramas.

Extractos de etanol de hojas

La mayoría de los compuestos identificados, en orden de abundancia (Cuadro 6) fueron: hexilenglicol, de naturaleza poliol, con actividades antibacterianas y antifúngicas (Kinnunen y Koskela, 1991); éster etílico del ácido linolénico y ácido hexadecanoico, éster etílico, ambos de naturaleza de éster de ácido graso, con actividades antiinflamatorias, hipocolesterolémicas, antioxidantes, nematocidas y plaguicidas (Rajeswari et al., 2013); 2,5-difluoro- β , 3,4-trihidroxi-N-metil-bencenoetanamina, de naturaleza fenólica de amina, con actividad no reportada. Sin embargo, se han reportado amidas sustituidas con actividad anticancerígena (Pachuta-Stec et al., 2009).

Extractos de etanol de ramas

La mayoría de los compuestos identificados (Cuadro 6), en orden de abundancia fueron: ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, de naturaleza de éster de ácido graso, con actividad no reportada; hexilenglicol; ácido linoleico y ácido hexadecanoico, éster etílico, estos compuestos también se identificaron en el extracto de etanol de hojas.

Cuadro 6. Compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de *F. microphylla*.

No	TR	Nombre del compuesto	Fórmula M.	PM	% Área
Hojas					
1	6.09	Hexilenglicol	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	28.59
5	16.64	2,5-difluoro- β , 3,4-trihidroxi-N-metil-bencenoetanamina	C ₉ H ₁₁ F ₂ NO ₃	219	3.27
6	22.26	Ácido hexadecanoico éster etílico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	8.74
7	23.79	Ácido linoleico éster etílico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	9.31
Ramas					
1	6.03	Hexilenglicol	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	7.74
7	22.25	Ácido hexadecanoico éster etílico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	3.66
8	23.43	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	4.45
9	23.75	Ácido 9,12-octadecadienoico	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	16.99

TR: Tiempo de retención en minutos; PM: Peso molecular.

Extractos acuosos de hojas

La mayoría de los compuestos identificados se muestran en el Cuadro 7 y fueron: metoxifenil-oxima, de naturaleza oxima, con actividad antioxidante y antimicrobiana (Al-Tameme et al., 2015); isoproturón, de naturaleza amida, con actividad herbicida (Badr y Elkington, 1982), y 2,3 butadienol, de naturaleza glicol, con actividad no informada.

Extractos acuosos de ramas

El compuesto principal con 94.08% fue ácido hexanodioico, éster de bis (2-etilhexilo) (Cuadro 7), un éster de ácido graso. Este compuesto se conoce como plastificante, pero nunca se ha informado de fuentes naturales (Elleuch et al., 2010). De los compuestos obtenidos en los extractos acuosos de hojas y ramas de *F. microphylla*, se puede observar que los extractos están formados principalmente por dos o tres compuestos, a diferencia de las hojas y ramas de extractos de etanol. Por lo tanto, es relevante continuar con el análisis, el aislamiento y la identificación de los principales compuestos, y con los bioensayos.

Cuadro 7. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de hojas y ramas de *F. microphylla*.

No	TR (min)	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM	% Área
Hojas					
1	5.25	2,3 butadienol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	7.66
3	6.80	Metoxifenil-oxima	C ₈ H ₉ NO ₂	151	46.33
5	9.99	Isoproturón	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206	39.49
Ramas					
3	25.85	Ácido hexanodioico, éster de bis (2-etilhexilo)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370	94.08

TR: Tiempo de retención; PM: Peso molecular.

Flourensia retinophylla

Los resultados del análisis de GC-MS de los extractos de etanol y acuosos de hojas y ramas de *F. retinophylla* se muestran en los Cuadros 8 y 9. Los compuestos identificados en los extractos de etanol fueron 7 en hojas y 7 en ramas. Los identificados en los extractos acuosos fueron 6 en hojas y 2 en ramas.

Extractos de etanol de hojas

La mayoría de los compuestos (Cuadro 8) fueron: 9-octadecenamida, (Z) -; hexadecanamida; y octadecanamida. Estos tres compuestos son de naturaleza amida y se han informado de sus actividades antimicrobianas e inductoras del sueño (Cravatt et al., 1996; Meenakshi et al., 2012).

Extractos de etanol de ramas

La mayoría de los compuestos (Cuadro 8) fueron: éster etílico de ácido linoleico, de naturaleza éster de ácido graso, con actividades antioxidantes, nematicidas y plaguicidas (Rajeswari et al., 2013); forbol, de naturaleza diterpenoide, con actividad antiinflamatoria (Wang et al., 2015); 3', 8,8'-Trimetoxi-3-piperidil-2,2'-binaftaleno-1,1', 4,4'-tetrona, de naturaleza sesquiterpénica, con actividades anticancerígenas y antiinflamatorias (Al-Tameme et al., 2015).

Cuadro 8. Compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de *F. retinophylla*.

No	TR (min)	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM	% Área
Hojas					
5	21.07	Hexadecanamida	C ₁₆ H ₃₃ NO	255	22.5
6	22.82	9-octadecenamida, (Z) -	C ₁₈ H ₃₅ NO	281	46.7
7	23.06	Octadecanamida	C ₁₈ H ₃₇ NO	283	21.9
Ramas					
5	21.54	Éster etílico de ácido linoleico	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	27.2
6	23.06	Forbol	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	364	18.4
7	25.48	3', 8,8'-Trimetoxi-3-piperidil-2,2'- binaftaleno-1,1', 4,4'-tetrona	C ₂₈ H ₂₇ NO ₇	487	14.2

TR: Tiempo de retención; PM: Peso molecular.

Extractos acuosos de hojas

La mayoría de los compuestos (Cuadro 9) fueron: metoxi-fenil-oxima, de naturaleza oxima, con actividad antioxidante y antimicrobiana (Al-Tameme et al., 2015); isoproturón, de naturaleza amida, con actividad herbicida (Badr y Elkington, 1982).

Extractos acuosos de ramas

La mayoría de los compuestos (Cuadro 9) fueron: metoxi-fenil-oxima, de naturaleza oxima, también identificada en el extracto acuoso de hojas; enalapril, de naturaleza amina, con actividad hipertensiva (Sakamoto et al., 2005).

Cuadro 9. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de hojas y ramas de *F. retinophylla*.

No	TR (min)	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM	% Área
Hojas					
1	6.81	Metoxi-fenil-oxima	C ₈ H ₉ NO ₂	151	58.21
3	9.95	Isoproturón	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206	32.74
Ramas					
1	6.33	Metoxi-fenil-oxima	C ₈ H ₉ NO ₂	151	71.11
2	27.93	Enalapril	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	376	28.89

TR: Tiempo de retención; PM: Peso molecular.

Algunos de los compuestos identificados en los extractos de etanol y acuosos de hojas y ramas de *Flourensia* spp, en el presente estudio, se reportan por primera vez en la especie; y por su naturaleza de compuestos, *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla*, podrían considerarse como materias primas para el desarrollo de productos farmacológicos y biofungicidas.

Las diferencias entre los compuestos químicos identificados en las tres especies de *Flourensia* podrían atribuirse a los entornos en los que se desarrolló cada especie, como condiciones de luz, temperatura, precipitación (estrés hídrico) y tipo de suelo (Silva et al., 2012).

Efecto de las concentraciones de extractos de *Flourensia* spp. en hongos postcosecha *in vitro*

Identificación de hongos: *F. oxysporum* y *R. stolonifer*

Los resultados de la identificación por medio de amplificación por PCR, mostraron una homología del 97% con *F. oxysporum* (1029 pb) con clave MF663655.1; y con *R. stolonifer* la homología fue del 84% (1085 pb) con clave JN543962.1, de acuerdo al Genbank (Fig. 3).

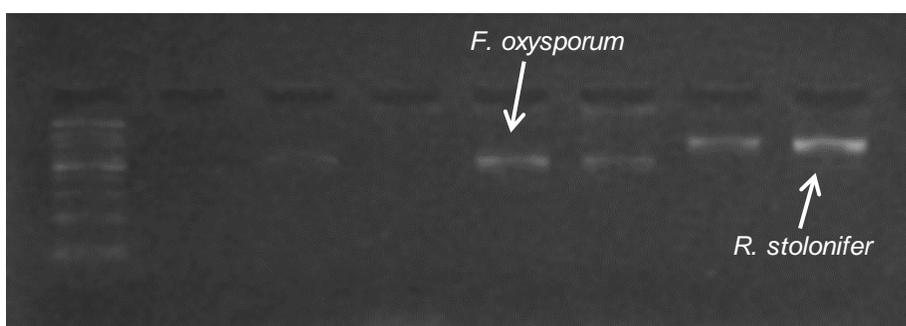


Figura 3. Identificación de *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, mediante PCR en gel de agarosa al 2%.

Actividad antifúngica *in vitro* en *F. oxysporum* y *R. stolonifer*

Los extractos acuosos de hojas y ramas y algunos extractos de etanol en las concentraciones más bajas de las tres especies de *Flourensia* mostraron bajos valores de inhibición (<20%) de los hongos. Por esta razón, estos valores no se consideraron en los Cuadros 10-12 para *F. oxysporum* y los Cuadros 14-16, para *R. stolonifer*. Además, las CMI de los extractos mencionados anteriormente tampoco se incluyeron en los Cuadros 13 y 17.

Efecto de *Flourensia* spp. en *F. oxysporum*

Los resultados del ANVA mostraron que el efecto de la actividad biológica de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* sobre *F. oxysporum* fue altamente significativo ($p < 0.05$). En los extractos de etanol de hojas y ramas de las tres especies, el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* aumentó significativamente en cada tiempo de incubación (Cuadros 10, 11 y 12) a medida que aumentaba la

concentración, pero no en los extractos acuosos, que presentaban una baja inhibición del patógeno. El efecto más alto ($p < 0.05$) se presentó a la concentración de 5000 mg/L de extractos de etanol de hojas y ramas. En hojas, las inhibiciones fueron: 92.63% para *F. cernua*; 93.63% para *F. microphylla*, y 74.4% para *F. retinophylla*. En ramas, las inhibiciones fueron: 90.1% para *F. cernua*, 90.25% para *F. microphylla*, y 82.65% para *F. retinophylla*.

Los resultados de la actividad antifúngica de los extractos de etanol se reflejaron en los valores obtenidos a las concentraciones mínimas requeridas para inhibir el patógeno al 50% y 90% (CMI₅₀ y CMI₉₀). Al final del ensayo (168 h), las CMI₅₀ y CMI₉₀ del extracto de etanol de hojas fueron: 619.94 mg/L y 2163 mg/L para *F. cernua*; 1901 mg/L y 7205 mg/L para *F. microphylla*; y 2983 mg/L y 9090 mg/L para *F. retinophylla*, respectivamente (Cuadro 13). En ramas, las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron: 1032 mg/L y 4240 mg/L para *F. cernua*; 2503 mg/L y 8648 mg/L para *F. microphylla*; y 3270 mg/L y 7409 mg/L para *F. retinophylla*, respectivamente (Cuadro 17).

Cuadro 10. Medias de inhibición porcentual de *F. oxysporum* evaluados en siete tiempos de incubación con extractos de *F. cernua*.

Tratamientos (mg/L)	Tiempo (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
FcEEH4000	100a	91.8ab	87.77ab	87.25a	87.28a	87.36a	87.36a
FcEEH5000	100a	98.19a	95.88a	93.97a	93.35a	92.63a	92.63a
FcEER4000	100a	87.86ab	84.39bc	84.52a	85.45a	85.19ab	85.19ab
FcEER5000	100a	95.48a	92.12ab	90.06a	89.64a	90.1a	90.1a
FcEEH3000	85.14ab	79.59b	75.36c	74.34b	74.53b	75.34bc	75.34bc
FcEER3000	80.66ab	62.02c	59.94d	59.19c	61.02c	61.18d	61.18d
FcEEH2000	68.4b	61.5c	61.24d	64.62c	65.21bc	65.81cd	65.81cd
FcEAH5000	44.86c	32.99de	29.5ef	25.35e	24.89e	22.97fg	22.97fg
FcEER2000	43.87c	33.98d	36.53e	36.82d	38.65d	39.24e	39.24e

Fc: *F. cernua*; EEH: extracto etanol de hojas; EER: extracto etanol de ramas, EAH: extracto acuoso hojas. Los resultados inferiores al 30% no fueron considerados.

Cuadro 11. Comparación de medias de inhibición porcentual de *F. oxysporum* en diferentes tiempos de incubación con extractos de *F. microphylla*.

Tratamientos (mg/L)	Tiempo (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
FmEEH4000	100a	89.54ab	87.56bc	85.96bc	85.59bc	83.81bc	82.76b
FmEEH5000	100a	100a	100a	95.69a	96.09a	93.31a	93.63a
FmEER4000	100a	84.37b	83.81c	81.14c	80.88c	81.34c	77.68b
FmEER5000	100a	92.69ab	92.26b	91.52ab	91.19ab	90.74ab	90.25a
FmEER3000	80.55b	69.15c	62.38e	56.98e	56.04e	57.97d	52.01d
FmEEH3000	74.43b	71.76c	72.76d	69.27d	66.49d	63.55d	61.74c
FmEEH2000	51.45c	48.83d	51.56f	47.07f	45.63f	39.98e	40.13e
FmEER2000	34.76d	33.27e	36.44g	31.33g	32.60g	30.48f	26.43f

Fm: *F. microphylla*; EEH: extracto etanol de hojas; EER: extracto etanol de ramas. Los resultados inferiores al 20% no fueron considerados. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estáticamente iguales ($p \leq 0.05$).

Cuadro 12. Comparación de medias de inhibición porcentual de *F. oxysporum* evaluados ensiete tiempos de incubación con extractos de *F. retinophylla*.

Tratamientos (mg/L)	Tiempo (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
FrEEH5000	100a	86.09a	84.06a	81.23a	79.4a	77.51a	74.4b
FrEER5000	100a	89.85a	86.11a	84.87a	84.33a	83.78a	82.65a
FrEER4000	86.9ab	75.19b	70.44c	65.9bc	64.09bc	60.7bc	56.4cd
FrEEH4000	81.51bc	74.17b	73.45b	71.35b	68.5b	65.29b	61.29c
FrEEH3000	70.74c	69.71b	65.57d	61.82c	57.88	54.8c	49.65de
FrEER3000	68.27c	58.70c	54.61e	51.94d	47.98d	47.26d	42.59e
FrEEH2000	49.2d	52.79c	50.44f	44.36e	43.47d	38.73e	32.6f
FrEAH5000	31.88e	40.55d	34.62g	31.07f	31.31e	28.28f	27.8fg

Fr: *F. retinophylla*; EEH: extracto etanol de hojas; EER: extracto etanol de ramas; EAH: extracto acuoso de hojas. Los resultados inferiores al 20% no fueron considerados.

Jasso de Rodríguez et al. (2007) reportaron la inhibición total de *F. oxysporum* por extractos de etanol de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* a la concentración de 1500 mg/L. Esta concentración fue más baja que las reportadas en este estudio. Las diferencias encontradas con el estudio mencionado anteriormente, donde se analizó la misma especie, podrían atribuirse a la variación en las concentraciones de los compuestos químicos del material vegetal, que pueden asociarse al proceso de extracción, además de las fechas de muestreo, la edad de la planta, estado de crecimiento, variación estacional y condiciones ambientales en las cuales las plantas crecieron en sus sitios nativos (Silva et al., 2012).

Cuadro 13. Concentración mínima inhibitoria 50 y 90 de extractos *Flourensia* ssp. para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* a 168h de incubación.

Extracto	CMI ₅₀ (mg/L)	95% Límites fiduciales		CMI ₉₀ (mg/L)	95% Límites fiduciales		Chi ^a
		Inferior	Superior		Inferior	Superior	
FcEEH	619.94	517.62	722.65	2163	1843	2620	4.08
FcEER	1032	533.86	1648	4240	2493	13398	42.3
FmEEH	1901	1026	3279	7205	3927	5035	58.36
FmEER	2503	1735	4871	8648	4925	7349	38.57
FrEEH	2983	1991	5031	9090	5272	75407	43.03
FrEER	3270	2978	3613	7409	6238	9481	4.87

Fc: *F. cernua*; Fm: *F. microphylla*; Fr: *F. retinophylla*; EEH: extracto de etanol de hojas; EER: extracto de etanol de ramas.

^aValor Chi-cuadrado, significativo a nivel $p \leq 0.05$.

Los resultados de este estudio fueron menores que los reportados por Ramaiah y Garampalli (2015), que requirieron 600,000 mg/L (60%) de extractos acuosos de *Solanum indicum*, *Azadirachta indica* y *Oxalis latifoliato*, inhibieron *F. oxysporum* 78.3%, 75% y 70.3%, respectivamente. Además, López-Benítez et al. (2005), reportaron una inhibición de *F. oxysporum* en 100% y 92.6%, con los extractos acuosos de *L. tridentata* y *Cinnamomum zeylanicum*, respectivamente, a una concentración de 50,000 mg/L (5%). El uso de etanol en las extracciones

de compuestos naturales de plantas, permite recuperar una mayor concentración de compuestos químicos con actividad biológica, que aquellas extracciones realizadas con agua (De León-Zapata et al., 2016). Esto podría ser una justificación de por qué los extractos de etanol requieren concentraciones más bajas que los extractos acuosos para lograr una mayor inhibición de los patógenos.

Efecto de *Flourensia* spp. en *R. stolonifer*

Los resultados del ANVA mostraron que el efecto de la actividad biológica de las concentraciones de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* en *R. stolonifer* fue altamente significativo ($p < 0.05$). Los extractos de etanol de hojas y ramas de las tres especies mostraron una alta inhibición del patógeno de una manera dependiente de la concentración (Cuadros 14-16); de tal forma que, al aumentar la concentración, el porcentaje de inhibición de *R. stolonifer* aumentó significativamente en cada tiempo de incubación (Cuadros 14-16). Sin embargo, los extractos acuosos mostraron una baja inhibición del patógeno. La mayor inhibición (100%) estuvo presente a 3000 mg/L en extractos de etanol de hojas y ramas de *F. cernua* y *F. microphylla*. En *F. retinophylla*, la inhibición total se reportó en hojas y ramas a 4000 mg/L, aunque, inhibiciones de 94% estaban presentes a 2000 mg/L.

Los resultados de la actividad antifúngica de los extractos de etanol mostraron valores bajos de CM_{50} y CM_{90} para las tres especies. Al final de cada bioensayo, las CM_{50} y CM_{90} en extractos de etanol de hojas fueron: 410 mg/L y 1385 mg/L para *F. cernua*; 265.12 mg/L y 1662 mg/L para *F. microphylla*; y 24.10 mg/L y 573.97 mg/L para *F. retinophylla*, respectivamente (Cuadro 17). En ramas, las CM_{50} y CM_{90} fueron: 958.19 mg/L y 1692 mg/L para *F. cernua*; 708.61 mg/L y 2394 mg/L para *F. microphylla*; 80.32 mg/L y 1121 mg/L y para *F. retinophylla*, respectivamente (Cuadro 17). Yang y Jiang (2015) reportaron una CM_{50} de 2900 mg/L para inhibir *R. stolonifer* con polifenoles del té verde. Esta concentración es más alta que los resultados de CM_{50} reportados para las tres especies de *Flourensia* en este estudio.

Cabe señalar que hay pocos estudios de evaluación antifúngica de compuestos bioactivos de *F. cernua* contra *R. stolonifer*. De León Zapata et al. (2016), evaluaron los extractos acuosos de *F. cernua* a 4000 mg/L, inhibiendo *R. stolonifer* 67.40%, estos resultados mostraron una inhibición menor en relación con la obtenida en este estudio sobre el mismo hongo. Además, los resultados de este estudio fueron superiores a los reportados por Jasso De Rodríguez et al. (2011) que observaron una inhibición del 40% para *R. stolonifer* con extractos de etanol de *Agave lechuguilla* y *Yucca carnerosana* a 4000 y 5000 mg/L, respectivamente.

Cuadro 14. Comparación de medias de inhibición porcentual de *R. stolonifer* evaluados con extractos en etanol y acuosos de hojas y ramas de *F. cernua*.

Tratamientos (mg/L)	Tiempo (h)	
	24	48
FcEEH3000	100a	100a
FcEEH4000	100a	100a
FcEEH5000	100a	100a
FcEEH6000	100a	100a
FcEER3000	100a	100a
FcEER4000	100a	100a
FcEER5000	100a	100a
FcEER6000	100a	100a
FcEEH2000	97.13a	95.93a
FcEER2000	91.69a	84.98b
FcEEH1000	72.61b	48.81c

Fc: *F. cernua*; EEH: extracto etanol de hojas; EER: extracto etanol de ramas, EAH: extracto acuoso hojas. Los resultados inferiores al 40% no fueron considerados. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).

Cuadro 15. Comparación de medias de inhibición porcentual de *R. stolonifer* evaluados con extractos en etanol de hojas y ramas de *F. microphylla*.

Tratamientos (mg/L)	Tiempo (h)	
	24	48
FmEEH3000	100a	100a
FmEEH4000	100a	100a
FmEEH5000	100a	100a
FmEEH6000	100a	100a
FmEER3000	100a	100a
FmEER4000	100a	100a
FmEER5000	100a	100a
FmEER6000	100a	100a
FmEEH2000	94.08a	91.76b
FmEER2000	93.92a	92.61b
FmEEH1000	73.33b	69.77c
FmEER1000	61.29bc	41.31e
FmEEH500	58.29cd	55.90d

Fm: *F. microphylla*; EEH: extracto etanol de hojas; EER: extracto etanol de ramas. Los resultados inferiores al 40% no fueron considerados. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).

Cuadro 16. Comparación de medias de inhibición porcentual de *R. stolonifer* evaluados con extractos en etanol de hojas y ramas de *F. retinophylla*.

Tratamientos (mg/L)	Tiempo (h)		
	24	48	72
FrEEH4000	100a	100a	100a
FrEEH5000	100a	100a	100a
FrEEH6000	100a	100a	100a
FrEER4000	100a	97.78ab	98.7a
FrEER5000	100a	100a	100a
FrEER6000	100a	100a	100a
FrEEH3000	95.99ab	96.57ab	97.94a

FrEER3000	89.52abc	93.75abc	98.14a
FrEEH2000	84.59bc	90.47abc	94.3ab
FrEER2000	78.76cd	86.82bcd	94.25ab
FrEEH1000	75.57cd	84.26cde	89.36bc
FrEER500	65.36d	77.07de	86.32bc
FrEEH500	65.09d	75.23e	84.82c
FrEER1000	49.59e	51.13f	71.03d
FrEEH50	43.66e	55.87f	66.31d
FrBEE50	4.74f	25.23g	45.27e

Fm: *F. retinophylla*; EEH: extracto etanol de hojas; EER: extracto etanol de ramas. Los resultados inferiores al 40% no fueron considerados. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).

Cuadro 17. Concentración mínima inhibitoria 50 y 90 de extractos *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* para inhibir el crecimiento micelial de *R. stolonifer* en diferentes tiempos de incubación.

Extracto	Tiempo (h)	CMI ₅₀ (mg/L)	95% Límites fiduciales		CMI ₉₀ (mg/L)	95% Límites fiduciales		Chi ^a
			Inferior	Superior		Inferior	Superior	
FcEEH	24	410.05	303.68	525.14	1685	1315	2278	8.55
	48	958.19	920.30	997.11	1692	1602	1798	1.96
FcEER	24	440.90	316.30	577.40	2115	1608	2976	9.76
	48	958.19	920.30	997.11	1692	1602	1798	1.96
FmEEH	24	284.71	214.01	362.17	1491	1181	1955	5.75
	48	265.12	197.08	340.21	1662	1307	2200	5.43
FmEER	24	377.84	259.86	506.15	1893	1429	2688	9.60
	48	708.61	419.16	1027	2394	1625	4407	32.23
FrEEH	24	119.97	73.31	175.05	1744	1285	2513	4.93
	48	54.68	32.09	82.40	1055	804.45	1428	2.99
	72	24.10	13.80	37.26	573.97	450.06	737.40	1.75
FrEER	24	390.94	237.31	555.35	2750	2005	4189	9.67
	48	228.05	130.91	342.78	2274	1557	3718	10.55
	72	80.32	42.10	128.08	1121	787.93	1694	6.28

Fc: *F. cernua*; Fm: *F. microphylla*; Fr: *F. retinophylla*; EEH: extracto de etanol de hojas; EER: extracto de etanol de ramas. ^aValor Chi-cuadrado, significativo a nivel $p \leq 0.05$.

La actividad antifúngica de los extractos de etanol de hojas y ramas de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* en *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, podría atribuirse a los compuestos identificados en esta investigación, tales como: sesquiterpenos, diterpenos, ésteres de ácidos grasos, polioles, amidas, aminas, benzofuranos y dioxolano; que han sido reportados con actividades antioxidantes, antimicrobianas, antibacterianas, antiinflamatorias, insecticidas, nematocidas, pesticidas y antifúngicos (Igwe y Mgbemena, 2014; Rajeswari et al., 2013; Meenakshi et al., 2012; Muthulakshmi et al., 2012; Kinnunen y Koskela, 1991).

Los mecanismos de acción de los compuestos identificados en los extractos que causan la inhibición antifúngica no se conocen; sin embargo, se conoce el mecanismo de los fenoles contra los patógenos, ya que estos compuestos producen una inhibición enzimática por su oxidación y los taninos que inhiben la síntesis de proteína en la célula (Rodríguez-Pedroso et al., 2012). La alta concentración de compuestos fenólicos en los extractos de etanol de las hojas de *F. microphylla* y *F. retinophylla*, promueve una alta actividad antioxidante de los extractos, que a su vez promueve una alta actividad antifúngica.

La interacción sinérgica de la actividad antioxidante de los compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de *Flourensia* spp. aumenta su capacidad inhibitoria frente a *F. oxysporum* y *R. stolonifer* (Rodríguez-Pedroso et al., 2012). El efecto de estas interacciones podría ser muy útil en la lucha contra los patógenos.

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se puede considerar que la alta efectividad antifúngica de los componentes bioactivos, *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* tienen el potencial de desarrollar biofungicidas contra hongos fitopatógenos, que atacan los frutos en postcosecha. Además, los biofungicidas representan una alternativa para el desarrollo de la química verde, aplicada a la agricultura.

También es importante mencionar que el proceso reportado en esta investigación para obtener un extracto de etanol crudo es una alternativa económica para recuperar un agente antifúngico y antioxidante de alta efectividad para diferentes

aplicaciones agrícolas, lo que le da un valor agregado en comparación con otros procesos, que requieren etapas de purificación posteriores, lo que aumenta el costo de las tecnologías desarrolladas.

Debido a las actividades biológicas de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* reportados en esta investigación, en el futuro es necesario llevar a cabo un programa de domesticación para tener suficiente material vegetal para obtener los compuestos biofungicidas. En investigaciones previas, se ha logrado la domesticación de especies de plantas silvestres de uso tradicional, como *Parthenium argentatum* Gray (Rodríguez-García et al., 2002) y *Lesquerella fendleri* (Gray) S. Wats. (Rodríguez García et al., 2007), que han demostrado tener varias aplicaciones industriales. Por lo tanto, existe la posibilidad de industrialización y comercialización de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla*.

Caracterización de cubiertas nanolaminadas sobre PET

Potencial zeta

Las muestras de PET fueron previamente aminolizadas y tratadas con HCl para cargar positivamente la superficie del soporte (PET A/C). Por lo tanto, la primera capa de la cubierta cargada negativamente (capa de alginato) interactuará con la superficie del soporte mediante fuerzas electrostáticas y luego con la capa de carga positiva posterior (quitosano). Para garantizar que las interacciones fueran posibles a través de fuerzas electrostáticas, se confirmó las cargas opuestas de cada una de las soluciones componentes de la multicapa, mediante la determinación del valor de potencial zeta (Cuadro 18). Se encontró que el valor del potencial zeta para el alginato puro, fue de -75.77 ± 1.10 mV a pH 7.0, mientras que la incorporación de *F. cernua* a la solución, aumentó significativamente ($p < 0.05$) el valor a -42.50 ± 1.42 mV a pH 7.0. Se garantizó la interacción electrostática, ya que el quitosano puro y funcionalizado con *F. cernua* presentó cargas de 52.03 ± 2.61 y 45.40 ± 1.93 mV a pH 3, respectivamente. Las cargas positivas de quitosano se deben a la protonación de los grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) presentes en su estructura a pH 3.0 (Martins et al., 2010). Esta condición fue suficiente para

apoyar la interacción electrostática y promover el autoensamblaje para construir las cinco capas de los recubrimientos nanolaminados. Los valores obtenidos en el presente estudio, coinciden con los obtenidos por otros autores, Carneiro-da-Cunha et al. (2010) reportaron -62.13 ± 4.01 mV para la solución de alginato de sodio y $+58.28 \pm 4.18$ mV para la solución de quitosano; por su parte Medeiros et al. (2012b) obtuvieron valores de $+43.17 \pm 3.03$ mV a pH 3 para quitosano, de igual forma, Pinheiro et al. (2012) de $+45.83 \pm 3.35$ mV a un pH similar. Estos autores señalan que las cargas opuestas de alginato y quitosano (en solución), mostraron que pueden interactuar por fuerzas electrostáticas, logrando así el autoensamblaje de las capas.

Cuadro 18. Potencial zeta de las soluciones polielectrolito

Soluciones	Potencial zeta (mV)
Alginato	-75.77 ± 1.10 b
Alginato + Fc	-42.50 ± 1.42 a
Quitosano	52.03 ± 2.61 a
Quitosano + Fc	45.40 ± 1.93 b

Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores con las mismas literales en cargas iguales, no presentan diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Ángulo de contacto

Fabra et al. (2016) señalan que las mediciones de ángulo de contacto son herramientas útiles para determinar la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de la superficie de las cubiertas: valores más bajos ($\theta < 20^\circ$) están cercanamente relacionados con superficies humectables; por el contrario, las superficies hidrofóbicas muestran altos valores ($\theta > 70^\circ$) del ángulo de contacto. Los valores de ángulo de contacto observados en PET, PET A/C y de las capas sucesivas, se muestran en la Figura 3. El carácter hidrofóbico del PET original, se confirmó por el alto valor obtenido para su ángulo de contacto ($82.93 \pm 1.47^\circ$), el cual coincide con el reportado en estudios previos (Carneiro-da-Cunha et al., 2010; Pinheiro et al., 2012). Después de la aminólisis, la superficie del PET exhibió un ángulo de contacto significativamente menor ($p < 0.05$) ($71.15 \pm 3.9^\circ$), lo que

significa que el PET A/C es menos hidrofóbico que el PET original. Carneiro-da-Cunha et al. (2010) y Pinheiro et al. (2012) reportaron una disminución en el ángulo de contacto de 78.37 a 63.21° y de 81.78 a 73.56°, respectivamente, después de la aminólisis del PET. Además, la diferencia obtenida en el ángulo de contacto entre el original y el PET A/C confirma que el proceso de aminólisis se realizó con éxito. Los resultados del ángulo de contacto también exhiben un comportamiento distinto cuando la capa más externa varía entre alginato y quitosano (funcionalizado o no), confirmando que el recubrimiento se ensambló progresivamente mediante deposición alterna de estos dos polielectrolitos (Fig. 4). Se observó que los ángulos de contacto del conjunto de capas de quitosano eran más altos que los de las capas de alginato, estos resultados pueden explicarse por la mayor hidrofobicidad del quitosano en comparación con el alginato (Medeiros et al., 2012b).

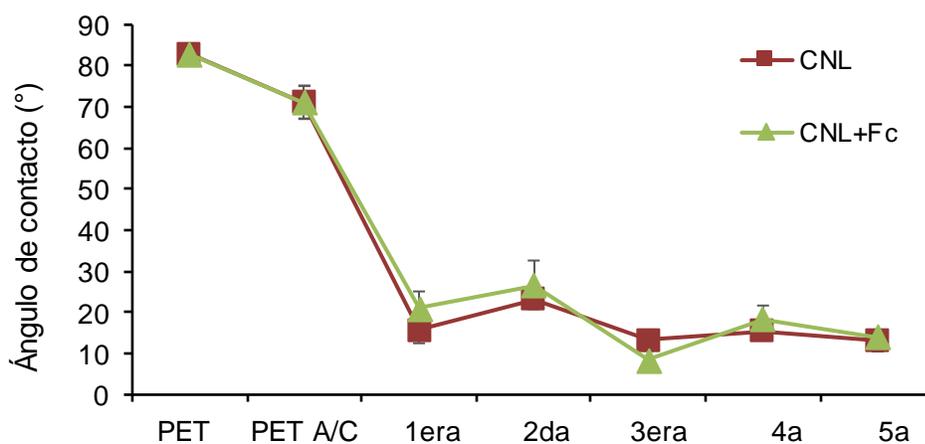


Figura 4. Ángulo de contacto medido en PET original, soporte PET A/C y en cada una de las cinco capas sucesivas que contienen: CNL y CNL+ Fc, después de 15 s de aplicación de la gota. Cada punto es la media de 15 mediciones y las barras indican el error estándar.

La incorporación del extracto de etanol de hojas de *F. cernua* (Fc) no influyó en la naturaleza hidrófila o hidrófoba del alginato y el quitosano, respectivamente. Como la capa más externa es alginato, el recubrimiento nanolaminado producido exhibe un ángulo de contacto de aproximadamente 13.95 ± 2.31 y $13.17 \pm 3.77^\circ$

(CNL+Fc y CNL, respectivamente), lo que lo convierte en un recubrimiento relativamente hidrófilo. Además, las diferencias encontradas con respecto al ángulo de contacto con el agua en las capas de alginato y quitosano también pueden estar relacionadas con otros factores por ejemplo, su composición química, el nivel de interpenetración de la capa más externa por segmentos de la capa de polímero, previamente adsorbida y al hinchamiento de las capas cuando están en contacto con las gotas de agua (Pinheiro et al., 2012). Como ya se mencionó anteriormente, las mediciones de ángulo de contacto ayudan a seguir la deposición de capas sucesivas sobre PET A/C.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO₂)

Se evaluaron las propiedades de barrera a los gases del recubrimiento nanolaminado, usando el soporte PET A/C como referencia. Se midieron las permeabilidades de vapor de agua y oxígeno (PVA y PO₂, respectivamente) y los resultados se muestran en la Cuadro 19. Una de las principales funciones del envasado de alimentos es evitar o disminuir la pérdida de agua, por lo tanto, la PVA debe ser lo más bajo posible (Pinheiro et al., 2012).

Los valores de PVA para del soporte PET A/C; PET A/C con nanocapas y de las nanocapas solas (Cuadro 19) mostraron una PVA menor en comparación con los valores reportados para películas comestibles convencionales, compuestas de alginato y quitosano puro, de 24.6×10^{-11} g/m.s.Pa. (Hambleton et al., 2009) y 3.8×10^{-11} g/m.s.Pa (Souza et al., 2009), respectivamente. Los valores de PVA para los recubrimientos nanolaminados CNL+Fc y CNL fueron de 4.17 y 4.20×10^{-13} g/m.s.Pa, respectivamente; y no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Estos resultados coinciden con los reportados por Pinheiro et al. (2012) y Medeiros et al. (2012b), 2×10^{-13} y 1.9×10^{-13} g/m.s.Pa, respectivamente. La disminución en PVA, para las cubiertas nanolaminadas podría ser atribuido a los fuertes enlaces que se producen entre las sucesivas capas de alginato y quitosano (Jang et al., 2008), que evitan o disminuyen la difusión de vapor de agua.

La permeabilidad al oxígeno (PO_2), es otro parámetro a tener en cuenta en la vida de anaquel de las frutas y verduras. Una reducción del índice de flujo de oxígeno promueve una reducción de la oxidación. La PO_2 de películas y recubrimientos comestibles depende de varios factores, como la integridad de la película, la relación entre las zonas cristalina y amorfa, así como la relación hidrofílica/hidrofóbica (Medeiros et al., 2012a). Los valores de PO_2 obtenidos para los nanolaminados fueron de 2.02 y 5.50×10^{-15} g/m s Pa (Cuadro 19), que son similares al reportado por Medeiros et al. (2012a) de 1×10^{-15} g/m s Pa. Los sistemas nanolaminados obtenidos (CNL y CNL+Fc) mostraron valores de PO_2 significativamente más bajos ($p < 0.05$) en comparación con el soporte de PET A/C; lo que significa que las nanocapas muestran una barrera efectiva contra el flujo de O_2 . Por otra parte, la presencia del extracto de *F. cernua* no mostró diferencias cuando se comparó con la multicapa utilizada como referencia (CNL).

Cuadro 19. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y permeabilidad al oxígeno (PO_2) del soporte PET A/C; PET A/C con nanocapas y de las nanocapas solas.

	PVA (g/m s Pa)	PO_2 (g/m s Pa)
PET A/C	$1.19 \times 10^{-11} \pm 8.70 \times 10^{-13}$ a	$3.90 \times 10^{-13} \pm 1.85 \times 10^{-13}$ a
PET A/C – CNL	$1.07 \times 10^{-11} \pm 5.77 \times 10^{-13}$ a	$5.41 \times 10^{-13} \pm 5.26 \times 10^{-13}$ a
PET A/C – CNL+Fc	$1.08 \times 10^{-11} \pm 2.16 \times 10^{-13}$ a	$7.50 \times 10^{-13} \pm 3.70 \times 10^{-13}$ a
CNL	$4.20 \times 10^{-13} \pm 2.04 \times 10^{-13}$ b	$2.02 \times 10^{-15} \pm 1.01 \times 10^{-15}$ b
CNL+Fc	$4.17 \times 10^{-13} \pm 7.62 \times 10^{-14}$ b	$5.50 \times 10^{-15} \pm 4.49 \times 10^{-15}$ b

Los valores representan el promedio experimental de 6 repeticiones \pm desviación estándar. Las literales iguales en las columnas, indican que no existe diferencia estadística por la prueba de Tukey

Los resultados de PVA y PO_2 de los nanolaminados se encuentran dentro del rango de otros valores reportados, los cuales sugieren que estos recubrimientos tienen propiedades de barrera selectiva. Estos resultados pueden estar relacionados con las interacciones existentes entre las cinco nanocapas que exhiben una estructura de red compacta formada por la matriz polimérica, que

posiblemente aumenta la tortuosidad y restringe el transporte de moléculas de agua y oxígeno (Medeiros et al., 2014; Medeiros et al., 2012b).

Microscopía electrónica de barrido (SEM) con detector EDS

Las imágenes capturadas en el microscopio electrónico de barrido (SEM) para observar la superficie del soporte de PET A/C, con las cinco capas ya adsorbidas se muestran en la Figura 5a, b, c, y d. Las Figuras 5a y c, muestran la superficie más externa de las cinco capas ya adsorbidas en el soporte de CNL(a) y CNL+Fc (c), a 650X, se puede observar que al añadir el extracto de *F. cernua*, se presenta una superficie más homogénea. La Figura 5b y d muestran las cinco capas de los dos polielectrolitos, de CNL (b) y CNL+Fc (d). Carneiro-da-Cunha et al.(2010) y Medeiros et al., (2012) reportaron observaciones similares de cubiertas nanomulticapa de alginato-quitosano y pectina-quitosano.

El SEM utilizado cuenta con un detector de rayos X y en general se puede decir que es una técnica de caracterización diferente denominada EDS (Energy Dispersive Spectroscopy), la cual permite realizar microanálisis químico de manera rápida, utilizando los rayos X fruto de las interacciones inelásticas de los electrones incidentes. Con los resultados obtenidos por el detector EDS se construye una gráfica entre la intensidad y la energía de los fotones de rayos X detectados y con gran precisión se pueden identificar los elementos presentes en una determinada muestra, ya que casi todos los elementos químicos presentan picos en intervalos de energía característicos.

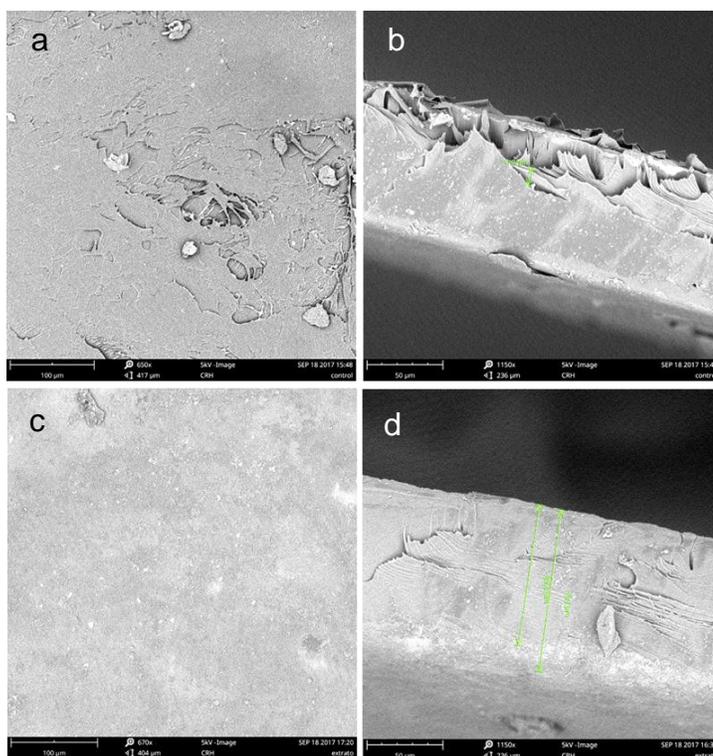


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie más externa de las cinco capas adsorbidas, a) PET A/C CNL y c) PET A/C CNL CNL+Fc; así como la imagen de múltiples capas de b) CNL y d) CNL+Fc.

Estos análisis se realizaron sobre varias regiones aleatorias de ambas superficies (CNL y CNL+Fc), en las Figuras 6 y 7 se presentan los resultados del análisis, se observa la micrografía de la superficie y en el espectrograma de la zona evaluada se observan los elementos presentes.

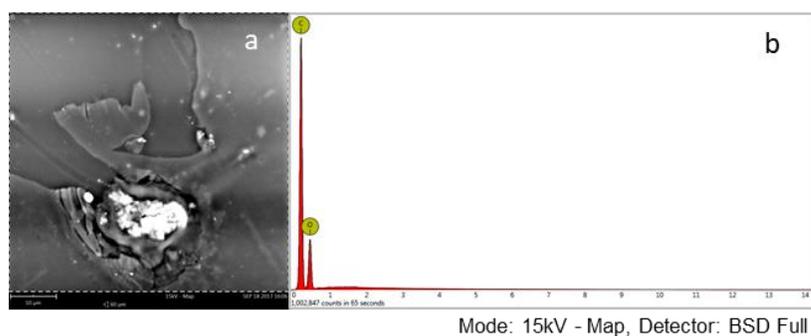


Figura 6. CNL, a) Imagen obtenida mediante SEM de la superficie del sustrato con la región donde se realizaron mediciones de EDS; b) Gráfica de intensidades Vs. energía característica de los elementos que constituyen el sustrato.

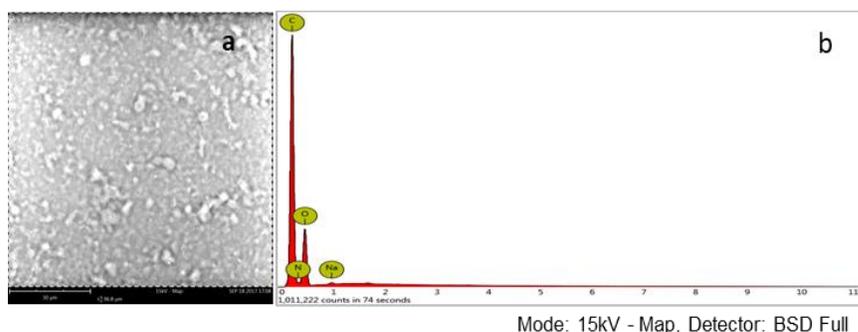


Figura 7. CNL+Fc, a) Imagen obtenida mediante SEM de la superficie del sustrato con la región donde se realizaron mediciones de EDS; b) Gráfica de intensidades Vs. energía característica de los elementos que constituyen el sustrato.

En el Cuadro 20 se relaciona cada elemento identificado y su concentración en peso, igualmente se presenta el dato en porcentaje atómico. La muestra que contiene extracto de *F. cernua* presenta nitrógeno, mientras que la muestra CNL no lo presenta; esto podría atribuirse a la presencia del ácido pterin-6-carboxílico ($C_7H_5N_5O_3$), tercer compuesto de mayor concentración identificado en el extracto, que junto al quitosano, aumentan la concentración de nitrógeno, siendo posible su identificación por esta prueba.

Cuadro 20. Resultados del microanálisis químico realizado sobre las muestras de CNL y CNL+Fc.

Cubierta	Símbolo	Nombre	Conc. Atómica	Conc. Peso
CNL	C	Carbono	72.1	65.99
	O	Oxígeno	27.9	34.01
CNL+Fc	C	Carbono	64.82	58.66
	O	Oxígeno	27.46	33.1
	N	Nitrógeno	7.59	8.01

Efecto de Cubiertas Nanolaminadas en la Vida de Anaquel de Frutos de Tomate a 20 °C/85% HR y 11 °C/90% HR

Pérdida de peso

Las cubiertas comestibles producen una atmósfera modificada entre la cubierta y la superficie del fruto, protegiendo a los frutos desde su aplicación hasta el consumo (Souza et al., 2010). La pérdida de masa de los frutos se produce por la pérdida de agua, porque otros componentes que pueden ser perdidos (aroma, sabores y los productos gaseosos de la respiración), son insignificantes en relación a la pérdida de agua (Olivas and Barbosa-Cánovas, 2005).

En la vida poscosecha de los cultivos hortofrutícolas, una pérdida de peso superior al 5% es un factor limitante para el consumo y la comercialización. Es conocida la relación positiva entre la pérdida de peso con la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Aktas et al., 2012). Los tomates son muy susceptibles a la rápida pérdida de agua, lo que causa una contracción que afecta su valor sensorial, ya que tienen una piel muy delgada, que ofrece poca resistencia a la transferencia de masa. Utilizar recubrimientos comestibles basados en quitosano sería una ventaja, ya que actúan como barreras, reducen la transferencia de agua y protegen la piel de las heridas mecánicas (García et al., 2014). El porcentaje de la pérdida de peso de los frutos de tomate, en condiciones que simulan el almacenamiento a temperatura ambiente y en frío se muestra en las Figuras 8a y b, respectivamente. Los resultados para la prueba a 20 °C y 85%HR, muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos al día 15, siendo el tratamiento CNL+Fc el que presenta la menor pérdida de peso (3.83%), a continuación el tratamiento CNL presentó una pérdida de peso de 7.21% y el tratamiento SC tuvo la mayor pérdida con 9.82%. Los tratamientos con nanocubiertas funcionaron como una barrera a la pérdida de humedad (Medeiros et al., 2012b), y la adición del extracto de *F. cernua* evitó una mayor pérdida de agua. Un comportamiento similar fue reportado por Vieira et al. (2016), al utilizar un nano-recubrimiento de quitosano funcionalizado con fracción líquida de *A. vera* sobre arándanos. Los resultados de la presente investigación,

concuerdan con la capacidad de barrera detectada del nanolaminado, que exhibió valores más bajos de la permeabilidad al vapor de agua con respecto a cubiertas convencionales, las cuales fueron evaluadas a temperatura ambiente. Ruelas-Chacon et al. (2017) reportaron un porcentaje de pérdida de peso mayor al 15% al día 16, en tomate con cubierta convencional de goma guar y almacenado a 22 °C. La diferencia en resultados en relación a los del presente estudio, puede atribuirse a las propiedades de barrera mejoradas de los recubrimientos nanolaminados, que debido a las interacciones electrostáticas entre las capas adyacentes de alginato y quitosano mas la adición de *F. cernua*, que provocó un aumento de la tortuosidad de la matriz, disminuyendo así la difusión de las moléculas de vapor de agua a través de la matriz de los materiales (Souza et al., 2014).

Los resultados obtenidos a 11 °C y 90%HR, presentaron diferencia significativa ($p < 0.1$), siendo los tratamientos CNL+Fc y SC estadísticamente iguales, que presentaron la menor pérdida de peso durante el desarrollo de la prueba, a los 15 días de almacenamiento la pérdida de peso fue de 4 y 5% para CNL+Fc y SC, respectivamente, al final de la prueba la pérdida fue de 7% para ambos tratamientos. El tratamiento CNL tuvo una mayor pérdida de peso con valores de 8% a los 15 días y de 10.39% a los 25 días, resultado similar fue reportado por García et al. (2014) en tomate, al comparar un tratamiento sin cubierta y uno con cubierta de quitosano, siendo los frutos de éste último, los que presentaron una mayor pérdida de peso después de 37 días de almacenamiento; los autores atribuyen dicho comportamiento a una menor adhesividad y extensibilidad de la cubierta. Es importante señalar que a los 15 días de almacenamiento los tomates con las cubiertas CNL+Fc y SC son aptos para la comercialización.

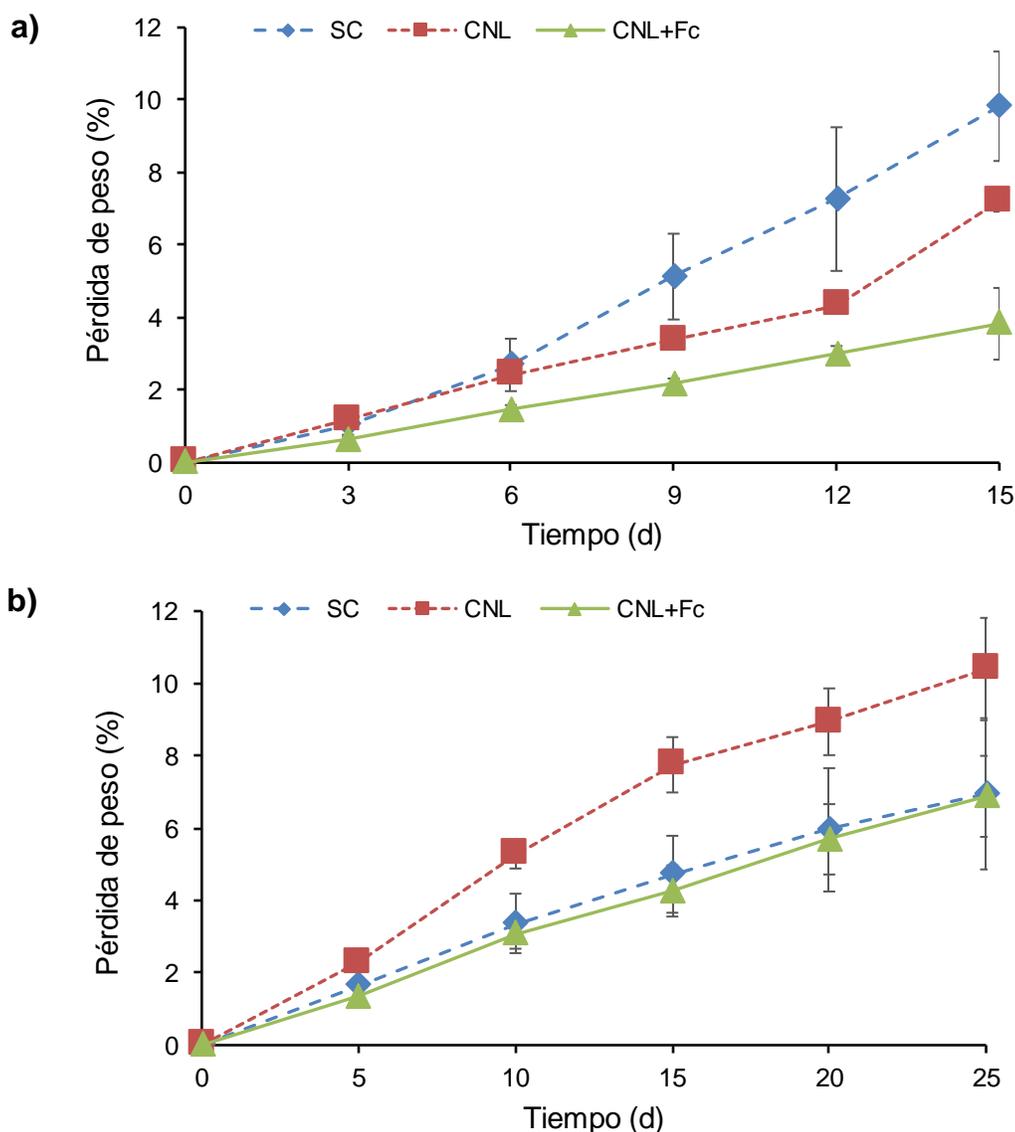


Figura 8. Pérdida de peso (%) de frutos de tomate: sin cubierta (SC), con cubierta nanolaminada (CNL) y con CNL+Fc; almacenados a) 20 °C y 85% HR; b) 11 °C y 90% HR. Cada punto es el promedio de cinco determinaciones, las barras indican la desviación estándar.

Contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT) y pH

Los valores de CSS, acidez y pH, para frutos de tomate en las condiciones de almacenamiento evaluadas se presentan en los Cuadros 20 y 21.

Contenido de sólidos solubles (CSS)

El contenido de sólidos solubles (CSS) representa sustancias solubles en agua como azúcares, ácidos, vitamina C y algunas pectinas (Oliveira et al., 1999), el

90% de CSS corresponde a azúcar, esta variable es usada como un indicador de contenido de sólidos solubles en la etapa de maduración de los frutos.

En el ensayo a 20 °C y 85% HR (Cuadro 21), se observa que en los tres tratamientos hubo un ligero aumento en el CSS en los primeros intervalos de tiempo (3 y 6 días), y posteriormente el CSS disminuyó al final del ensayo (15 días), en el caso del tratamiento CNL+Fc al término del ensayo, el CSS fue igual que al inicio (4.33 °Brix), mientras que en los tratamientos CNL y SC, el CSS disminuyó (3.9 °Brix). Bhattarai y Gautam (2006), mencionan que en la fase de maduración cuando la pérdida de agua ocurre, hay un incremento de CSS debido al aumento de la concentración de azúcar en los frutos, también citan que en el caso de que al final del almacenamiento disminuya el CSS en los frutos, es probablemente a que se presenta un retardamiento en las reacciones de degradación de los polisacáridos y del correspondiente consumo de los azúcares resultantes por los tejidos vivos de las frutas. En este ensayo se observó este comportamiento, menos acentuado en el tratamiento CNL+Fc, lo que se atribuye a la menor pérdida de agua/pérdida de peso.

En el ensayo realizado a 11 °C y 90% HR (Cuadro 22), los tres tratamientos presentaron un aumento significativo ($p < 0.1$) en el CSS, siendo el tratamiento CNL el que mayor incremento tuvo, esto relacionado a que fue el tratamiento con mayor pérdida de agua/pérdida de peso. El incremento de CSS puede atribuirse al aumento de la concentración de azúcar en los frutos (Bhattarai y Gautam 2006).

Acidez titulable (AT)

La acidez titulable es otro parámetro que cambia con la fase de maduración, debido a los ácidos orgánicos que son consumidos durante la postcosecha de los frutos (Medeiros et al., 2012). La disminución en la AT en los frutos puede ser debido a la ruptura de los enlaces de los ácidos y transformación a azúcares presentes en el fruto con la respiración durante el almacenamiento (Toğrul y Arslan, 2004)

Los valores de AT a 20 °C y 85% HR variaron significativamente ($p < 0.05$) en el transcurso del ensayo (Cuadro 20), entre el inicio y final (15 días) los tratamientos SC y CNL+Fc tuvieron un decremento de 1 y 2 centésimas en los valores de AT, en el caso del tratamiento CNL hubo un aumento de 1 centésima. Las pocas variaciones en los valores de acidez titulable siguieron que la maduración de los frutos fue retardada (Medeiros et al., 2010).

Un comportamiento similar se presentó en la prueba a 11 °C, donde los tratamientos de SC y CNL+Fc presentaron una reducción ($p < 0.1$) de AT; y el tratamiento CNL incrementó su valor en 4 centésimas.

Cuadro 21. Propiedades fisicoquímicas de frutos de tomate, durante el almacenamiento a 20°C y 85%HR.

Variable	Tratamiento	Tiempo (d)					
		0	3	6	9	12	15
CSS	SC	4.17 ^{Bbc}	4.23 ^{Cabc}	4.37 ^{Aab}	4.57 ^{Aa}	3.63 ^{Bd}	3.90 ^{Bcd}
	CNL	4.57 ^{Aa}	4.7 ^{Ba}	4.0 ^{Ab}	4.0 ^{Bb}	3.73 ^{Bc}	3.90 ^{Bbc}
	CNL+Fc	4.33 ^{Bb}	5.10 ^{Aa}	4.27 ^{Abc}	4.07 ^{Bcd}	3.90 ^{Ad}	4.33 ^{Ab}
AT	SC	0.38 ^{Aa}	0.33 ^{Bd}	0.34 ^{ABcd}	0.35 ^{Bbcd}	0.36 ^{Abc}	0.37 ^{Aab}
	CNL	0.34 ^{Bab}	0.30 ^{Cc}	0.34 ^{Bab}	0.30 ^{Cc}	0.33 ^{Bb}	0.35 ^{Ba}
	CNL+Fc	0.39 ^{Ab}	0.38 ^{Abc}	0.36 ^{Ac}	0.4 ^{Aa}	0.36 ^{Ad}	0.37 ^{Abcd}
pH	SC	4.52 ^{Aa}	4.19 ^{Cc}	4.19 ^{Bc}	4.26 ^{Bb}	4.16 ^{Bc}	4.17 ^{Bc}
	CNL	4.18 ^{Cc}	4.35 ^{Aa}	4.27 ^{Ab}	4.37 ^{Aa}	4.26 ^{Ab}	4.38 ^{Aa}
	CNL+Fc	4.26 ^{Bbc}	4.23 ^{Bc}	4.29 ^{Ab}	4.15 ^{Cd}	4.28 ^{Ab}	4.34 ^{Aa}

CSS= contenido de sólidos solubles (%). AT = Acidez titulable (%), en gramos de ácido cítrico equivalente por 100 g de tomate). Las medias seguidas de las mismas letras mayúsculas no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos (columnas) y las medias seguidas de las mismas letras minúsculas no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) a través del tiempo (filas).

pH

Los valores de pH a 20 °C y 85% HR de los tratamientos cambiaron ligeramente durante el almacenamiento de 15 días ($p < 0.05$), (Cuadro 20). El pH de los frutos con cubierta se incrementó de 4.18 a 4.38 y de 4.26 a 4.34 para CNL y CNL+Fc, respectivamente; para los frutos SC el pH disminuyó de 4.52 a 4.17. En el ensayo 11 °C y 90% HR (Cuadro 21), los frutos SC y con CNL+Fc presentaron un ligero

incremento ($p < 0.1$) de pH, mientras que los frutos con CNL no presentaron diferencia ($p > 0.1$).

Cuadro 22. Propiedades fisicoquímicas de frutos de tomate, durante el almacenamiento a 11°C y 90% HR.

Variable	Tratamientos	Tiempo (d)					
		0	5	10	15	20	25
CSS	SC	5.27 ^{Ac}	4.90 ^{Ce}	5.23 ^{AcD}	5.50 ^{ABb}	5.63 ^{Ba}	5.13 ^{Bd}
	CNL	4.93 ^{Bd}	5.30 ^{Bc}	5.20 ^{Ac}	5.57 ^{Ab}	5.80 ^{Aa}	5.73 ^{Aa}
	CNL+Fc	4.87 ^{Be}	5.57 ^{Aa}	5.13 ^{AcD}	5.33 ^{Bb}	5.03 ^{Cd}	5.20 ^{Bbc}
AT	SC	0.47 ^{Aa}	0.40 ^{Bc}	0.41 ^{Bbc}	0.43 ^{Bb}	0.43 ^{Bb}	0.37 ^{Bd}
	CNL	0.38 ^{Cb}	0.40 ^{Bb}	0.52 ^{Aa}	0.43 ^{Bb}	0.43 ^{Ab}	0.42 ^{Ab}
	CNL+Fc	0.41 ^{Bb}	0.45 ^{Aa}	0.38 ^{Bc}	0.41 ^{Ab}	0.39 ^{Cbc}	0.38 ^{Bc}
pH	SC	4.14 ^{Cd}	4.22 ^{Bc}	4.29 ^{Bb}	4.20 ^{Bc}	4.18 ^{Bcd}	4.34 ^{Aa}
	CNL	4.22 ^{Bb}	4.32 ^{Aa}	4.32 ^{Aa}	4.31 ^{Aa}	4.18 ^{Bc}	4.22 ^{Cb}
	CNL+Fc	4.27 ^{Abc}	4.23 ^{Bcd}	4.33 ^{Aa}	4.31 ^{Aab}	4.21 ^{Ad}	4.30 ^{Bab}

CSS= contenido de sólidos solubles (%). AT = Acidez titulable (% en gramos de ácido cítrico equivalente por 100 g de tomate). Las medias seguidas de las mismas letras mayúsculas no presentaron diferencia significativa ($p > 0.1$) entre tratamientos (columnas) y las medias seguidas de las mismas letras minúsculas no mostraron diferencia significativa ($p > 0.1$) a través del tiempo (filas).

Color

El color es un indicador de la madurez, el más obvio de la calidad de los frutos de tomate (Ali et al., 2010). Batu (2004), reportó una escala de valores a^*/b^* (índice de enrojecimiento) para expresar el enrojecimiento y su relación con la etapa de maduración de la fruta de tomate (Cuadro 2). El valor a^* indica el grado de enrojecimiento en tomate y b^* muestra una decoloración amarilla. Los frutos de tomate se obtuvieron en la etapa de comercialización, una vez que el color rojo se desarrolló y se corroboró con los valores reportados por Batu (2004). En el ensayo a las condiciones de 20 °C y 85% HR (Fig. 9a), los frutos de tomate con CNL+Fc, CNL y SC, tenían valores del índice de enrojecimiento de 0.9, 0.96 y 0.98 respectivamente (Fig. 9a), correspondiendo el índice a un color rojo claro para CNL+Fc, y a un color rojo para CNL y SC (Cuadro 2). Después del día 3 el tratamiento SC incrementó la intensidad del color rojo, alcanzando un valor de índice de 1.05 lo que mostró mayor avance de la madurez. No se encontraron

diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos con recubrimientos. Los frutos del tratamiento CNL+Fc mantuvieron la etapa de color rojo claro durante el período del ensayo, el índice tuvo un valor no mayor de 0.93, lo cual mostró que las cubiertas nanolaminadas retardaron la maduración de los frutos. Ruelas-Chacon et al. (2017) reportaron valores a^*/b^* mayores a 0.95 en tomates con cubierta tradicional de goma de guar, a los 16 d de almacenamiento.

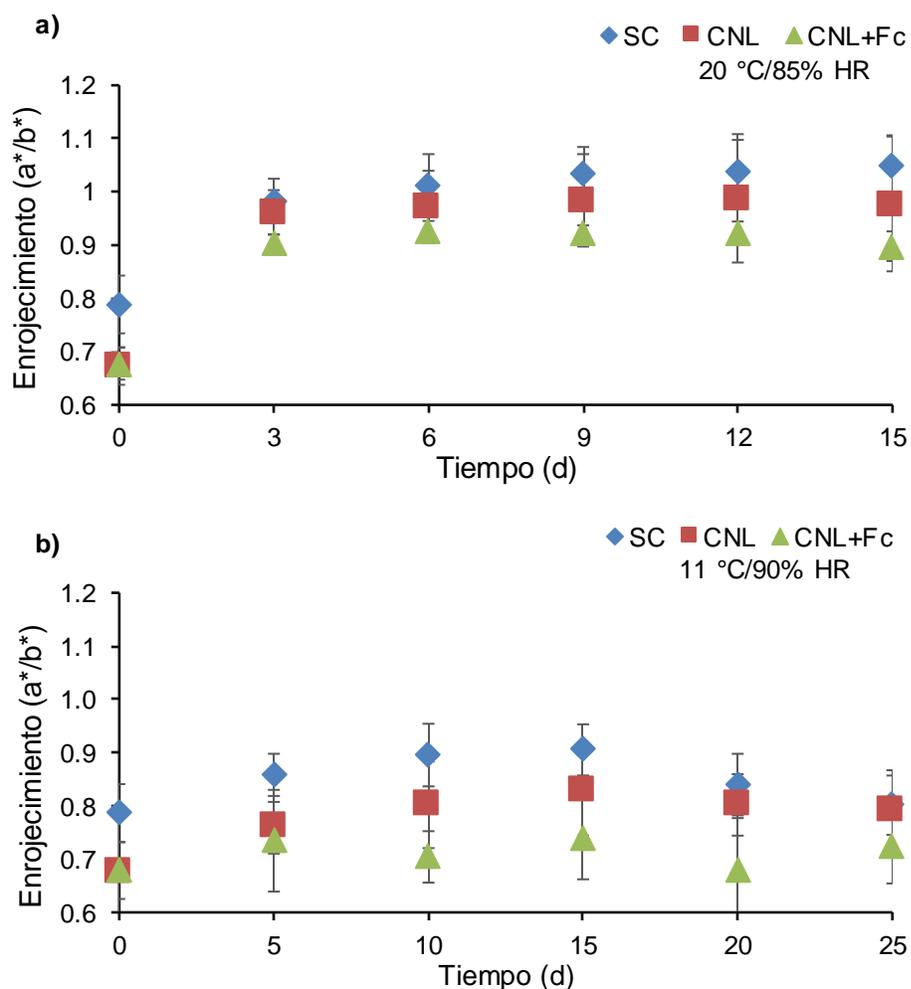


Figura 9. Enrojecimiento (a^*/b^*) de frutos de tomate almacenados (a) 15 días a 20 °C/85% HR y (b) 25 días a 11 °C/90% HR. Los valores son la media y las barras de error muestran la desviación estándar.

En cuanto a los frutos almacenados a 11 °C y 90% HR (Figura 9b), los valores del índice de enrojecimiento de los tres tratamientos se mantuvieron en el color

rojo claro de acuerdo con el Cuadro 2, lo que podría atribuirse a la temperatura fría en el ensayo; siendo importante resaltar que hubo diferencias significativas ($p < 0.01$), entre tratamientos, resultando el tratamiento de CNL+Fc con los valores menores de índice de color durante el ensayo de 25 días y el tratamiento SC con los valores mayores.

Firmeza

El proceso de maduración afecta la textura de fruta y la estructura y composición de polisacáridos de la pared celular. (Saladié et al., 2007). Los cambios de reblandecimiento se han asociado con la degradación de la laminilla media del parénquima cortical de las células, originando un incremento en la solubilización de pectina, causando mínimos efectos en su peso molecular y pequeñas disminuciones en el contenido de hemicelulosa (García et al., 2014).

En los ensayos de almacenamiento para la evaluación de firmeza de fruto, se observa (Fig. 10), que en el día inicial de las pruebas, los valores de firmeza presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, siendo estadísticamente el de mayor valor el tratamiento CNL+Fc, lo que podría atribuirse a la resina que mejoró la resistencia de la nanocubierta. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Athmaselvi et al. (2013) quienes encontraron mayor firmeza al inicio de la prueba con frutos de tomate recubiertos a base de *A. vera*. En el ensayo a 20 °C/85% HR, se observa a los 15 días, que en general hubo una disminución de firmeza en los tratamientos, presentándose diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los mismos, los frutos en el tratamiento CNL+Fc presentaron la mayor firmeza (3.8 N) y los tratamientos CNL y SC fueron estadísticamente iguales y con menor firmeza. La mayor firmeza presentada por el tratamiento CNL+Fc, puede ser atribuida al efecto de la resina del extracto en la nanocubierta. Ali et al. (2010) reportaron que el recubrimiento de la fruta propicia altos niveles de CO₂ que pueden limitar la actividad de las enzimas que producen el ablandamiento de la pared celular, lo que permite mantener la firmeza durante el almacenamiento. Zapata et al. (2007) reportaron reducción en

la firmeza de tomate de 11.65 N al corte, a 4.0 N en comercialización, lo cual concuerda con la firmeza (3.8 N), alcanzada en el presente estudio por los frutos, al final del tiempo de almacenamiento (15 días) en el tratamiento CNL+Fc a 20°C. En el ensayo de almacenamiento a 11 °C/90% HR, durante 25 días (Fig. 10), la firmeza de los tomates disminuyó en general en los 3 tratamientos comparada con los valores al inicio de la prueba. Los tratamientos con nanocubiertas resultaron estadísticamente iguales ($p < 0.1$), y con mayor firmeza que el tratamiento SC. El frío influyó para retardar la maduración del fruto y por consecuencia retardar la pérdida de su firmeza.

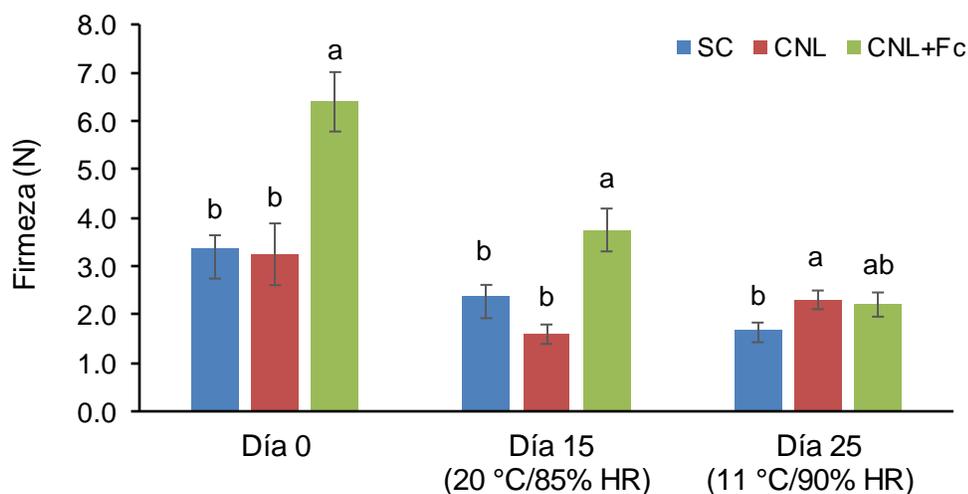


Figura 10. Firmeza (N) de frutos de tomate: sin cubierta (SC), con cubierta nanolaminada (CNL) y con CNL+Fc; durante el almacenamiento a 20 °C/85% HR y 11 °C/90% HR. Los valores son la media de 7 repeticiones y las barras de error muestran la desviación estándar.

Análisis microbiológicos

Hongos y levaduras

Los resultados microbiológicos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). En el ensayo 20 °C y 85% HR, el tratamiento que mostró los mejores resultados fue CNL+Fc, ya que este tratamiento inhibió el crecimiento de hongos y levaduras durante 6 días (Fig. 11a). Durante el periodo del día 9 al 15, el tratamiento CNL+Fc mostró un menor crecimiento de hongos y levaduras

que el tratamiento CNL, el cual a su vez mostró un menor crecimiento en comparación del tratamiento SC, que presentó el mayor crecimiento microbiológico en el ensayo.

Estos resultados evidenciaron que la actividad antifúngica del extracto de etanol de *F. cernua* demostrada *in vitro* (Jasso de Rodríguez et al., 2007, 2017), fue también manifestada en frutos de tomate, lo cual puede estar asociado con la acción fungicida de *F. cernua*. Además este efecto podría ser promovido por la combinación del extracto de *F. cernua* con el quitosano, del cual se ha reportado actividad antifúngica (Cerqueira et al., 2011; Qiu et al., 2014)

Los resultados microbiológicos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.1$), en el ensayo 11 °C y 90% HR, el tratamiento que mostró los mejores resultados fue CNL+Fc, porque este tratamiento inhibió el crecimiento de hongos y levaduras durante 10 días (Fig. 11b). Durante el periodo del día 15 al 25, el tratamiento CNL+Fc mostró un menor crecimiento de hongos y levaduras que los tratamientos SC y CNL. Estos resultados confirman la actividad antifúngica del extracto de etanol de *F. cernua* (Jasso de Rodríguez et al., 2007, 2017).

De los resultados observados se deduce que las cubiertas nanolaminadas con ingredientes bioactivos en los dos ambientes y periodo de tiempo diferente (15 y 25 días de almacenamiento), continúan liberando más eficientemente el ingrediente activo (extracto de *F. cernua*), porque el efecto antifúngico continua contra hongos y levaduras durante todo el periodo, alargando la vida de anaquel de los frutos de tomate.

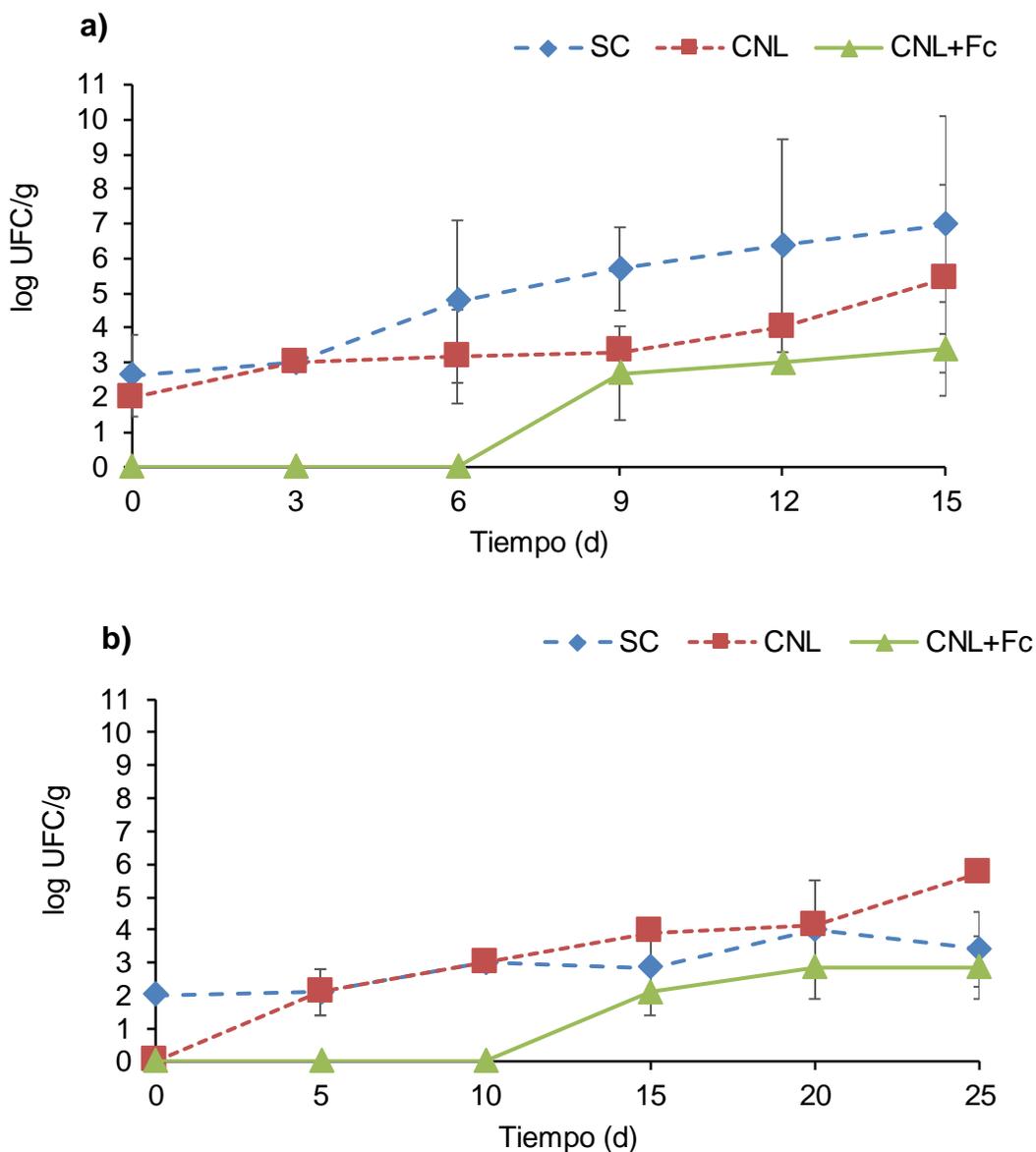


Figura 11. Conteo microbiológico de hongos y levaduras, durante el tiempo de almacenamiento de los frutos de tomate: sin cubierta (SC); con cubierta nano-laminada CNL y con CNL+Fc a 20 °C/85% HR (a) y 11 °C/90% HR (b). Cada punto indica el promedio de 4 repeticiones, las barras indican el error estándar.

Microorganismos Mesófilos.

La cuantificación de los microorganismos aerobios mesófilos permite estimar de forma general la carga microbiana presente en los frutos. Su conocimiento es interesante, ya que su valor es reflejo de calidad.

En el ensayo de almacenamiento a 20 °C y 85% HR, los resultados de los microorganismos mesófilos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), el tratamiento que mostró la mayor inhibición fue CNL+Fc, ya que durante 6 días (Fig. 12a), no mostró la presencia de microorganismos, Además en el periodo del día 9 al 15, este tratamiento mostró un menor crecimiento de microorganismos que los tratamientos CNL y SC, los cuales fueron estadísticamente iguales.

Por otra parte, en la prueba a 11 °C/90% HR (Figura 12b) se observó diferencia estadística ($p < 0.1$) entre tratamientos, Es interesante destacar que los primeros 10 días a 11 °C/90% HR, no se observó la presencia de microorganismos mesófilos en los tratamientos CNL+Fc y SC, pero si se observó crecimiento en el tratamiento CNL. En el periodo de 10 a 25 días, los tratamientos CNL+Fc y SC, mostraron un comportamiento similar en el crecimiento de microorganismos mesófilos y al final del periodo, los tres tratamientos fueron estadísticamente iguales.

El efecto inhibitorio de la cubierta nanolaminada con el extracto de *F cernua* se atribuye principalmente a la actividad antifúngica de la resina del extracto (Jasso de Rodriguez et al., 2007 y 2017). Lo anterior evita la contaminación de los frutos durante el almacenamiento

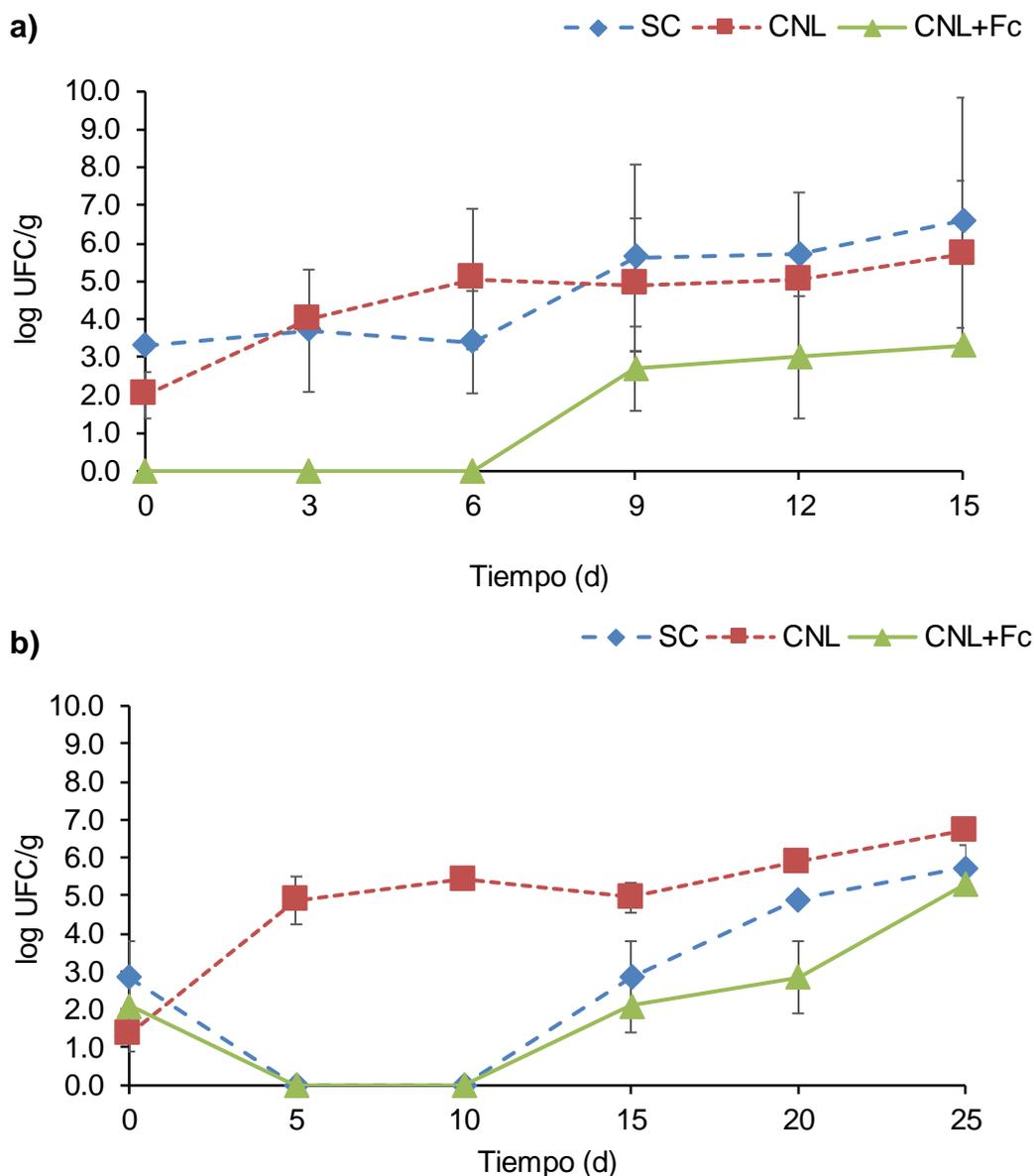


Figura 12. Conteo microorganismos mesófilos, durante el tiempo de almacenamiento de los frutos de tomate: sin cubierta (SC); con cubierta nano-laminada CNL y con CNL+Fc a 20 °C/85% HR (a) y 11 °C/90% HR (b). Cada punto indica el promedio de 4 repeticiones, las barras indican el error estándar.

Tasa de transferencia de gas y producción de etileno

En el ensayo a 20°C/85% HR, después de 10 días de almacenamiento la tasa de transferencia de O₂ presentó una reducción significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos CNL y CNL+Fc, con respecto al tratamiento SC (Fig. 13a), lo cual indica que el consumo de oxígeno por los frutos fue reducido por efecto de los

tratamientos con nanocubiertas, los cuales fueron estadísticamente iguales. Por otra parte, la tasa de transferencia de CO₂, fue menor estadísticamente ($p < 0.05$) para los tratamientos con CNL y CNL+Fc con respecto al tratamiento SC, lo cual indica que el proceso de respiración se redujo debido a las nanocubiertas. Fagundes et al. (2015) citan que en el almacenamiento de frutos, la tasa de respiración depende directamente de la tasa de O₂ absorbido por la fruta (tomate), esto explica los resultados obtenidos en la presente investigación con las nanocubiertas, la baja tasa de O₂ absorbido por el fruto influyó en una menor tasa de CO₂ liberado o respiración.

En el ensayo a 11 °C/90% HR (Fig. 13b), los tratamientos tuvieron una menor tasa de transferencia O₂ y de CO₂ con respecto al ensayo a 20°C/85% HR, lo cual es atribuido a la menor temperatura y al efecto de las cubiertas. En el consumo de O₂ se presentaron diferencias significativas ($p < 0.1$) entre tratamientos, el orden creciente de consumo fue: CNL < CNL+FC < SC. Por otra parte los tratamientos con cubierta nanolaminada fueron estadísticamente iguales y menores que el tratamiento SC en la producción de CO₂

Los resultados del presente estudio concuerdan con Ruelas-Chacon et al. (2017) que reportaron una menor producción de CO₂ en frutos de tomate 'Roma' recubiertos con goma de guar (2.8 mL kg⁻¹ h⁻¹) en comparación con tomates sin recubrir. También otros autores han reportado la reducción de la tasa de respiración en frutos de tomate, utilizando revestimientos a base de goma arábica (Taşdelen and Bayindirli, 1998), alginato o zeína (Zapata et al., 2008) y la hidroxil propil metil celulosa (HPMC) (Sanchez-Gonzalez et al., 2011; Navarro-Tarazaga et al., 2008), durante el almacenamiento.

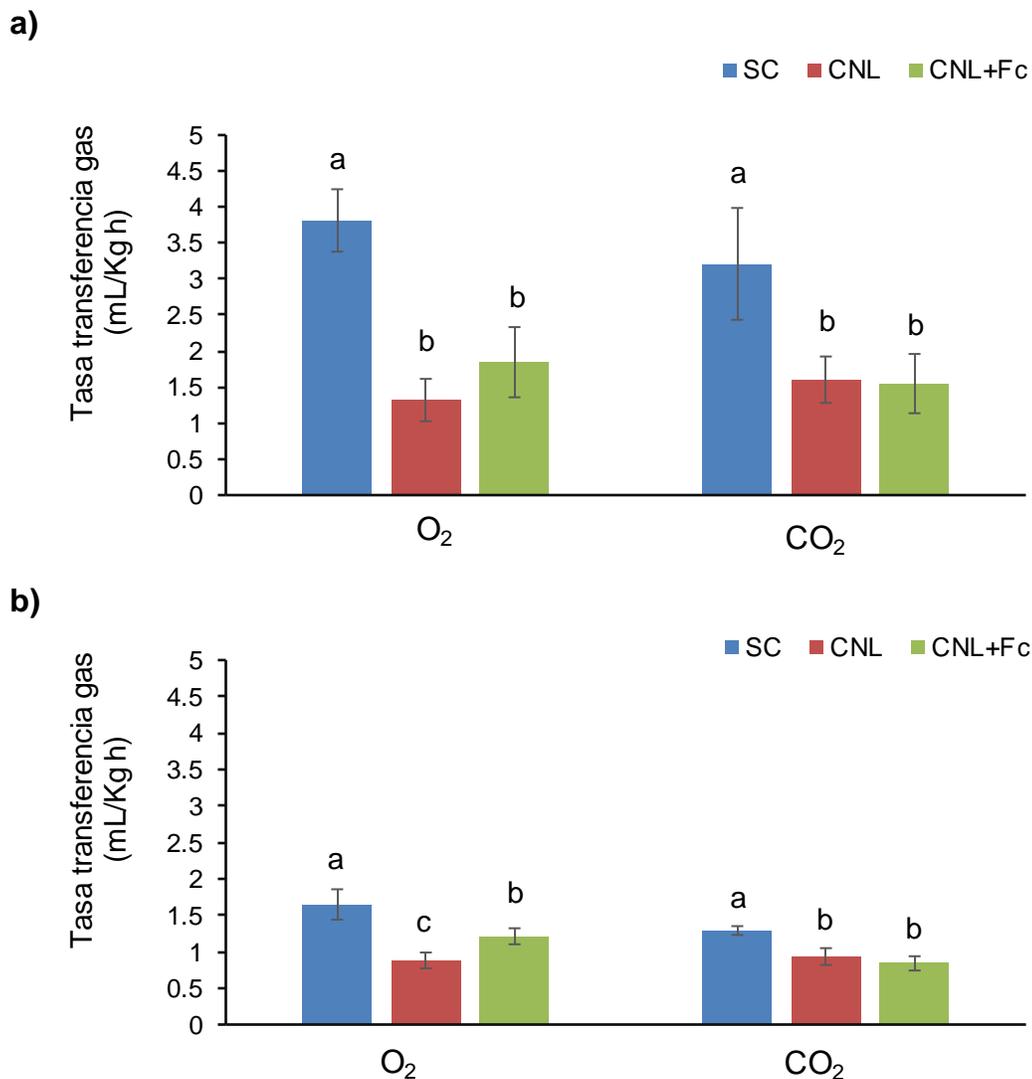


Figura 13. Tasa de transferencia de O₂ y CO₂ en frutos de tomate: sin cubierta (SC), con cubierta nano-laminada CNL y con CNL+Fc a 20 °C/85% HR (a) y 11 °C/90% HR (b). Las barras de error indican la desviación estandar.

Etileno

La tasa de producción de etileno mostró diferencias significativas en ambas condiciones de almacenamiento (Fig. 14). En la condición a 20°C/85% HR el tratamiento CNL+Fc produjo la menor cantidad de etileno que los tratamientos CNL y SC, que son estadísticamente iguales. En la condición a 11 °C/90% HR los tratamientos con las nanocubiertas CNL+Fc y CNL fueron estadísticamente iguales y produjeron menor cantidad de etileno que SC (Fig. 14). En el proceso de respiración la producción de etileno precede a la producción de CO₂. El etileno

influye en la maduración y senescencia de los frutos, en la ruta biosintética del etileno, la enzima ACC Oxidasa es la responsable de la oxidación de ACC a etileno, lo que constituye la última etapa de su biosíntesis, esta enzima es altamente dependiente del O_2 y existe relación directa entre ACC Oxidasa, CO_2 y etileno (Bolívar et al., 2011), Lo anterior explica la relación que existe entre la baja tasa de absorción de O_2 , baja tasa de CO_2 y baja tasa de producción de etileno en los tratamientos con nanocubiertas (CNL+Fc, CNL) en esta investigación.

Además se ha reportado que los frutos de tomate suelen seguir un patrón de maduración climatérica controlado por el etileno (Carrari y Fernie, 2006) lo que implica cambios en los procesos físicos, químicos, bioquímicos y fisiológicos. Por lo tanto, la mayoría de las tecnologías de almacenamiento poscosecha de tomate se enfocan en el control de la respiración y la acción del etileno, con el fin de retrasar estos cambios (Martínez-Romero et al., 2007; Serrano et al., 2008).

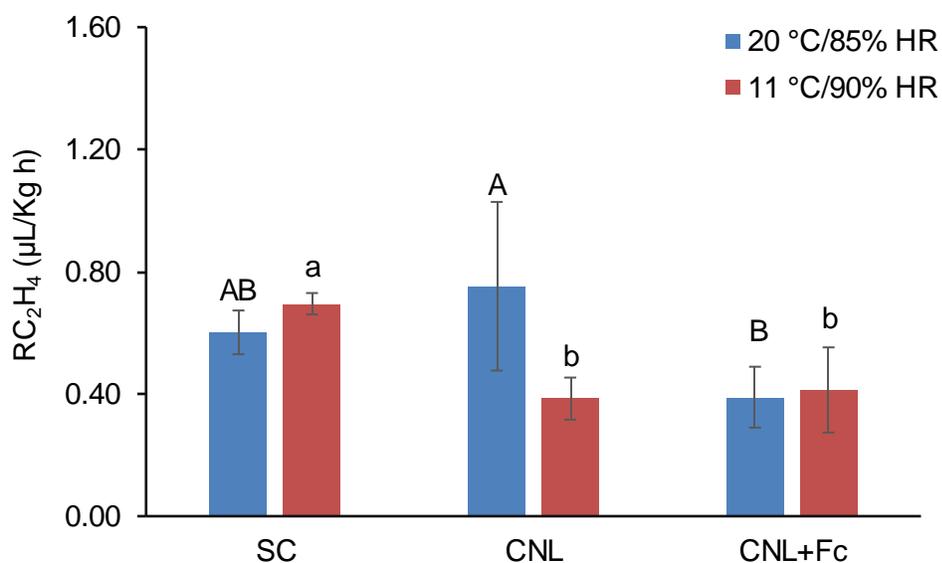


Figura 14. Tasa de producción de etileno en frutos de tomate: sin cubierta (SC); con cubierta nano-laminada (CNL) y con CNL+Fc. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) entre los tratamientos de almacenamiento a 20 °C/85% HR y letras minúsculas iguales indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos a 11 °C / 90% de HR ($p > 0.1$)

Evaluación visual de frutos de tomate

El deterioro de los frutos de tomate por hongos, levaduras y microorganismos mesófilos causa alteraciones metabólicas y son responsables de olores y sabores desagradables y de cambios visibles en color y textura.

La Figura 15 muestra las imágenes de los tomates de los tres tratamientos evaluados: SC; CNL y CNL+Fc, en la condición de 20 °C/85%HR, en diferentes periodos de tiempo durante 15 días. Es visible que en el día 9, el tomate sin cubierta (SC), perdió firmeza y la proliferación de microorganismos en su superficie está presente, la cual se incrementa hasta el día 15, mientras que el tomate con CNL, muestra en la superficie el inicio de la presencia de microorganismos, los cuales continúan incrementando la invasión de la superficie del tomate hasta el día 15, aunque la invasión es menor que en el tratamiento SC, efecto que podría atribuirse a la cubierta nanolaminada de quitosano y alginato. En el caso del tratamiento CNL+Fc se observa un aspecto sano hasta el días 12, en el día 15, se observa en el tomate mínima presencia de microorganismos. Lo anterior muestra el efecto positivo de la nanocubierta con extracto de *F. cernua*, que inhibió el crecimiento de los microorganismos (hongos, levaduras y mesófilos). Estos resultados concuerdan con los resultados microbiológicos de este estudio, en donde se ha atribuido al extracto de *F. cernua* el efecto antimicrobial de la nanocubierta, el cual fue reportado *in vitro* por Jasso de Rodriguez et al. (2007 y 2017). También se ha reportado que el quitosán tiene actividad antifúngica (Cerqueira et al., 2011; Qiu et al., 2014), a lo cual se debe el efecto del tratamiento CNL en los tomates.

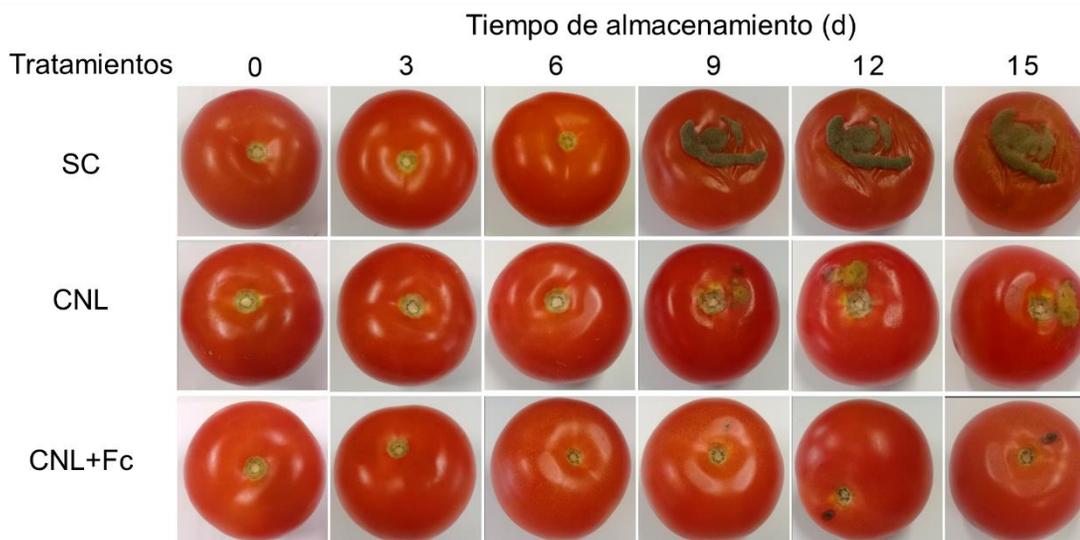


Figura 15. Cambio gradual de los frutos de tomate, durante el tiempo de almacenamiento transcurrido (de cero a 15 d), a 20°C y 85% HR.

Las imágenes de los tomates de los tres tratamientos evaluados: SC; CNL y CNL+Fc, en la condición de 11 °C/90% HR, se muestran a los 20 y 25 días del ensayo (Fig. 16). Es visible que en tratamiento SC, la invasión de microorganismos ocupa gran parte del fruto, en el tratamiento CNL la invasión es en menor magnitud. En el caso del tratamiento de CNL+Fc se observa un aspecto sano del tomate, sin presencia de microorganismos, lo cual puede atribuirse al extracto de *F. cernua* que posee propiedades antifúngicas.

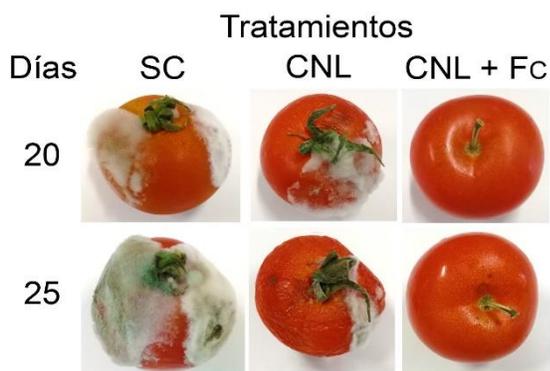


Figura 16. Efecto de los tres tratamientos sobre frutos de tomate, a los días 20 y 25 del almacenamiento a 11°C y 90% HR.

La cubierta nanolaminada con el extracto de *F. cernua* alargó la vida de anaquel de los frutos de tomate en la condición de 20°C y 85% HR, así como en la condición de 11°C y 90% HR, es importante remarcar que los resultados de la primera condición son importantes porque permitiría alargar la vida del tomate en la comercialización al público. Además hacer notar la riqueza biológica de *F. cernua*.

CONCLUSIONES

Los extractos de etanol de hojas y ramas de *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* tuvieron una alta efectividad en la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, patógenos que afectan a frutos en postcosecha.

La actividad antifúngica de los extractos de etanol de *Flourensia* spp., se puede atribuir a la sinergia entre los compuestos identificados, así como a las elevadas concentraciones de polifenoles.

Los compuestos identificados en los extractos de etanol de las tres especies de *Flourensia* son una alternativa natural para formulaciones destinadas a controlar hongos fitopatógenos en frutos durante las etapas pre y postcosecha.

Este es el primer reporte científico de la actividad antifúngica de extractos de etanol y acuosos de hojas y ramas de *F. microphylla* y *F. retinophylla* contra *R. stolonifer*.

Se construyeron con éxito las cubiertas nanolaminadas en un soporte de PET A/C mediante la técnica de deposición de capa por capa (LbL), lo anterior se demostró mediante la prueba de ángulo de contacto.

Las cubiertas nanolaminadas desarrolladas, presentaron valores de permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (PVA y PO₂), inferiores a los reportados previamente para cubiertas convencionales, basadas en alginato o quitosano puro, característica importante para formular nanocubiertas con buena barrera contra los gases.

A temperatura ambiente (20 °C y 85% HR) en almacenamiento durante 15 días, la cubierta nanolaminada con extracto de *F. cernua* alargó la vida de anaquel de los frutos de tomate, debido a la capacidad de la cubierta de reducir la pérdida de peso de los frutos de tomate, así como la velocidad de transferencia de O₂ y CO₂, que restringieron la producción de etileno, que a su vez influyó en el retraso de la maduración, así como en mantener la firmeza y la coloración rojo claro del

fruto. La cubierta nanolaminada con el extracto de *F. cernua*, fué la más efectiva para inhibir la proliferación de hongos, levaduras y microorganismos mesófilos en los frutos de tomate, proporcionando una apariencia sana hasta los 12 días.

En el ambiente a 11 °C y 90% HR de almacenamiento durante 25 días, se observó que se incrementó la vida de anaquel en los frutos de tomate, lo cual podría atribuirse al efecto del frío, debido a que a esta temperatura los procesos de transferencia de O₂, y CO₂ y producción de etileno disminuyeron y mitigaron el efecto de las cubiertas nanolaminadas. Por otra parte la inhibición de los hongos y levaduras hasta el día 10, por la cubierta nanolaminada con el extracto de *F. cernua* conjuntamente con el ambiente en frío, pudo contribuir a mantener una sana apariencia de los frutos hasta los 20 días de almacenamiento.

REFERENCIAS

- Aktas, H., Bayindir, D., Dilmaçunal, T., Koyuncu, M.A., 2012. The effects of minerals, ascorbic acid, and salicylic acid on the bunch quality of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) at high and low temperatures. *HortScience* 47, 1478–1483.
- Al-Tameme, H.J., Hameed, I.H., Idan, S.A., Hadi, M.Y., 2015. Biochemical analysis of *Origanum vulgare* seeds by fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J. Pharmacogn. Phyther.* 7, 221–237.
- Ali, A., Maqbool, M., Ramachandran, S., Alderson, P.G., 2010. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 58, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.05.005>
- Altenhofen, M., Bierhalz, A.C.K., Kieckbusch, Silva Da, T.G., 2009. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydr. Polym.* 77, 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.014>
- AOAC, Official Methods of Analysis (2), 1984, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Tex, USA, vol. 918.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., Yamamoto, N., 1997. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chem.* 60, 593–604. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00038-1)
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, A., 2008. Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26, 114–120.
- Athmaselvi, K.A., Sumitha, P., Revathy, B., 2013. Development of Aloe vera based edible coating for tomato. *Int. Agrophysics* 27, 369–375. <https://doi.org/10.2478/intag-2013-0006>
- Badr, A., Elkington, T.T., 1982. Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. *Environ. Exp. Bot.* 22, 265–270. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(82\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0098-8472(82)90017-X)
- Bailey, A., Chandler, D., Grant, W.P., Greaves, J., Prince, G., Tatchell, M., 2010. *Biopesticides: Pest Management and Regulation.*

- Batta, Y.A., 2007. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.010>
- Batu, A., 2004. Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes. *J. Food Eng.* 61, 471–475. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00141-9)
- Bhattarai, D. R., & Gautam, D. M. (2006). Effect of harvesting method and calcium on post harvest physiology of tomato. *Nepal Agriculture Research Journal*, 7, 37–4
- Bergo, P., Sobral, P.J.A., 2007. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocoll.* 21, 1285–1289. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.014>
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., 2003. Transpiration and water stress. In: Bartz JA, Brecht JK (eds) *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. NY, USA, pp 111-159.
- Benzie, I.F.F., Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
- Bohlmann, F., Grenz, M., 1977. Über inhaltsstoffe der gattung *Flourensia*. *Chem. Ber.* 110, 295–300.
- Bolívar, N., Saucedo, C., Sauri, E., 2011. RESPIRATION AND RELATED PARAMETERS OF MATURATION IN HARVESTED Chicozapote IN THE YUCATAN PENINSULA. *Rev. Bras. Frutic* 261–266. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000032>
- Bombelli, E.C., Wright, E.R., 2006. Tomato fruit quality conservation during post-harvest by application of potassium bicarbonate and its effect on *Botrytis cinerea*. *Cienc. e Investig. Agrar.* 33, 167.172.
- Bosquez-Molina, E., Jesús, E.R. de, Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J.R., Morales-López, J., 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biol. Technol.* 57, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>
- Brody, A.L., 2006, “Nano and Food Packaging Technologies Converge”, *Food Technology*, 60 (3): 92-94.
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M.E., Benuzzi, D., Sanz de Tosetti, M.I., 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium*

- expansum and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.003>
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C., Teixidó, N., 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.12.006>
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Carvalho, S., Quintas, M.A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Physical and thermal properties of a chitosan/alginate nanolayered PET film. *Carbohydr. Polym.* 82, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.043>
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Souza, M.P., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2009. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *J. Food Eng.* 95, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.05.020>
- Carrari, F., Fernie, A.R., 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* 57, 1883–1897.
- Casariego, A., Souza, B.W.S., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Cruz, L., Díaz, R., 2008. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocoll.* 22, 1452–1459.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., Aguilar, C.N., 2010. In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ind. Crops Prod.* 32, 324–328. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.013>
- Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2011. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.07.002>
- Cerqueira, M.A., Lima, Á.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Vicente, A.A., 2009. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *J. Food Eng.* 94, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.003>
- Cerqueira, M.A., Pinheiro, A.C., Silva, H.D., Ramos, P.E., Azevedo, M.A., Flores-López, M.L., Rivera, M.C., Bourbon, A.I., Ramos, Ó.L., Vicente, A.A., 2014.

Design of Bio-nanosystems for Oral Delivery of Functional Compounds. *Food Eng. Rev.* 6, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9074-3>

Cerqueira, M.A., Sousa-Gallagher, M.J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *J. Food Eng.* 97, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.019>

Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2012. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. *Food Hydrocoll.* 27, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.007>

Chambi, H., Grosso, C., 2006. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Res. Int.* 39, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.009>

Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P., Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Wyn, P., 2011. The development , regulation and use of biopesticides for integrated pest management The development , regulation and use of biopesticides for integrated pest management. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>

Cravatt, B.F., Lerner, R.A., Boger, D.L., 1996. Structure determination of an endogenous sleep-inducing lipid, cis-9-octadecenamide (oleamide): a synthetic approach to the chemical analysis of trace quantities of a natural product. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 580–590.

Cooksey, K., Marsh, K. S., & Doar, L. H., 1999. Predicting permeability & transmission rate for multilayer materials. *Food Technology*, 53, 60–63.

Cueto Wong, M.C., Rivas Morales, C., Alanis Guzmán, M.G., Oranday Cárdenas, A., Amaya Guerra, C. a., Núñez González, A., Samaniego Gaxiola, J. a., Cano Ríos, P., 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Mex. Micol.* 31, 29–35.

da Silva, S.L., Figueiredo, P.M.S., Yano, T., 2007. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.065>

Dávila-Aviña, J.E. de J., Villa-Rodríguez, J., Cruz-Valenzuela, R., Rodríguez-Armenta, M., Espino-Díaz, M., Ayala-Zavala, J.F., Olivas-Orozco, G.I.,

- Heredia, B., González-Aguilar, G., 2011. Effect of edible coatings, storage time and maturity stage on overall quality of tomato fruits. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 6, 162–171. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4528.1449>
- Datta, S.C., 2003. *Plant physiology*. New Age International (ed). New Delhi, India, pp 92-96.
- De León-Zapata, M.A., Pastrana-Castro, L., Rua-Rodríguez, M.L., Alvarez-Pérez, O.B., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N., 2016a. Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi. *Food Chem.* 198, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.034>
- De León-Zapata, M.A., Pastrana-Castro, L., Rua-Rodríguez, M.L., Alvarez-Pérez, O.B., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N., 2016b. Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi. *Food Chem.* 198, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.034>
- de Moura, M.R., Aouada, F.A., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Krochta, J.M., Mattoso, L.H.C., 2009. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *J. Food Eng.* 92, 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.015>
- Decher, G., 2002. Polyelectrolyte Multilayers, an Overview, *Multilayer Thin Films*. <https://doi.org/10.1002/3527600574.ch1>
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., Galotto, M.J., 2005. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chem.* 91, 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.002>
- Dillon, M.O., Mabry, T.J., Besson, E., Bouillant, M.L., Chopin, J., 1976. New flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 15, 1085–1086.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C., 2009. Postharvest Biology and Technology Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? 52, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J., 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 114, 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>
- El Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., Arul, J., 1992. Chitosan coating

to extend the storage life of tomatoes. *Hort-Sci.*, 27, 1016–1018.

- Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira, L., Shaaban, K.A., Laatsch, H., 2010. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial streptomyces sp. TN262. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 579–593. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8808-4>
- Eshel, D., Regev, R., Orenstein, J., Droby, S., Gan-mor, S., 2009. Postharvest Biology and Technology Combining physical , chemical and biological methods for synergistic control of postharvest diseases: A case study of Black Root Rot of carrot 54, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.011>
- Estell, R.E., Fredrickson, E.L., James, D.K., 2016. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. *Biochem. Syst. Ecol.* 65, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.019>
- Estell, R.E., James, D.K., Fredrickson, E.L., Anderson, D.M., 2013. Within-plant distribution of volatile compounds on the leaf surface of *Flourensia cernua*. *Biochem. Syst. Ecol.* 48, 144–150. <https://doi.org/DOI 10.1016/j.bse.2012.11.020>
- Fabra, M.J., Flores-López, M.L., Cerqueira, M.A., de Rodriguez, D.J., Lagaron, J.M., Vicente, A.A., 2016. Layer-by-Layer Technique to Developing Functional Nanolaminate Films with Antifungal Activity. *Food Bioprocess Technol.* 9, 471–480. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1646-1>
- Fagundes, C., Moraes, K., Pérez-Gago, M.B., Palou, L., Maraschin, M., Monteiro, A.R., 2015. Effect of active modified atmosphere and cold storage on the postharvest quality of cherry tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 109, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.017>
- FAO, 1989. Prevention of post-harvest food losses: Fruits, vegetables and root crops. A training manual [WWW Document].
- FIRA, 2016. Tomate rojo 2016. *Panor. Aliment.* 2.
- Fernandes, C., Calderon V., S., Ballesteros, L.F., Cerqueira, M.A., Pastrana, L.M., Teixeira, J.A., Ferreira, P.J., Carvalho, S., 2018. Carbon-based sputtered coatings for enhanced chitosan-based films properties. *Appl. Surf. Sci.* 433, 689–695. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.088>
- Fu, J., Ji, J., Yuan, W., Shen, J., 2005. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* 26, 6684–6692.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.034>

García, 2008. Manual de manejo cosecha y poscosecha del tomate de árbol, Corpoica.

Garcia, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., 2000. Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Edible Starch-based Films and Coatings. *J. Food Sci.* 65, 941–944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09397.x>

García, M., Casariego, A., Díaz, R., Roblejo, L., 2014. Effect of edible chitosan/zeolite coating on tomatoes quality during refrigerated storage. *Emirates J. Food Agric.* 26, 238–246. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16620>

González, S., Flores, M., Benavides, a., Flores, a., 2011. Inhibitory Activity of *Heliopsis longipes* Extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 29, 146–153.

Goren, A.C., Piozzi, F., Akcicek, E., Kili, T., Arika, S., Moziolu, E., Setzer, W.N., 2011. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem. Lett.* 4, 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.013>

Hahn, F., 2002. Fungal spore detection on tomatoes using spectral fourier signatures. *Biosyst. Eng.* 81, 249–259. <https://doi.org/10.1006/bioe.2001.0036>

Hambleton, A., Debeaufort, F., Bonnotte, A., Voilley, A., 2009. Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. *Food Hydrocoll.* 23, 2116–2124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.04.001>

Henriod, R.E., 2006. Postharvest characteristics of navel oranges following high humidity and low temperature storage and transport. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.05.012>

Hernández-Castillo, F.D., Castillo Reyes, F., Gallegos Morales, G., Rodríguez Herrera, R., Aguilar, C.N., 2011. Plant Extracts from Mexican Native Species : An Alternative for Control of Plant Pathogens, *Research in Organic Farming*. InTech.

Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., Trejo-Espino, J.L., 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer*(Ehrenb.:Fr.) Vuill.: causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Rev. Mex.*

Fitopatol. 24, 65–69

- Hong, P., Hao, W., Luo, J., Chen, S., Hu, M., Zhong, G., 2014. Postharvest Biology and Technology Combination of hot water , *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 88, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.10.004>
- Igwe, O.U., Mgbemena, N.-A., 2014. Chemical investigation and antibacterial activity of leavaes of *Peperomia pellucid* L. HBK (Piperaceae). *Asian J. Chem. Pharm. Res.* 2, 78–86.
- Jang, S.G., Choi, D.G., Heo, C.J., Lee, S.Y., Yang, S.M., 2008. Nanoscopic ordered voids and metal caps by controlled trapping of colloidal particles at polymeric film surfaces. *Adv. Mater.* 20, 4862–4867. <https://doi.org/10.1002/adma.200702851>
- Jasso De Rodríguez, D., García, R.R., Castillo, F.D.H., González, C.N.A., Galindo, A.S., Quintanilla, J.A.V., Zuccolotto, L.E.M., 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Ind. Crops Prod.* 34, 960–966. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J.L., Rodríguez-García, R., Villarreal Quintanilla, J.A., Lira-Saldivar, R.H., 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Ind. Crops Prod.* 25, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.08.007>
- Jasso de Rodríguez, D., Salas-Méndez, E. de J., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F.D., Díaz-Jiménez, M.L.V., Sáenz-Galindo, A., González-Morales, S., Flores-López, M.L., Villarreal-Quintanilla, J.A., Peña-Ramos, F.M., Carrillo-Lomelí, D.A., 2017. Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Ind. Crops Prod.* 107, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.054>
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., Tadini, C.C., 2010. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1088–1094. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.014>
- Kester, J.J., Fennema, O.R., 1986. Edible film and coatings: A review. *Food Technol* 40, 47-59.

- Kinnunen, T., Koskela, M., 1991. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. *Acta Derm. Venereol.* 71, 148–150.
- Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., 2014. *Scientia Horticulturae* Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 172, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.016>
- Kristo, E., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G., 2008. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocoll.* 22, 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.003>
- Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M., 1994. Edible coatings and films to improve food quality. Florida, United States of America: CRC Press.
- Kwok, D.Y., Neumann, a. W., 1999. Contact angle measurement and contact angle interpretation, *Advances in Colloid and Interface Science*. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00087-6)
- Labouta, H.I., Schneider, M., 2010. Tailor-made biofunctionalized nanoparticles using layer-by-layer technology. *Int. J. Pharm.* 395, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.05.019>
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Ltd: Oxford.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., Hsiang, T., 2012. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biol. Control* 61, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.014>
- Lima, J.N., Silva, G.B., Cordeiro, C.S., Lins, M.M., Oliveira, L., Franco, C.A., Campos-Takaki, G.M., 2014. Isolation, identification and phenotypic characterisation of *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil in Pernambuco, Brazil. *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2013)*. Wageningen Academic Publishers. p. 119.
- Lin, D., Zhao, Y., 2007. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Innovations in the Development and Application of Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables* 6.

- López-Benítez, A., López-Betancourt, S.R., Vázquez-Badillo, M.E., Rodríguez-Herrera, S.A., 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hanses, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23, 183–190.
- Lu, J., Charles, M.T., Vigneault, C., Goyette, B., Raghavan, G.S.V., 2010. Effect of heat treatment uniformity on tomato ripening and chilling injury. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.01.005>
- Madhusudhan, V.L., 2015. Efficacy of 1% acetic acid in the treatment of chronic wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*: prospective randomised controlled clinical trial. *Int. Wound J.* 13, 1129–1136.
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H.S., Moalemiyan, M., Kushalappa, A.C., 2007. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydr. Polym.* 68, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.020>
- Mali, S., Grossmann, M.V.E., García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., 2005. Mechanical and thermal properties of yam starch films. *Food Hydrocoll.* 19, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.05.002>
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P., 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol. Technol.* 73, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.014>
- Martínez-Romero, D., Serrano, M., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D., 2007. Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 543–560.
- Martins, S., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Sep. Purif. Technol.* 88, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.020>
- Martins, G. V., Mano, J.F., Alves, N.M., 2010. Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. *Carbohydr. Polym.* 80, 571–574. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.030>
- McCormick, K.E., Han, I.Y., Acton, J.C., Sheldon, B.W., Dawson, P.L., 2005. In-package pasteurization combined with biocide-impregnated films to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in Turkey bologna. *J.*

- Food Sci. 70, M52–M57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09046.x>
- Medeiros, B.G. d. S., Souza, M.P., Pinheiro, A.C., Bourbon, A.I., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2014. Physical Characterisation of an Alginate/Lysozyme Nano-Laminate Coating and Its Evaluation on “Coalho” Cheese Shelf Life. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1088–1098. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1097-5>
- Medeiros, B.G. de S., Pinheiro, A.C., Carneiro-Da-Cunha, M.G., Vicente, A.A., 2012b. Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan - Evaluation of its gas barrier properties and application on “Tommy Atkins” mangoes. *J. Food Eng.* 110, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.021>
- Medeiros, B.G. de S., Pinheiro, A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2012a. Polysaccharide/Protein Nanomultilayer Coatings: Construction, Characterization and Evaluation of Their Effect on “Rocha” Pear (*Pyrus communis* L.) Shelf-Life. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2435–2445. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0508-0>
- Meenakshi, V.K., Gomathy, S., Senthamarai, S. Paripooranaselvi, M., Chamundeswari, K.P., 2012. GC-MS Determination of the bioactive components of *Microcosmus exasperatus* Heller. *J. Curr. Chem. Pharm. Sci.* 2, 271–276.
- Miranda, S.P., Cárdenas, G., López, D., Lara-sagahon, A. V, 2003. Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate 47, 331–336.
- Molina-Salinas, G.M., Ramos-Guerra, M.C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B.D., Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S., 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Med. Res.* 37, 45–49.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Bond, G., Capelle, M., Volley, A., 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid – based edible films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 42, 67 – 89.
- Muthulakshmi, A., Jothibai, M.R., Mohan, V.R., 2012. GC-MS analysis of bioactive components of *Feronia elephantum* Correa (Rutaceae). *J. Appl. Pharm. Sci.* 2, 69–74.
- Navarro-Tarazaga, M.L., Del Río, M.A., Krochta, J.M., Pérez-Gago, M.B., 2008. Fatty Acid Effect on Hydroxypropyl Methylcellulose - Beeswax Edible Film Properties and Postharvest Quality of Coated “Ortanique” Mandarins

10689–10696.

- Ogden, I., Rosa, E., Wyss, G., Brandt, K., 2005. Seguridad y contaminación. Información destinada al consumidor para el control, de la calidad y la seguridad en las cadenas de producción orgánica, in: Research Institute of Organic Agriculture FiBL and University of Newcastle. p. 4.
- Okenwa Uchenna Igwe, and N.M.-A.M., 2014. Chemical al Investigation and Antibacterial Activity of the Leaves of Peperomia. *Asian J. Chem. Pharm. Res.* 2, 78–86.
- Olivas, G.I., Mattinson, D.S., Barbosa-Cánovas, G. V., 2007. Alginate coatings for preservation of minimally processed “Gala” apples. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.018>
- Olivas, G. I., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 657–670.
- Oliveira, M. E. B., Bastos, M. S. R., Feitosa, T., Branco, M. A. A. C., & Silva, M. G. G. (1999). Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(3), 326–332.
- Pachuta-Stec, A., Rzymowska, J., Mazur, L., Mendyk, E., Pitucha, M., Rzaczyńska, Z., 2009. Synthesis, structure elucidation and antitumour activity of N-substituted amides of 3-(3-ethylthio-1,2,4-triazol-5-yl)propenoic acid. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 3788–3793. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.04.034>
- Pagella, C., Spigno, G., De Faveri, D.M., 2002. Characterization of starch based edible coatings. *Food Bioprod. Process. Trans. Inst. Chem. Eng. Part C* 80, 193–198. <https://doi.org/10.1205/096030802760309214>
- Paladines, D., Valero, D., Valverde, J.M., Díaz-Mula, H., Serrano, M., Martínez-Romero, D., 2014. The addition of rosehip oil improves the beneficial effect of Aloe vera gel on delaying ripening and maintaining postharvest quality of several stonefruit. *Postharvest Biol. Technol.* 92, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.014>
- Parra, D.F., Tadini, C.C., Ponce, P., Lugao, A.B., 2004. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydr. Polym.* 58, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.08.021>

- Pavlath, A.E., Orts, W., 2009. Edible films and coatings for food applications.
- Pérez-Hernández, N., Ponce-Monter, H., Ortiz, M.I., Cariño-Cortés, R., Joseph-Nathan, P., 2009. Structure-Activity Relationships of Aromadendranes in Uterus Relaxant Activity. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, J. Biosci.* 64c, 840–846.
- Phan The, D., Debeaufort, F., Luu, D., Voilley, A., 2008. Moisture barrier, wetting and mechanical properties of shellac/agar or shellac/cassava starch bilayer bio-membrane for food applications. *J. Memb. Sci.* 325, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.07.052>
- Pinheiro, A.C., Bourbon, A.I., Medeiros, B.G.D.S., Da Silva, L.H.M., Da Silva, M.C.H., Carneiro-Da-Cunha, M.G., Coimbra, M.A., Vicente, A.A., 2012. Interactions between κ -carrageenan and chitosan in nanolayered coatings - Structural and transport properties. *Carbohydr. Polym.* 87, 1081–1090. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.040>
- Ponce, A.G., Roura, S.I., del Valle, C.E., Moreira, M.R., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.013>
- Qin, Y., Chen, Q., Chen, Z., Xu, H., Fu, M., Li, S., Wang, H., Xu, M., 2012. Activating defense responses and reducing postharvest blue mold decay caused by *Penicillium expansum* in peach fruit by yeast saccharide. *Postharvest Biol. Technol.* 74, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.07.005>
- Qiu, M., Wu, C., Ren, G., Liang, X., Wang, X., Huang, J., 2014. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. *Food Chem.* 155, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.026>
- Quezada, J., Gutierrez, M., Debeaufort, F., 2003. Application of edible coatings to improve shelf-life of mexican guava. *Acta Hort.* 599, 589–594.
- Rajeswari, G., Murugan, M., Mohan, V.R., 2013. GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. bark (Linaceae). *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 29, 818–824.
- Ramaiah, A.K., Garampalli, R.K.H., 2015. In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Asian J. Plant Sci. Res.* 5, 22–27.

- Ramos-García, M., Bosquez-Molina, E., Hernández-Romano, J., Zavala-Padilla, G., Terrés-Rojas, E., Alia-Tejagal, I., Barrera-Necha, L., Hernández-López, M., Bautista-Baños, S., 2012. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 α in fresh tomatoes. *Crop Prot.* 38, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.016>
- Ramos-García, M.L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L.L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I., Estrada-Carrillo, M., 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28, 44–57.
- Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., 2008. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 313–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.010>
- Rodríguez-García, R., Rodríguez, D.J. De, Angulo-sánchez, J.L., 2002. Guayule Production: Rubber and Biomass Response to Irrigation. *Trends new Crop. new uses 1998*, 240–244.
- Rodríguez-Jasso, R.M., Mussatto, S.I., Pastrana, L., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. *Chem. Pap.* 68, 203–209. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0430-9>
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Bautista-Baños, S., Cruz-Triana, A., Rivero, D., 2012. Antifungal activity of *Acacia farnesiana* extracts on the in vitro growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Científica UDO Agrícola* 12, 91–96.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J.I., 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Res. Int.* 39, 840–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.002>
- Rodríguez García, R., Jasso de Rodríguez, D., Angulo-Sánchez, J.L., Dierig, D.A., Diaz Solís, H., De la Rosa-Loera, A., 2007. *Lesquerella fendleri* response to different sowing dates in northern Mexico. *Ind. Crops Prod.* 25, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.08.006>
- Rojas-Graü, M.A., Raybaudi-Massilia, R.M., Soliva-Fortuny, R.C., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Martín-Belloso, O., 2007. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 254–264.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.017>

- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- Rudra, J.S., Dave, K., Haynie, D.T., 2006. Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17, 1301–1315. <https://doi.org/10.1163/156856206778667433>
- Ruelas-Chacon, X., Contreras-Esquivel, J.C., Montañez, J., Aguilera-Carbo, A.F., Reyes-Vega, M.L., Peralta-Rodriguez, R.D., Sánchez-Brambila, G., 2017. Guar gum as an edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of roma tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Food Qual.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8608304>
- Ruíz-Martínez, J., Ascacio, J.A., Rodríguez, R., Morales, D., Aguilar, C.N., 2011. Phytochemical screening of extracts from some mexican plants used in traditional medicine. *J.Med.Plant.Res.* 5, 2791–2797.
- Sakamoto, K.-I., Sugimoto, K.I., Sudoh, T., Akio Fujimura, A., 2005. Different Effects of Imidapril and Enalapril on Aminopeptidase P Activity in the Mouse Trachea. *Hypertens Res.* 28, 243–247.
- Saladié, M., A. J. Matas, T. Isaacson, M. A. Jenks, S. M. Goodwin, K. J. Niklas, R. Xiaolin, J. M. Labavitch, K. A. Shackel, A. R. Fernie, A. Lytovchenko, M. A. O'Neill, C. B. Watkins and J. K. C. Rose. 2007. A Re-evaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.*144:1012-1028.
- Salazar, R., Pozos, M.E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M.C., Waksman, N., 2008. Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico. *Pharm. Biol.* 46, 166–170. <https://doi.org/10.1080/13880200701498952>
- Salvador, M.L., Jaime, P., Oria, R., 2002. Modeling of O₂ and CO₂ exchange dynamics in modified atmosphere packaging of Burlat cherries. *J. Food Sci.* 67, 231–235.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., 2010. Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *J. Food Eng.* 98, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.026>
- Sanchez-Gonzalez, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C.,

- Chafer, M., 2011. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.11.004>
- Serrano, M., Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., 2008. Post-harvest ripening of tomato. In: Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), *Tomatoes and Tomato Products*. Oxford & IBH Publishing, New Delhi, India, pp. 67–84
- Seymour, G. B., Taylor, J. E., Tucker, G. A., 1993. *Biochemistry of Fruit Ripening*, Chapman and Hall, London, UK.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., Ippolito, A., 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans* 30. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00111-X)
- Shelhammer, T. H., Krochta, J. M. 1997. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *J. Food Sci.*, 62, 390 – 394.
- Shrestha, A.K., Arcot, J., Paterson, J.L., 2003. Edible coating materials - Their properties and use in the fortification of rice with folic acid. *Food Res. Int.* 36, 921–928. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00101-7)
- Silva, H.D., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., 2015. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *J. Food Eng.* 167, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.037>
- Silva, M.P., Piazza, L.A., López, D., López Rivilli, M.J., Turco, M.D., Cantero, J.J., Tourn, M.G., Scopel, A.L., 2012. Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry* 77, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.09.020>
- Silva, M.P., Piazza, L.A., López, D., López Rivilli, M.J., Turco, M.D., Cantero, J.J., Tourn, M.G., Scopel, A.L., 2012. Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry* 77, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.09.020>
- Singh, C., Sharma, H.K., Sarkar, B.C., 2010. Influence of process conditions on the mass transfer during osmotic dehydration of coated pineapple samples. *J. Food Process. Preserv.* 34, 700–714. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00386.x>

- Sobral, P.J. a, Menegalli, F.C., Hubinger, M.D., Roques, M. a, 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin-based edible films. *Food Hydrocoll.* 15, 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)
- Sorrentino, A., Gorrasi, G., Vittoria, V., 2007. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.004>
- Sothornvit, R., Krochta, J.M., 2005. Plasticizers in edible films and coatings. *Innov. food Packag.* 30. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3>
- Sothornvit, R., Rhim, J.W., Hong, S.I., 2009. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. *J. Food Eng.* 91, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.026>
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Casariego, A., Lima, A.M.P., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2009. Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocoll.* 23, 2110–2115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.021>
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. The Use of Electric Fields for Edible Coatings and Films Development and Production: A Review. *Food Eng. Rev.* 2, 244–255. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9029-x>
- Souza, M.P., Vaz, A.F.M., Cerqueira, M.A., Texeira, J.A., Vicente, A.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2014. Effect of an Edible Nanomultilayer Coating by Electrostatic Self-Assembly on the Shelf Life of Fresh-Cut Mangoes. *Food Bioprocess Technol.* 8, 647–654. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1436-1>
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M.L., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 123–134. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7)
- Szöke, É., Máday, E., Gershenzon, J., Allen, J.L., Lemberkovics, É., 2003. Beta-eudesmol, a new sesquiterpene component in intact and organized root of chamomile (*Chamomilla recutita*). *J. Chromatogr. Sci.* 42, 229–233.
- Tanada-Palmu, P.S., Grosso, C.R.F., 2005. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Postharvest Biol. Technol.* 36, 199–208.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.12.003>

- Taşdelen, Ö., Bayindirli, L., 1998. Controlled atmosphere storage and edible coating effects on storage life and quality of tomatoes. *J. Food Process. Preserv.* 22, 303–320. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1998.tb00352.x>
- Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K., Kobaisy, M., 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *J. Chem. Ecol.* 27, 2263–2273. <https://doi.org/10.1023/A:1012283005014>
- Toğrul, H., & Arslan, N. (2004). Extending shelf-life of peach and pear by using CMC from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in emulsions. *Food Hydrocolloids*, 18, 215–226.
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., Delfio, M.A., Pérez-Gago, M.B., 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 872–900. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.485705>
- Van Hung, D., Tong, S., Tanaka, F., Yasunaga, E., Hamanaka, D., Hiruma, N., Uchino, T., 2011. Controlling the weight loss of fresh produce during postharvest storage under a nano-size mist environment. *J. Food Eng.* 106, 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.027>
- Vieira, J.M., Flores-López, M.L., de Rodríguez, D.J., Sousa, M.C., Vicente, A.A., Martins, J.T., 2016. Effect of chitosan-Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 116, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.01.011>
- Villaverde, J.J., Sevilla-mor, B., Pilar, S., 2013. Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No . 1107 / 2009 Carmen Lopez-Goti. <https://doi.org/10.1002/ps.3663>
- Wang, J.-F., Yang, S.-H., Liu, Y.-Q., Li, D.-X., He, W.-J., Zhang, X.-X., Liu, Y.-H., Zhou, X.-J., 2015. Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from *Croton tiglium*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.017>
- Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D.J., 2006. Functional materials in food nanotechnology. *J. Food Sci.* 71, 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>
- Wijesinghe, C.J., Wijeratnam, R.S.W., Samarasekara, J.K.R.R., Wijesundera, R.L.C., 2010. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an

- isolate of *Trichoderma asperellum*. *Biol. Control* 53, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.009>
- Wong-Paz, J.E., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M.L., López, L.I., Nevárez-Moorillón, G. V., Aguilar, C.N., 2015. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8, 104–111. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60299-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60299-6)
- Yahia, E.M., Guevara, J.C., Tijskens, L.M.M., Cedeño, L., 2005. The effect of relative humidity on modified atmosphere packaging gas exchange. *Acta Hortic.* 674, 97–104.
- Yang, X., Jiang, X., 2015. Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnol. Lett.* 37, 1463–1472.
- Zabka, M., Pavela, R., 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93, 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.076>
- Zapata, L., Gerard, L., Davies, C., 2007. Correlación matemática de índices de color del tomate con parámetros texturales y concentración de carotenoides. *Ciencia, docencia y ... XVIII*, 207–226
- Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., Serrano, M., 2008. Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1287–1293.
- 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. *LWT-Food Sci. Technol.* 41, 2159–2165.
- Zhang, H., Zheng, X., Wang, L., Li, S., Liu, R., 2007. Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries. *J. Food Eng.* 78, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.027>
- Zhong, Y., Li, Y., Haynie, D., 2006. Control of stability of polypeptide multilayer nanofilms by quantitative control of disulfide bond formation. *Nanotechnol.* 17, 5726–5734.