

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Estudio del efecto inhibitorio sobre *Penicillium expansum* en manzanas (*Malus doméstica*) con cubiertas de chíá (*Salvia hispánica*), empleando antifúngicos

Por:

María Lucía Estrada Moreno

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Estudio del efecto inhibitorio sobre *Penicillium expansum* en manzanas (*Malus doméstica*) con cubiertas de chía (*Salvia hispánica*), empleando antifúngicos

TESIS:

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presentado por:

María Lucia Estrada Moreno

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

ASESOR PRINCIPAL



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

VOCAL



MC. José Humberto Sánchez Robles

VOCAL



Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, octubre de 2013

"Nadie alcanza la meta con un solo intento, ni perfecciona la vida con una sola rectificación. Nadie camina la vida sin haber pisado en falso muchas veces... Nadie siente el amor sin probar sus lágrimas, ni recoge rosas sin sentir sus espinas. Nadie llega a la otra orilla sin haber ido haciendo puentes para pasar. Nadie consigue su ideal sin haber pensado muchas veces que perseguía un imposible. Nadie reconoce la oportunidad hasta que esta pasa por su lado y la deja ir. Pero nadie deja de llegar, cuando se tiene la claridad de un don, el crecimiento de su voluntad, la abundancia de la vida, el poder para realizarse y el impulso de DIOS. Nadie deja de arder con fuego dentro. Nadie deja de llegar cuando de verdad se lo propone. ¡Si sacas todo lo que tienes y estas con DIOS...Vas a llegar!" " Sé tú mismo el cambio que quieres ver en el mundo."

M.K. Gandhi

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades quiero decir "Padre Dios gracias por éste logro en el que me demostraste una vez más tu gran fidelidad, tu inmenso amor y tu infinita misericordia. Gracias amigo Jesús por ser mi guía en todo momento y haberme permitido llegar a la meta de éste gran proyecto".

Quiero extender mi agradecimiento a mi escuela, la *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro* "Mi alma matter", quién me abrigó en mi estancia en sus instalaciones, gracias por todos los conocimientos que he adquirido, me diste la gran oportunidad de formarme como profesionista pero sobre todo como una persona de grandes valores. Todos y cada uno de los recuerdos que me llevo estarán guardados en el fondo de mi corazón, y nunca terminare de agradecer de expresar el profundo orgullo que me da el pertenecer a esta institución y siempre llevare en alto el nombre de la "Bendita casa de estudios".

Quiero expresar mi agradecimiento a la *Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez* por creer en mí para la ejecución de éste proyecto, del cual me siento muy orgullosa de haber formado parte, y más aún por su asesoría en el desempeño del mismo muchas gracias por su paciencia y disposición para la realización de este trabajo. Gracias por sus conocimientos brindados, pero sobre todo gracias por su amistad brindada y gran paciencia en todo momento.

Agradezco sinceramente a la empresa *Biorganix, S.A* por hacerme copartícipe en la realización de su proyecto de investigación, especialmente al *M.C. José Humberto Sánchez Robles* gracias por la confianza depositada en todo lo necesario para la ejecución de este gran proyecto. Esperando que se hayan cubierto sus expectativas.

Quiero agradecer a la *Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez* por aceptar ser parte de éste equipo de trabajo en el desempeño de éste gran proyecto, su colaboración, y asesoría me sirvieron de mucho, pero sobre todo por su valiosa amistad.

Agradezco al *Ing. Gustavo López Guarín*, por su apreciable apoyo en el desarrollo de esta investigación, por su disponibilidad para tenerme en contacto continuo con la *Dra. Ana Verónica*, su esposa.

Agradezco, a la M.C María Hernández González por sus valiosos consejos como académico durante mi estancia en la universidad, por todos sus conocimientos aportados, mi respeto para usted.

Quiero agradecer a la M.C Xóchitl Ruelas Chacón, por sus conocimientos y apoyo brindados durante mi estancia en la universidad.

Mi agradecimiento para la Lío. Laura Olívía Fuentes Lara por haber sido parte de mi formación académica; por su afecto y comprensión en todo momento.

Agradezco al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, por sus conocimientos brindados como parte de mi formación académica y las facilidades en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, por sus valiosos consejos que sin duda me han servido a lo largo de mi estancia dentro de la universidad, por su comprensión en todo momento.

De igual forma mi agradecimiento al cuerpo de trabajo del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, al Dr. Antonio Aguilera Carbó, al Químico Oscar Noé Reboloso Padilla, a la Dra. Ma. de Lourdes Morales Caballero a las y los encargados de los laboratorios, sin duda sin su apoyo éste logro no sería posible.

Agradezco también a mis profesores del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 128, de Fresno Nichi; Nicolás Cruz Rodríguez, Ing. Silvano, Ing. Enrique, T.I. Ma. de los Ángeles Gallardo, Lío. Ever Paniagua, Dr. Marco Antonio Granados, Ing. Rafael Duran, M.V.Z Gabriel Ramón, Ing. Efrén Rodríguez, Ing. Isael Duran; sus conocimientos y consejos en mi formación media superior fueron de vital importancia para la culminación de mis estudios profesionales, su presencia en mi vida ha sido muy importante.

A los docentes que contribuyeron en mi formación académica en la Escuela Secundaria Técnica Agropecuaria No. 016 "Dr. Gustavo Baz Prada"; Benito, Josefa, Abel, Joel, Raquel, Jesús, Ma. del Carmen; sus consejos y motivación en mi etapa de adolescente fue de mucha ayuda en mi formación, sus conocimientos y consejos me son de mucha utilidad, gracias por impulsarme a ser cada día mejor.

A mis profesores de la Escuela Primaria "Gral. Álvaro Obregón", Efrén López, Gregorio Sánchez, Balbina Reyes, Joel, Estela Moreno; Pedro Garay; ustedes fueron uno de los pilares de mi formación académica, gracias por su entrega en mi aprendizaje.

A mi amiga *Marilú Hernández Bautista*, sabías que lo que me gusta de tu amistad es que no dejas que me engañe y siempre me dices las cosas tal y como son, siempre necesitare de una amiga como tú" gracias por tu apoyo incondicional en todo momento.

A *Lorena Cozar Huítrón*, por tu valiosa amistad en mi estancia en la universidad, por tu apoyo, una amiga como tú, es fácil de encontrar, difícil de encontrar, fácil de querer y difícil de olvidar"

A mis amigos compañeros de la generación XVIII de la Carrera Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos: *Raúl Alejandro Ramos, Angélica Reyes, Lidia Álvarez, Selene Vidal, Dinora Espinoza, Ulises Solís, Luis B. Pérez, Antonio Mena, Miguel Jahuey, Salvador Vega Alejandra Prado, Alejandra Aguilar, Ruth Betsabe Cubas, Mary y Ana Gaby Victorino, Leticia Vilchis, Modesta Herrera, Ma. del Pilar Estrada, Joaquín Hernández, Fabián Hernández, Brenda Lizeth Ramírez, Marlen Ramírez, Laura Salas, Karen Trejo, Anayeli Jiménez, Jazmín Mendoza, A. Karen Clemente, Laura Bonifaz, Catalina de Jesús, Karol Himelda, Janeth Alejandra Acosta, Pamela Gamboa, Ana Pamela Fonseca, Luis Eduardo Pérez, María Elena Velázquez, Ivón Velázquez, Rosibel Ramírez*, gracias por compartir conmigo ésta etapa de nuestras vidas.

Agradezco a *Cristal Guerra (Cris)* y *José Antonio Ahumada (Tony)*, por brindarme su amistad, por su apoyo en la realización de éste logro, y por todos los momentos compartidos en mi estancia dentro de la universidad, "gracias chicos".

Agradezco a las amigas de la residencia femenil Hidalgo, a *Claudia Marín, María Sánchez, Teresa Rebollar, Alejandra, Angélica Flores Hernández, Rocío Escorcía Casas, Diana Belén Villa, Brenda Nayeli Vázquez*, por su valiosa amistad en mi estancia dentro de la universidad, por todos los momentos agradables que pasamos juntas y por todo el apoyo brindado.

Dedicatorias

A Dios

A ti padre todopoderoso porque nunca me abandonas, aun cuando siento que ya no puedo, siempre me muestras una salida, ante cualquier adversidad, por ayudarme a cumplir un sueño más en mi vida, gracias Dios por tantas bendiciones, alegrías, tristezas, encuentros, desencuentros, y todo lo que he vivido durante mi estancia en este maravilloso lugar.

Con todo mi respeto, amor, cariño y admiración

A mis padres: Sr. Domingo Estrada Avelino y Sra. María Lilia Moreno Vilchís

Gracias por brindarme la dicha de traerme al mundo, no encuentro las palabras para agradecerles todo lo que me han dado. A través de este medio quiero expresarles que éste logro es de ustedes, ya que nunca me cansare de pagarles todo lo que me han dado. Como olvidar que muchas veces se quitaron el pan de la boca para que mis hermanos y a mí no nos faltara nada. Dios no pudo darme mejores padres que ustedes, gracias por ser los mejores padres del mundo. ¡Los amo papás!

A mi hermana: Ma. Isabel Estrada Moreno

Hermanita, siempre has sido mi ejemplo a seguir, te admiro tanto, por ser una mujer fuerte que supo sacar adelante su familia a pesar de la corta edad que tenías, eres una gran mujer hermana, tu apoyo incondicional en todo momento, tus consejos y sobre todo gracias por creer y confiar en mí ihermanita eres mi confidente! .

A mi hermano: Israel Estrada Moreno

Porque eres de esas personas que ayudan sin esperar nada a cambio. Por todo lo que has logrado, eres el mejor ejemplo de superación, te agradezco por tu confianza, por contarme tus penas. Te quiero mucho hermanito, sin tu amistad y tu apoyo éste logro no habría sido posible.

A mi hermano: *Bonifacio Estrada Moreno*

Te agradezco por apoyarme, por tu buen humor en todo momento, por todos los momentos graciosos que pasamos juntos riéndonos por cualquier ocurrencia, gracias hermanito, por tu palabras de aliento en todo momento, y aunque la vida nos ponga retos que enfrentar siempre hay que mostrar fuerzas para salir adelante.

A mi hermano: *José Luis Estrada Moreno*

Hermanito como ha pasado el tiempo y vaya que hemos crecido, y más aún que no te he visto, pero los bonitos recuerdos de cuando éramos niños no se olvidan aunque estoy segura que sigues siendo bien enojón. Te quiero mucho.

A mi hermano: *Jesús Estrada García*

Hermano, tus palabras de aliento en todo momento me son de vital importancia en el desempeño de mis objetivos, así como tu apoyo moral en cada situación.

A mi hermana: *Guillermína Olmos Moreno*

Hermana, gracias por todo tu apoyo, eres un gran ejemplo a seguir, ya que demostraste que no hay obstáculos que impidan realizar nuestros sueños si hay disposición para realizarlos, y a pesar de que no nos frecuentamos mucho, te quiero mucho y aprecio lo que has hecho por mí.

A mi hermana: *Florentina Olmos Moreno*

Hermana, tu fortaleza para sacar adelante sola a tus hijos es un gran ejemplo de vida que no das marcha atrás, eres una mujer valiente, y por eso te estimo mucho.

A mi hermano: *Pedro Estrada García*

Eres mi hermano mayor y por eso te debo respeto, aunque hace falta más cercanía a la familia, aun así, a pesar de tu carácter y actitud, te aprecio hermano.

A mis abuelitos:

Tomasa Avelino (+) y Daniel Estrada (+)

Severiana Vilchís y Román Moreno (+)

Gracias por ser las personas, fuentes de mi inspiración y ejemplos a seguir, los adoro, saben su fortaleza me ha ayudado en todo momento y aunque algunos de ustedes ya no están con nosotros, su recuerdo vive en nuestro corazón.

A mis sobrinos (as)

Vicente (Chente), Efraín (Efra), Gabriel (Gaby), Jesús, Araceli (Chely), Melissa (Meli), Ulises (Uli), Vaneli (Vane), Iris, Yelmí, Jacibe (Jacy), Jonathan, Pedro, Antonio (Toño), Guadalupe (Lupita), Gloria (Goyís), Ana Lucía, Yolanda. Ustedes son la alegría de la casa, el motivo de orgullo de sus padres, ilos adoro!

A mis cuñados (as) Gabriel Ramón, María Isabel Arteaga, Elizabeth Salgado, Isael Duran, Rufina Quintana, Lucía Arteaga, Gilberto Duran; su apoyo incondicional directo e indirecto a través de mis hermanos contribuyo al logro de este objetivo, gracias por ser parte de mi familia.

A mi novio: Roberto Ramírez Ramírez

Te agradezco porque apareciste en mi vida cuando menos lo esperaba y me has enseñado muchas cosas, eres un gran ser humano, aunque no me creas, me has enseñado a no tener miedo y ser valiente. Gracias amor por el tiempo que compartes a mi lado, por decirme las cosas como son y aunque llevamos poco tiempo conociéndonos, eres importante en mi vida. Te amo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
----------------------	----------

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN	3
------------------------------	----------

1.1 Antecedentes.....	3
-----------------------	---

1.2 JUSTIFICACIÓN	6
-------------------------	---

1.3 Hipotesis.....	7
--------------------	---

1.4 Objetivo general	7
----------------------------	---

1.4.1 Objetivos particulares	8
------------------------------------	---

CAPITULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA	9
--	----------

2.1 Chía (Salvia hispánica).....	9
---	----------

2.1.1 Antecedentes	9
---------------------------------	----------

2.1.2 Características botánicas	9
---------------------------------------	---

2.1.3 Fruto de chía	10
---------------------------	----

2.1.4 Mucílago.....	12
---------------------	----

2.1.5 Composición y valor nutricional.....	14
--	----

2.1.5.1 Fuente de ácidos grasos esenciales.....	14
---	----

2.1.5.2 Fuente de antioxidantes.....	15
--------------------------------------	----

2.1.5.3 Fuente de Proteínas y Aminoácidos	16
---	----

2.1.5.4 Fuente de vitaminas y minerales	17
---	----

2.1.6 Usos y aplicaciones.....	17
2.1.7 Origen y distribución nacional	18
2.2 Películas y recubrimientos: Definición y aplicación	19
2.2.1 Materiales empleados en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles	20
2.2.1.1 Polisacáridos	20
2.2.1.2 Quitina.....	20
2.2.1.2.1 Quitosano (quitosán).....	21
2.2.1.2.2 Mecanismo de acción antibacteriana del quitosano.....	22
2.2.1.2.3 El quitosano como recubrimiento	23
2.2.1.2.4 Los mucílagos	24
2.2.1.3 Proteínas	24
2.2.1.4 Lípidos y resinas.....	25
2.2.1.5 Otros ingredientes.....	25
2.2.2 Tecnologías para la aplicación de recubrimientos y películas comestibles	26
2.3 Agentes patógenos en frutas.....	27
2.3.1 Penicillium expansum.....	27
2.3.1.1 Morfología.....	28
2.3.1.2 Propagación.....	29
2.3.1.3 Sintomatología.....	29
2.3.1.4 Inhibición del crecimiento de Penicillium expansum.....	29
2.4 Agentes antimicrobianos	30
2.4.1 Agentes antimicrobianos naturales en los alimentos.....	30
2.4.1.1 Agentes antimicrobianos naturales.....	31
2.4.1.1.1 Clasificación de antimicrobianos naturales por su origen:	31
2.4.2 Plantas con acción antimicrobiana	32
2.4.2.1 Grupos más comunes de compuestos que presentan acción antimicrobiana proveniente de plantas	32
2.4.2.2 Modo de acción de los productos derivados de las plantas	35
2.5 Ajo	36

2.5.1	Generalidades	36
2.5.2	Variedades	36
2.5.3	Distribución geográfica del ajo	37
2.6	Gobernadora	38
2.6.1	Descripción botánica	38
2.6.2	Distribución geográfica	39
2.6.3	Constituyentes fotoquímicos	40
2.6.4	Etnobotánica y antropología.....	41
2.6.5	<i>Propiedades antifúngicas in vitro de L. tridentata</i>	42
2.7	Clavo (<i>Zyzygium aromaticum</i>).....	43
2.7.1	Descripción botánica	43
2.7.2	Generalidades del clavo.....	43
2.7.3	Principios activos del clavo (<i>Zyzygium aromaticum</i>)	45
2.7.4	Usos y aplicaciones del clavo de olor (<i>Zyzygium aromaticum</i>)	46
2.7.5	Actividad antifúngica	46
2.8	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	48
2.8.1	<i>Descripción</i>	48
2.8.2	<i>Distribución</i>	48
2.8.3	<i>Usos de la higuerilla</i>	49
2.8.4	<i>Actividad biológica de la higuerilla</i>	49
2.9	Aplicación de aceites esenciales en recubrimientos comestibles.....	50
2.9.1	...Aplicación de la combinación quitosano y aceites esenciales y su efecto en el control de microorganismos.....	50
2.10	Antimicóticos más usados a nivel comercial	50
2.10.1	Fungicidas de uso agrícola.....	51

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS53

Etapa experimental 1. Producción de películas comestibles a base de mucílago de chíá

3.1 Elaboración de películas comestibles.....53

3.1.1 Obtención del mucílago de Chíá (*Salvia hispanica*).....53

3.1.3 Elaboración de películas comestibles54

Etapa experimental 2. Efecto inhibitorio de antifúngicos sobre sobre *Penicillium expansum*

3.2 Material biológico.....54

3.3 Mantenimiento y proliferación de las cepas.....55

3.3.1 Preparación de medio de cultivo sólido.....55

3.3.2 Crecimiento en medio sólido (Siembra en cajas de Petri por la técnica de punción)56

3.4.1 Tinción simple con azul de metileno.....56

3.4.2 Observación con KOH al 10% (Hidróxido de potasio).....57

3.5 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento en *P. expansum* empleando extractos de ajo, gobernadora, clavo, higuera, steribox comercial y oligosacáridos de quitosán.....57

3.5.1 Selección de agentes antimicrobianos57

3.5.2 Cinéticas de Inhibición cuantitativa de crecimiento de *Penicillium expansum*, con inhibidores de crecimiento58

3.5.2.1 Preparación de medio envenenado.....59

3.5.2.2 Siembra de *P. expansum* en medio envenenado59

3.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los inhibidores de crecimiento.59

Etapa experimental 3. Actividad de la cubierta comestible a base de mucílago de chíá (*S. hispánica*) sobre manzanas *Golden delicious*.

3.6.2 Obtención de los frutos61

3.6.3	Tratamientos aplicados a la manzanas (<i>Golden delicious</i>)	62
3.6.4	Agrupación y clasificación de los frutos	63
3.6.6	Inoculación de microorganismos.....	64
3.6.7	Almacenamiento de los frutos con los recubrimientos comestibles	64
3.6.8	Evaluaciones efectuadas a los tratamientos	65
3.6.8.1	<i>Pérdida de peso</i>	65
3.6.8.2	Cambios de apariencia	65
3.6.8.3	<i>Daños efectuados a los frutos por la acción de Penicillium expansum</i>	65
3.6.9	Diseño Estadístico	65
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
	Etapa Experimental 1. Producción de películas comestibles a base de mucílago de chía	
4.1.1	Obtención del mucílago de chía.....	66
4.1.2	Formulación de películas comestibles	67
	Etapa experimental 2. Efecto inhibitorio de extractos vegetales sobre <i>Penicillium expansum</i>	
4.2	Material biológico.....	68
4.2.1	Mantenimiento y proliferación de las cepas.....	68
4.2.1.1	Crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> en medio sólido PDA.....	69
4.2.2	Evaluación macroscópica de <i>Penicillium expansum</i>	70
4.2.3	Evaluación microscópica de la cepa	70
4.2.3.1	Tinción simple con azul de metileno	70
4.2.4	Observación con KOH (Hidróxido de potasio).....	71
4.3	Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento en <i>P. expansum</i> empleando extractos de ajo, gobernadora, clavo, higuera, steribox comercial y oligosacáridos de quitosán, usando concentraciones de 0.25%, 0.5%, y 1%.....	71

4.3.1.1 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de Clavo (<i>Zizigyum aromaticum</i>).....	72
4.3.1.2 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	73
4.3.1.3 Cinéticas de inhibición de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de ajo (<i>Allium sativum</i>).....	75
4.3.1.4 Cinéticas de inhibición de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de higuera (<i>Ricinus communis</i>).....	77
4.3.1.5 Cinéticas de inhibición de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> empleando Steribox Comercial.....	78
4.3.1.6 Cinéticas de inhibición de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> , empleando Oligosacáridos de Quitosán de diferentes tiempos de hidrólisis (8, 12, 16 y 20 hrs).....	80
4.3.2 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)	83
4.3.2.1 Determinación de la CMI de <i>Penicillium expansum</i> con extracto de clavo (<i>Zizigyum aromaticum</i>).....	83
4.3.3 Determinación de la CMI de <i>Penicillium expansum</i> , con extracto de Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	84
4.3.4 Determinación de la CMI, de <i>Penicillium expansum</i> con extracto de ajo (<i>Allium sativum</i>)	85
4.3.5 Determinación de la CMI de <i>Penicillium expansum</i> , con extracto de Higuera (<i>Ricinus communis</i>)	86
4.3.6 Determinación de la CMI de <i>Penicillium expansum</i> , con antifúngico de Steribox comercial	86
4.3.7 Determinación de la CMI de <i>Penicillium expansum</i> con oligosacáridos de quitosán a diferentes tiempos de hidrólisis (OQ8 h, OQ12h, OQ16h, y OQ20h).....	88
Etapa experimental 3. Actividad de la cubierta comestible a base de mucílago de chíá (<i>S. hispánica</i>) sobre manzanas <i>Golden delicious</i> .	
4.4 Actividad de la cubierta comestible a base de mucílago de chíá (<i>S. hispánica</i>) sobre manzanas <i>Golden delicious</i> (<i>malus doméstica</i>).....	90
4.4.1 Efecto de los recubrimientos a base de mucílago de chíá (<i>S. hispánica</i>)	90

4.4.1.1 Pérdida de humedad.....	90
4.4.1.2 Cambio de apariencia	92
5. CONCLUSIONES	97
6. PERSPECTIVAS	99
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8. ANEXOS.....	104

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de <i>salvia hispánica</i> a) planta de chía y b) semilla de chía.	10
Figura 2. Micrografías obtenidas por SEM de núculas de chía; (A) Sección longitudinal, estructura interna (x187), P: pericarpio; T: testa; E: endosperma; C: Cotiledones; B: Vista lateral (x145); C: superficie del pericarpio (x1500); D: Sección transversal del pericarpio (x 3000), c: cutícula; epi: epicarpio; meso: mesocarpio; la: capa de esclereidas; endo: endocarpio.....	11
Figura 3. Micrografías obtenidas por SEM de núculas de chía hidratadas durante diferentes tiempos (x80); E: 5; F: 15; G: 30 y H: 60 minutos.....	12
Figura 4. Forma de acción de los recubrimientos y películas comestibles.....	19
Figura 5. Estructura química del quitosano, donde da es el grado de acetilación.....	21
Figura 6. Estructuras macroscópicas y microscópicas de <i>Penicillium expansum</i> (a y b), y <i>Botrytis cinerea</i> (c y d).....	34
Figura 7. Apreciación de las variedades de ajo.....	37
Figura 8. a) descripción ilustrativa de la planta de ajo, así como b) las partes del bulbo.....	38
Figura 9. Follaje de un arbusto de gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>) donde se aprecian algunas características distintivas de las hojas bifoliadas, flores, y los frutos con su cubierta vellosa.	39
Figura 10. Botón floral de la planta de clavo	44

Figura 11. a) Semilla de Clavo de olor en seco, y b) Semilla de clavo verde aun en la planta.....	44
Figura 12. Estructura de los principales componentes químicos del clavo: a) Eugenol, b) β -cariofileno, c) α - humuleno, y d) Eugenil acetato	45
Figura 13 a) Planta de higuierilla <i>R. communis</i> con sus frutos y, b) Hoja higuierilla	49
Figura 14. Secado de las películas en estufa de secado a 38°C.....	54
Figura 15. Preparación del medio de cultivo, a) y llenado de las cajas petri, b).....	55
Figura 16. Siembra por la técnica de punción, utilizando asa micológica estéril sobre la superficie de un agar en caja de petri.....	56
Figura 17. Imagen de los extractos vegetales, proporcionados por Biorganix Mexicana, ubicada en Ramos Arizpe, Coahuila	57
Figura 18. Imagen de los oligosacáridos de quitosán en buffer de ácido acético - acetato de sodio a diferentes pesos moleculares y tiempos de fermentación.	58
Figura 19. Inoculación de las cajas con medio envenenado, usando la técnica de punción; a) extracción del inóculo, b) Siembra por punción en caja Petri con medio envenenado.	59
Figura 20. Preparación del medio envenenado; a) Adición del inhibidor a la solución PDA, y b) Vertido del medio en las cajas Petri.	61
Figura 21. Selección de los frutos a), lavado b), y desinfección c).....	62
Figura 22. Inmersión de los frutos en la solución de mucílago de chíá (<i>Salvia hispanica</i>) y cada uno de los inhibidores de crecimiento.....	64
Figura 23. Frutos inoculados a) y almacenados a temperatura ambiente (23-25°C); b).....	64
Figura 24. Obtención del mucílago de chíá; hidratación a), mucílago centrifugado b), mucílago listo para usarse c).....	66
Figura 25. Películas de mucílago de chíá, con 1% de plastificante, CaCl ₂ al 0.2%, y diferentes concentraciones de mucílago a) 10%, b) 30% / 40 ml vol., c) 25%/50 ml vol., d)24%/60ml, e) 21%/30ml, f) 30% /30 ml vol., g) 22%/50 ml vol., h) 28%/ 30 ml vol., i)20%/40 ml vol.....	68
Figura 26. Curva de crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> en agar PDA.	69

Figura 27. Morfología macroscópica de <i>Penicillium expansum</i> en agar PDA	70
Figura 28. Estructura interna de <i>Penicillium expansum</i> a) conidióforos, b) esporas	70
Figura 29. Morfología de <i>Penicillium expansum</i> en microscopio electrónico a 40X.	71
Figura 30. Curva de inhibición de <i>P. expansum</i> en medio envenenado de clavo (<i>Zyzygium aromaticum</i>).....	72
Figura 31. Curvas de inhibición de <i>P. expansum</i> en medio envenenado de concentraciones de extracto de gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).	74
Figura 32. Curvas de inhibición de <i>P. expansum</i> en medio envenenado de concentraciones de extracto de ajo (<i>Allium sativum</i>)	76
Figura 33. Curvas de inhibición de <i>P. expansum</i> en medio envenenado de concentraciones de extracto de higuera (<i>Ricinus comunis L.</i>).	78
Figura 34. Curvas de inhibición de <i>P. Expansum</i> en medio envenenado de concentraciones de antifúngico Steribox comercial A. C.	79
Figura 35. Curvas de inhibición de <i>P. expansum</i> en medio envenenado de concentraciones de oligosacáridos de quitosán a) 8h, b) 12h, c) 16h y d) 20h de fermentación.....	82
Figura 36. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>P. expansum</i> en medio envenenado (clavo + agar PDA) a) 0.1%, b) 0.15% y c) 0,2% a 264 hrs de incubación.	84
Figura 37. Crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> en medio envenenado a una concentración de 0.53 como valor CMI a) , y agar PDA b)	85
Figura 38. Crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> en medio envenenado usando <i>Allium sativum</i> como antifúngico a una concentración de 0.19 como valor CMI a) , y agar PDA b)	85
Figura 39. Crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> en medio envenenado usando <i>Ricinus comunis</i> como antifúngico a una concentración de 0.55% como valor CMI a) , y agar PDA b)	86
Figura 40. Imágenes de crecimiento de <i>P. expansum</i> en medio envenenado, usando Steribox A.C como inhibidor de crecimiento para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en diferentes concentraciones de 0.1% a) , 0.15% b) y 0.2% c)	87
Figura 41. Determinación de la CMI de <i>Penicillium expansum</i> usando Oligosacáridos de quitosán diferentes tiempos de hidrólisis como inhibidor del crecimiento durante 264 hrs de incubación a 26° C. a) OQ8h, b) OQ12h, c) OQ16h, d) OQ20h, y e) control..	89
Figura 42. Porcientos de las pérdidas de peso de los frutos con daño y sin daño durante 5 semanas de tratamiento..	91
Figura 43. Porcentaje de daños de <i>Penicillium expansum</i> en los tratamientos.	94

Figura 44. Frutos inoculados durante 5 semanas de observación; evaluación a) SCA, b) CC, c) CcA-Cl, d) CcA-Go e) CcA-Aj, f) CcA-Hi, g) CcA-St, h) CcA-OQ8h, i) CcA-oq12H, J) CcA-OQ16h, k) CcA-OQ20h.	95
Figura 45. Firmeza de los frutos al término del periodo de evaluación a) SCA, b) CC, c) CcA-Cl, d) CcA-Go e) CcA-Aj, f) CcA-Hi, g) CcA-St, h) CcA-OQ8h, i) CcA-oq12H, J) CcA-OQ16h, k) CcA-OQ20h.....	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tendencias de los consumidores que tienen impacto directo en la tecnología y conservación de alimentos	3
Cuadro 2. Composición de los ácidos grasos de la chía, lino, pez, menhaden (<i>Brevoortia tyrannus</i>).....	14
Cuadro 3. Clasificación de aminoácidos esenciales y no esenciales en la semilla de chía.	16
Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de quitosano en el control de varios hongos post- cosecha importantes en la producción hortofrutícola.....	22
Cuadro 5. Aplicaciones del quitosano en la industria de alimentos.....	23
Cuadro 6. Ejemplo de recubrimientos usados en frutas.....	27
Cuadro 7. Clasificación taxonómica de <i>Penicillium expansum</i>	28
Cuadro 8. Enfermedades de post-cosecha más importantes para manzanas y peras.	30
Cuadro 9. Principales constituyentes fotoquímicos de <i>Larrea tridentata</i>	40
Cuadro 10. Concentración de los componentes usados en el recubrimiento.	54
Cuadro 11. Inhibidores de crecimiento para <i>Penicillium expansum</i>	58
Cuadro 12. Rangos de concentraciones a evaluar de los extractos	60
Cuadro 13. Diseño de los tratamientos	62
Cuadro 14. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de clavo (<i>Zyzygium aromaticum</i>) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%	73
Cuadro 15. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de gobernadora (<i>L. tridentata</i>) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%.	75
Cuadro 16. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de ajo (<i>A. sativum</i>) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%......	77
Cuadro 17. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de higuera (<i>R. comunis</i>) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%.	78

Cuadro 18. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de <i>Penicillium expansum</i> empleando extracto de steribox a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%.	79
Cuadro 19. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de <i>P. expansum</i> a diferentes concentraciones de oligosacáridos de quitosán a 8, 12, 16 y 20 horas de hidrólisis .	82
Cuadro 20. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Zyzigium aromaticum</i> ...	84
Cuadro 21. Determinación de la CMI de Steribox comercial.....	87
Cuadro 22. Valores de Concentraciones mínimas Inhibitorias de los Inhibidores de crecimiento	89
Cuadro 23. Pérdidas de peso en porciento de los frutos tratados.....	91
Cuadro 24. Valores de pérdida de firmeza de los tratamientos.....	94

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas del proyecto “Desarrollo y transferencia de tecnología para el control de patógenos post- cosecha en fruto de manzana (*Malus domestica*) como cultivo modelo”, con clave **ECO 2010-01-148092**.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional y Tecnología bajo la convocatoria de proyectos de Economía 2012.

Los colaboradores de esta investigación son:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

M.C. José Humberto Sánchez Robles

Dr. Jesús Alonso Sánchez

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

RESUMEN

Hoy en día existe una fuerte demanda sobre alimentos más sanos y elaborados a partir de fuentes naturales, como consecuencia esto ha conducido al desarrollo de tecnologías que prolonguen la vida de anaquel de los productos en condiciones óptimas para el consumo humano, y que conserven la integridad del alimento, es así como en los últimos años ha existido una búsqueda y revalorización de sustratos provenientes de fuentes naturales que presenten constituyentes y/o productos derivados aplicables al desarrollo de alimentos, los cuales incidan en la nutrición mediante el aporte simultáneo de efectos benéficos para la salud.

En los últimos años ha existido una búsqueda y revalorización de sustratos provenientes de fuentes naturales que presenten constituyentes y/o productos derivados aplicables al desarrollo de alimentos, los cuales incidan en la nutrición mediante el aporte simultáneo de efectos benéficos para la salud.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio de *Penicillium expansum* en manzana (*Malus domestica*) como fruto modelo, usando un recubrimiento a base de mucílago de chía (*Hiptys suaveolens*) y diferentes extractos vegetales de *Larrea tridentata*, *Ricinus communis*, *Zizygyum aromaticum*, *Allium sativum*, Oligosacáridos de quitosán a diferentes tiempos de hidrólisis (8, 12, 16, 20 h) y Steribox comercial,

La actividad antifúngica *in vitro* del crecimiento de *Penicillium expansum* se determinó efectuando cinéticas de crecimiento en medio sólido, empleando medio envenenado con concentraciones de 0.25%, 0.5% y 1%. Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los antimicrobianos.

Penicillium expansum mostró sensibilidad al ser evaluado por cada uno de los antimicrobianos, inhibiéndose su crecimiento radial, y disminuyendo su velocidad específica de crecimiento teniendo que *Zizygyum aromaticum*, y Steribox comercial ejercen efecto fungicida al observarse una inhibición del 100% a una CMI de 0.2% en ambos casos, mientras que los oligosacáridos de quitosán de alto peso molecular presentaron una inhibición del 32% en el

caso de los oligosacáridos de 8 hrs de hidrólisis a una CMI de 0.55%, y para los oligosacáridos de 12 hrs de hidrólisis se tiene una inhibición del 30% a una CMI de 0.7%.

Se buscó una formulación para una película a base de mucílago de chía (*Hyptis suaveolens*) en el que la formación de ésta película se generó a partir de una concentración de 20%, usando diversas concentraciones a partir de ésta concentración hasta 30% hasta obtener la película con las características deseadas, encontradas a una concentración de 30%; una vez que se encontró dicha formulación, ésta se unió con cada uno de los antimicrobianos, para ver el efecto que se ejerce sobre los frutos de manzana.

Al evaluar la vida de anaquel de los frutos con el recubrimiento comestible más los antimicrobianos e inoculados con esporas de *Penicillium expansum*, almacenados durante cinco semanas a temperatura ambiente, se observa que éstas manzanas se mantienen durante este tiempo con las características para su consumo en comparación con los frutos que no se le aplicó, ya que no hubo indicio del crecimiento de éste patógeno.

Palabras clave: *Penicillium expansum*, CMI, chía, recubrimiento comestible, antimicrobiano, cinética de inhibición

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Hoy en día, existe una fuerte demanda sobre alimentos más sanos y elaborados a partir de fuentes naturales, como consecuencia esto ha conducido al desarrollo de tecnologías que prolonguen la vida de anaquel de los alimentos para el consumo humano. Estas tecnologías tienen la finalidad de prolongar la vida de anaquel de los productos en condiciones óptimas para el consumo, así como mantener sus propiedades nutrimentales, físico- químicas; ya que el incremento de alimentos naturales actualmente tiene un aumento en su demanda a nivel mundial como se aprecia en el cuadro 1 (Saucedo- Pompa, 2007; Ochoa, 2009).

Cuadro 1. Tendencias de los consumidores que tienen impacto directo en la tecnología y conservación de alimentos.

Tendencias Actuales	Características
Convenientes de alta calidad	Fáciles de almacenar con vida útil satisfactoria
De procesos menos severos	Calentamiento menos intenso y daño mínimo
Con menos aditivos artificiales	Uso de antimicrobianos naturales, timol, carvacrol, eugenol, etc.
Más frescos	Uso de congelación
Más saludables	Con menos grasas saturadas y menos cantidad de azúcar

Fuente: (Welti, 1997).

En los últimos años ha existido una búsqueda y revalorización de sustratos provenientes de fuentes naturales que presenten constituyentes y/o productos derivados aplicables al desarrollo de alimentos, los cuales incidan en la nutrición mediante el aporte simultáneo de efectos benéficos para la salud. En ese contexto se encuentra la chía (*Salvia hispánica*), especie vegetal originaria del sudeste de EE.UU y noroeste de América Central (México, Guatemala). Los pueblos asentados en esas regiones han consumido las semillas de este cultivo desde épocas precolombinas habiendo constituido un elemento básico de la dieta de los

pueblos azteca y del oeste norteamericano. En nuestro país, su creciente expansión en las provincias del noroeste puede representar un aporte tendiente a la diversificación de la producción agrícola, con el consecuente impacto socioeconómico en dicha región. Así, las cualidades nutricionales de la semilla de chía y de los productos derivados de la misma han comenzado a ser revalorizados dado su elevado contenido de ácidos grasos ω -3, fibra dietaria, proteínas y antioxidantes, ofreciendo una nueva oportunidad para mejorar la nutrición humana.. En los últimos años, se ha registrado un incremento en la búsqueda de fuentes vegetales subutilizadas, a partir de las cuales puedan obtenerse aceites con una elevada proporción de ácidos grasos de alto valor nutricional (De la Cruz y García, 2007).

El interés por la chía resurgió a finales del siglo pasado, ya que se encontró que posee un elevado contenido de aceite (32%). Además de ser buena fuente de proteína (18%) y fibra cruda (24%), el mucilago de la semilla resulta útil como aditivo alimenticio, entre otras características (Bushway *et al.*, 1981; Beltran- Orozco y Romero, 2003).

El mucílago de chía, carbohidrato complejo de alto peso molecular (Lin y Daniel, 1994), es un componente importante de la semilla por su potencial importancia fisiológica. Este mucílago emerge de la semilla cuando entra en contacto con agua, constituyendo un hidrocoloide con potencial uso como agente espesantes en la industria de alimentos y farmacéutica.

Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz continua, delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo de una solución formadora del recubrimiento (García- Ramos *et al.*, 2010). Por otra parte una película comestible (PC) es una matriz preformada, delgada, que posteriormente será utilizada en forma de recubrimiento o estará ubicada entre los componentes del mismo. Dichas soluciones formadoras de PC o RC pueden estar conformada por compuestos de un polisacárido, un compuesto de naturaleza proteica, lipídica o por mezcla de los mismos (Krochta *et al.*, 1994; Avendaño, 2010). Al igual que los RC, las PC poseen propiedades mecánicas, generan efecto barrera frente al transporte de gases, y pueden adquirir diversas propiedades funcionales dependiendo de las características de las sustancias encapsuladas y formadoras de dichas matrices (Vásconez *et al.*; 2009; Avendaño, 2010).

Las películas y recubrimientos comestibles, se han usado desde el siglo XII en China. En Inglaterra, en el siglo XVI, se cubrían alimentos con grasa para prevenir la pérdida de humedad (Hardenburg, 1967; Avendaño, 2010). En 1930, en Estados Unidos, se utilizaba cera caliente para cubrir frutas cítricas y emulsiones aceite- agua para cubrir frutas frescas y vegetales. A partir de 1950 hay reportes en la literatura de películas hechas a base de polisacáridos, proteínas, lípidos y mezclas, las más exitosas fueron las películas hechas a base de lípidos (monoglicéridos acetilados, ceras y surfactantes) y se usaron para bloquear la transferencia de humedad, reducir la abrasión superficial durante la manipulación y controlar el escaldado en manzanas (Keshner y Fennema, 1998; Avendaño, 2010).

Los hongos patógenos causan considerables pérdidas en frutas y verduras en etapa de post-cosecha (Wills *et al.*, 2007). La fruta, debido a su bajo pH y alto contenido de humedad, son altamente susceptibles al ataque de diversos hongos, los cuales, además de causar pudriciones, pueden producir micotoxinas, lo que hace a la fruta no apta para su consumo (Moss, 2002; Wills *et al.*, 2007). Es difícil determinar la magnitud de las pérdidas de post-cosecha debido a pudriciones, sin embargo, son significativas y varían ampliamente según el producto (Agrios, 2005; Wills *et al.*, 2007).

En años recientes se ha incrementado el interés en el uso de extractos naturales vegetales como alternativas para el control de microorganismos patógenos al hombre. El uso de antimicrobianos en alimentos está cambiando dadas las tendencias de los consumidores hacia “alimentos naturales” que contengan menos aditivos “químicos” (Davidson, 1996). Algunos estudios han demostrado que las plantas usadas en la industria alimentaria contienen metabolitos secundarios que han presentado actividad antimicrobiana. (Centurion, *et al.*, 2010).

Los antimicrobianos naturales, son compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos, que constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos sanos y seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento (Chavarrías, 2006).

1.2 JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el incremento en la demanda de frutos y vegetales frescos, ha forzado a la industria alimentaria a desarrollar nuevos y mejores métodos de conservación que preserven la calidad y extiendan la vida de anaquel de los productos. Existen diferentes problemas de gran importancia dentro de las cadenas distribuidoras de alimentos, tal es el caso de la pérdida de calidad en los frutos frescos, con disminuciones hasta del 80% desde su cosecha hasta su consumo final.

Mencionando que los alimentos de alta calidad y sin conservadores sintéticos han tenido mayor demanda, lo que ha generado que las industrias alimenticias hagan un mayor esfuerzo en desarrollar y aplicar nuevas tecnologías de conservación, mediante el uso de conservadores antimicrobianos de origen natural (Chien, *et al.*, 2007).

El comportamiento de los consumidores hacia el consumo de alimentos con mínimo procesado, así como el uso de antimicrobianos naturales (a base de plantas) han incrementado en este siglo, debido a la creciente demanda del cuidado de la salud, lo que trae como consecuencia que se opte por el consumo de alimentos frescos. A lo que surge la necesidad de que se produzcan alimentos con un procesado mínimo. En contraparte el procesado de alimentos es muy costoso y los alimentos sufren cambio en la composición nutricional al dejar de ser un producto fresco y natural (Gottau, 2012).

La sociedad actual, demanda productos con menos aditivos químicos ya que, algunos de estos son sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad. Es así, como los productores de alimentos han sido forzados a tratar de remover completamente el uso de antimicrobianos químicos o adoptar alternativas naturales para el mantenimiento o extensión de la vida útil de subproductos (Nychas, 1995).

Como consecuencia de esto, surge la industria de los “alimentos mínimamente procesados”, los cuales son productos altamente perecederos, y con el peligro potencial de la supervivencia y crecimiento de ciertos microorganismos patógenos (Smid y Gorris, 1999).

Estudios recientes muestran que los recubrimientos han surgido como una tecnología post-cosecha emergente para la conservación, extensión de la vida comercial de las frutas y mejora de su calidad. Existen factores que han llevado a la elaboración de películas y recubrimientos comestibles, tal es el caso en el incremento de las expectativas del consumidor por una mayor variedad de productos frescos con mayor vida útil. Por tal razón las películas o recubrimientos comestibles resultan una forma innovadora y efectiva de proteger al alimento, además de contribuir con técnicas novedosas que permitan ser aplicadas con la finalidad de mejorar la calidad y vida post- cosecha de los productos alimenticios.

La manzana (*Malus domestica*) es el cultivo comercial más importante, denominado el fruto de excelencia. Sus características de calidad debido a su alto valor nutricional; al igual que la calidad y diversidad de productos que se obtienen en la industria transformadora lo hacen sumamente atractivo al consumidor y permiten su comercialización hacia el mercado de exportación.

El presente trabajo de investigación fue determinar el efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de mucílago de chía, así como la actividad fúngica de extractos de diferentes plantas para inhibir el crecimiento de algunos hongos que intervienen en la calidad y vida útil de manzanas variedad *Golden delicious* listas para su consumo.

1.3 HIPÓTESIS

La aplicación de un recubrimiento comestible a base de mucílago de chía (*Salvia hispánica*) usando diferentes antimicrobianos naturales, alargan la vida de anaquel en manzana (*Malus domestica*) inhibiendo el crecimiento de *Penicillium expansum*.

1.4 Objetivo general

Desarrollar un recubrimiento comestible a base de mucílago de chía (*Salvia hispánica*), utilizando agentes antimicrobianos como ingrediente activo y evaluar su inclusión en la formulación, para la aplicación en el control de *Penicillium expansum* sobre manzana (*Malus domestica*) como fruto modelo.

1.4.1 Objetivos particulares

- Desarrollar un nuevo recubrimiento comestible a base de mucilago de chía (*Salvia hispánica*) y evaluar componentes con propiedades antimicrobianas en el recubrimiento comestible.
- Determinar la concentración mínima del mucilago de chía para la elaboración del recubrimiento.
- Realizar cinéticas de inhibición de crecimiento de *P. expansum*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria sobre el crecimiento de *P. expansum* utilizando diferentes antimicrobianos.
- Realizar y evaluar la aplicación del recubrimiento comestible de mucilago de chía con antimicrobianos en manzana.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Chía (*Salvia hispánica*)

2.1.1 Antecedentes

En México hay un grupo amplio de especies que pertenecen a la familia *Labiatae*, ésta comprende aproximadamente 512 especies en todo el país (Hernández, 1994; Standley y Williams, 1973), destacando dos géneros por su gran número de especies (aprox.65% de las existentes en el país) y porque son las tradicionalmente llamadas chías: *Hyptis* y, por supuesto *Salvia*, de esta última sobresale *Salvia hispánica* L. que representa la variedad que se comercializa en nuestro país (Domínguez *et al.*, 2002). El interés por la chía resurgió a finales del siglo pasado, ya que se encontró que posee un elevado contenido de aceite (32%). Además de ser una buena fuente de proteína (18%) y fibra cruda (24%), el mucílago de la semilla resulta útil como aditivo alimenticio, entre otras características (Bushway *et al.*, 1981; Beltran- Orozco y Romero, 2003).

2.1.2 Características botánicas

La chía pertenece a la familia de las *Lamiáceas*; es una de las especies vegetales con la mayor concentración de ácido graso alfa-linolénico (omega 3). Planta anual, de hasta 1 m de altura, presenta hojas opuestas, de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 de ancho. Las flores son hermafroditas, purpúreas a blancas, y aparecen en ramilletes terminales, sobre pedicelos; el cáliz es un tubo acampanado, ligeramente comprimido lateralmente, con pelillos a lo largo de las venas, florece entre julio y agosto en el hemisferio norte. Al cabo del verano, las flores dan lugar a un fruto en forma de aquenio. Sus hojas son enteras y ovaladitas de hasta 6 cm de largo, con pelitos en la parte de abajo y poco onduladas en las orillas. Las flores son de color morado muy chiquititas y se dan estas florecitas en espigas gruesas que le salen en las puntas de las ramas llegan a medir 10 cm aproximadamente (Tenorio, 2000).

La semilla es muy pequeña, café con rayitas o manchitas negras, parda-grisácea, rica en mucílago, fécula y aceite; tiene unos 2 mm de largo por 1, mm de ancho, y es ovalada y lustrosa (figura 1) es originaria de áreas montañosas de México y si bien resulta una verdadera

novedad en nuestro mercado, se sabe que desde hace ya 3500 años a.C. era conocida como un importante alimento y medicina (Tenorio, 2000).



Figura 1. Imagen de *Salvia hispanica* **a)** Planta de chía y **b)** Semilla de chía.

2.1.3 Fruto de chía

El fruto de chía consiste en cuatro pequeñas núculas, similares a un aquenio indehiscente, cada una de las cuales contiene una única semilla. Cada una de estas núculas tiene un pericarpio claramente estratificado: cutícula, epicarpio, mesocarpio, capa de escleridad y endocarpio, el cual está en contacto con la testa de la semilla.

La figura 2 muestra las micrografías obtenidas por SEM de las núculas oscuras: glabras, de forma elipsoidal, compuestas por la semilla verdadera y el pericarpio que la rodea. La semilla verdadera consta de una cubierta seminal (testa), el endosperma y el embrión, compuesto principalmente por los cotiledones.

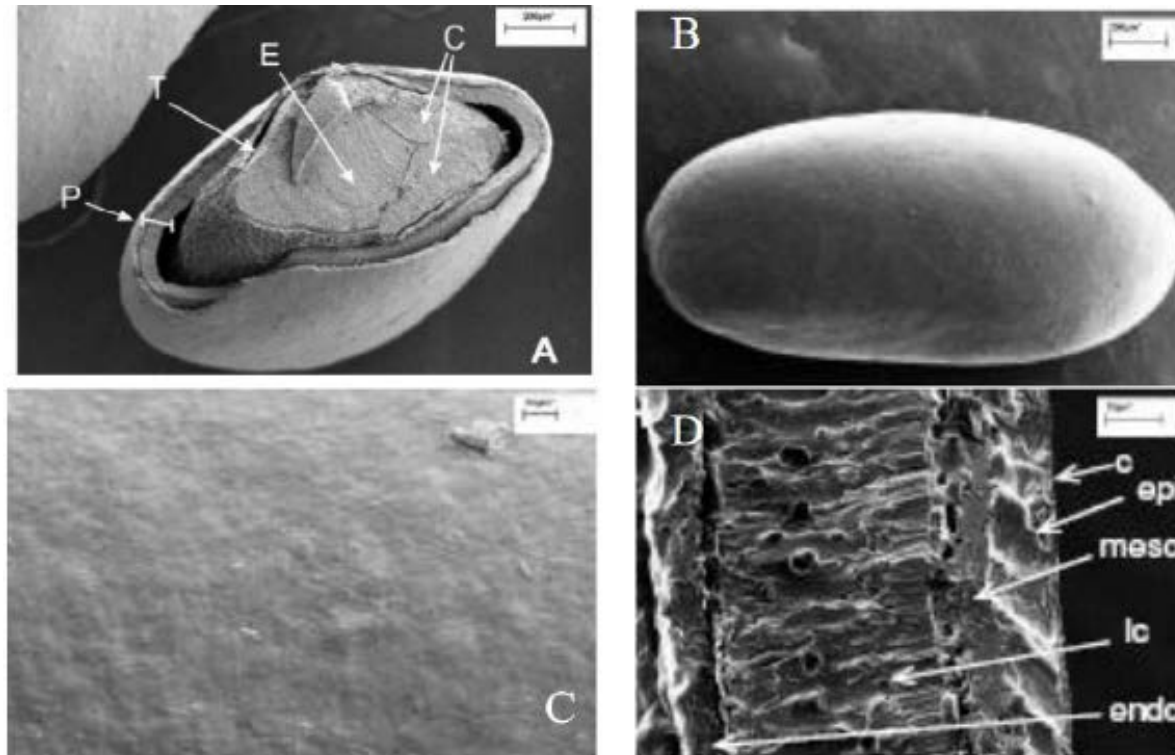


Figura 2. Micrografías obtenidas por SEM de núculas de chíá; (A) Sección longitudinal, estructura interna (x187), P: pericarpio; T: testa; E: endosperma; C: Cotiledones; B: Vista lateral (x145); C: superficie del pericarpio (x1500); D: Sección transversal del pericarpio (x 3000), c: cutícula; epi: epicarpio; meso: mesocarpio; la: capa de esclereidas; endo: endocarpio.

En el epicarpio (Figura. 2D) se encuentran células que producen mucílago cuando se las humedece. Las paredes anticlinales de las células que lo forman llevan refuerzos de fibrillas celulósicas anticlinales celulósicas espiraladas acompañadas de inclusiones de morfología y composición variada. Cuando las núculas entran en contacto con el agua, el epicarpio se hincha, la cutícula se rompe al agotar su elasticidad y el contenido de las células se derrama como mucílago rodeando toda la superficie del fruto, quedando adherido a la misma con notable tenacidad (Figura 3).

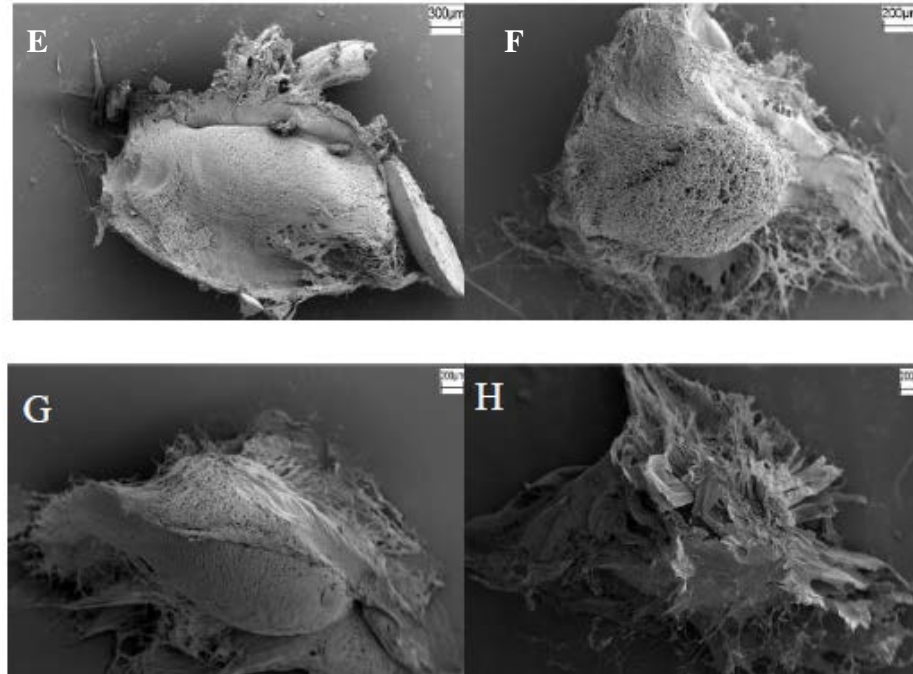


Figura 3. Micrografías obtenidas por SEM de núculas de chía hidratadas durante diferentes tiempos (x80); E: 5; F: 15; G: 30 y H: 60 minutos.

2.1.4 Mucílago

La chía produce un mucílago que se libera cuando se pone en contacto con agua, este polisacárido tiene la capacidad de absorber siete veces su peso en agua. Este fenómeno también ocurre cuando la semilla entera se mezcla con los jugos gástricos, el gel producido puede formar una barrera física entre los carbohidratos y enzimas digestivas, por lo tanto son digeridos en forma uniforme y lenta, lo que se traduce en el no aumento de insulina en sangre.

Recientemente, se ha demostrado que el mucílago aislado tiene la capacidad de absorber 27 veces su peso en agua, lo que es significativamente mejor a lo reportado con la semilla entera (Muñoz *et al.*, 2012). Debido a su capacidad de absorción única, la utilización de la semilla y el mucílago de chía como ingredientes funcionales permitirán el desarrollo de nuevos alimentos con alto impacto en la prevención de enfermedades cuando se ingiere hay una interacción sobre el metabolismos de lípidos, disminuyendo la absorción intestinal de ácidos grasos, colesterol y el arrastre de sales biliares, aumenta la pérdida de colesterol a través de las heces, además de inhibir la síntesis endógena de colesterol y desaceleración de la digestión, la absorción de nutrimentos; este mucílago forma geles de alta viscosidad que

producen distensión gástrica, enlentecimiento del jugo gástrico, y sensación de saciedad (Hentry, 1990); con el mucílago se producirán alimentos de consumo habitual, que pueden ser mejorados contribuyendo a la prevención de muchas dolencias que afectan al hombre moderno (Ayerza, 1995).

La semilla de *Hyptis suaveolens* (L. Poit), al ponerse en contacto con el agua forma una barrera gelatinosa en su superficie a la cual se le llama mucílago, constituido principalmente por fibra dietaria. El gran interés por la fibra dietaria se remota a los años 70, cuando se empezaron a realizar estudios epidemiológicos que relacionaron la deficiencia de fibra dietaria con enfermedades que se presentan principalmente en países occidentales, como la constipación, pólipos, cáncer al colón, y trastornos metabólicos como obesidad y enfermedades coronarias (Pascal, 1996).

La fibra dietaria se define como los carbohidratos complejos de las plantas que los seres humanos no digieren porque carecen de las enzimas necesarias. La fibra se divide en dos categorías: soluble e insoluble. Mientras que la fibra insoluble pasa a través de la zona digestiva relativamente sin cambios, la fibra soluble se disuelve para formar un gel. Las pectinas, las gomas y los mucílagos son ejemplos de la fibra soluble (Jenkins, *et al.*, 2000). Así mismo gracias a esta fibra dietaria, según su naturaleza química y solubilidad, promueve la pérdida de peso, previene la constipación, la diverticulitis, enfermedades coronarias, obesidad, cáncer; y tiene efectos favorables sobre la regulación intestinal y los niveles de glucemia (Olavarría, 2013).

El mucílago de la semilla de chía, no solamente tiene importancia por su valor nutricional, sino además, porque tiene una naturaleza hidrocoloide y gelificante, lo cual es una propiedad importante no solamente en la industria de alimentos, sino también en la industria cosmetológica (Tosco, 2004).

2.1.5 Composición y valor nutricional

2.1.5.1 Fuente de ácidos grasos esenciales

Las semillas de chía destacan por su riqueza en componentes nutricionales como los ácidos grasos poliinsaturados, fibra y vitaminas del grupo B (Brenna, 2002).

Los aceites de la semilla constituyen el 32% -39% del total, donde el 60% de éstos es el ácido α -linolénico (omega-3, precursor de los ácidos grasos DHA ácido docosahexanoíco y EPA o ácido eicosapentanoíco) y el 20% es el ácido α -linoleíco (omega-6). Esta elevada cantidad implica que la semilla de chía hace que sea una de las mejores fuentes de ácidos grasos esenciales (AGE), junto con el lino (*Linum usitatissimum L.*) de origen agrícola (Ayerza, 1996).

Se denominan ácidos grasos esenciales (AGE) a un grupo de ácidos grasos que el organismo no puede fabricar y que tienen que ser ingeridos a través los alimentos o de los complementos. Se diferencian de los no esenciales (ácidos grasos saturados o mono insaturados) en que los últimos se pueden obtener a partir de otros nutrientes (Ayerza, 1996).

Los ácidos grasos esenciales (AGE) tienen funciones muy importantes en el organismo (Cuadro 2): ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares, a normalizar la tensión arterial elevada, a mantener la flexibilidad de las membranas celulares, reduce el nivel de colesterol, mejoran además el sistema nervioso e inmunológico, etc. (Ayerza, 1996).

Cuadro 2. Composición de los ácidos grasos de la chía, lino, pez, menhaden (*Brevoortia tyrannus*).

Ácidos Grasos	Ácidos Monoinsaturados (MUFA Oleicos)	Ω -6 Linoleíco	Ω -3 Linolénico
Aceite	% de ácidos grasos totales		
Pez Menhaden	25	2.2	29.8
Chía	6.5	19	63.8
Lino	19.5	15	57.5

Fuente: Simopoulos, 1999.

2.1.5.2 Fuente de antioxidantes

Las semillas de chía contienen una muy buena cantidad de compuestos con potente actividad antioxidante; principalmente flavonoides (mirsetina, quercetina y kaempferol), δ y γ -tocoferol y antioxidantes fenólicos tales como ácidos clorogénico y caféico. Mencionando que los flavonoides son antiinflamatorios, antimutagénicos, antivíricos y anticancerígenos (especialmente son recomendables en cáncer de pulmón y estómago), además de ayudar en la cardiopatía isquémica (Bushway *et al.*, 2000).

Los antioxidantes actúan eliminando la necesidad de utilizar antioxidantes artificiales como las vitaminas. Se ha demostrado que las vitaminas antioxidantes anulan los efectos protectores de las drogas cardiovasculares. El problema de ingerir insuficientes antioxidantes desaparece con una mayor cantidad de α -linolénico de origen vegetal, lo que genera otra ventaja sobre los ácidos grasos omega-3 provenientes de productos de origen marino.

Los antioxidantes, además de resultar un saludable aporte dietario y terapéutico, sirven a la buena conservación del aceite. Esto explica como los mayas, sin grandes técnicas de conservación, podían almacenar la harina de chía durante largos periodos sin que se pusiese rancia, algo poco habitual en semillas oleaginosas. Los antioxidantes protegen de tumores, afecciones cardiovasculares, inflamaciones, virus y radicales libres, ayudando a la calidad de los alimentos así como la salud de los consumidores (González *et al.*, 2010).

Los antioxidantes aportan múltiples beneficios al organismo, su función principal es eliminar y/ o reducir radicales libres que se producen como resultado de la oxidación celular. Un número limitado y controlado de estos elementos resulta beneficioso para el organismo, por el papel que desempeñan en el organismo dentro del sistema inmunológico, dado que son capaces de eliminar microorganismos patógenos. Cuando el número de radicales libres aumenta y se inestabiliza produce resultados negativos. Así por ejemplo se ha visto la relación que existe entre estas moléculas y ciertas enfermedades de carácter degenerativo, como alteraciones del aparato circulatorio, del sistema nervioso y otras enfermedades graves o el envejecimiento precoz. Estos resultados negativos se producen porque los radicales libres alteran el ADN de las células, impidiendo la renovación celular o alterando su normal funcionamiento (Bulhosen, 2012).

2.1.5.3 Fuente de Proteínas y Aminoácidos

Esta semilla posee alrededor de 20% de proteínas. Los aminoácidos de la chía no tienen factores limitantes en una dieta para adultos, lo que significa que esta puede ser incorporada en las dietas humanas, y mezcladas con otros granos, con el fin de producir una fuente equilibrada en proteínas.

Las proteínas de la semilla de chía, a diferencia del trigo, avena, cebada y centeno, no contienen gluten, lo que es benéfico para los celíacos. La chía tiene presencia de todos los aminoácidos esenciales y con buen contenido de lisina, aminoácido limitante en los cereales (Moreu, 2013).

Por su alto contenido en proteínas, la semilla de chía, ayuda a construir y regenerar músculos y tejidos, es ideal para deportistas y para las etapas del crecimiento.

Las semillas de chía contienen un 23% de proteínas y en su composición están presentes los aminoácidos presentes en el cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación de aminoácidos esenciales y no esenciales en la semilla de Chía.

Aminoácidos esenciales	Aminoácidos no esenciales
Fenilalanina	Alanina
Metionina	Ácido Aspártico
Histidina	Glicina
Triptófano	Serina
Treonina	Acido Glutámico
Leucina	Arginina
Isoleucina	Glutamina
Lisina	Prolamina
Valina	Tirosina
	Cisteína

Fuente: Fernández, 2010; Mosquera, 2010

2.1.5.4 Fuente de vitaminas y minerales

La semilla de chía es una buena fuente de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina y ácido fólico) y vitamina E y A. Además contiene calcio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc y cobre, selenio, boro). Otra ventaja es el muy bajo contenido en sodio que tiene esta semilla.

2.1.6 Usos y aplicaciones

La chía puede utilizarse a través del aceite de sus semillas, obviamente cultivadas en forma orgánica, prensadas en frío y sin proceso de refinado. Dado su alto contenido de omega 3, bastaría con ingerir apenas unos gramos de aceite (una cucharadita) en crudo, a fin de cubrir las necesidades diarias de ácido linolénico. Dada la baja proporción de omega 6 en su composición, la mezcla con aceite de girasol permite obtener un equilibrado suplemento de AGE, con la relación ideal entre los omegas 6 y 3: 4 a1. Obviamente que son aceites para consumir en frío y sin proceso alguno de cocción, a fin de preservar sus delicados principios nutricionales (Bushway *et al.*, 1981).

Asimismo, el consumo de las semillas de chía es una buena forma de beneficiarse con su aporte de omega 3. Incluso tras ser prensada para generar aceite, la semilla de chía continúa sorprendiendo por su buena concentración de AGE y de otros nutrientes (como los 1.180 mg de calcio y los 20,4 mg de hierro); de allí su empleo en forma de harina, técnicamente llamada semilla parcialmente desgrasada.

La riqueza nutricional de la chía, la convierte en ingrediente ideal para adicionar a productos de panificación y a un sinnúmero de preparaciones culinarias y bebidas. Los requerimientos diarios de omega 3 se cubrirían con apenas cuatro gramos de harina. En el caso de consumir la semilla entera, conviene ingerirla molida (harina) o muy bien masticada, para permitir su correcta metabolización.

Tal vez los factores limitantes para una mayor difusión del consumo de la chía sean, por el momento, el desconocimiento de sus virtudes y el económico. Dado que no se trata de una semilla oleaginosa propiamente dicha, y que se procesa artesanalmente en frío, la producción de su aceite es más costosa. Pero este argumento se neutraliza con la baja dosis diaria que se requiere para cubrir las necesidades mínimas. Además siempre se puede consumir la semilla

(entera o en forma de harina), alternativa mucho más económica y que permite capitalizar nutrientes que no están presentes en el aceite (el caso de minerales y fibra) (Moreu, 2013).

Algunos usos destacados han sido: En la guerra fue indispensable por su condición energizante, para pagar los tributos anuales que los aztecas exigían a los pueblos conquistados, fue ofrecida a los dioses en las ceremonias religiosas (Ayerza, 1996).

La semilla de la chía por su elevado contenido proteínico se utiliza principalmente como alimento para ganado. El mucílago de la semilla puede ser útil como aditivo alimenticio ya que en el caso de frutas, éstas podrán tener un protector natural que va a retrasar su descomposición o poder controlar su maduración. Una nueva harina será apta para celíacos. Los postres y salsas podrán contar con nuevas consistencias, y los embutidos con envoltura biodegradable. Habrá medicamentos y perfumes inteligentes. La minería, la industria textil, y hasta la petrolífera, trabajarán con nuevos materiales. Una alternativa para que todo esto sea posible es a partir de la semilla de chía (Olavarría, 2013).

Fuera de los países de donde es nativa, la chía se dio a conocer para la gran mayoría como novedosa semilla usada en alimentos para animales con el producto denominado chía Pet TM. Poco se sabe, sin embargo, del enorme valor alimenticio de las semillas y de sus características medicinales (Coates y Ayerza, 1996).

Además de ser comestible, el aceite de las semillas se puede utilizar para las pinturas o como sustituto para el aceite de linaza. Los aceites de la hoja de chía, pueden ser útiles en condimentos o fragancias, y posiblemente como pesticidas, porque muchos insectos parecen evitar la planta (Pascual *et al.*, 1997).

2.1.7 Origen y distribución nacional

Hierba nativa y endémica de México con amplia distribución silvestre en: Sinaloa, Chihuahua, Chiapas, Veracruz, Michoacán y Oaxaca (Tenorio, 2000). Se cultiva preferentemente en suelos ligeros no demasiado húmedos; como la mayoría de las salvias, es tolerante respecto a la acidez y a la sequía, pero no soporta las heladas; requiere abundante sol, y no fructifica en la sombra. Sus semillas se utilizan molidas como alimento; el mayor centro productor de México está en Jalisco, de donde se exportan cantidades crecientes a Japón, Estados Unidos y Europa donde se cultiva comercialmente también en Guatemala (Ixtaina *et al.*, 2010).

2.2 Películas y recubrimientos: Definición y aplicación

Las películas o recubrimientos comestibles pueden cumplir muchos de los requisitos involucrados en la comercialización de alimentos entre los que destacan el valor nutricional, la sanidad, alta calidad, estabilidad y economía.

De acuerdo con Krochta y De Mulder-Johnston (1997), una película comestible se define como aquella capa delgada de material comestible formada sobre un alimento como un recubrimiento, o colocada (lo que implica que debe ser preformada) sobre o entre los componentes de los alimentos. Ambos sistemas ofrecen una barrera selectiva a la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, etc.; además pueden servir como agentes acarreadores de otros ingredientes o aditivos (antioxidantes, saborizantes, antimicrobianos y colorantes) para mejorar el potencial de conservación y las características de manejo del alimento. En algunos casos las películas comestibles con buenas propiedades mecánicas pueden llegar a sustituir las películas de empaque sintéticas.

Las cubiertas comestibles pueden ser aplicadas directamente a la superficie del alimento como una barrera adicional de protección para mantener la calidad y estabilidad de un alimento (figura 4). Para el caso de frutas y vegetales, los recubrimientos con polímeros comestibles y biodegradables ofrecen una alternativa de empaque sin causar daño al medio ambiente.

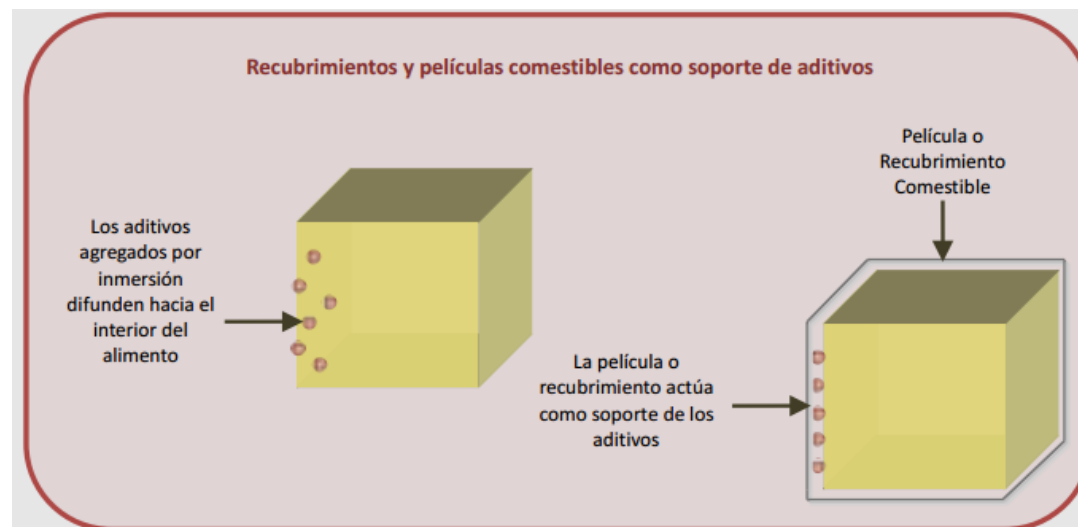


Figura 4. Forma de acción de los recubrimientos y películas comestibles (Fuente: Rojas *et al.*, 2009).

2.2.1 Materiales empleados en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles

Las películas o recubrimientos comestibles pueden elaborarse a partir de polisacáridos, proteínas y/o lípidos. La selección de dichos materiales estará en función de las características del alimento al cual se desee emplear.

2.2.1.1 Polisacáridos

Generalmente los recubrimientos formados con polisacáridos exhiben una elevada permeabilidad al vapor de agua, debido a su naturaleza hidrofílica. Los polisacáridos solubles en agua son polímeros de cadena larga en forma lineal o ramificada que poseen unidades glucosídicas que, como media, poseen tres grupos hidroxilos, por lo que forman puentes de hidrógeno con el agua, y por lo tanto, las partículas de polisacáridos pueden tomar las moléculas del agua, hincharse con ellas y solubilizarse total o parcialmente dando un carácter espesante y/o gelificante a la fase acuosa (Fennema, 1982; Baldwin *et al.*, 1995).

Los recubrimientos y películas comestibles elaboradas a base de polisacáridos como compuestos estructurales, se han aplicado con éxito para prolongar la vida de anaquel de frutas, hortalizas, productos marinos o de carne reduciendo su deshidratación, para reducir los niveles internos de O₂ y elevar los de CO₂, y evitar la rancidez oxidativa y oscurecimiento superficial, a pesar de que la mayoría de ellos no evitan por completo la pérdida de humedad (Nisperos-Carriedo, 1994).

2.2.1.2 Quitina

La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza de tal forma que constituye el segundo polímero más abundante después de la celulosa. Es un polisacárido no tóxico y biodegradable (Guzmán, 2003). Se encuentra formada por monómeros 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucosa, unido mediante enlaces α 1-4. Su estructura es similar al de la celulosa con excepción de que los grupos hidroxil en la posición 2 son reemplazados por grupos acetilamino (Peral y Gartzia, 2002).

La quitina fue encontrada por primera vez en 1811 por el profesor Henri Braconnot en hongos. En 1830 se aisló en insectos y se le dio el nombre de quitina, esta es un producto ligero, en polvos o copos de color blanco o amarillento que puede ser procesada en múltiples derivados como el quitosán (Guzmán, 2003).

2.2.1.2.1 Quitosano (quitosán)

Este compuesto es la forma N-desacetilada de la quitina de la que se obtiene tras sustituir los grupos acetaminado por grupos amino, es un polisacárido catiónico de alto peso molecular, químicamente está constituido de unidades de glucosamina parcialmente desacetilado (2 amino-2 deoxy-D-glucosa), biodegradable, soluble (figura 5). Forma parte de la pared corporal de los crustáceos principalmente. Se biodegrada en el hombre por la acción de la lisozima. La mayoría de los polisacáridos poseen baja actividad superficial o en ocasiones carecen de ella, pero se emplean ampliamente como agentes espesantes, retenedores de agua y estabilizantes. Cuando no existe evidencia de grupos hidrofóbicos, la función estabilizadora se debe a que modifican las propiedades reológicas de la fase continua (Bautista *et al*, 2005).

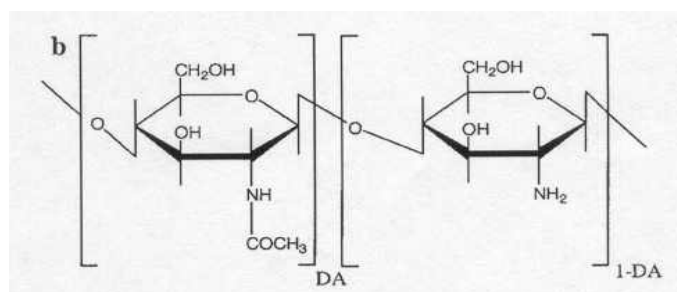


Figura 5. Estructura química del quitosano, donde DA es el grado de acetilación (Shahidi, 1999).

La quitina y el quitosán son polisacáridos, químicamente similar a la celulosa que sólo difieren en la presencia o ausencia de nitrógeno (Bautista *et al*, 2005).

Se define la quitina y el quitosán como solubles o insolubles en ácido acético a 0.1 mol/L respectivamente o por el grado de desacetilación. La quitina con más de un 50% de desacetilación es considerada quitosán e incluso otros la definen como tal ante un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente en el caso del quitosán, se establece que el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98% (Hernández, 2004). El quitosano actúa como estabilizante mediante un aumento de la viscosidad de la fase continua disminuyendo con el movimiento de las gotas de emulsión; además de que posee actividad antimicrobiana.

El quitosano es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, posee propiedades fungicidas, bactericidas y nematocidas y actúa como cubierta protectora retardando

la maduración de los frutos mediante la modificación de su atmósfera interna y por lo tanto limitando el desarrollo de los patógenos (El Ghaouth *et al.*, 1991; Shahidi *et al.*, 1999).

2.2.1.2.2 Mecanismo de acción antibacteriana del quitosano

La actividad antimicrobiana del quitosano difiere del microorganismo, en el caso de los hongos, este polímero ejerce un efecto antifúngico inhibiendo la formación de esporas e hifas (Hernández- Lauzardo *et al.*, 2008). En contraste, la actividad antibacteriana del quitosano es más compleja y difiere entre bacterias Gram- positivas debido a la diferente composición de la superficie celular entre ambos tipos de bacterias. Respecto al mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano no está totalmente dilucidado, y dentro de los mecanismos propuestos, los investigadores coinciden que posee tres posibles acciones según la concentración usada; en el cuadro 4 se puede observar el efecto del quitosano a diferentes concentraciones en el control de diferentes hongos.

Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de quitosano en el control de varios hongos post- cosecha importantes en la producción hortofrutícola.

Patógeno	Concentración de quitosano	Resultados	Referencias
<i>Alternaria alternata</i>	2 y 2.5% 6.0 mg MI ⁻¹ 2%	Inhibición de crecimiento micelial	Sánchez <i>et al.</i> , 2007 El Ghaout <i>et al.</i> , 1992c.
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2%	Baja esporulación y germinación de esporas Inhibición de crecimiento micelial	Hernández- Lauzardo <i>et al.</i> , 2008. Hernández, 2002 Bautista- Baños <i>et al.</i> , 2004. El Ghaout <i>et al.</i> , 1992c
<i>Colletotrichum gloesporoides</i>	2.5 y 3.0% 3.0% 6.0 mg mL ⁻¹	Inhibición de crecimiento micelial y de formación de esporas.	Bautista- Baños <i>et al.</i> , 2004. El Ghaouth <i>et al.</i> 1992c
<i>Fusarium oxysporium</i>	1.5, 2.5 y 3.0% 1.5%	Inhibición de crecimiento micelial Baja esporulación y baja germinación de esporas.	Bautista -Baños <i>et al.</i> , 2004 El Ghaout <i>et al.</i> , 1992c
<i>Botrytis cinérea</i>	50.0 mg mL ⁻¹ 6.0 mg mL ⁻¹	Control del crecimiento de la enfermedad	Ben- Shalom <i>et al.</i> , 2003 El Ghaout <i>et al.</i> , 1992c
<i>Penicillium digitatum</i>	2.5 y 3.0	Inhibición de crecimiento micelial	El Ghaout <i>et al.</i> , 1992c

Fuente: García, 2010.

2.2.1.2.3 El quitosano como recubrimiento

Junto con otros elementos, el quitosano se utiliza como recubrimiento para frutas retrasando el envejecimiento, disminuyendo la oxidación, las pérdidas por transpiración y protegiendo frente al ataque de hongos y bacterias.

Las películas con quitosano son resistentes, duraderas, y flexibles con propiedades mecánicas similares a polímeros comerciales de fuerzas medias. Se emplean junto con otros elementos en recubrimientos para frutas retrasando el envejecimiento, disminuyendo la oxidación las pérdidas por transpiración y protegiendo frente al ataque de hongos (cuadro 5). Su acción como protector de alimentos frente a microorganismos (concentraciones del 0.02% protegen frente a *E. coli* como, bacterias, levaduras y hongos, es interesante para la obtención de alimentos mínimamente procesados y para retrasar la aparición de sabores desagradables en la carne.

Cuadro 5. Aplicaciones del quitosano en la industria de alimentos

Aplicación	Efecto
Aditivo	Clarificación y desacidificación de bebidas de frutas Prolongar sabor Control de textura agente emulsificante Agente espesante y estabilizante Estabilizante de color antioxidante Fibra dietaria
Calidad nutricional	Efecto hipocolesterolémico Reducir absorción de grasa Formulaciones para alimento bebes
Agente conservador	Antibacterial Antifúngico/ fungistático Reducción de producción de etileno y dióxido de carbono Control de transferencia de humedad
Películas y cubiertas comestibles	Control de oxidación enzimática en frutas Barrera protectora contra el medio Liberación controlada de antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes y protección antimicrobiana Aumento de la vida de anaquel

Fuente: Shahidi *et al.*, 1999; Rinaudo, 2008

2.2.1.2.4 Los mucílagos

Los mucílagos son polisacáridos heterogéneos, formados por diferentes azúcares y en general ácidos urónicos. Se caracterizan por formar disoluciones coloidales viscosas: geles en agua. Los mucílagos son constituyentes normales de las plantas y su uso en el recubrimiento de frutas cortadas no ha sido muy estudiado. Nit *et al.*, (2004), afirman que de la planta de sábila se puede extraer gel cristalino conocido como aloe vera el cual está libre de aroma y sabor. Por otro lado Serrano *et al.*, (2006) emplearon un gel elaborado a partir de aloe vera para el recubrimiento de uvas de mesa, observando una extensión de la vida útil de las frutas hasta 35 días comparado con uvas sin cubrir. Además dicho recubrimiento permitió retener la concentración de ácido ascórbico de las uvas. Por otra parte Martínez *et al.*, (2006) estudiaron el efecto de un recubrimiento comestible (RC) a base de aloe vera aplicado en cerezas, obteniendo una disminución de los cambios en los diferentes parámetros responsables de la pérdida de calidad de la fruta, además de excelentes propiedades sensoriales en los recubrimientos.

Otro mucílago recientemente empleado en la elaboración de RC es el extraído de cactus. Este tipo de mucílago tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, disolverse y dispersarse por sí mismo y formar soluciones viscosas (Domínguez, 1995). Así, Del-Valle *et al.*, (2005) desarrollaron un recubrimiento comestible a partir de mucílagos de cactus (*O. ficus indica*) con el fin de extender la vida útil de fresas. Este recubrimiento no afectó la calidad sensorial de las frutas recubiertas, manteniendo además su color y firmeza original durante el almacenamiento.

2.2.1.3 Proteínas

Las películas o recubrimientos elaborados con proteínas también presentan gran permeabilidad al vapor de agua, 2 ó 4 veces más que los empaques plásticos, son buenas formadoras de películas y se adhieren a las superficies hidrofílicas (Rendell-Dunn, 1990). Sin embargo, se puede aumentar la resistencia a la transmisión de vapor de agua mediante la combinación de proteínas con materiales hidrofóbicos, estas películas compuestas ofrecen una mayor expectativa de aplicación (Gennadios *et al.*, 1994). Las principales proteínas que pueden ser empleadas en la elaboración de películas compuestas comestibles son: colágeno, gelatina, proteínas de la leche, proteínas derivadas de los cereales, proteínas oleosas entre otras.

2.2.1.4 Lípidos y resinas

Generalmente las películas y recubrimientos elaborados a partir de ceras han mostrado ser más resistentes al transporte de la humedad que otras películas elaboradas con otros lípidos o resinas. Materiales hidrofóbicos como ceras y ésteres de ácidos grasos han sido aplicados como recubrimientos, observando que presentan excelentes barreras que limitan la transferencia de vapor de agua, no obstante, no poseen la capacidad de formar películas con estabilidad y maleabilidad adecuadas para su manejo (Kamper y Fennema, 1985; Baldwin *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2004).

Entre los materiales lipídicos que se han empleado para la elaboración de formulaciones destinadas a productos ligeramente procesados, se encuentran la cera de abejas, monoglicéridos acetilados, ácido esteárico, ácido laúrico y ésteres de ácidos grasos-sacarosa (Wong *et al.*; Ruiz *et al.*, 1994).

2.2.1.5 Otros ingredientes

Ciertos componentes son requeridos en la formulación de recubrimientos basados en polisacáridos y proteínas para modificar las propiedades mecánicas; a estos compuestos se les clasifica como plastificantes (Baldwin *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1994).

Con la intención de aprovechar las ventajas de los diferentes componentes, las formulaciones se elaboran combinando los materiales mencionados en diferentes proporciones. En estas cubiertas compuestas, el uso de dos o más materiales simplemente combinados o laminados permiten mejorar las propiedades de intercambio gaseoso, adherencia y permeabilidad al vapor de agua. Las películas compuestas de quitosano y algunos ácidos grasos de punto de ebullición alto producen una sal de ácido graso- quitosano, en donde la transmisión del agua depende de la hidrofobicidad de la cadena de ácido graso, encontrándose que con la película de ácido laúrico- quitosano se obtiene una estructura única de placas sobrepuestas que mejoran la propiedad de resistencia al agua de la cubierta, mientras que la tasa de difusión gaseosa no se afecta por la hidrofobicidad de la película (Wong *et al.*, 1992). Este tipo de recubrimientos tienen potencial para cubrir productos vegetales enteros o mínimamente procesados.

2.2.2 Tecnologías para la aplicación de recubrimientos y películas comestibles

Actualmente se desarrollaron varios métodos para la correcta aplicación de las matrices comestibles sobre los alimentos. Como se mencionó antes los RC se diferencian de las PC por el modo en que son aplicados. Las técnicas de inmersión o spray se utilizan para RC y el Casting para PC:

- a) INMERSIÓN: consiste en la aplicación de las matrices comestibles sumergiendo el alimento en la solución filmogénica preparada. Se utiliza especialmente en aquellos alimentos cuya forma es irregular que requieren de una cobertura uniforme y gruesa. Es importante que el producto a tratar esté previamente lavado y secado, y que una vez retirado de la solución se deje drenar el excedente de solución para lograr un recubrimiento uniforme.
- b) SPRAY: Esta técnica se basa en la aplicación de la solución filmogénica presurizada. Permite obtener RC más finos y uniformes. Se usa en alimentos de superficie lisa o para la separación de componentes de distinta humedad de un alimento compuesto, por ejemplo en platos preparados como pizzas u otros.
- c) CASTING: mediante esta técnica se obtienen películas o films premoldeados. Consiste básicamente en la obtención de una dispersión uniforme compuesta por biomoléculas (proteínas, polisacáridos, lípidos), plastificante y agua. Luego se vierte sobre una placa de material inocuo (acero inoxidable) donde se deja secar para que se forme el film o película. La velocidad de secado junto con la temperatura y humedad son condiciones determinantes para la calidad del film (transparencia, consistencia, propiedades mecánicas), por lo tanto deben ser controladas correctamente. Una vez finalizado el secado se tiene un film de gran tamaño, el cual es fraccionado para ser aplicado sobre los alimentos a tratar (Lárez *et al.*, 2006).

Actualmente las PC y los RC se utilizan en distintos recubrimientos en una gran variedad de frutas y verduras, algunos ejemplos se mencionan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Ejemplos de recubrimientos usados en frutas

Producto	Compuestos del recubrimiento	Funcionalidad del recubrimiento	Referencia
Mango (MP)	Quitosano	Reducir la pérdida de peso y el deterioro de los caracteres sensoriales. Inhibir el crecimiento de microorganismos	Chien <i>et al.</i> , 2007
Zanahoria (MP)	Almidón + Glicerol y quitosano	Inhibir el desarrollo de microorganismos presentes	Durango <i>et al.</i> , 2003a
Ciruela (MP)	Hidroxipropilcelulosa (HPC) + Lípido	Preservar la calidad post-cosecha de los frutos	Pérez –Gago <i>et al.</i> , 2003
Pera (F)	Carboximetilcelulosa (CMC)+ aceite de soja + oleato sódico	Prolongar el tiempo de almacenamiento y vida útil	Togrul y Arslan 2003b
Frambuesa (F)	Quitosano	Reducir la pérdida de peso y el deterioro de los caracteres sensoriales (conservación del color). Inhibir el crecimiento de microorganismos.	Han <i>et al.</i> , 2004

MP =Mínimamente procesado
F=Fresco

Fuente: Parzanese, 2012

2.3 Agentes patógenos en frutas

En pomáceas, los principales patógenos de post-cosecha se pueden subdividir en dos grandes grupos: aquellos que causan infección quiescente de lenticelas y aquellos que ingresan a través de heridas posterior a la cosecha (Barkai-Golan, 2001), dentro de este último grupo se encuentra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinérea* Pers.: Fr, entre otros (Jones y Aldwinckle, 2002)

2.3.1 *Penicillium expansum*

Al menos 11 especies de *Penicillium* han sido aisladas de manzanas infectadas naturalmente por este hongo (Rosenberger, 1990), pero *Penicillium expansum* es la especie más importante (cuadro 7). Además de causar pérdidas económicas, *P. expansum* es también

importante para la salud pública, ya que produce la patulina (Weidenborner, 2001), una micotoxina crítica para la comercialización de jugo de manzanas (Delage *et al.*, 2003).

Cuadro 7. Clasificación taxonómica de *Penicillium expansum*

Nombre común	Moho azul
Nombre científico	<i>Penicillium expansum</i>
Clase:	Deuteromycetes
Orden:	Moniliales
Género	<i>Penicillium</i>
Familia	<i>expansum</i>

Fuente: Weidenborner, 2001

2.3.1.1 Morfología

P. expansum (Cuadro 7), perteneciente al orden *Moniliales* de la clase *Deuteromycetes* (Ciampi, 2002), es el agente causal del moho azul, considerada la pudrición de post-cosecha más importante en pomáceas, especialmente en manzanas (Jones y Aldwinckle, 2002). Este hongo patógeno causa considerables pérdidas económicas (Smith *et al.*, 1992), logrando incluso que los frutos afectados no sean aptos para su consumo, debido a la producción de patulina, una micotoxina que puede constituir un grave peligro para la salud, tanto del hombre como de los animales (Moss, 2002; Agrios, 2005). Las manifestaciones externas de la enfermedad, en manzanas, son lesiones ligeramente deprimidas, blandas al tacto y de coloración clara, las que pueden eventualmente comprometer todo el fruto (Latorre, 2004). Sobre la superficie del hospedero, las masas conídicas son blancas al principio, y al madurar las esporas se tornan de color azul verdoso, dando lugar al nombre común de la enfermedad (Smith *et al.*, 1992; Ciampi, 2002).

2.3.1.2 Propagación

El fruto se infecta principalmente a través de heridas, ocasionadas por insectos o manipulación de la fruta (Smith *et al.*, 1992; Barkai-Golan, 2001). Las esporas son diseminadas por el viento, agua y contacto directo entre frutos enfermos y sanos durante el periodo de almacenamiento (Jones y Aldwinckle, 2002; Smith *et al.*, 1992). Su control se basa en tratamientos químicos, los cuales previenen la infección e inhiben el desarrollo del patógeno sobre la superficie de los frutos.

2.3.1.3 Sintomatología

El síntoma de esta enfermedad es una podredumbre blanda, acuosa y en general de color marrón claro, en la cual el tejido afectado se separa fácilmente del sano. En general comienza a desarrollarse a partir de una herida sobre la cual se manifiesta la presencia del hongo, primero el micelio de color blanco, recubriéndose luego de la esporulación azul característica que le da el nombre a la enfermedad (Snowdon, 1993; Mondino *et al.*, 2009).

2.3.1.4 Inhibición del crecimiento de *Penicillium expansum*.

Existen además medidas preventivas, tales como realizar una cosecha cuidadosa, evitar el contacto de fruta contaminada con aquella sana y mantener los frutos almacenados a baja temperatura (Smith *et al.*, 1992; Latorre, 2004; Agrios, 2005). Sin embargo, cuantas más esporas haya, más posibilidades que el patógeno logre vencer las barreras naturales e infecte el tejido susceptible (Dobra y Rossini, 1993). Baert *et al.* (2008) demostraron que la cantidad de esporas de *P. expansum* inoculadas en manzanas, determina el porcentaje de podredumbres en los frutos. Este efecto, además fue dependiente de la temperatura a la cual fue almacenada la fruta (4, 12 y 25 °C), observándose mayores porcentajes de podredumbre a mayor temperatura. Para niveles de inóculo $\geq 2 \times 10^4$ esporas, el desarrollo de la enfermedad se manifestó en más del 90% de los frutos para todas las temperaturas estudiadas.

En el campo, *Penicillium* spp. sobrevive en los restos orgánicos del cultivo, en el suelo y quizás en la corteza muerta de los árboles. Los conidios están presentes también en el aire y sobre la superficie de la fruta (Rosenberger, 1990; Dobra y Rossini, 1993). No obstante, se observa muy poca presencia de esta enfermedad en el campo (Jijakli y Lepoivre, 2004; Mondino *et al.*, 2009).

En nuestro país se han registrado diferentes enfermedades de post-cosecha (Cuadro 8). Sin embargo, la podredumbre producida por *Penicillium expansum* es la enfermedad de postcosecha más importante en manzanas y peras en nuestro país y en todo el mundo (Eckert y Ogawa, 1988; Dobra y Rossini, 1993; Xu y Berrie, 2005).

Cuadro 8. Enfermedades de postcosecha más importantes para manzanas y peras.

Nombre de la enfermedad	Agente causal
Moho azul	<i>Penicillium expansum</i> Link
Moho gris; Pudrición calicina	<i>Botrytis cinérea</i> Pers.:Fr
Podredumbre por Corazón mohoso	<i>Alternaria Alternaria</i> spp.
Podredumbre blanda	<i>Alternaria</i> spp.; <i>Penicillium</i> spp.; <i>Fusarium</i> spp.
Podredumbre amarga	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg: Fries) Vuillemin;
Podredumbre negra	<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl.;
Sarna del manzano	<i>Mucor</i> spp
Podredumbre morena	<i>Colletotrichum</i> spp.
Ojo de pescado	<i>Diplodia seriata</i> De Not. (= <i>Botryosphaeria obtusa</i>)
Podredumbre por	<i>Venturia inaequalis</i>
Podredumbre por	<i>Monilinia fructigena</i>
Podredumbre por	<i>Athelia epiphylla</i> Pers.
Podredumbre por	<i>Cladosporium Cladosporium</i> spp.

Fuente: Dobra y Rossini, 1993; Mondino *et al.*, 2009; Aragón *et al.*, 2010.

2.4 Agentes antimicrobianos

Con la evolución de la ciencia de alimentos han surgido muchos compuestos químicos con actividad antimicrobiana. El agente antimicrobiano del que se tiene el registro más antiguo es la sal de mesa, la cual se sigue utilizando en la actualidad para conservar productos cárnicos. En el siglo XX se dieron grandes avances en la conservación de alimentos por medio de agente químicos, fue entonces cuando empezaron las revisiones de daños a la salud.

2.4.1 Agentes antimicrobianos naturales en los alimentos

El uso de agentes antimicrobianos en la industria de alimentos es una práctica muy común para extender la vida útil de diferentes productos. Los antimicrobianos, son agentes químicos que actúan inhibiendo y/o disminuyendo el crecimiento de microorganismos, y en algunos casos pueden actuar provocando su muerte. Los blancos principales de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones alimentarias (agentes

infecciosos y productores de toxinas) y los que alteran los alimentos, cuyos productos metabólicos finales (catabolitos) o enzimas causan malos olores, sabores desagradables, problemas de textura, cambios de coloración o riesgo sanitario (Davidson y Zivanovic, 2003).

La eficacia de los antimicrobianos alimentarios depende de muchos factores entre los que se incluyen: el pH, la capacidad amortiguadora del alimento, el tiempo y la temperatura de almacenamiento del mismo, el microorganismo de interés, el tipo y la concentración del antimicrobiano, pudiendo actuar sobre la pared celular, la membrana celular, las enzimas metabólicas, así como la síntesis de proteínas y sistemas genéticos (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

2.4.1.1 Agentes antimicrobianos naturales

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma, apariencia y mayor comodidad. Es por esto el deseo de la sociedad moderna de consumir alimentos frescos, por lo que ha incrementado la popularidad de los alimentos “mínimamente o parcialmente procesados”. Este tipo de alimentos siguen los pasos mínimos de preparación, tratando de cambiar lo menos posible las cualidades de “alimento fresco” en la medida que sea posible, pero al mismo tiempo haciéndolo un alimento seguro y con una vida de anaquel suficiente para su transporte hasta el consumidor (Alzamora, 1997).

En la formulación de los RC se pueden incorporar productos naturales con actividad antimicrobiana procedentes de plantas, organismos marinos, insectos o microorganismos como alternativas viables al uso de los químicos de síntesis (Cowan, 1999; Triphany y Dubey, 2004).

2.4.1.1.1 Clasificación de antimicrobianos naturales por su origen:

- Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas (Beuchat, 2001) y polisacáridos como el quitosán (Davidson y Zivanovic, 2003).
- Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001).
- Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

2.4.2 Plantas con acción antimicrobiana

De acuerdo con Pitman y Jorgensen (2002), se estima que en el mundo existen entre 310000 y 422000 especies de plantas, encontrándose en los bosques tropicales cerca de 125000 especies (Mendelsohn y Balick, 1995). Dentro de esta diversidad, existen especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Harvey, 2000).

Como parte de su metabolismo, las plantas producen una diversidad de compuestos orgánicos, de los cuales la mayoría no parece tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos componentes se les conoce como metabolitos secundarios y sus propiedades químicas se han investigado ampliamente desde mediados del siglo XIX (Croteau *et al.*, 2000). Esta diversidad bioquímica es el resultado de la coevolución entre plantas y otros organismos, incluyendo virus, bacterias, nemátodos, insectos y mamíferos (Ehrlich y Raven, 1964; Duke, 1990; Rausher, 2001; Theis y Lerdau, 2003).

Se han evaluado muchas plantas en las que se han obtenido resultados gratos, como Montes y colaboradores (2000) evaluaron 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos fitopatógenos, y encontraron que entre 32 y 51% de las plantas evaluadas interactuaban con los hongos y causaban desde estimulación biológica hasta su inhibición total. Si se considera que la mayoría de los compuestos obtenidos de las plantas son biodegradables e inoctrinos, y que en México se encuentran aproximadamente 10% de las especies de plantas superiores del mundo y más de 40% de ellas son habitantes exclusivas del país (CONABIO, 1998), es viable explorar el potencial de empleo de sus extractos para controlar enfermedades en la industria de alimentos.

2.4.2.1 Grupos más comunes de compuestos que presentan acción antimicrobiana proveniente de plantas

Heterósidos sulfocianogénicos o heterósidos azufrados, son glucósidos que contienen tanto N_2 como azufre y se biosintetizan a partir de diversos aminoácidos, lo que da lugar a diferentes estructuras químicas. Su distribución es limitada, se encuentran principalmente en la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*), a las que proporcionan el olor y sabor característico.

Glucósidos cianogénéticos: Son sustancias orgánicas, también conocidas como heterósidos cianogénéticos, principios activos de diferentes familias botánicas (*Rosaceae*, *Linaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, etc.). Químicamente, corresponden a estructuras heterosídicas: su genina, que biogénicamente deriva de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina y valina, suele ser un aldehído o una cetona, generalmente el benzaldehído o la acetona, unidos al ácido cianhídrico en forma de hidroxinitrilo. La molécula de azúcar reductor se fija por la función hidroxílica para formar el heterósido. Ciertas plantas y animales tienen enzimas que hidrolizan y separan el azúcar liberando el cianuro, éste actúa directamente sobre las mitocondrias inhibiendo la producción de energía.

Compuestos fenólicos: Definidos químicamente como anillos bencénicos con uno o más grupos hidroxilo, existen más de veinticinco mil estructuras llamadas fenólicas, muchas de las cuales son usadas frecuentemente como conservantes por su acción antioxidante. En las plantas previenen la oxidación de las membranas y otros tipos de daños oxidativos. Como defensas, son de sabor desagradable, tóxicos e inhiben la digestión (figura 6). Los colores azules y rojos de la mayoría de las flores son proporcionados por flavonoides, los robles y el té son ricos en polímeros fenólicos llamados taninos, el olor de la gaulteria es debido a un ácido fenólico (metilsalicilato). Ha sido demostrado que estos compuestos tienen efecto antimicrobiano (Toda *et al.*, 1989) sobre una amplia gama de microorganismos, al parecer por su capacidad de acomplejar proteínas extracelulares y de la pared celular bacteriana.

Terpenos: Es el segundo grupo más importante de compuestos secundarios. Son muy diversos en estructura y actividad, aunque todos surgen del isopreno. La mayoría son volátiles e imparten el olor típico a coníferas, mentas y muchas otras especies herbáceas y arbustivas. Los triterpenoides, un subgrupo, incluyen muchos compuestos extremadamente amargos, como la curcubitacina de las calabazas y pepinos.

Alcaloides: Alcaloides: compuestos cíclicos que contienen nitrógeno. Están distribuidos extensamente entre muchas familias de plantas superiores, donde a menudo son producidos en las raíces. Su actividad en animales es diversa, pero muchos intervienen como neurotransmisores. Numerosos alcaloides son adictivos (Kutchan, 1995).

Glucosinolatos: Comprenden un pequeño grupo de compuestos también llamados heterósidos sulfocianogénéticos o heterósidos azufrados, son glucósidos que contienen tanto N₂ como

azufre y se biosintetizan a partir de diversos aminoácidos, lo que da lugar a diferentes estructuras químicas. Su distribución es limitada, se encuentran principalmente en la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*), a las que proporcionan el olor y sabor característico (Encinar 2012).

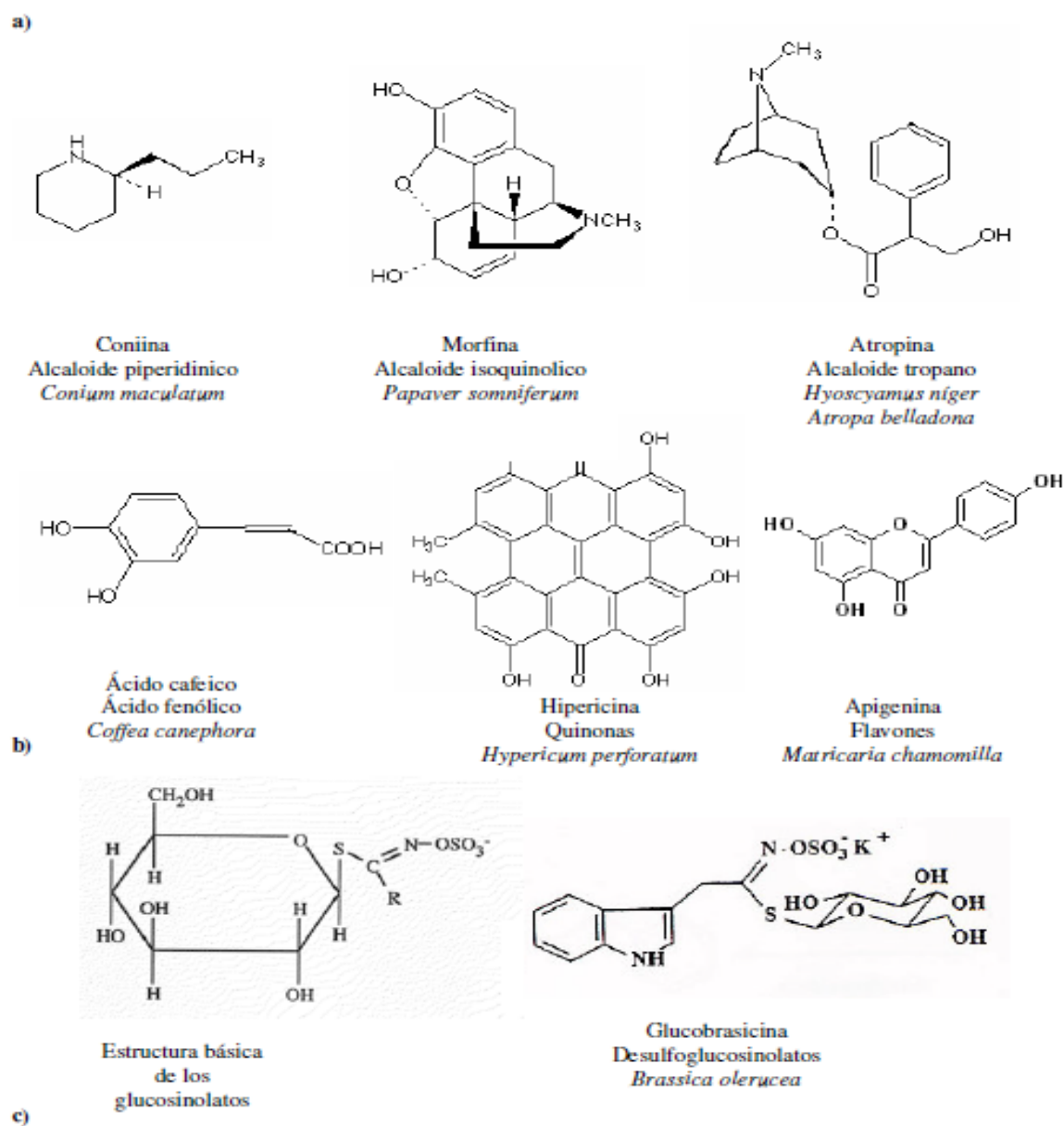


Figura 6. Estructura química de algunos compuestos con actividad antimicrobiana: a) Compuestos del grupo de los alcaloides, b) diferentes compuestos del grupo de los flavonoides y c) compuestos del grupo de los glucosinolatos. Fuente: Cowan, 1999.

2.4.2.2 Modo de acción de los productos derivados de las plantas

Los mecanismos de acción de estos compuestos son variables, por ejemplo la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales se ha postulado que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA, y de las lecitinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999). Entre los productos naturales más estudiados se encuentran los presentes en plantas, hierbas y especias y dentro de estos los aceites esenciales (AEs) de plantas aromáticas.

La bioactividad de estos compuestos puede variar dependiendo de la especie o hierba, tipo de microorganismo presente y alimento involucrado (Giese, 1994). La actividad antimicrobiana de las especies y plantas se atribuye generalmente a compuestos fenólicos presentes en los extractos o aceites esenciales de las mismas (Nychas, 1995; Shelef, 1983) y se reconoce que factores como contenido de grasa, proteínas, sales, el pH y la temperatura afectan la bioactividad de los compuestos fenólicos (Nychas, 1995; Tassou & Nychas, 1994).

Muchas plantas (tomillo, romero, orégano, espliego, menta, hierbabuena, hinojo, anís, cominos, etc.) y especias como clavo, canela, pimienta, nuez moscada, etc. Tienen acción antimicrobiana en alimentos. Los aceites esenciales de canela, romero, pimienta negra y clavo evitan la colonización de *Aspergillus* y otros mohos (Wendorff y Wisconsin, 1997). Por otra parte Nachaman (1995), determinó que la esencia de orégano y tomillo inhibe el crecimiento de *Aspergillus* en los granos de trigo almacenados.

Mientras que Matamoros *et al* (1999), en sus estudios realizados afirma que la mezcla de vainillina y sorbato de potasio inhibe mejor el crecimiento de mohos del género *Penicillium* que su presencia en forma individual.

2.5 Ajo

2.5.1 Generalidades

El ajo (*Allium sativum*) es una planta bulbosa, vivaz y rústica que pertenece a la familia de las *Liliaceae*. Su raíz se compone de 6-12 bulbillos, conocidos tradicionalmente como dientes de ajo, unidos por la base formando un cuerpo con forma redondeada llamada cabeza de ajos. Cada uno de los dientes, así como el bulbo, queda recubierto por una membrana semitransparente. De su parte superior nacen partes fibrosas que enraízan la planta a la tierra y le proporcionan el alimento. Su color es blanco-amarillento una vez retirada la delgada capa que lo recubre. Esta película posee tonos que van desde el blanco al gris. Si algo caracteriza al ajo son sus intensos aroma y sabor.

El ajo es una planta que ya se conocía 3000 años A. C. su cultivo se remota a los tiempos de Babilonia y muchas habían sido las personalidades históricas que han recomendado su uso.

2.5.2 Variedades

El color de la capa que envuelve los ajos es su elemento diferenciador en el mercado para distinguir tres tipos.

Ajo blanco o común. Es el ajo más consumido en los hogares españoles ya que resulta en seco un condimento ideal para numerosas recetas por su intenso sabor y aroma persistente. Su color exterior es blanquecino, y los dientes se distribuyen de forma aislada. Se puede conservar sin necesidad de nevera durante un gran período de tiempo. Su tamaño es mayor que el resto de tipos, pudiendo alcanzar diámetros de 10-12 cm.

Ajos morados o rosados. Su tamaño es menor y su color exterior se mueve en una amplia gama de morados-rosados. Su período de conservación es mayor que en el Ajo blanco.

Ajo tierno o Ajete. Se trata de la planta en su fase de juventud, a finales de invierno o comienzos de la primavera. Su textura presenta una menor rigidez que en su adultez, mostrándose como un alimento tierno que combina con platos de revueltos de verduras o tortillas. Los tipos de ajos descritos se aprecian en la figura 7, (López *et al.*, 2006).



Figura 7. Apreciación de las variedades de ajo

Fuente: Cohenete, 2010

2.5.3 Distribución geográfica del ajo

Aunque el ajo es originario de Asia, se cultiva ampliamente en países subtropicales y templados, fundamentalmente para el uso culinario.

La geografía productiva en México está bien definida, no solo por las regiones que la componen, sino también por el tipo de ajo que se produce. En la zona de Bajío-Centro que abarca los estados de Guanajuato y Querétaro, en los que se produce ajo morado, que se siembra en los meses de septiembre a octubre, mientras que en la zona Centro- Norte, que abarca los estados de Aguascalientes y Zacatecas, se prioriza la producción de ajo blanco, que tiene mayor aceptación en los mercados internacionales, se siembra de manera tardía entre los meses de octubre y noviembre (Castellanos *et al.*, 2000).

Independientemente de otras acciones terapéuticas, a la par de las culinarias, se le atribuyen propiedades antimicrobianas. Los primeros pasos para identificar los constituyentes activos del ajo datan de la mitad del siglo pasado, cuando Cavalito *et al* (2008) descubrieron la alicina (dialil sulfato), una sustancia que se formaba por la acción de la enzima alinasa, presente en la cubierta, cuando actuaba sobre la alicina que forma parte de los dientes de ajo, al machacarlos. Sus propiedades antimicrobianas se confirmaron frente a *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* y otros patógenos. Estudios más modernos han aportado nuevos datos acerca de los compuestos causantes de la capacidad antimicrobiana del ajo (figura 8). Actualmente existen muchos preparados comerciales, de los cuales la mayoría contiene polvo o aceite de ajo. El primero es una preparación de dientes de ajo pulverizados que en contacto

con agua produce alicina; el aceite de ajo se produce comercialmente mediante el calentamiento de sus dientes a 100°C y la recolección de los vapores destilados, proceso en el cual la alicina se convierte en dialil sulfuros y otros compuestos. Estudios realizados *in vitro* con diferentes microorganismos han revelado que el aceite de ajo tiene una concentración mínima inhibitoria (CMI) menos para los microorganismos estudiados, apuntando que los dialil sulfuros poseen una mayor acción antimicrobiana que la alicina.



Figura 8. a) Descripción ilustrativa de la Planta de ajo, así como **b)** las partes del bulbo,

2.6 Gobernadora

2.6.1 Descripción botánica

Larrea tridentata es un arbusto perenne xerofito siempre verde. Su edad puede exceder a los 100 años, aunque algunas plantas pueden sobrevivir cientos o miles de años a través de reproducción vegetativa asexual, ya que las raíces producen brotes o retoños que después se convierten en nuevas plantas. La edad se determina por el tamaño de la corona radicular. La raíz crece solo cerca de 170 cm hacia abajo, pero se ramifica hasta más de 4 m lateralmente (Brinker, 1993). El tamaño de la planta varía de 0.5 a 4 m en altura dependiendo de la lluvia de invierno o verano, y la altura promedio varía de acuerdo a su raza de ploídia (diploide 86 cm, hexaploide 112 cm y tetraploide 138 cm). No hay tallo principal pero las ramas gruesas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotómica lateralmente (Coyñe y Roberts, 1975). Las hojas son pequeñas y bofoliadas, de un verde oscuro a verde amarillento con cutículas gruesas y una capa resinosa, tienen peciolo cortos y crecen opuestas en las ramas. Las flores son amarillas (Figura 9) usualmente aparecen al final del invierno o a principios de la primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia,

crecen cerca de las terminaciones de los retoños jóvenes como capullos solitarios con cinco pétalos y su polen y néctar atraen a muchas abejas.



Figura 9. Follaje de un arbusto de gobernadora (*Larrea tridentata*) donde se aprecian algunas características distintivas de las hojas bifoliadas, flores, y los frutos con su cubierta vellosa.

2.6.2 Distribución geográfica

L. tridentata domina aproximadamente 17.5 millones de Has desde el oeste de Texas hasta el sur de California en los Estados Unidos (Duirsborg, 1952). Su rango en el desierto Mojave va desde parte sur de California y Nevada a la parte central de Arizona y Nuevo México, limitado por heladas hivernales o lluvias excesivas de invierno. En la República Mexicana, la gobernadora se encuentra en la parte del Desierto Sonorense, incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur y Sonora, y en el desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí y Durango. Se estima que el 25% (500,000 km²) del territorio nacional está cubierto con este arbusto de las zonas áridas (Belmares *et al.*, 1979). Las razas de esta especie se caracterizan por ser diferentes en su número cromosómico, ya que las plantas del desierto Chihuahuense son diploides ($n=13$), las del Sonorense son tetraploides ($n=26$) y las del Mojave son hexaploides ($n=39$) (Sakakibara *et al.*, 1976). Su rango de adaptación en elevación es menos del nivel del mar en el Valle de la Muerte en California, hasta más de los 2500 m en las sierras del norte de México (Van Davender, 1990). Crece bien en planicies secas y mesas, rodeando colinas y

declives, y en varios tipos de suelos, excepto arcillosos, salinos o graníticos (Shreve y Wiggins, 1964). Su crecimiento ampliamente distribuido en áreas generalmente consideradas como improductivas, ha conducido a hacer estudios de su potencial valor comercial.

2.6.3 Constituyentes fotoquímicos

Los principales compuestos en la resina de *L. tridentata* reportados en la literatura son numerosos, sin embargo, en el cuadro 9, se presenta un resumen de los más importantes. El compuesto más importante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidermales superior e inferior de las hojas, y tallos es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), uno de los antioxidantes mejor conocido (Seigler *et al.*, 1974).

Cuadro 9. Constituyentes fotoquímicos de *Larrea tridentata* (Brinker, 1993).

Porcentaje del peso seco	Tipo	Compuesto
16-21	Lignanosen fenólicos	Ácido dihidroguaiarético, hemino, ácido nordihidroguaiarético, nordihidroguaiacina
5-7.5	Flavonoides	Apigenina, Kaempferol
10-15	saponinas	
	Triterpenos	Larreagenina A
0.1-0.2	Monoterpenos	Ácido Larrético
	Volátiles	
	Hidrocarburos 35	Alfa pineno, Delta-3-careno, limoneno
	Aromáticos	Benzaldehído, Benzilacetato, Benzilbutano, Metil naftaleno,
	Esteroides	Beta-sitosterol, colesterol, campesterol
	Taninos	
	Carbohidratos	Glucosa, sucrosa

70.1 (de tallos)	Lípidos	Alkil esterres (C46-C56)
16.6	Aminoácidos	Fenilalanina, isoleucina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina
	Vitaminas	
15.6 mg/Lb		Caroteno
19.8 mg/100 g		Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio, Potasio, Calcio, Magnesio, Hierro, Fósforo, Azufre.

Tomado de Lira Saldivar, 2003

2.6.4 Etnobotánica y antropología.

Son diversos los padecimientos en los que se aplican las propiedades medicinales de la gobernadora, siendo su uso más común en aquellos que son de origen renal urinario, entre ellos: cálculos renales o de vejiga, para deshacerlos se recomienda tomar como agua de uso la cocción de ramas o de toda la planta; malestares renales (dolor de riñón, mal de orín, mal de piedra), cistitis (inflamación de la vejiga y tapiadura), para aliviarlos se pueden ocupar ramas (jóvenes), raíces, hojas o corteza, en cocimiento administrado en ayunas (Baja California Sur, Durango, Hidalgo, Guanajuato y Michoacán).

Con frecuencia se le emplea en problemas ginecológicos, como esterilidad femenina, mediante lavados vaginales con el cocimiento de las hojas, con la finalidad de regularizar el sangrado o quitar los dolores menstruales. Como conceptivo, cuando las mujeres no conciben porque están "descompuestas de la matriz por enfriamiento", se administra un té preparado con gobernadora, manzanilla y canela, además, de dar un masaje para calentar a la mujer. Aunque también suelen usarse las raíces, ramas o corteza en cocimiento como abortivo. Se utiliza para aliviar el dolor de reumas; el cocimiento de la planta o las ramas puestas en alcohol, se dejan reposar por un día, ambas preparaciones se usan en frotación, o sólo se aplica la planta soasada en la zona dolorida.

Asimismo, se reporta para tratar anemias, catarro, diabetes, dolor de cabeza, tos, úlcera, uretritis, presión sanguínea e infecciones en los pies, se sugiere beber el cocimiento de las

raíces, ramas o corteza, en lugar de agua, hasta recuperarse; con este mismo cocimiento, se frota el área dolorida o es usado en baños cuando se tienen hemorroides.

Cuando hay mala digestión o dolor de estómago se ingiere la infusión de las ramas, o bien, estas se aplican calientes sobre el vientre; para aliviar hinchazones o inflamaciones del cuerpo, se ponen fomentos calientes con la infusión de las hojas, la que además sirve para lavar heridas y granos; en caso de mareos, se machacan las hojas y se dan a oler; si se tiene calentura, se hierve toda la planta y con esto se baña todo el cuerpo y para lograr una buena cicatrización, se deja hervir la planta hasta que adquiera consistencia de miel, para aplicarla sobre golpes y heridas (Moreno *et al.*, 2011).

2.6.5 Propiedades antifúngicas in vitro de *L. tridentata*

De los primeros trabajos sobre el efecto fungicida y/ o fungistático de la resina de gobernadora reporta que al utilizar extractos crudos de cloroformo y etanol los hongos *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Phythium* sp. Pringsh. *Rhizopus nigricans* Ereb. Fueron controlados *in vitro*, tanto con el extracto metanólico como el clorofórmico; no fue el caso de *Fusarium oxysporum* Shelechtend.; Fr., ya que con 1000 ppm de cada extracto, solo se controló en un 76 y 93% respectivamente (Fernández *et al.*, 1979). Posteriormente otros autores han venido corroborando *in vitro* las propiedades antifúngicas de la gobernadora, ya sea con productos obtenidos con diferentes extractantes, o bien con material vegetativo seco y molido. Los resultados obtenidos por Velázquez (1981), indican que el extracto que mejor efecto manifestó en estudios *in vitro* fue la fracción etanólica a dosis de 2000 ppm, observando un crecimiento nulo a los 15 días después de la inoculación del hongo *Cytosporina* sp.

Otros estudios realizados por Moreno *et al.*, (2011) evaluaron el efecto fúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de *Aspergillus flavus* y *Penicillium*, mediante dos técnicas; la técnica del pozo en agar con la adición de 50µL del extracto en concentraciones de 100, 200, 400 y 600 mg/ Ml; y por la técnica de dilución de extracto de agar, mezclando los extractos con el medio PDA en concentración de 100 mg/. La actividad del extracto se reflejó por la formación de un halo de inhibición en la primera técnica y por el crecimiento radial del hongo en la segunda. Los resultados arrojados por ambas técnicas permitieron detectar los efectos antifúngicos que presentaron los extractos; destacando especialmente los etanólicos y metanólicos, ya que con ellos se lograron

inhibiciones de hasta el 100% en ambas cepas, mostrando concentraciones mínimas inhibitorias que van de 3 a 7 mg/mL.

Al respecto Tequida *et al.*, (2002) quienes observaron que los extractos alcohólicos de *Larrea tridentata* L. mostraron una inhibición del crecimiento de *A. flavus* de 71.2 y 76%, con los solventes metanol y etanol respectivamente. Estos autores también reportan que el crecimiento de *P. expansum* se vio afectado con extractos etanólicos de *L. tridentata*, ya que el hongo presentó un desarrollo de 0.5 cm de diámetro; mientras que el testigo tuvo un crecimiento de 1.2 cm, esto representó una inhibición de 58.3 y 50% respectivamente, la prueba fue efectuada mediante la técnica de dilución de extracto en agar. (Moreno *et al.*, 2011).

2.7 Clavo (*Zyzygium aromaticum*)

2.7.1 Descripción botánica

El clavero es un árbol perenne de la familia de las mirtáceas que puede llegar a medir unos 12 y 15 m de altura, tardando 20 años en desarrollarse, pero puede seguir produciendo fruto hasta 50 años. Su corteza es gris, con hojas puntiagudas muy aromáticas parecidas a las del laurel, semejantes a las del laurel, provistas de numerosas glándulas que le confieren un tacto pegajoso. Se le dió su nombre por el parecido que tienen las yemas florales de este árbol a un clavo oxidado, además de que los pétalos son amarillos. En indonesia se produce la mayor cosecha de clavo de olor, le siguen Madagascar, Tanzania, Sri Lanka, Malasia y la Isla de Granada. El clavo de olor posee un aroma fuerte, este árbol da un fruto de color rojizo o amarillo (Bonivento *et al.* 2008).

2.7.2 Generalidades del clavo

El fruto se recolecta cuando la yema floral todavía no se ha abierto, ya que cuando éstas se desarrollan por completo pierden su aroma. Al principio, las yemas florales tienen una tonalidad rosa, pero a medida que van creciendo adquieren una tonalidad rojo fuerte que indica la fecha de recolección del fruto (Figura 10). Los principales productos obtenidos del fruto del clavo son las propias semillas de clavo, clavo molido, oleorresinas y aceite esencial obtenido de los tallos, hojas y semillas de clavo (Hernández, 2011).



Figura 10. Botón floral de la planta de clavo.

Las semillas de clavo (Figura 11) son recolectadas cuando han alcanzado su talla adecuada y se tornan de color rojizo. Después de la recolección, las semillas se separan del tallo a mano o mediante la utilización de una trilladora.

Inmediatamente después de la separación, las semillas son secadas al sol o usando secado artificial. El color y contenido en aceite de los clavos secados artificialmente no difiere enormemente de los mismos cuando son secados a la sombra (Hidayat y Nurdjannah, 1992). El almacenamiento de las semillas suele hacerse en un ambiente seco y con buena ventilación. Si no se realiza adecuadamente puede causar pérdidas de aceite por evaporación. La tasa de evaporación durante el almacenamiento depende de las condiciones físicas de los frutos, temperatura y humedad relativa (Purseglove *et al.*, 1981). Condiciones ambientales desfavorables pueden causar pérdidas de volátiles, crecimiento de hongos y desarrollo de aromas rancios (Reineccius, 1994).



Figura 11. a) Semilla de Clavo de olor en seco, y **b)** Semilla de clavo verde aun en la planta

La oleorresina de clavo es un líquido muy viscoso que contiene de 40-60% de eugenol (EG). Se utiliza en la industria farmacéutica para elaborar productos anestésicos, en la industria alimentaria como saborizante para condimentos y repostería, y en la industria cosmética para formular perfumes y cremas terapéuticas.

2.7.3 Principios activos del clavo (*Zizygium aromaticum*)

El aceite esencial de clavo está formado por una variedad de compuestos, esta composición varía dependiendo de su procedencia. Entre estos componentes destaca el eugenol (72-90%), como compuesto mayoritario, taninos como el β -cariofileno (4-21%) y eugenil acetato (0.5-21%). Además también se puede encontrar pequeñas cantidades de α -humuleno y trazas (<1%) de otros 25 a 35 constituyentes. La estructura química de los principales componentes de Aceite esencial de clavo AEC se aprecian en la figura 12. En un resumen de estos principios activos del clavo.

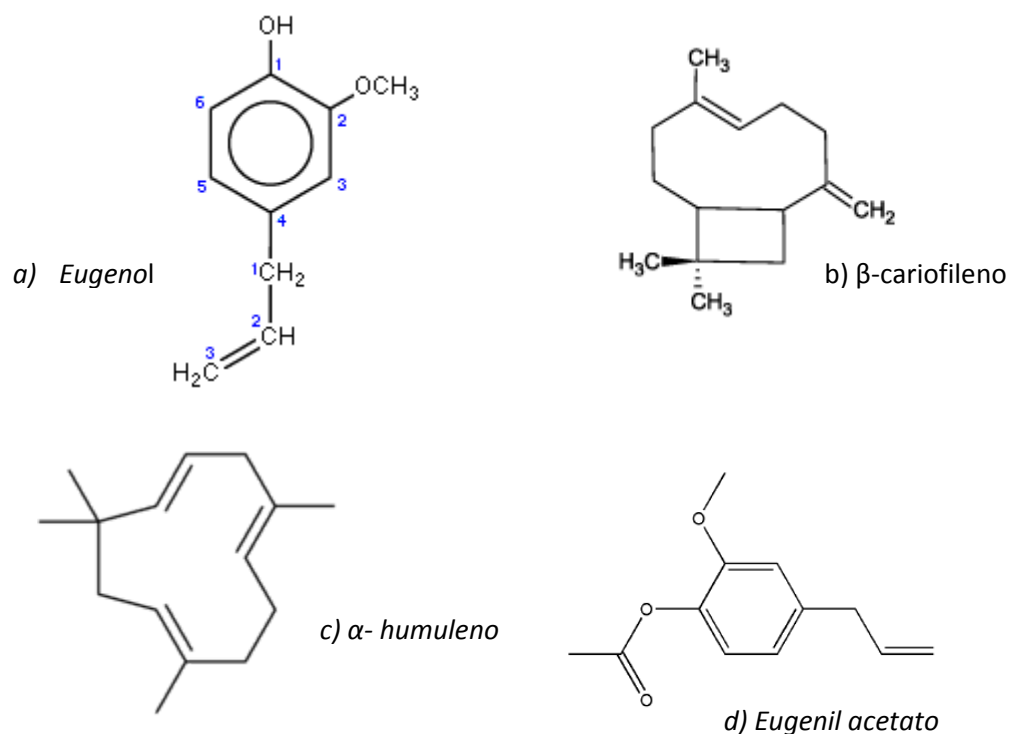


Figura 12. Estructura de los principales componentes químicos del clavo: **a)** Eugenol,

b) β -cariofileno, c) α - humuleno, y d) Eugenil acetato.

2.7.4 Usos y aplicaciones del clavo de olor (*Zizygium aromaticum*)

El clavo al igual que la canela, es una planta de gran utilidad para el hombre, forma también parte de la preparación de comidas, es medicinal por sus propiedades benéficas en el tratamiento de muchas enfermedades y es considerada de uso industrial.

a) Usos alimenticios: se usa en la preparación de comidas debido a que es un agente que proporciona fragancia y sabor, acompaña muy bien a los platos dulces y los salados, en preparaciones de pollos, guisados de conejo, arenques, jamos glaseado, plátanos asados y se usa en pastelería, en la preparación de arroz y vinos (Bonivento et al. 2008).

b) Usos medicinales: Para el mal aliento y dolor de muela, el aceite en combinación con pasta de óxido de zinc es eficaz para la alveolitis seca, los estudios en animales indican que puede reducir la fiebre, sirve para el dolor abdominal, alergias, arteriosclerosis, es antihistamínico, antioxidante, antimutagénico, para intoxicaciones inducidas por arseniato, (prevención), para el tratamiento de asma, pie de atleta, (Wales, 2001; Bonivento et al, 2008). Los sesquiterpenos del clavo de olor tienen propiedades anticancerígenas, según experimentos demostrados en ratas evaluando la infusión de brotes reduce el cáncer de pulmón, el deshidroeugenol y el trans-coniferilaldehido son eficaces contra algunos agentes mutagénicos que participan en el desarrollo de cáncer (García et al., 2006).

c) Otros usos del clavo: en la industria farmacéutica y de cosméticos, es antibacterial, antihongos, para larvas o parásitos, es repelente de mosquitos (tópico), el eugenol es un constituyente del clavo, en pasta o mezclado como cemento dental se usa como relleno y material de restauración, el aceite de esta planta es usada por el ganado para impedir la fermentación bacteriana (Wales, 2001).

2.7.5 Actividad antifúngica

Las propiedades antifúngicas del AEC se deben principalmente a su componente mayoritario EG (Manohar et al., 2001). Cox et al, en 2001 demostraron que la actividad antifúngica es debida a su acción sobre la membrana celular, provocando la desestabilización de la misma e induciendo la muerte celular (Cox et al., 2001).

La efectividad del AEC ha sido demostrada en *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* (Tampieri *et al.*, 2005) y *Aspergillus niger* (Pawar y Thaker, 2006). Núñez *et al.* (2001) estudiaron el efecto de la temperatura, el tiempo de contacto y la concentración (0,2%-0,8%) (v/v) de oleorresina de clavo dispersada en una solución saturada de azúcar sobre *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los resultados demostraron un aumento del efecto fungicida a 37 °C. Esta temperatura permitió la eliminación de un inóculo de 10⁶ UFC de *Candida albicans* en un tiempo de contacto de aproximadamente un minuto. Los resultados también demostraron que la actividad fungicida de la solución de clavo-azúcar sobre *Candida albicans* después de dos minutos de contacto fue muy similar a los desinfectantes utilizados normalmente en centros hospitalarios, como povidona yodada y cloroxilenol. A pesar de que la oleorresina demostró un importante efecto letal, *Penicillium citrinum* y *Aspergillus niger* fueron más resistentes al tratamiento. Después de 60 minutos, la oleorresina de clavo (0,4%) (v/v) disuelta en soluciones acuosas causó un 99,6% de reducción de la población inicial de *Trichophyton mentagrophytes*.

Un estudio más referente a la utilización del clavo es el realizado por Alvarado *et al* (2011), en el que uso aceites esenciales de canela, clavo, tomillo y quitosano para evaluar su actividad fúngica sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill, agente causal de la pudrición blanda del tomate.

Pawar y Thaker (2006), estudiaron los efectos inhibitorios contra el hongo *Aspergillus niger*, en estos ensayos se utilizaron 75 aceites esenciales de corteza de canela, clavo de olor, y hierba de limos (*Cymbopogon citratus*), en el que se mostró que estos extractos inhiben el crecimiento de las hifas y las esporas de este hongo.

Otros autores han realizado estudios en alimentos como el pan, en el que Pilco *et al* (2009) usaron aceite esencial de clavo de olor para la conservación de pan artesanal usando tres concentraciones (10µl, 12.5 µl y 15 µl), analizando mohos del género *Penicillium*, presentes en el pan artesanal, en este estudio se comparó la efectividad del aceite esencial de clavo de olor con un antimoho comercial (Pangermex, aceite esencial de cítricos), aplicándose en forma de spray. El aceite de clavo presenta la misma capacidad inhibitoria que el antimoho comercial por un periodo de 10 días.

2.8 Higuierilla (*Ricinus communis*)

2.8.1 Descripción

La higuierilla, palma cristi o ricino, *R. communis* es una planta anual que se encuentra como arbusto o árbol, llegando a medir de 1 a 12 m de altura. Sus hojas son alternas y palmeadas (Aguilar y Zolla, 1982). Su raíz es tipo pivotante, las flores se encuentran arregladas en panículas o racimos terminales; las masculinas se encuentran abajo y las femeninas en la parte superior de los racimos. Presenta frutos globosos, triloculares y con espinas suaves. Dentro de cada fruto se encuentran 3 semillas casi ovales con una rígida testa rojiza-café. Dependiendo de la variedad, el tamaño de la semilla varía de 0.8 a 2.2 cm de largo y de 0.4 a 1.2 cm de ancho (Frohne y Pfander, 1983; Pacheco, 2009).

Existen distintas variedades: la Al Guarani, Carmenita roja, Carmencita rosa, Gibsonii, Impala, Mirante, Rosada, Sanguienus, Verde, Zanzibariensis y Zanzi palm (Toledo et al., 2006), entre otra. Estas variedades se han obtenido mediante un proceso de selección, potenciando características de interés comercial para la industria (Gilvan et al., 2006).

2.8.2 Distribución

Aunque su origen aún no se ha determinado de Souza *et al.*, (2007) afirman que la higuierilla es originaria de África, India o China (Scarpa y Guerci, 1982). En México la higuierilla se distribuye en Baja California, Chiapas, Chihuahua, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán, en forma silvestre, y de manera cultivada en los estados de Oaxaca, Colima, y Tamaulipas (Pacheco, 2009).

La higuierilla (*Ricinus communis*) es una planta que en muchos lugares es considerada como maleza, crece cerca de las casas, ríos y milpas (figura 13). Miembro (1990) describe al lugar donde habita la higuierilla como ruderal, arvense y ubicado en los márgenes de los ríos, en áreas abiertas de bosque de encino, pino-encino. Tiene algunos usos medicinales, pero, también se ve un amplio mercado de comercialización por el contenido de aceite presente en la semilla.

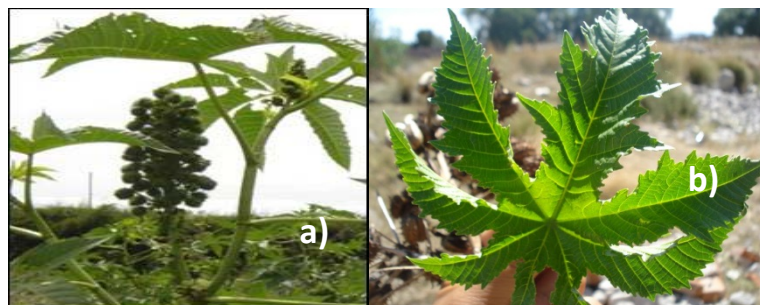


Figura 13. a) Planta de higuera *R. communis* con sus frutos y, **b)** Hoja higuera.

2.8.3 Usos de la higuera

Esta planta es una maleza en zonas agrícolas y urbanas, no obstante se ha estudiado por sus propiedades secantes, medicinales y el uso de su aceite en la industria para la elaboración de biocombustible, para la fabricación de pinturas, jabones, cosméticos, barnices, fibras sintéticas, resinas y lubricantes en el ara automotriz y aeronáutica (Turner *et al.*, 2004). En el área agrícola, la torta o bagazo de la higuera se utiliza como fertilizante orgánico, además de que hojas y semillas son usadas como materia prima para la elaboración de extractos para el control de insectos plaga, roedores, moluscos y fitopatógenos con resultados exitosos (Rodríguez, 2005).

2.8.4 Actividad biológica de la higuera

Las hojas tiernas tienen más principios insecticidas que las hojas maduras. Los compuestos de la higuera (*R. communis*) que tienen propiedades insecticidas son la ricina y la ricinina. La ricina, presente en la albumina de la semilla, es un polvo blanco, inodoro, soluble en solución de cloruro sódico al 10%, con toxicidad muy elevada. Con relación a la ricinina ($C_8H_8N_2O_2$), alcaloide presente en la semilla y hoja, asienta que es una sustancia cristalina e incolora y soluble en agua, alcohol, eter y cloroformo. Es un ester metílico del ácido ricínico que posee un grupo nitrilo (-CN) y una función cetónica (CO), que no forma sales con ácidos.

De acuerdo a esta información las hojas tiernas son más tóxicas para insectos que las hojas maduras por tener en mayor concentración la ricina y la ricinina (Rodríguez, 2011).

2.9 Aplicación de aceites esenciales en recubrimientos comestibles

En la actualidad, varios autores han utilizado los aceites esenciales como aditivos en las formulaciones de sus recubrimientos. La incorporación de agentes antimicrobiales como es el caso de los aceites esenciales (anís, cardamo y tomillo) en películas, cubiertas o empaques, se ha probado en varios productos alimenticios como carne y productos de panadería, inhibiendo el desarrollo de hongos, bacterias y levaduras (Cagri *et al.*, 2004). Plotto *et al.* (2003), adicionaron aceite de tomillo (10 g l^{-1}) al recubrimiento, obteniendo en frutos de tomate una significativa inhibición en el crecimiento de *B. cinerea*.

2.9.1 Aplicación de la combinación quitosano y aceites esenciales y su efecto en el control de microorganismos

En estudios realizados por Ponce *et al.* (2008), se demostró el efecto inhibitorio de cubiertas comestibles con quitosano y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) al 1%, sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en la superficie de calabazas (*Cucurbita moschata* Dutch). Asimismo, este recubrimiento logró inhibir 5 mm más el halo de crecimiento de esta bacteria en comparación con el resto de otras cubiertas probadas como fueron las combinaciones de quitosano y olivo (*Olea europea* L) y quitosano y chile (*Capsicum annum* L.). Otra combinación que demostró buenos resultados fue la reportada por Pranoto *et al.* (2005), estos autores realizaron un recubrimiento a base de quitosano y aceite de ajo. Los resultados se mostraron favorables debido a que este recubrimiento controló el crecimiento de los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Vargas *et al.* (2006), elaboraron un recubrimiento de quitosano y ácido oleico, para cubrir frutos de fresa observándose que la incidencia de microorganismos se redujo hasta en un 80% al término de la evaluación en comparación con los frutos no tratados.

2.10 Antimicóticos más usados a nivel comercial

Anfotericina y B nistatina. El primero es un antibiótico más importante y se usa en el tratamiento de diversos padecimientos micóticos diseminados. Se clasifica como polieno, destruye la membrana celular micótica a causa de su afinidad por el ergosterol (componentes de las membranas de los hongos, pero no de células bacterianas ni humanas). La nistatina es

otro antimicótico que debido a su toxicidad se usa típicamente en infecciones causadas por la levadura "*Candida*" (Ingrahan *et al.*, 1988).

Ketoconazol. Es el más importante de una familia de compuestos imidazólicos con actividad antimicótica. Todos bloquean la síntesis del ergosterol (Ingrahan *et al.*, 1988).

Fluconazol y tiazoles. Estos son una familia de antifúngicos relacionados, los cuales inhiben el crecimiento de los hongos al interferir la síntesis de los esteroides de sus membranas plasmáticas. Algunos de estos agentes se utilizan de forma tópica en el tratamiento de infecciones locales, pero otros se usan de forma sistémicos. Los más comunes son: cetoconazol, miconazol, terconazol, (Ingrahan *et al.*, 1988).

Fluorocitosinas. Son drogas sintéticas usadas en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas, muchas especies son resistentes por naturaleza a su acción (Ingrahan *et al.*, 1988).

Griseofulvina. Esta sustancia fue aislada por primera vez en los años 30, a partir del hongo "*Penicillium griseofulvum*", es un agente fúngico muy efectivo, inhibe el crecimiento de las células fúngicas porque interfiere en la división celular, los únicos hongos sensibles son los dermatofitos que invaden las células de la queratina de la piel, pelo, uñas, estos hongos producen infecciones que se denominan comúnmente tiñas, esta droga es efectiva contra esta clase de infecciones (Ingrahan *et al.*, 1988).

2.10.1 Fungicidas de uso agrícola

Benomilo. Fungicida sistémico con movilidad local de la familia bencimidazol, recomendado por el control de numerosas micosis foliares y de los frutos producidas por ascomicetos y hongos imperfectos por ejemplo: "*Rhizoctonia solani*", "*Penicillium spp.*", "*Venturia spp.*", "*Monilia spp.*", "*Botrytis spp.*", "*Sclerotia spp.*", "*Cercospora sp.*", "*Fusarium spp.*", "*Verticillium spp.*" (Latorre, 1994). En un estudio realizado por Rojas y Rondón (1995), encontraron que el hongo "*Fusarium decemcellulare Brick*" el cual causa las agallas del mango es altamente sensible al agroquímico benomil, ya que este patógeno mostro inhibición de su crecimiento y la mezcla de los fungicidas cicloeximida y benomil también lograron una buena inhibición de este hongo.

Bromuro de metilo. Tiene una acción biocida generalizada. Se utiliza en la esterilización del suelo, en granos almacenados y como tratamiento cuarentenario de frutas para exportación tiene acción fungicida únicamente a altas concentraciones. Los tratamientos se deben aplicar sobre un suelo húmedo con una temperatura superior a 50°C (Latorre, 1994).

Miclobutanil. Es un fungicida inhibidor del esterol recomendado para manzanos y peral, presenta un poder erradicante de 96h se utiliza como insecticida aplicado a la semilla para la prevención de ciertas enfermedades foliares y de la espiga en el trigo y otros cereales. (Latorre, 1994).

3. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación fue efectuada en las instalaciones dentro de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”; en el Laboratorio de Producción Animal, el Laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente al Departamento de Nutrición Animal, correspondientes a la División de Ciencia Animal, en Buenavista Saltillo, Coahuila, México.

El presente trabajo de investigación se dividió en 3 etapas las cuales se describen a continuación:

Etapa experimental 1. Producción de películas comestibles a base de mucílago de chíá

3.1 Elaboración de películas comestibles

3.1.1 Obtención del mucílago de Chíá (*Salvia hispánica*)

Se usó la metodología propuesta por Cuapio (2012), con modificaciones. El procedimiento consiste en emplear un vaso de precipitado (Pyrex) de 1000 ml, y adicionar 500 ml de agua destilada y 50 g de semilla de chíá (*Hyptis suaveolens*), llevándolo a una parrilla termo- agitador (Nuova II), calentando hasta llegar a 37°C, hidratando la semilla durante una hora, mediante agitación constante con agitador magnético.

Una vez que se alcanzó el tiempo de hidratación, se procedió a la molienda de la semilla en una licuadora (OSTERYZER) por 10 segundos a la mínima velocidad, recuperando el producto en un matraz Erlenmeyer. Después de esto, se procedió a centrifugar, en centrífuga (Centrífuga Sorvall Evolution Rc) a 3000 rpm durante 20 minutos, hasta su posterior utilización.

Posteriormente se emplearon los datos para la determinación de rendimientos.

3.1.2 Formulación de películas comestibles

Se formuló la película a base del mucílago de chíá previamente obtenido; inicialmente se usaron concentraciones a partir de 10% de las cuales había formación de la película, preparando una solución de 200 ml conformada por el 20% de mucílago de chíá, y

el 80% de agua destilada, además de 1% de glicerol (Merck) y 0.2% de CaCl₂ (CTR Scientific) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración de los componentes usados en el recubrimiento.

Componente %			Vol (ml)
Mucílago	Glicerol	CaCl ₂	
20-30%	1	0.15	30
	1.7	0.2	40

3.1.3 Elaboración de películas comestibles

Primeramente se midió el agua destilada en un matraz Erlenmeyer, llevándolo a la parrilla termo-agitadora a 50°C, con agitador magnético, adicionando el mucílago junto con el glicerol y el CaCl₂, hasta la total disolución de éstos. Enfriando la solución a 40° C, para después vertir en cada una de las cajas petri con volúmenes de 30, 40, 50 y 60 ml, secando las películas obtenidas a temperatura ambiente (Figura 14).

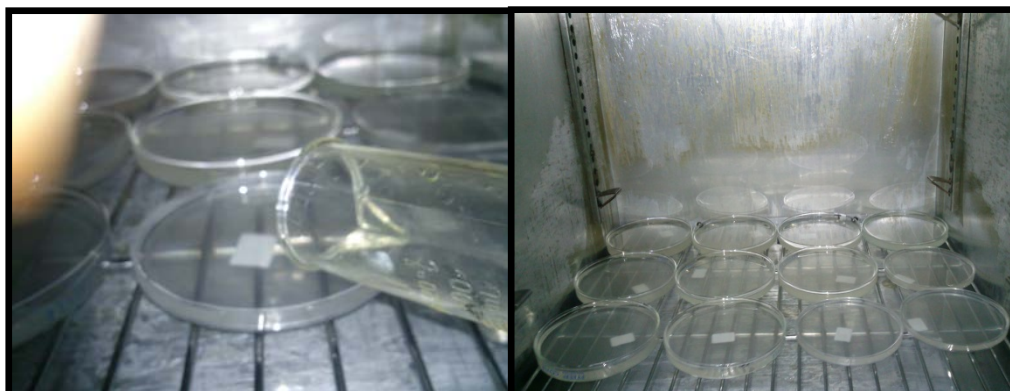


Figura 14. Secado de las películas en estufa de secado

Etapas experimentales 2. Efecto inhibitorio de antifúngicos sobre *Penicillium expansum*.

3.2 Material biológico

Las cepas del microorganismo *P. expansum* fue tomada de cultivos puros aislados y proporcionados por la empresa Biorganix Mexicana SA de CV Ramos Arizpe, Coahuila, México.

3.3 Mantenimiento y proliferación de las cepas

3.3.1 Preparación de medio de cultivo sólido

Se preparó medio de cultivo Agar PDA (BD Bioxón[®]) para el crecimiento de *P. expansum* agregando 39 g en 1000 ml de agua destilada, procediendo a disolver en flama de mechero hasta la disolución total del polvo y aparición de color cristalino; continuando con la esterilización en autoclave (PRESTO M.R) a 121°C a 15 Lb de presión, durante 15 minutos.

En condiciones asépticas y desinfectadas del área de trabajo; el medio previamente esterilizado fue vertido en cajas Petri de plástico estériles de 9 cm de diámetro (con aproximadamente 30 ml c/u), dejando solidificar a temperatura ambiente (Figura 15), evitando corrientes de aire, para después ser etiquetarlas y guardarlas en refrigeración a 6°C, hasta su posterior utilización.

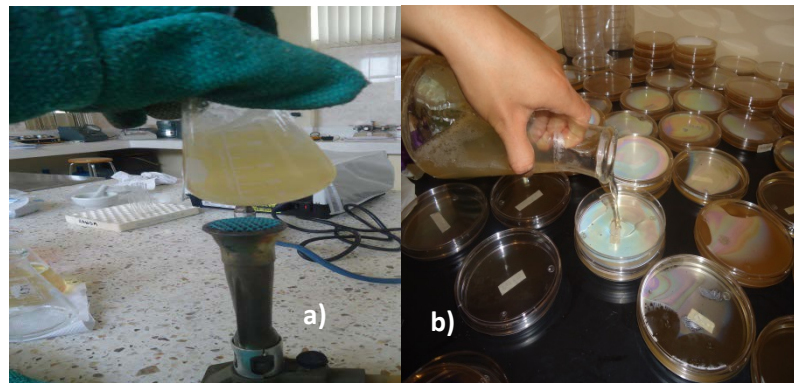


Figura 15. a) Preparación del medio de cultivo, b) Llenado de las cajas Petri

3.3.2 Crecimiento en medio sólido (Siembra en cajas de Petri por la técnica de punción)

La proliferación de los microorganismos se realizó mediante la técnica de punción, con ayuda del asa micológica (o asa recta); se realizó tomando parte del micelio de la cepa de cada uno de los hongos (*P. expansum*) y por una punción suave en el centro de la caja inocular el microorganismo (Figura 16), posteriormente se incubó (incubadora arsa, modelo AR-290) a 26°C por 5 días hasta observar crecimiento en el medio.

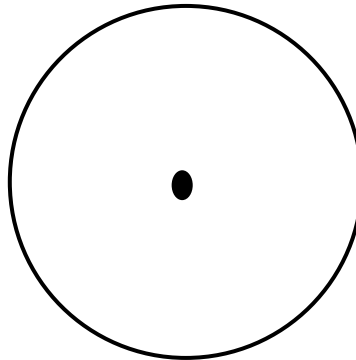


Figura 16. Siembra por la técnica de punción, utilizando asa micológica estéril sobre la superficie de un agar en caja de Petri (Fuente: Rojas, 2000).

3.4 Evaluación microscópica de las cepas

3.4.1 Tinción simple con azul de metileno

Se usó la técnica de tinción con azul de metileno para analizar las características morfológicas del microorganismo, realizando primeramente el frotis; poniendo una gota de agua destilada en el portaobjetos y adicionando la muestra de *P. expansum* utilizando el asa bacteriológica, homogenizando bien y fijando con calor pasando el portaobjetos varias veces por encima de la llama del mechero, hasta que se seque. Una vez que la fijación se haya realizado se añade el azul de metileno y esperar un minuto, posteriormente se lavó con agua, se secó y observó en el microscopio primero con el objetivo de 40X; luego de añadir aceite de inmersión se observa con el objetivo de 100X.

3.4.2 Observación con KOH al 10% (Hidróxido de potasio)

Se realizó con la finalidad de observar la estructura interna del hongo, mediante la evaluación microscópica en fresco con KOH, extrayendo la muestra del hongo con el asa bacteriológica, depositado en el portaobjetos con agua destilada.

3.5 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento en *P. expansum* empleando extractos de ajo, gobernadora, clavo, higuera, steribox comercial y oligosacáridos de quitosán.

3.5.1 Selección de agentes antimicrobianos

Los diferentes extractos vegetales fueron extraídos mediante los métodos de separación Soxhlet, infusión (Figura 17), los cuales fueron proporcionados por la empresa Biorganix, Coahuila.



Figura 17. Imagen de los extractos vegetales, proporcionados por Biorganix, Mexicana, ubicada en Ramos Arizpe, Coahuila.

Por otra parte cabe mencionar que los oligosacáridos de quitosán utilizados en ésta etapa fueron obtenidos mediante una enzima quitosanasa y caracterizados por Charles Rodríguez (2008). Los OQ de diferentes pesos moleculares fueron obtenidos a diferentes tiempos de fermentación (8, 12, 16, y 20 h), caracterizados como se indica en la figura 18.



Figura 18. Imagen de los oligosacáridos de quitosán en buffer de ácido acético - acetato de sodio a diferentes pesos moleculares y tiempos de fermentación.

3.5.2 Cinéticas de Inhibición cuantitativa de crecimiento de *Penicillium expansum*, con inhibidores de crecimiento

Se efectuaron las cinéticas de inhibición de crecimiento para *Penicillium expansum* en agar PDA, para lo cual se prepararon cajas Petri con este medio, midiendo 2000 ml de agua destilada y 78 g de medio de cultivo, una vez disuelto en el calor del mechero, fueron sometidos a esterilización en autoclave (PRESTO M.R) a 121° C, durante 15 minutos a 1 atm de presión. Se emplearon tres concentraciones de cada inhibidor 0.25%, 0.5% y 1% (cuadro 11).

Cuadro 11. Inhibidores de crecimiento para *Penicillium expansum*

Inhibidores de crecimiento	
Abreviatura	Antimicrobiano
E1	Clavo
E2	Gobernadora
E3	Ajo
E4	Higuerilla
E5	Steribox (comercial)
E6	OQ 8hr hidrólisis
E7	OQ 12hr hidrólisis
E8	OQ 16hr hidrólisis
E9	OQ 20hr hidrólisis
E10	Testigos

3.5.2.1 Preparación de medio envenenado

Una vez que el medio esterilizado fue enfriado a 40°C antes de la solidificación se adicionaron las concentraciones de los inhibidores, homogenizándolos, para luego ser vertidos en las cajas Petri de 9 cm de diámetro. Para el caso de los OQ fueron esterilizados mediante filtros de celulosa de 0.45 µm (MILLEX^RHA filter Unit 0.45 µm). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

3.5.2.2 Siembra de *P. expansum* en medio envenenado

Una vez solidificado el medio con los inhibidores se adicionó en cada caja un inóculo obtenido con el asa bacteriológica y mediante la técnica de punción (Figura 19), se depositó en el centro de la caja Petri; con el fin de determinar el crecimiento radial, para luego ser incubadas (incubadora AR-290) a una temperatura de 26°C, con monitoreo a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96, 120, 144 hr respectivamente), midiendo el crecimiento radial con regla de 30 cm.



Figura 19. Inoculación de las cajas con medio envenenado, usando la técnica de punción; **a)** extracción del inóculo, **b)** Siembra por punción en caja Petri con medio envenenado.

3.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los inhibidores de crecimiento

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se tomó como base las concentraciones usadas en la determinación del porcentaje de inhibición de los extractos.

Para la realización de esta prueba primeramente se procedió a la preparación del medio envenenado, (Figura 20) formado por los diferentes extractos evaluados así como los diferentes oligosacáridos en solución con Agar PDA, una vez que se determinó el porcentaje de inhibición (el cual se determinó empleando las velocidades específicas de crecimiento) de los

mismos, para determinar la concentración mínima a la cual se logra el porcentaje de inhibición, realizando siembras del hongo (*Penicillium expansum*) estableciendo rangos entre dos concentraciones según en las que se haya logrado la inhibición mayor (Cuadro 12). Siguiendo la misma metodología que la usada en la determinación del porcentaje de inhibición. El porcentaje de crecimiento y de inhibición fueron determinados mediante las siguientes fórmulas.

- El % de crecimiento se determinó mediante:

$$x = \frac{\text{Velocidad específica de crecimiento de la concentración usada}}{\text{Velocidad específica de crecimiento del control}} \times 100$$

La inhibición del crecimiento de cada uno de los extractos evaluados se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$100 - \% \text{ de crecimiento}$$

Cuadro 12. Rangos de concentraciones a evaluar de los extractos

Inhibidor	Concentraciones a evaluar %
Clavo	0,1; 0,15; 0,2
Gobernadora	0,5 – 1
Ajo	0,2- 1
Higuerilla	0,5- 1,8
Steribox 0.5	0,1; 0,15; 0,2
%	
OQ8hrs	0,5-2
OQ12hrs	0,5-2
OQ16hrs	0,5-2
OQ20hrs	0,5-2

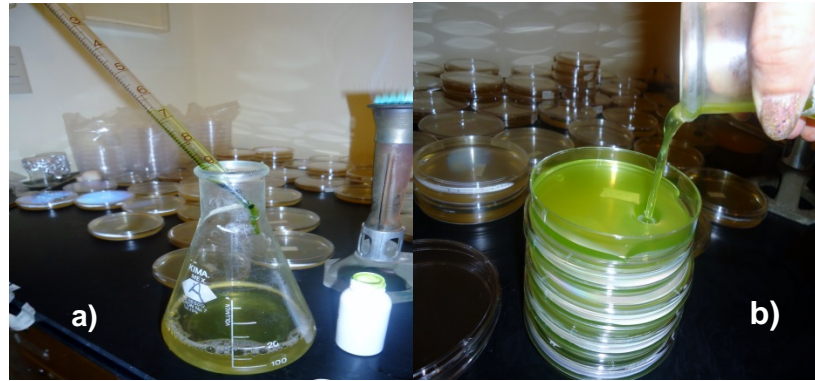


Figura 20. Preparación del medio envenenado; **a)** Adición del inhibidor a la solución PDA, y **b)** Vertido del medio en las cajas Petri.

Etapas experimentales 3. Actividad de la cubierta comestible a base de mucílago de chíá (*S. hispánica*) sobre manzanas *Golden delicious*.

3.6 Aplicación de recubrimiento comestible a base de pectina cítrica sobre manzana

3.6.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología, así como también en el Nutrición Animal ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

3.6.2 Obtención de los frutos

Los frutos usados para el análisis fueron obtenidos en la central de abastos de la ciudad de Saltillo, Coahuila, usando manzana nacional, variedad *Golden delicious*, (*Malus domestica*) de un peso promedio de 110 g provenientes de productores del estado de San Luis Potosí, estableciendo criterios de selección de los frutos, como ausencia de daños en la piel, ausencia visible de microorganismos, madurez y color. Los frutos fueron tomados y ordenados en grupos según el número de tratamientos a usar. Posteriormente fueron lavadas y desinfectadas con una solución clorada (500 ppm) por 5 minutos (Figura 21), secando a temperatura ambiente.



Figura 21. a) Selección de los frutos, **b)** lavado, y **c)** desinfección

3.6.3 Tratamientos aplicados a la manzanas (Golden delicious)

En el desarrollo del experimento se diseñó trabajar con 3 tratamientos principales, los cuales se describen en el cuadro 13. En el caso del tratamiento formado por cubierta y antimicrobiano (CcA), se aprecian los diferentes antifúngicos con la cubierta. Utilizando en este mismo tratamiento las concentraciones en las que presentó mejor poder inhibitorio así como la concentración mínima inhibitoria sobre *Penicillium expansum* para la aplicación del recubrimiento comestible sobre manzana

Cuadro 13. Diseño de los tratamientos

	TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	ABREVIATURA
	Control		SCA
	Con Cubierta		CC
		Cubierta y Clavo	CcA-CI
		Cubierta y Gobernadora	CcA-Go
		Cubierta y Ajo	CcA-Aj

FRUTOS	Cubierta y Antimicrobiano	Cubierta e Higuierilla	CcA-Hi
		Cubierta y Steribox 0.5%	CcA-St
		Cubierta y Oligosacáridos de quitosán 8h de hidrólisis	CcA-OQ8h
		Cubierta y Oligosacáridos de quitosán 12h de hidrólisis	CcA-OQ12h
		Cubierta y Oligosacáridos de quitosán 16h de hidrólisis	CcA-OQ16h
		Cubierta y Oligosacáridos de quitosán 20h de hidrólisis	CcA-OQ20h

3.6.4 Agrupación y clasificación de los frutos.

La selección de los frutos se realizó mediante lotes completamente al azar, la agrupación se efectuó tomando en cuenta el tratamiento correspondiente para cada uno, apartando a cada lote 5 repeticiones, una vez estando ya ordenados se procedió a la enumeración de cada fruto, procurando tener un estricto control para las observaciones y el monitoreo de los datos durante el desarrollo del experimento.

3.6.5 Aplicación del recubrimiento comestible

Una vez que se preparó la solución del recubrimiento de mucílago de chíá, destinado a aplicar a los diferentes tratamientos, se mantuvo a 37°C, los frutos fueron sometidos por inmersión al recubrimiento comestible por un tiempo no mayor a 5 segundos (Figura 22), inmediatamente fueron secados con una corriente de aire en cada fruto, aplicando dos veces este procedimiento a cada uno.



Figura 22. Inmersión de los frutos en la solución de mucílago de chíá (*S. hispánica*) y cada uno de los inhibidores de crecimiento.

3.6.6 Inoculación de microorganismos

Al obtener los frutos con el recubrimiento aplicado y deshidratado se procedió a la aplicación de las esporas fúngicas correspondientes de acuerdo al tratamiento establecido, a cada lote se le aplica una carga de 1×10^7 .

3.6.7 Almacenamiento de los frutos con los recubrimientos comestibles

Una vez que la cubierta aplicada al fruto secó completamente y se depositaron las esporas a los frutos, éstos se colocaron en recipientes plásticos; y se almacenaron a temperatura ambiente durante un periodo de 5 semanas como se aprecia en la Figura 23, con el fin de mantener el fruto en condiciones normales de almacenamiento.

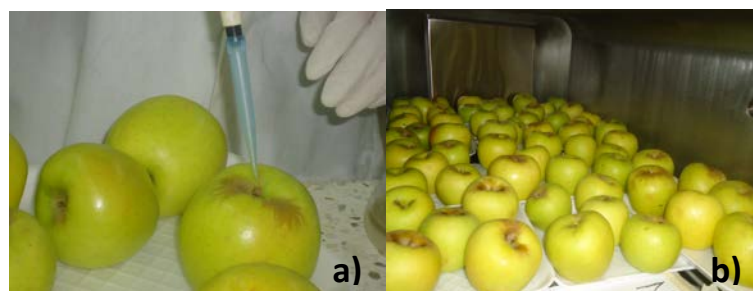


Figura 23. a) Frutos inoculados y b) almacenados a temperatura ambiente.

3.6.8 Evaluaciones efectuadas a los tratamientos.

Una vez almacenados los tratamientos durante este periodo se monitorearon 2 parámetros con el fin de medir la vida de anaquel del fruto.

3.6.8.1 Pérdida de peso

Este parámetro se registró semanalmente por un lapso de 5 semanas, que se efectuó el experimento mediante el uso de una balanza gravimétrica (Explorer, OHAUS).

3.6.8.2 Cambios de apariencia

Al igual que el parámetro anterior, éste fue evaluado semanalmente mediante el uso de una cámara fotográfica SONY Cyber-shot de 15.1 MEGAPIXELES.

3.6.8.3 Daños efectuados a los frutos por la acción de *Penicillium expansum*

Los daños por el deterioro causado por la presencia del hongo en los frutos, se evaluaron visualmente tomando en cuenta la siguiente: 0= no dañado; 1= daño ligero (<25%); 2= daño moderado (>25% y <50%); 3= daño severo (>50% y <75%); y 4= completamente dañado (75-100%).

IDC= Σ (Nivel de daño) X (Número de frutos de éste nivel) / Número de frutos totales.

La mayor que se puede obtener es 4 y equivale al 100%.

Usando análisis visual, al término del tiempo de evaluación se definió la firmeza de los frutos, en cada uno de los tratamientos, mediante una escala del 1 al 5 donde 1 representa a los frutos con más arrugamiento y el 5 son los que no presentaron pérdidas de firmeza.

3.6.9 Diseño Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar empleando el programa Minitab ®16, los promedios de las mediciones se compararon mediante comparación de medias Tukey.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Etapa Experimental 1. Producción de películas comestibles a base de mucílago de chía

4.1 Elaboración de películas comestibles

4.1.1 Obtención del mucílago de chía

Usando la técnica de centrifugación se obtuvo un rendimiento del 50% de mucílago extraído, gracias a la modificación del volumen de agua destilada (0.5:5 (p/v) y la centrifugación que en comparación con la metodología usada por Cuapio (2012) se incrementó casi al doble, ya que él obtuvo un rendimiento de 24%; como se aprecia en la Figura 24; mientras que con la centrifugación se facilitó el desprendimiento del pericarpio incrementándose al doble, liberándose el mucílago, facilitando la búsqueda de la concentración de la película adecuada.

Se observó que es posible formar películas de chía a partir de una concentración del 20%, a ésta concentración se presenta una fina capa maleable en la caja Petri, que es favorable a lo que se busca en la aplicación del alimento a usar (manzana *Golden delicious*).

Otras de las características de las películas de *Salvia hispánica* es que son pegajosas, debido a que el mucílago presenta una viscosidad alta que puede mejorar el proceso de adhesión del recubrimiento en los alimentos, sin embargo se dificulta la manipulación en película.



Figura 24. a) Obtención del mucílago de chía; hidratación, b) mucílago centrifugado, y c) mucílago listo para usarse.

4.1.2 Formulación de películas comestibles

Las semillas de chía al ser sumergidas en agua, quedan envueltas por un material de aspecto gelatinoso conocido como mucílago, el cual es de interés no sólo desde el punto de vista nutricional sino de importancia como agente espesante en la industria alimentaria; representando una alternativa para la producción de películas comestibles a base de éste polímero.

Una vez que se extrae el sobrenadante de la semilla de chía, el contenido de fibra corresponde al 40%, de éste un 5% es correspondiente a la fibra soluble, conocida como mucílago. A respecto Lyn (2007) define al mucílago de chía como un tetrapolisacárido lineal formado por D-xilosa, D-glucosa, 4-o-metil-D-ácido glucorónico en proporciones de 2:1:1, cuyo peso molecular es variado entre 0.8 y 2.0×10^6 Da. Con una elevada viscosidad al estar disuelto en agua.

En el presente estudio se observó que las películas formadas a partir de éste mucílago, usando concentraciones a entre 20% y 30% , generaban películas con características con grosor, color, y maleabilidad, propias a las que se desean en el alimento, caracterizadas por Aguilar (2013) de igual forma probando diferentes volúmenes, de vaciado en las cajas petri (30, 40, 50, 60 ml), en donde el volumen de 30 ml fue el que mostró un grosor deseado en la película una vez que estuvo seca. Probando además 1.7 y 1% de glicerol como plastificante, logrando una humectación maleabilidad deseada a la concentración de 1%; probando además 0.15 y 0.2% de CaCl_2 . Finalmente la película que se decidió usar en el alimento fue la de 30% de mucílago, 0.2% de CaCl_2 , y 1% de plastificante (glicerol) según los resultados obtenidos en la caracterización efectuada por Aguilar (2013).

Un factor importante observado en la formulación de las películas a base de chía es el color que está en función de la concentración puesto que a mayor concentración, de mucílago, se vuelve más opaca la película (Figura 25). Otro factor importante que afecta el color de las películas es la técnica de extracción del mucílago, ya que si no se realiza adecuadamente, algunos componentes de la semilla como el pericarpio pueden ir dispersos en el sobrenadante, afectando las propiedades de las película como lo menciona Aguilar (2013).

En los resultados obtenidos se observa que el grosor de las películas es afectado por el volumen de la solución, ya que al incrementarse, es proporcional el aumento del grosor. Al respecto Aguilar (2013), menciona que el espesor en los films de pectina es proporcional a la concentración y volumen usado.

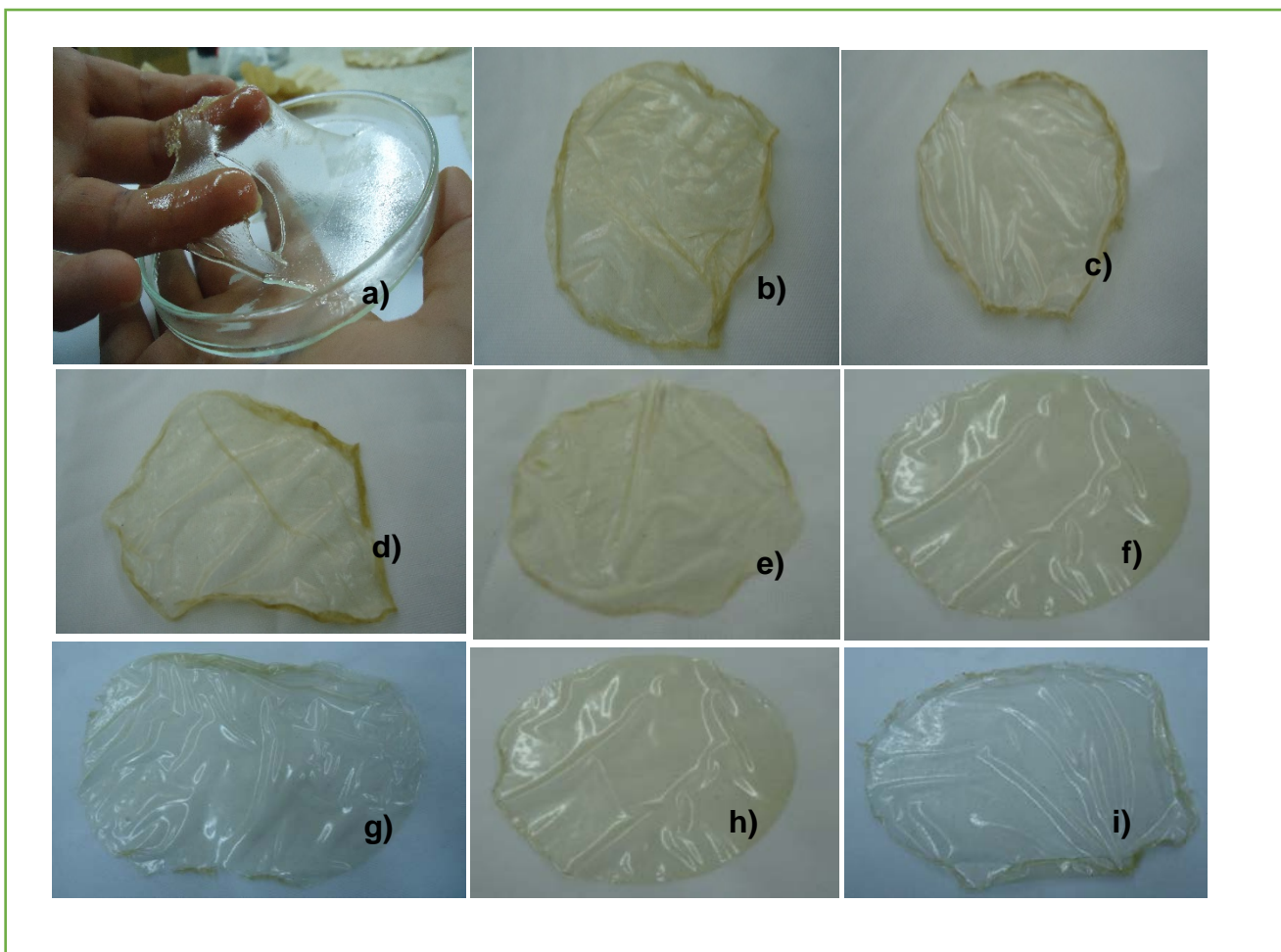


Figura 25. Películas de mucílago de chíá, con 1% de plastificante, CaCl_2 al 0.2%, y diferentes concentraciones de mucílago **a)** 10%/30 ml vol., **b)** 30% / 40 ml vol., **c)** 25%/50 ml vol., **d)**24%/60ml, **e)** 21%/30ml, **f)** 30% /30 ml vol., **g)** 22%/50 ml vol., **h)** 28%/ 30 ml vol., **i)**20%/40 ml vol.

Etapas experimentales 2. Efecto inhibitorio de extractos vegetales sobre *Penicillium expansum*

4.2 Material biológico

4.2.1 Mantenimiento y proliferación de las cepas

4.2.1.1 Crecimiento de *Penicillium expansum* en medio sólido PDA

La cinética de crecimiento de *P. expansum* se muestra en la Figura 26, en la que se puede apreciar que a las 24 hrs el microorganismo inicia su fase logarítmica, visualizando que a este tiempo hay un rápido crecimiento y un desarrollo del micelio cuyo crecimiento ocurre en las extremidades de las hifas, en ésta fase ocurre la utilización de los carbohidratos, nitrógeno, y fosfatos; además aparecen las esporas. Así mismo se aprecia la velocidad específica de crecimiento de *P. expansum* de 0.0091μ cm/día (centímetros por día).

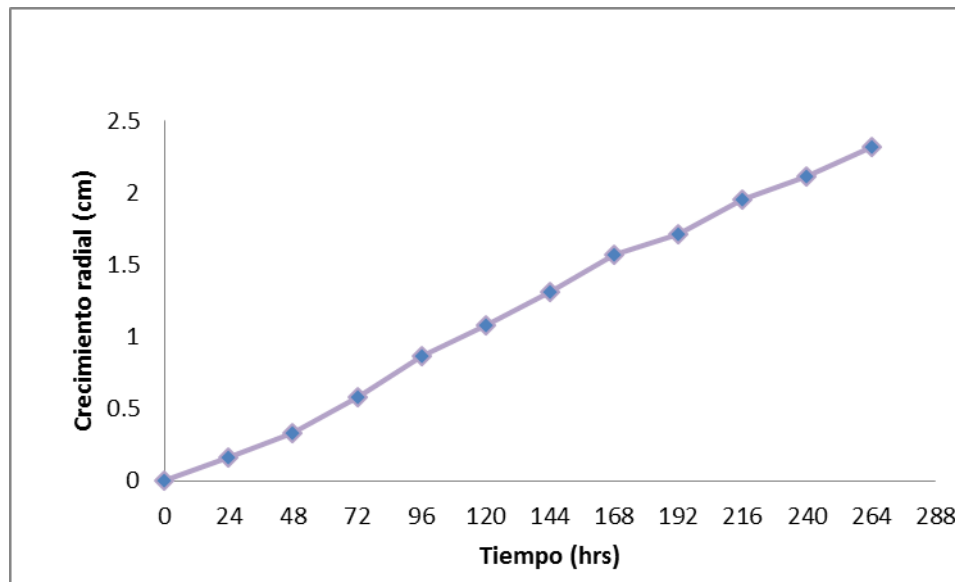


Figura 26. Curva de crecimiento de *Penicillium expansum* en Agar PDA.

La velocidad específica de crecimiento (μ) es definida como la pendiente en la fase de crecimiento exponencial, y está estrechamente relacionada con el tiempo de generación. Teniendo que la velocidad de crecimiento es el aumento de la masa celular por unidad de tiempo; ésta es influenciada por diversos factores ambientales (temperatura, composición del medio, entre otros), de igual forma por algunas características genéticas del microorganismo en estudio (Madigan *et al.*, 1997). Arias y Piñeros (2008) inocularon las colonias de éste hongo en agar Czapeck alcanzando un diámetro de 4 cm en 7 días. Mientras que los resultados en la presente investigación, a éste mismo tiempo *Penicillium expansum* obtuvo un crecimiento de 3.2 cm de diámetro, este valor traducido a la velocidad específica de crecimiento es buena, ya que estudios demuestran que el microorganismo en agar PDA, invade la caja Petri en una semana, (Moreno *et al.*, 2011).

4.2.2 Evaluación macroscópica de *Penicillium expansum*

Al realizar una evaluación macroscópica de la cepa de *Penicillium expansum* indica que es un hongo color azul, lo que le brinda el nombre de podredumbre azul en el fruto en estudio, inicialmente aparece primero un moho con colonias blancas que luego se torna a color azulado (Donoso y Latorre, 2006). Las colonias están constituidas de micelios de hifas delgadas, con textura pulverulenta, no presenta exudación, mostrando en el centro de la colonia elevación, debido a la acumulación de esporas, redonda con borde irregular (Figura 27).

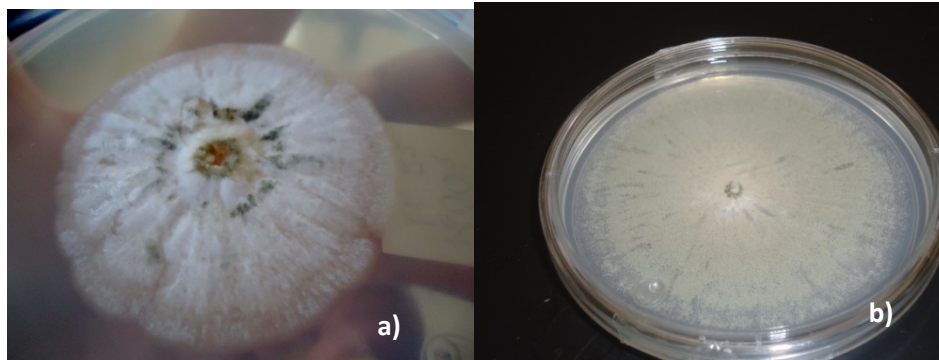


Figura 27. Morfología macroscópica de *Penicillium expansum* en Agar PDA

4.2.3 Evaluación microscópica de la cepa

4.2.3.1 Tinción simple con azul de metileno

En la Figura 28, se aprecian los resultados obtenidos al realizar un análisis microscópico, se apreciaron la estructura interna del hongo, observando que presenta conidióforos hialinos septados (Arias y Piñeros, 2008).

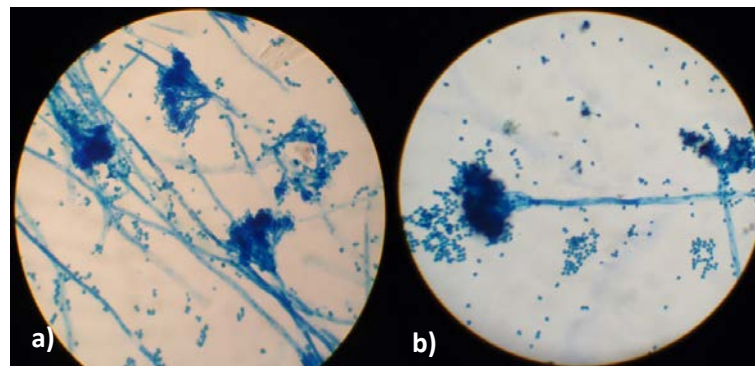


Figura 28. Estructura interna de *Penicillium expansum* a) conidióforos, b) esporas

4.2.4 Observación con KOH (Hidróxido de potasio)

El análisis microscópico usando hidróxido de potasio (KOH) y muestra en fresco de *P. expansum*, permiten visualizar la estructura interna del hongo; en donde se pueden apreciar las hifas septadas, además de las esporas, en un campo de 40X, mostradas en la Figura 29. Al respecto Tangarife (2011), caracterizó esta cepa en fresco mencionando que en la morfología interna se aprecian claramente los conidióforos rectos, hialinos o levemente pigmentados, con fialides que nacen directamente de la hifa o sobre métulas. Conidias producidas en cadena, de forma esféricas o elipsoidales, a menudo con una base trunca, hialinas, de pared delgada y en ocasiones ornamentadas. Esos resultados coinciden con los presentados en esta investigación.

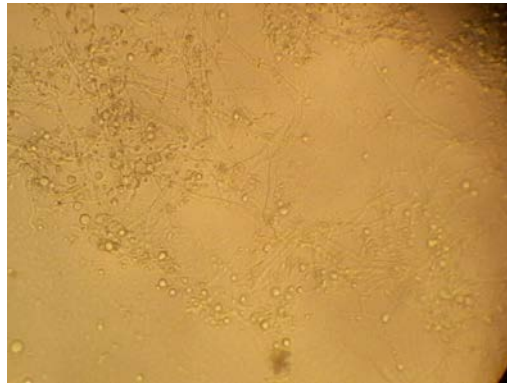


Figura 29. Morfología de *Penicillium expansum* en microscopio electrónico a 40X.

4.3 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento en *P. expansum* empleando extractos de ajo, gobernadora, clavo, higuera, steribox comercial y oligosacáridos de quitosán, usando concentraciones de 0.25%, 0.5%, y 1%.

Los extractos usados en ésta evaluación fueron codificados como E1 (Clavo), E2 (Gobernadora), E3 (Ajo), E4 (Higuera), E5 (Steribox Comercial), E6 (Oligosacáridos de Quitosán 8 hrs), E7 (Oligosacáridos de Quitosán 12 hrs), E8 (Oligosacáridos de Quitosán 16), E9 (Oligosacáridos de Quitosán 20 hrs).

4.3.1.1 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento de *Penicillium expansum* empleando extracto de Clavo (*Zizygyum aromaticum*)

En la figura 30, se aprecia la curva de inhibición de *P. expansum* usando el extracto de clavo como antifúngico a diferentes concentraciones, comparado con el control, en el que se observa que el la inhibición total de éste microorganismo se observó a partir de la concentración más baja usada de 0.25%, durante las 264 hrs que perduró la cinética. Por lo tanto se tiene una μ de 0, en las concentraciones evaluadas debido a que se tiene una inhibición al 100%, comparado con el control que presentó una velocidad de crecimiento de 0.0091μ cm/día (Cuadro 14). Se sabe que el componente mayoritario del clavo es el eugenol, el cual ejerce acción antifúngica, mediante su acción sobre la membrana celular, provocando la desestabilización de la misma, induciendo con ello a la muerte celular (Hernández, P, 2011).

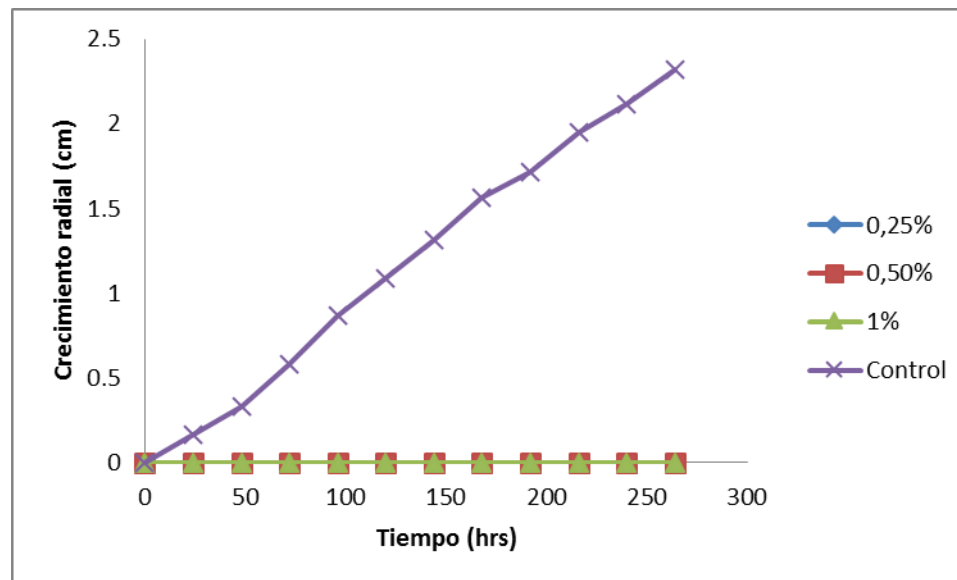


Figura 30. Curva de inhibición de *P. expansum* en medio envenenado de Clavo (*Zyzygium aromaticum*)

Cuadro 14. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de *Penicillium expansum* empleando extracto de clavo (*Zyzygium aromaticum*) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%

Concentración	μ (cm/h)	% Inhibición
Control	0,0091	0
0,25%	0	100
0,50%	0	100
1%	0	100

4.3.1.2 Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento de *Penicillium expansum* empleando extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*)

En la figura 31 se aprecia la cinética de inhibición de *P. expansum*, usando como antifúngico tres concentraciones de extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*), apreciando que a la concentración de 0,25% se tiene la inhibición menor; iniciando su fase de adaptación a las 24 hrs, comenzando a partir de éste tiempo su fase logarítmica hasta llegar a 120 hrs donde se observa un ligero decaimiento de la curva, sin embargo vuelve a ser gradual de manera exponencial hasta llegar a las 216 hrs donde comienza observarse la fase estacionaria donde, la acumulación de desechos y agotamiento de nutrientes son evidentes, trayendo consigo que a las 240 h se observe la fase de muerte microbiana, con una inhibición del 65,93% (Cuadro 15). Mientras que la curva de inhibición al 0,5% de extracto de gobernadora muestra mayor inhibición en comparación con la concentración anterior, debido a que ésta concentración se incrementó al doble la acción del antimicrobiano usado, en esta curva se observa que la fase de adaptación del microorganismo en estudio, se prolonga hasta las 48 hrs, iniciando a partir de este tiempo la fase logarítmica de forma exponencial, hasta las 264 hrs, sin llegar a la fase estacionaria durante éste tiempo. De igual forma en esta curva se aprecia una velocidad de crecimiento de 0,0016 cm /día (centímetros por día), presentando de ésta forma un % de inhibición de 82.41%.

La curva de inhibición al 1% de *Larrea tridentata* muestra la inhibición radial mayor con un 92.3%, debido a que se triplicó la concentración del extracto, apreciándose que *Penicillium expansum* tardó alrededor de 72 hrs en adaptarse al medio, debido a la alta concentración del

extracto, teniendo una velocidad de crecimiento de 0,0007 cm/día (centímetros por día) observando que su fase logarítmica tiene un ligero incremento, por debajo de los valores de las concentraciones anteriormente mencionadas. Encontrando a los valores de velocidad de crecimiento bajos, comparados con el control, Estudios realizados por diferentes autores mencionan que el ácido nordihidroguayarático (NDGA) extraído de *Larrea tridentata* es muy efectivo inhibiendo hongos, Este compuesto quizá tiene potencial para el control de hongos productores de filamentosos (Vargas-Arispuro et al., 2006).

Los resultados arrojados por el programa estadístico Minitab® 16 mostraron que en *Larrea tridentata* se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de 0.5% y 1%, mientras que entre la concentración de 0.25 y 0.5% no son significantes (Anexo 1).

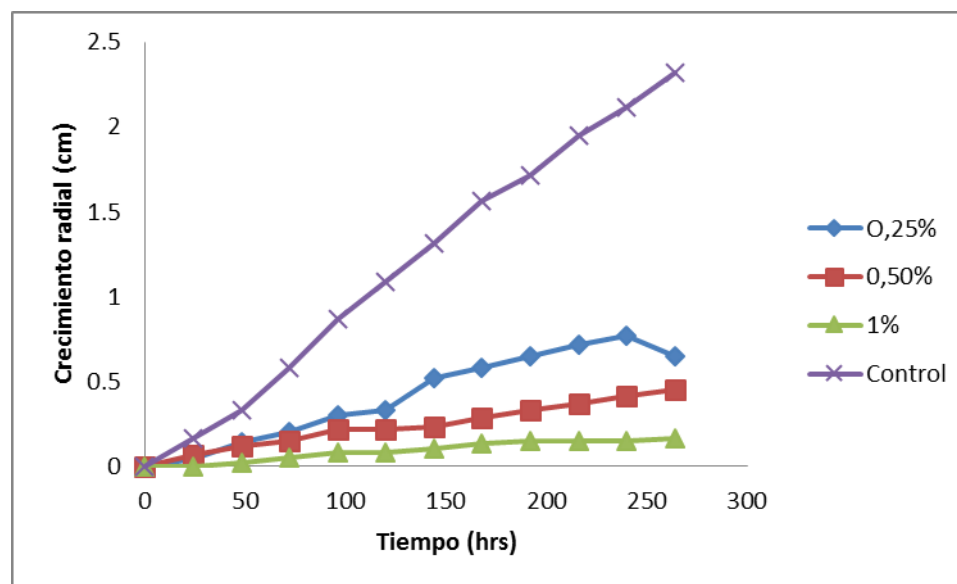


Figura 31. Curvas de inhibición de *P. expansum* en medio envenenado de concentraciones de extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*).

Cuadro 15. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de *Penicillium expansum* empleando extracto de gobernadora (*L. tridentata*) a concentraciones de 0,25, 0,5 y 1%.

Concentración	μ (cm/h)	% Inhibición
Control	0,0091	0
0,25%	0,0031	65,94
0,50%	0,0016	82,42
1%	0,0007	92,31

4.3.1.3 Cinéticas de inhibición de crecimiento de *Penicillium expansum* empleando extracto de ajo (*Allium sativum*)

Al aplicar una concentración de 0,25% de extracto de ajo, (Figura 32), mediante la técnica de dilución en agar, se tiene un 48,35% de efecto inhibitorio, mostrándose a ésta concentración que la fase de latencia del microorganismo se efectuó durante las primeras 24 horas con poca dificultad para adaptarse al medio, partiendo de aquí un indicio del crecimiento exponencial de manera, hasta llegar a las 48 hrs donde se aprecia que los microorganismos se reproducen de manera exponencialmente, prolongándose hasta las 216 horas en donde se aprecia un ligero decaimiento del crecimiento, no obstante a partir de las 240 horas el crecimiento vuelve a ser gradual, apreciándose en esta figura la velocidad de crecimiento radial de 0,0051 cm/ horas (centímetros / horas), con un 43,95% de inhibición del mismo.

La adaptación del microorganismo en un medio envenenado con una concentración de 0,5% de extracto de ajo, el comportamiento de la curva, comienza con una fácil adaptación al medio, durante las primeras 24 horas, al igual que la concentración anterior, sin embargo en la fase logarítmica hay un crecimiento constante al llegar a las 192 horas, difiere con la concentración anterior, ya que ésta curva sigue la fase hasta llegar a las 264 horas, mientras que en la anterior se observó un decaimiento de la curva, mostrando una velocidad de crecimiento de 0.0057 cm/ horas (centímetros/ hora), correspondiente al 37.36% de inhibición, siendo éste valor mayor que la concentración, de 0,25% (Cuadro 16).

Por otra parte la curva de inhibición con 1% mostró el porcentaje de inhibición fue mayor (48,35%) al aumentar el triple la concentración, ya que el microorganismo tiene un crecimiento menor debido a que los componentes del ajo actúan en mayor concentración, Sin embargo el porcentaje de inhibición es menor que los extractos anteriores, debido a que se han realizado

diferentes estudios en los que mencionan que *Penicillium ssp.* ataca a la planta de ajo, al igual que causa pudriciones de bulbos durante el periodo de almacenaje, en donde bajo condiciones experimentales, la enfermedad puede destruir el 50% de los “dientes” (Velázquez, R, 2004). Lo que significa que el hongo se adapta fácilmente a la composición del ajo, teniendo que los compuestos que intervienen en la acción antifúngica del ajo son los la alicina y los tiosulfatos, en esta concentración se aprecia una velocidad de crecimiento radial de 0,0047 cm / día (centímetros/ día). De manera general las velocidades de crecimiento de *Penicillium expansum* en este medio comparadas con el control son medias comparadas con el control.

Las concentraciones de los promedios de *Allium sativum* analizados estadísticamente no se encontró diferencia significativa en ninguna de las tres concentraciones analizadas con este extracto usado como antimicrobiano (0.25, 0.5 y 1%) (Anexo 2).

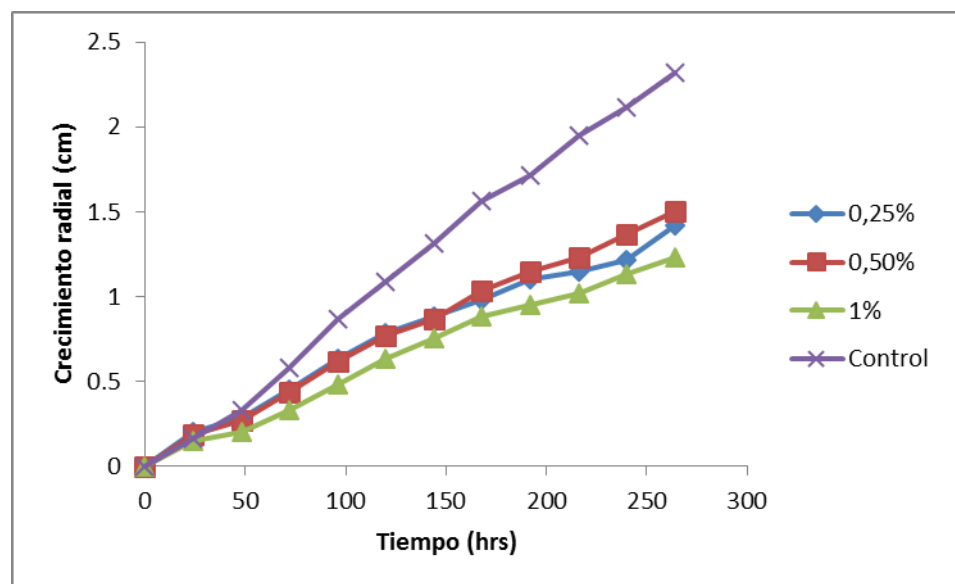


Figura 32. Curvas de inhibición de *P. expansum* en medio envenenado de concentraciones de extracto de Ajo (*Allium sativum*)

Cuadro 16. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de *Penicillium expansum* empleando extracto de ajo (*A. sativum*) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%.

Concentración	μ (cm/h)	% Inhibición
Control	0,0091	0
0,25%	0,0051	43,96
0,50%	0,0057	37,36
1%	0,0047	48,35

4.3.1.4 Cinéticas de inhibición de crecimiento de *Penicillium expansum* empleando extracto de higuera (*Ricinus communis*)

La cinéticas de inhibición de éste extracto como se aprecia en la Figura 33 muestran un porcentaje de inhibición mayor en la concentración 1% con un valor de 74.7% de inhibición radial, correspondiente a 0.0040 cm/h. Se observa que el porcentaje de inhibición es creciente conforme se aumenta la concentración del extracto en el medio, efecto inverso con los valores de velocidad específica de crecimiento, ya que disminuyen al incrementarse la concentración de éste extracto. En las concentraciones de 0,25% y 0,5% tienen el mismo crecimiento en ambas curvas, con un ligero crecimiento mayor en la concentración de 0,5%, que presenta una velocidad de crecimiento radial de 0,0085 cm/h (centímetro/ hora) y un 70.49% de inhibición, que es menor que la concentración de 0,25% que mostró un valor de 8.79% (Cuadro 17), con una velocidad de crecimiento radial de 0,0083 cm/ hora. Apreciando también que las concentraciones mayores están cercanos a la curva de crecimiento del control que muestra una velocidad de crecimiento de 0,0091 cm/ horas. Autores investigadores afirman que la higuera tiene diversos compuestos químicos, como el ácido ricinoléico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido esteárico, ácido dihidroesteárico, alcaloides (ricinina), ricina, enzimas (lipasa) sin embargo no se han registrado estudios referentes a su uso como antifúngicos, y se desconoce su acción específica (Anónimo 1).

Los datos analizados para *Ricinus comunis* arrojaron diferencia significativa entre las tres concentraciones analizadas (Anexo 3)

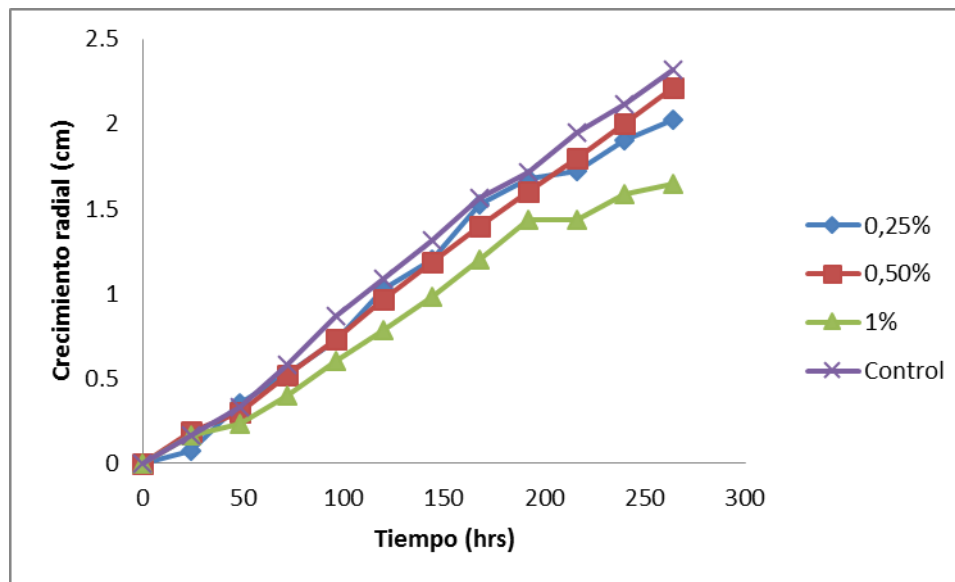


Figura 33. Curvas de inhibición de *P. expansum* en medio envenenado de concentraciones de extracto de Higuerrilla (*Ricinus comunis* L).

Cuadro 17. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de *Penicillium expansum* empleando extracto de higuerrilla (*R. comunis*) a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%.

Concentración	μ (cm/h)	% Inhibición
Control	0,0091	0
0,25%	0,0083	8,80
0,50%	0,0042	70,49
1%	0,0040	74,72

4.3.1.5 Cinéticas de inhibición de crecimiento de *Penicillium expansum* empleando Steribox Comercial

Las cinéticas de inhibición de este extracto comercial en las concentraciones evaluadas mostraron un 100% de inhibición, (Figura 34) en cada una de las curvas de estas concentraciones (cuadro 18), ya que este antifúngico es una sustancia compuesta por amonio cuaternario según la concentración usada en este análisis es 0,5%, que impide la aparición de

podredumbres de origen fúngico en post-cosecha, se aplica sobre superficies, no en la fruta, se usa como desinfectante de utilización preventiva.

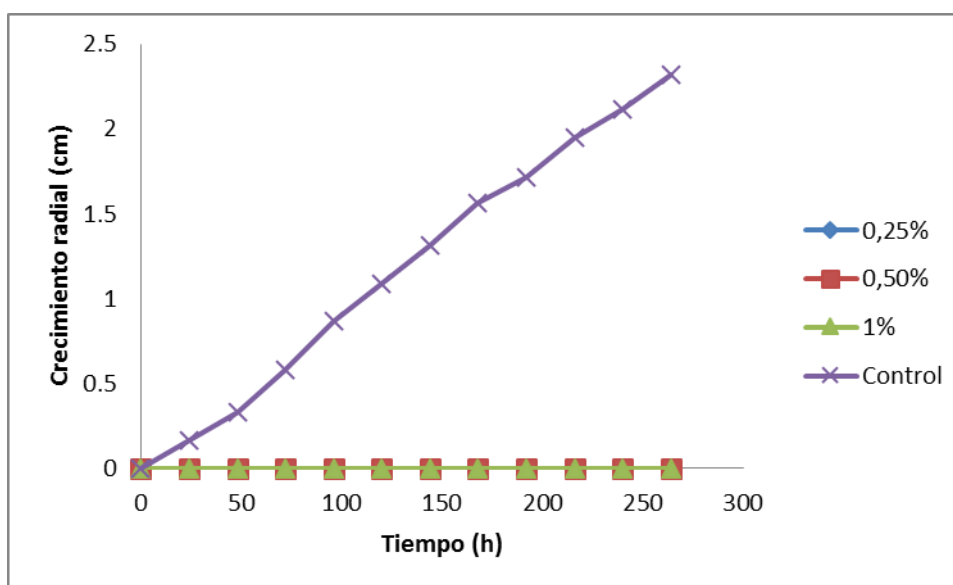


Figura 34. Curvas de inhibición de *P. expansum* en medio envenenado de concentraciones de antifúngico Steribox comercial A. C.

Cuadro 18. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de *Penicillium expansum* empleando extracto de steribox a concentraciones de 0,25. 0,5 y 1%.

Concentración	μ (cm/h)	% Inhibición
Control	0,0091	0
0,25%	0	100
0,50%	0	100
1%	0	100

4.3.1.6 Cinéticas de inhibición de crecimiento de *Penicillium expansum*, empleando

Oligosacáridos de Quitosán de diferentes tiempos de hidrólisis (8, 12, 16 y 20 hrs).

En la figura 35, se aprecian las curvas de inhibición de los oligosacáridos de quitosán a diferentes tiempos de hidrólisis, se observa que en las cuatro curvas *Penicillium expansum* inicia la fase exponencial a las 24 h, teniendo un crecimiento constante exponencial, en el que los microorganismos están creciendo y dividiéndose a una tasa máxima posible dada por las condiciones del medio, encontrando que la concentración de 0.25% fue la que menos potencial inhibitorio mostró en todos los oligosacáridos, se aprecia que no hay presencia de fase estacionaria ni de muerte. De manera general se observó que a la concentración de 1% comparada con el control, fue la que mayor porcentaje de inhibición mostró, con valores de 34% para los OQ8h (a), correspondiente una velocidad de crecimiento de 0.006cm/h, 36% para los OQ12h (b) y μ de 0,0058 cm/h, los OQ16h (c) mostraron 51% de inhibición, equivalente a $\mu = 0.0044$ cm/h y los OQ20h (d) 41%, equivalente a una μ de 0,0053 cm / h. Sin embargo en la curva 1% de los OQ12h se presentó una ligera dificultad del microorganismo para adaptarse al medio, siendo más evidente a partir de las 144 hrs donde se aprecia que la fase exponencial disminuye y se frena la velocidad de crecimiento, y a las 216 horas el microorganismo vuelve a retomar la curva de manera exponencial, esta dificultad puede deberse a la teoría de que el microorganismo use los oligosacáridos como fuente alterna de carbono (Avendaño, 2008). La inhibición media de éstos antifúngicos se observó en la concentración de 0.5%, como se aprecia en el cuadro 19, donde además se aprecian las velocidades de crecimiento obtenidos en cada una de las concentraciones evaluadas de los oligosacáridos.

Al analizar los porcentajes del crecimiento radial de *Penicillium expansum* en el paquete estadístico Minitab 16, se encontró que los oligosacáridos de quitosán de 8 h de hidrólisis estadísticamente mostraron diferencia significativa entre las concentraciones de (0.25, 0.5 y 1%) (Anexo 4) principalmente entre las concentraciones de 0.5 y 1%, al igual que los oligosacáridos de quitosán de 12 h, OQ16h y OQ20h (Anexo 5, 6, y 7).

En todas las cinéticas de estos oligosacáridos a estos tiempos de hidrólisis, no hubo presencia de fase estacionaria, debido a que los oligosacáridos de Quitosán de alto peso molecular al tener menor tiempo de hidrólisis, presentan menor inhibición. Al respecto se han realizado trabajos en donde han demostrado que el efecto del quitosano (350 kDa) y

oligoquitosano (6 kDa) sobre hongos fitopatógenos inhiben la germinación de las esporas y el crecimiento micelial. Los pesos moleculares usados en el presente análisis son clasificados de acuerdo a su peso molecular en alto (superior a 150kDa) correspondientes a los oligosacáridos de 8 ,12 y 16 hrs de hidrólisis; y mediano peso molecular (superior 100 kDa), correspondientes a los oligosacáridos de 20 hrs de hidrólisis (Moreno, 2009).

Diversos autores reportan que existen diferentes mecanismos de acción de la quitina, quitosano y sus derivados, sin embargo el mecanismo exacto de acción antimicrobiana es aún desconocido. Un mecanismo propuesto por Chen *et al.*, (1998), sugieren que la interacción entre la carga positiva de la molécula del quitosano y la carga negativa de las células de la membrana microbiana conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares. Otros estudios recientes muestran que un mecanismo de acción del quitosano, induce la formación de barreras estructurales de defensa que limitan el avance del patógeno. Algunos estudios más, aportan que el porcentaje de inhibición o la inhibición total de los patógenos, por parte del quitosano depende según la especie, considerando que existe una posible dependencia entre el grado de polimerización y el de N-acetilación del quitosano, el peso molecular (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). También depende de las condiciones del medio, la composición de nutrientes, y el periodo de incubación (Song, *et al.*, 2002). A respecto, Chien y Chou (2006), encontraron que el quitosano dependiendo del tipo y su concentración pueden causar desde un 25 hasta un 95% de inhibición del crecimiento de diferentes hongos que afectan la calidad de cítricos, comprobando que con un aumento de la concentración se aumenta la inhibición. Mientras que Plascencia *et al.*, (2003), también comprobaron que el quitosano inhibía el crecimiento radial y la germinación de esporas del hongo *Aspergillus niger* a la concentración 3g.litro⁻¹.

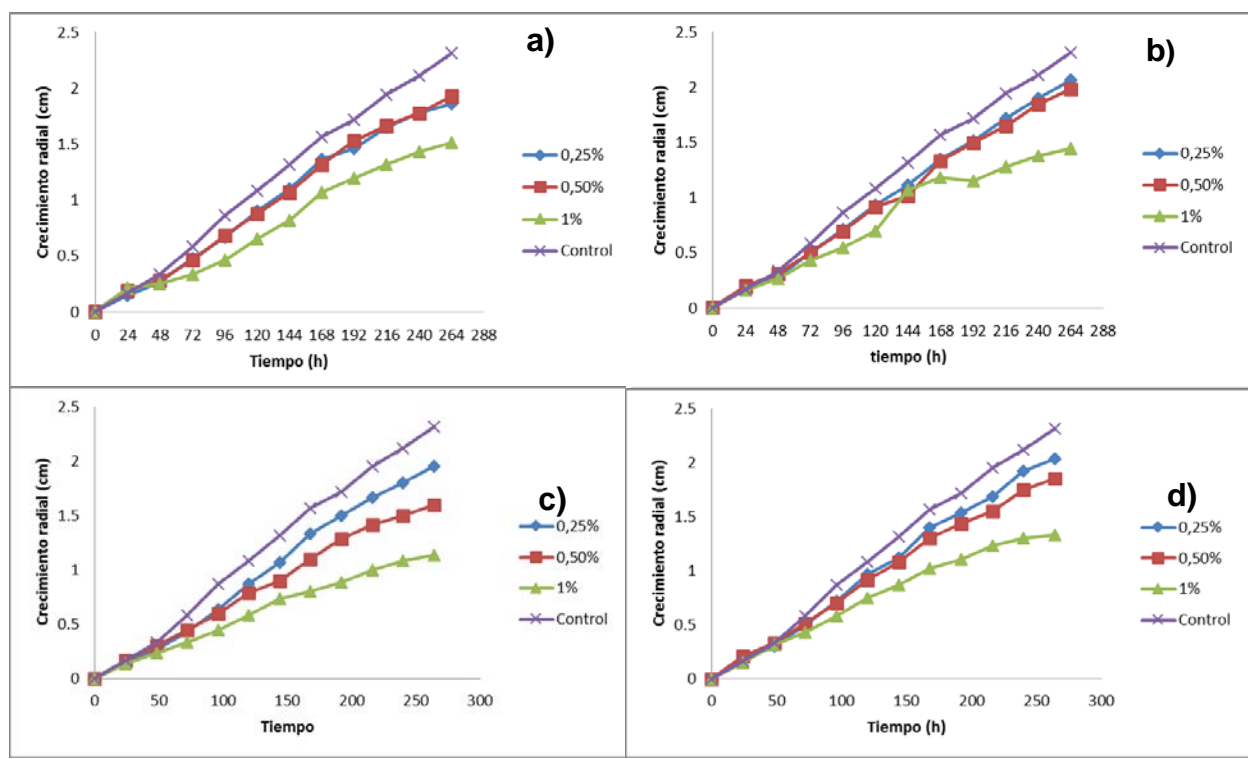


Figura 35. Curvas de inhibición de *P. expansum* en medio envenenado de concentraciones de Oligosacáridos de quitosán a) 8h, b) 12h, c) 16h y d) 20h de fermentación.

Cuadro 19. Velocidad específica de crecimiento (μ) y % de inhibición de *P. expansum* a diferentes concentraciones de oligosacáridos de quitosán a 8, 12, 16 y 20 horas de hidrólisis

	% Concentración	μ (cm/hr)	% Inhibición
Control		0,091	0
OQ8h	0.25	0,0076	16,49
	0.5	0,0077	15,38
	1	0,006	34,07
OQ12h	0.25	0,008	12,09
	0.5	0,0077	15,38
	1	0,0058	36,26
	0.25	0,0078	14,29

OQ16h	0.5	0,0063	30,77
	1	0,0044	51,65
OQ20h	0.25	0,008	12,09
	0.5	0,0072	20,88
	1	0,0053	41,76

4.3.2 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Una vez determinado el porcentaje de inhibición de los extractos, y los oligosacáridos de Quitosán evaluados, usando rangos entre las concentraciones en las que se haya obtenido la inhibición mayor se determinó la CMI. La concentración mínima inhibitoria se determina para encontrar la concentración exacta mínima a la cual se logra el porcentaje de inhibición, debido a que en la etapa anterior se manejaron rangos altos en las concentraciones usadas para la determinación del porcentaje de inhibición, mencionando que a nivel industrial una concentración alta genera costos elevados y no es rentable. Para ello, en base al análisis estadístico, se pudo determinar la existencia significativa o no de las concentraciones manejadas en cada extracto y oligosacárido evaluado. Obteniendo los siguientes resultados:

4.3.2.1 Determinación de la CMI de *Penicillium expansum* con extracto de clavo (*Zizigyum aromaticum*)

Se manejaron tres concentraciones para determinar la concentración mínima de inhibición total de este extracto del hongo en estudio (*P. expansum*). De estas concentraciones (0.1%, 0.15%, y 0.2%) (Cuadro 20), en las dos primeras se obtuvo una inhibición del 38% (Cuadro 23), mientras que en la concentración de 0.2% hubo inhibición del hongo al 100% (Figura 36).

Los datos arrojados en el análisis estadístico (Anexo 8), muestran la existencia de diferencia significativa en la concentración de 0.2%, pero dos primeras concentraciones (0.1 y 0.15%) no hay diferencia por eso se decidió usar la concentración de 0.2% en el fruto como concentración mínima inhibitoria para este inhibidor.

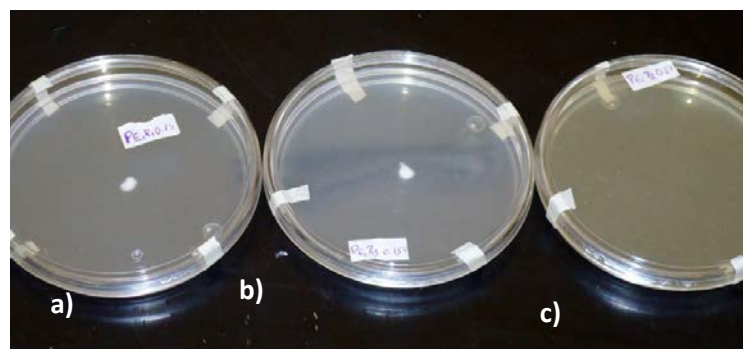


Figura 36. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *P. expansum* a) 0.1%, b) 0.15% y c) 0,2% de extracto de clavo a 264 hrs de incubación.

Cuadro 20. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Zyzigium aromaticum*

Concentración	μ (cm/hr)	% Inhibición
Control	0.0062	
0.1	0.0041	33.87
0.15	0.0039	37.10
0.2	0	100

4.3.3 Determinación de la CMI de *Penicillium expansum*, con extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*)

Para el caso de *Larrea tridentata*, la concentración mínima inhibitoria se buscó a partir de 0,5%, y 1%, ya que su porcentaje de inhibición fue de 82% y 92% respectivamente, estableciendo rangos 0.03 entre cada concentración, obteniéndose un porcentaje de inhibición promedio de 96- 98% en todas las éstas concentraciones. En el análisis estadístico no muestra diferencia significativa (Anexo 9), entre las concentraciones evaluadas, y decidiendo aplicar finalmente la concentración 0.53%, a aplicar en el fruto; siendo esta la más baja (figura 37).

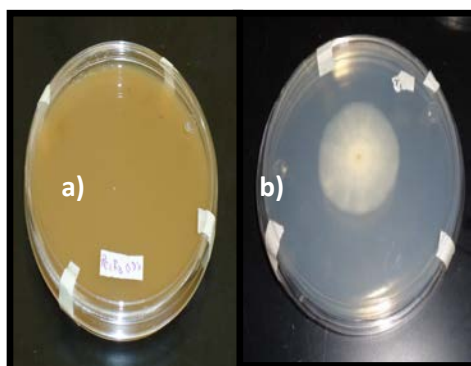


Figura 37. Crecimiento de *Penicillium expansum* en medio envenenado a una concentración de 0.53 como valor CMI **a)**, y agar PDA **b)**.

4.3.4 Determinación de la CMI, de *Penicillium expansum* con extracto de ajo (*Allium sativum*)

El porcentaje de inhibición del ajo fue de 43 y 48 %, el primer valor corresponde a la concentración de 0,25% y el segundo valor al 1%, observando que los valores máximos de inhibición se alcanzan en los extremos, ya que la concentración de 0,5% muestra el valor de inhibición más bajo (37%), con esto se procede a la determinación de la concentración mínima Inhibitoria (CMI) de este inhibidor analizando valores a partir de 0.19% hasta 1.3%, con rangos de 0.03 entre cada concentración. Los valores obtenidos en el crecimiento radial de los hongos al concluir las 264 hrs oscilan entre 1 cm aproximadamente. Estos resultados al someterlos al análisis estadístico mediante el uso del programa Minitab 16 Statistical software, no muestran diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas (Anexo 10), determinando con esto que la concentración a usar en el fruto será a partir de 0.19%, apreciada en el crecimiento de *P. expansum* en la Figura 38.

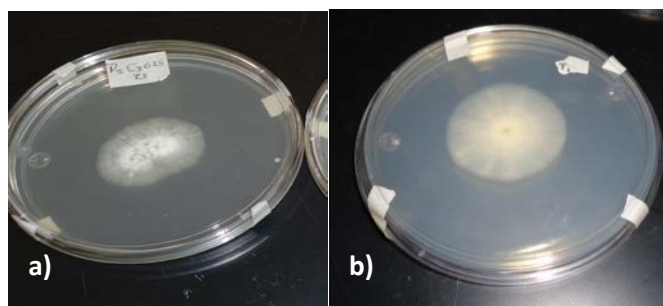


Figura 38. Crecimiento de *Penicillium expansum* en medio envenenado usando *Allium sativum* como antifúngico a una concentración de 0.19 como valor CMI **a)**, y agar PDA **b)**.

4.3.5 Determinación de la CMI de *Penicillium expansum*, con extracto de Higuera (*Ricinus communis*)

La CMI para el caso de *Ricinus communis*, se buscó a partir de las concentraciones de 0.5 y 1%, puesto que en el análisis del porcentaje de inhibición los resultados obtenidos para estos valores corresponden a 70 y 74% respectivamente, al igual que los inhibidores anteriores se usaron rangos de 0.03 a partir de 0,5% a 1,8%. El crecimiento radial promedio de *P. expansum* con este inhibidor durante 264 hrs de incubación, fue de 0,5 cm en estas concentraciones. En el análisis de los datos no existe diferencia significativa entre los tratamientos (Anexo 11), por lo que la concentración mínima Inhibitoria (CMI), para este inhibidor es de 0,55%, siendo la concentración más baja (Figura 39). El poder antimicrobiano de la higuera sobre el hongo fitopatógeno de *P. expansum* tuvo un gran potencial de inhibición por sus componentes presentes en el extracto como lo son la ricina la cual es una fitotoxina con actividad citotóxica. Su estructura consta de dos cadenas polipeptídicas: una con propiedades de lectina, que le permite fijarse a glicolípidos y glicoproteínas presentes en la superficie de la membrana celular, y otra capaz de inhibir la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas y causando la muerte en este caso del hongo causante de la podredumbre gris (Girbés, 2000).

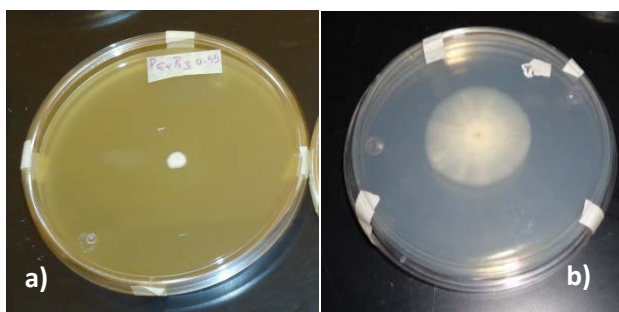


Figura 39. Crecimiento de *Penicillium expansum* en medio envenenado usando *Ricinus comunis* como antifúngico a una concentración de 0.55 % como valor CMI **a)**, y agar PDA **b)**.

4.3.6 Determinación de la CMI de *Penicillium expansum*, con antifúngico de Steribox comercial

La determinación de la concentración mínima inhibitoria del hongo en estudio por éste inhibidor se efectuó considerando su porcentaje de inhibición que efectuado en la etapa anterior, se

obtuvo una inhibición al 100% en las tres concentraciones evaluadas (0.25, 0.5 y 1%), procediendo a realizar la CMI, usando concentraciones de 0.1, 0,15 y 0.2% (Cuadro 21), siendo estas inferiores a la concentración más baja usada.

En el análisis estadístico mostró que las concentraciones de 0.1 y 0.15%, son iguales (Anexo 12), con un porciento de inhibición de 33% y 37% respectivamente; mientras que al 0,2% hay diferencia significativa, siendo ésta la concentración que mostró el 100% de inhibición, seleccionando a la vez este valor como concentración mínima inhibitoria de este inhibidor. En la Figura 40, se aprecia claramente el efecto de éste antifungico, sobre *Penicillium expansum*, ya que es una marca comercial y entre su composición química contiene un 25% de amonio cuaternario y los compuestos de amonio cuaternario son compuestos antimicrobianos como bactericidas, fungicidas y virucidas. Su actividad la desarrollan tanto sobre el medio ácido como alcalino, aunque en éste último muestra mejores acciones (Canahuí, 2009).

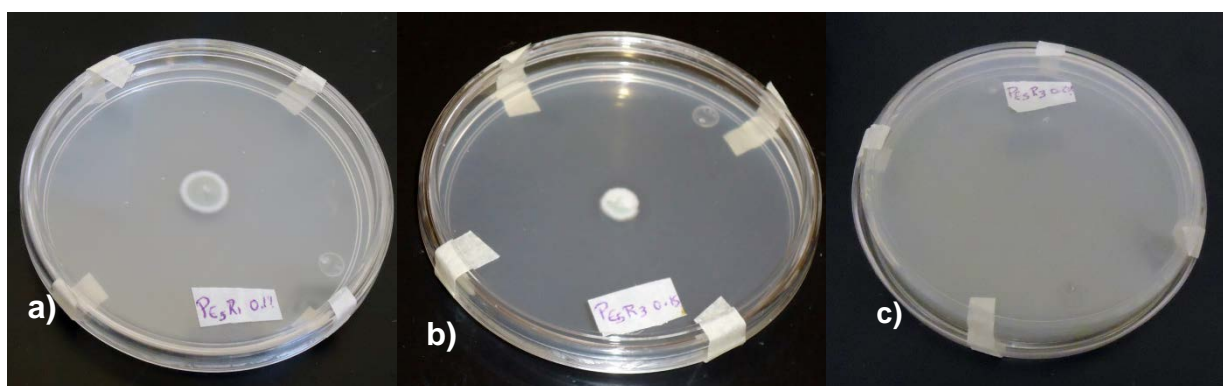


Figura 40. Imágenes de crecimiento de *P. expansum* en medio envenenado, usando Steribox A.C como inhibidor de crecimiento para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en diferentes concentraciones de 0.1% **a)**, 0.15% **b)** y 0.2% **c)**.

Cuadro 21. Determinación de la CMI de Steribox comercial

Concentración %	μ (cm/hr)	% Inhibición
Control	0.0062	
0.1	0.0041	33.87

0.15	0.0039	37.10
0.2	0	100

4.3.7 Determinación de la CMI de *Penicillium expansum* con oligosacáridos de quitosán a diferentes tiempos de hidrólisis (OQ8 h, OQ12h, OQ16h, y OQ20h)

Para la determinación de la CMI, de los Oligosacáridos de Quitosán a diferentes tiempos de hidrólisis, se tomó en consideración los resultados obtenidos en la etapa anterior, en la cual, éstos oligosacáridos alcanzaron el porcentaje de inhibición mayor a una concentración de 1%, con diferentes valores de inhibición, para el caso de OQ8h, mostró una inhibición de 34%, OQ12h, mostró 36% de inhibición, OQ16h presentó 46%, y OQ20h, mostró un 41%. Mientras que en sus concentraciones de 0.5% se presentaron valores de inhibición medios, considerando a partir de ésta concentración, determinar la concentración mínima inhibitoria de *Penicillium expansum* (CMI), estableciendo rangos de 0.03, hasta la concentración de 2%.

Una vez que se efectuaron las cinéticas del crecimiento de *Penicillium expansum* para determinar la CMI de los oligosacáridos, al analizar los datos estadísticamente se tiene que para los OQ8h no hubo diferencia significativa entre estos tratamientos evaluados, como se muestra en el anexo 13; tomando como valor de concentración mínima inhibitoria 0.55%, mientras que para los OQ de 12, 16, y 20h al analizar los datos obtenidos del crecimiento radial en el paquete estadístico Minitab 16 Statistical software indica la presencia de diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas, en el caso de los OQ12h (Anexo 14) la concentración de 0.7 mostró el valor de inhibición mayor con 38%, de *Penicillium expansum* tomándolo como valor CMI. Mientras que para los OQ16h se observó una diferencia significativa en la concentración de 0.62% que muestra un porcentaje de inhibición de 47%, por lo que se decide tomar este valor como CMI para la siguiente etapa del proyecto (Anexo 15), y finalmente en los OQ20h (Anexo 16) hubo diferencia significativa en la concentración de 0.62% ya que a partir de este valor se obtiene una inhibición de 55%, tomando esta concentración como CMI, para éste oligosacárido. A respecto en el cuadro 22 se muestran los valores de CMI de cada uno de los inhibidores de crecimiento de *Penicillium expansum* con su respectivo porcentaje de inhibición. En la figura 41 se aprecian las imágenes de las concentraciones usadas

como CMI, obtenidos del crecimiento de *Penicillium expansum* durante 264 h, usando oligosacáridos de quitosán como antifúngicos.

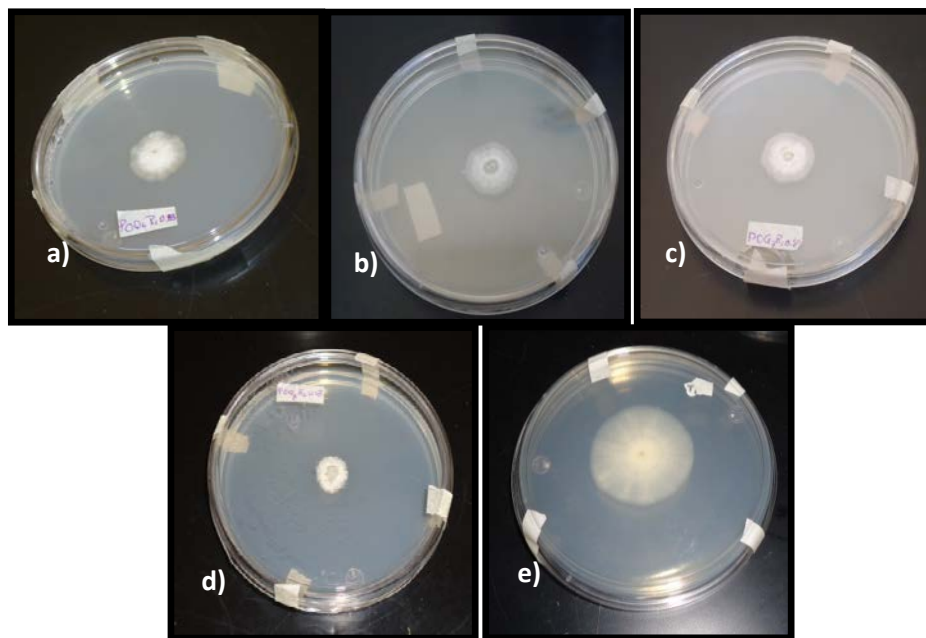


Figura 41. Determinación de la CMI de *Penicillium expansum* usando Oligosacáridos de quitosán diferentes tiempos de hidrólisis como inhibidor del crecimiento durante 264 hrs de incubación a 26° C. **a)** OQ8h, **b)** OQ12h, **c)** OQ16h, **d)** OQ20h, y **e)** control.

Cuadro 22. Valores de Concentraciones mínimas Inhibitorias de los Inhibidores de crecimiento

Inhibidor	CMI	% Inhibición
<i>Zizigyum aromaticum</i>	0.2	100
<i>Larrea tridentata</i>	0.53	97
<i>Allium sativum</i>	0.19	52
<i>Ricinus comunis</i>	0.55	75
Steribox	0.2	100
OQ8h	0.55	32
OQ12h	0.7	38

OQ16h	0.62	47
OQ20h	0.62	55

Etapa experimental 3. Actividad de la cubierta comestible a base de mucílago de chía (*S. hispánica*) sobre manzanas *Golden delicious*.

4.4 Actividad de la cubierta comestible a base de mucílago de chía (*S. hispánica*) sobre manzanas *Golden delicious (malus doméstica)*

4.4.1 *Efecto de los recubrimientos a base de mucílago de chía (S. hispánica)*

4.4.1.1 *Pérdida de humedad.*

En la figura 42 se aprecian los porcentajes de las pérdidas de humedad de los frutos evaluados durante el tiempo de almacenamiento con los diferentes tratamientos, en el lapso de éste periodo hubo una disminución debido a la maduración, siendo éste un fenómeno que se presenta de forma natural. Observando que en los frutos con daño se muestra una ligera pérdida de humedad mayor que en los frutos que no presentaron daños al inicio del tratamiento. Teniendo que el control sin daño mostró un valor de 22.7% de pérdida de peso, mientras que el control de los frutos con daño, se incrementó la pérdida hasta un 30.5%. Observando que no hay variación en los frutos tratados únicamente con cubierta (CC) en ambos lotes ya que la pérdida de peso es de 20%. Encontrando también como valor más bajo en cuanto a pérdida de humedad el tratamiento formado por la Cubierta más el extracto de Steribox comercial (CcA-St), con un valor de 17%. De manera general los tratamientos formados por la cubierta más los antimicrobianos mostraron valores de pérdida de humedad entre 17 y 20% (Cuadro 23) en los frutos sin daño, mientras que los frutos con daño para éste tratamiento, mostraron valores de pérdida de peso entre 17-21%.

Al realizar análisis estadístico, se encontró diferencia significativa en estos tratamientos (Anexo 18) por lo que se menciona que los tratamientos conformados por la cubierta más los diferentes antimicrobianos ejercen efecto sobre el peso de los frutos, comparado con el control. No obstante no se logra diferenciar entre los frutos tratados únicamente con cubierta y los de cubierta más antimicrobiano. Se observó una pérdida gradual de peso debido a que los

recubrimientos a base de polisacáridos tienen efecto sobre las propiedades de barrera a la humedad, son muy bajas debido a la naturaleza hidrofílica de las mismas (Guilbert, 2005). Saavedra y Algecira (2010) evaluaron el efecto de películas comestibles de almidón de yuca y proteína de soya en la conservación de fresas, donde obtuvieron una diferencia significativa en la pérdida de peso, ya que el recubrimiento elaborado con almidón presento un efecto negativo incrementando la pérdida de peso del fruto durante su almacenamiento; mientras que las formulaciones que incluían proteína se observó un efecto positivo, disminuyéndose el porcentaje de pérdida comparado con las fresas patrón.

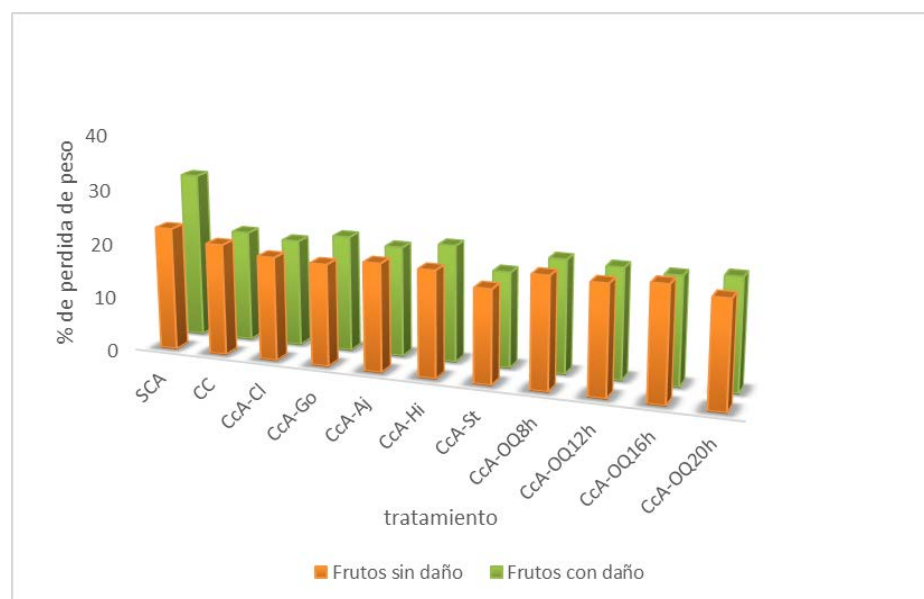


Figura 42. Porcientos de las pérdidas de peso de los frutos con daño y sin daño durante 5 semanas de tratamiento.

Cuadro 23. Pérdidas de peso en por ciento de los frutos tratados

Promedio de los porcentos (%) de las pérdidas de humedad de los frutos			
Tratamientos	Frutos sin daño	Frutos con daño	
SCA	22.705159	30.5159566	
CC	20.558145	20.4871891	
CcA-CI	19.0976528	19.7341525	

CcA-Go	18.7573997	21.369742
CcA-Aj	19.8637255	20.3023923
CcA-Hi	19.567456	21.5235843
CcA-St	17.2114523	17.5782517
CcA-OQ8h	20.5581448	20.823484
CcA-OQ12h	20.1433842	20.3074279
CcA-OQ16h	19.9906223	20.829162
CcA-OQ20h	19.5473958	20.549657

Los resultados obtenidos en este experimento son similares a los realizados por Cuapio (2012), en los que reporta que la aplicación de cubiertas de mucílago de chíá (*Hyptis suaveolens*), y como antimicrobiano polvo de canela, donde se redujo considerablemente el deterioro de manzanas durante más de 15 días a 37°C.

La pérdida de peso se debe a que la fruta presenta cambios; una vez que se cosechan los frutos de forma natural hay una predisposición a la pérdida de peso ya que tiene lugar la respiración, siendo este un fenómeno en el que las frutas y hortalizas frescas necesitan respirar a fin de obtener la energía suficiente para la mantención de la vida. Respiran absorbiendo oxígeno de la atmósfera y liberando dióxido de carbono, tal como lo hacen el hombre, los animales y otros organismos. Durante la respiración la producción de energía proviene de la oxidación de las propias reservas de almidón, azúcares y otros metabolitos. Una vez cosechado, el producto no puede reemplazar estas reservas que se pierden y la velocidad con que disminuyen será un factor de gran importancia en la duración de la vida de post-cosecha del producto (Ronceros, 2012).

4.4.1.2 Cambio de apariencia

La figura 43 muestra el porcentaje de crecimiento de *Penicillium expansum* en los frutos sometidos a los tratamientos, durante el periodo de evaluación, podemos notar que en los tratamientos formados por cubierta (CC) y cubierta más los diferentes antimicrobianos (CcA-), el daño estuvo en forma menos notable en comparación con el control, donde se observa un daño más notable con un 39%. Mientras que el daño en los tratamientos anteriores (CC y CcA) muestran el mismo valor (2.74%); relativamente bajos, cabe

mencionar que los tratamientos que presentaron éste valor fueron además del tratamiento únicamente con la cubierta CC, fueron los CcA-Hi, CcA-OQ8h, y CcA-OQ12h. Por otra parte algunos tratamientos mostraron crecimiento nulo del microorganismo, tales como CcA-Cl, CcA-Go, CcA-Aj, CcA-St, CcA-OQ16h, y CcA-OQ20h. En la Figura 44 se aprecian los frutos con los diversos tratamientos al término del periodo de evaluación. La aplicación de los recubrimientos comestibles también retardó el deterioro microbiológico de manzanas del corte fresco según Rojas-Graü (2006) esto debido a que las cubiertas crean una atmósfera modificada que puede cambiar la tasa de crecimiento de microorganismos, controlando el crecimiento de microorganismos inoocuos propios de la fruta, así como evitar el crecimiento de patógenos según lo reportado por Olivas y Barbosa-Cánovas (2005).

González- Aguilar *et al.* (2005) afirman que los resultados obtenidos se deben a que el retraso en el cambio de color observado en los frutos tratados (CcA y CC), se pueden deber a la atmosfera modificada interna creada en el fruto, incrementándose altos niveles de CO₂ y bajos niveles de O₂ que retrasaron los procesos de maduración. Por otra parte Saucedo-Pompa (2007) indica que los tratados con la cubierta con Ácido Elágico, presentaron menores cambios comparados con los frutos control sin ningún tratamiento en los frutos.

La firmeza de los frutos puede ser afectada por algún componente contenido en los extractos usado como antimicrobiano. En la figura 45 se aprecian las pérdidas de firmeza de los frutos durante el tiempo del tratamiento, mediante valores de arrugamiento al aplicar los diferentes tratamientos a la manzana, mediante una escala de 1-5, siendo 5 el más firmeza mantuvo. (cuadro 24) según la apariencia quedaron de la siguiente manera: el control SCA denota una pérdida total de su firmeza, seguido de la cubierta CC y del CcA-St. Mientras que en CcA-Aj, CcA-Hi, OQ8h, y OQ12h, se observa una apariencia aceptable con una pérdida media de la firmeza, por otro lado CcA-Go y CcA-Cl, muestran una mínima pérdida de firmeza de los frutos; mientras que CcA-OQ16h y CcA-OQ20h, no presentan pérdida visual de firmeza en las manzanas, considerando éstos como los mejores en cuanto a la conservación de firmeza.

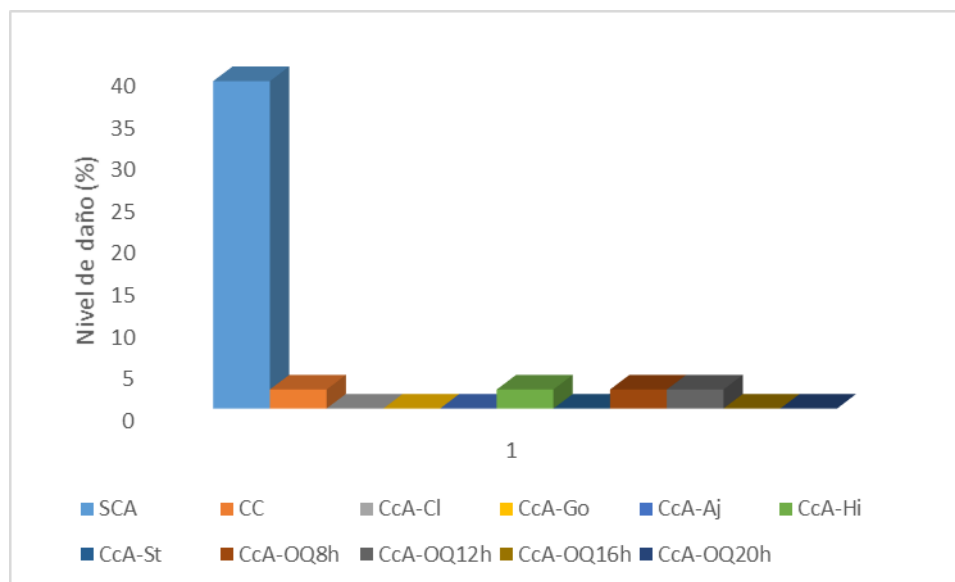


Figura 43. Porcentaje de daños de *Penicillium expansum* en los tratamientos

Cuadro 24. Valores de pérdida de firmeza de los tratamientos

Tratamiento	Pérdida de firmeza
SCA	1
CC	2
CcA-Cl	4
CcA-Go	4
CcA-Aj	3
CcA-Hi	3
CcA-St	2
CcA-OQ8h	3
CcA-OQ12h	3
CcA-OQ16h	5
CcA-OQ20h	5



Figura 44. Frutos inoculados durante 5 semanas de observación; evaluación **a) SCA**, **b)CC**, **c) CcA-Cl**, **d) CcA-Go** **e) CcA-Aj**, **f) CcA-Hi**, **g)CcA-St**, **h) CcA-OQ8h**, **i)CcA-oq12H**, **J)CcA-OQ16h**, **k) CcA-OQ20h**



Figura 45. Firmeza de los frutos al término del periodo de evaluación **a)** SCA, **b)**CC, **c)** CcA-Cl, **d)** CcA-Go **e)** CcA-Aj, **f)** CcA-Hi, **g)**CcA-St, **h)** CcA-OQ8h, **i)**CcA-oq12H, **J)**CcA-OQ16h, **k)** CcA-OQ20h

5. CONCLUSIONES

Los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bacteriostático en concentraciones bajas, éste efecto es evidente en el valor de velocidad específica de crecimiento en las curvas de inhibición, comparados con la curva común de crecimiento de *Penicillium expansum* en medio PDA. El poder inhibitorio de los oligosacáridos de quitosán es influenciado por el peso molecular de éstos, ya que a medida que se disminuye el peso molecular, la inhibición aumenta, en los pesos moleculares analizados los que muestran mayor efectividad contra éste patógeno fueron los de 16 y 20 hrs de hidrólisis con una inhibición de .

La concentración empleada como inhibidor es un factor importante, ya que conforme se aumenta la concentración, el microorganismo se adapta al medio y lo toma como fuente alterna de carbono.

En la extracción del mucílago de chíá (*Hiptys suaveolens*) se obtiene un rendimiento óptimo gracias a la centrifugación. Considerando que la técnica de extracción se realice adecuadamente y no se combine e mucílago con otros componentes de la semilla, ya que afecta a las propiedades de las películas como el color, el espesor, etc.

El extracto vegetal de *Zizigium aromaticum* muestra el mismo poder antifúngico que el extracto antifúngico comercial Steribox con una concentración mínima inhibitoria de 0.2% ejerciendo un efecto fungicida. Los extractos vegetales de *Larrea tridentata* y *Ricinus comunis*, muestran alta actividad antifúngica contra *Penicillium expansum*, con una inhibición de 97 y 74% respectivamente, mientras que el extracto de *Allium sativum* mostró un valor de inhibición menor que los anteriores extractos vegetales con un 52% de actividad antifúngica contra éste hongo.

Los recubrimientos comestibles a base de mucilago de chíá y diferentes extractos vegetales usados como antimicrobianos; lograron retardar el deterioro de los frutos, producto de la maduración; además de mostrar ser una barrera eficaz contra los microorganismos patógenos en manzana.

El estudio realizado permitió conocer algunas de las potencialidades del uso de las especies, de *Zizigium aromaticum*, *Larrea tridentata*, *Allium sativum*, *Ricinus comunis*

presentes en los ecosistemas de México contribuyendo al aumento del conocimiento de las mismas.

Los antimicrobianos usados en el presente estudio obtenidos de extractos vegetales, pueden constituirse en una fuente de principios activos que contribuyan al descubrimiento de antimicrobianos de origen natural los cuales pueden ser utilizados como línea base para la síntesis de moléculas útiles a nivel alimentario.

6. PERSPECTIVAS

Como aspecto final, quiero señalar que resulta indispensable reconocer que la información que se genera en el campo de tecnologías emergentes referentes a recubrimientos y películas comestibles debe ser aplicada a la industria alimentaria, ya que ésta ha sido condicionada a la escala de laboratorio y es importante tomar este rumbo con el objetivo de conocer su alcance.

El futuro de los agentes antimicrobianos de origen natural, se encuentra determinado por la actitud del consumidor actual ante los conservadores químicos. Los antimicrobianos de origen natural, se consideran como fuentes potencialmente seguras, pero su uso real en los productos alimenticios, se ha establecido para pocos casos. Cualquiera de estos extractos, deberá ser sometido a rigurosos estudios toxicológicos.

Deseo hacer mención que los resultados obtenidos en esta investigación, pueden favorecer otros alimentos ya que las características del alimento que se estudió pueden no ser aceptables por el consumidor.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, A. E., 2013. Caracterización de propiedades fisicoquímicas, térmicas, reológicas, y propiedades de barrera a los gases de películas comestibles elaboradas a partir de mucílago de *Salvia hispánica* y pectina cítrica. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Saltillo, Coahuila, México.

Alfaro, G, I.C. 2011. Cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.; Fr.) Viull por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales. Instituto Politécnico Nacional (Centro de desarrollo de productos bióticos). Tesis: Maestría en Ciencias Manejo Agroecológico de plagas y enfermedades. Yautepec, Morelos.

Anónimo 1. Higuierilla [En línea]. Consultado en marzo, 2013. Disponible en: [<http://www.geocities.ws/mrealcursos/higuierilla.htm>].

Ayerza (h), R. Associate in Arid Lands, Office of Arid Lands Studies, The University of Arizona, 250 E. Valencia Rd., Tucson, AZ85706-6800, USA.

Ayerza, R. (h). 1996. Fatty acid composition, protein and oil content of Chia (*Salvia hispánica* L.) grown in Columbia and Argentina. Third European Symposium on Industrial Crops and Products, Reims, France.

Brenna, J.T. 2002. Efficiency of conversion of α -linolenic acid to long chain w-3 fatty acids in man. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5:127-132.

Bulhosen, S. 2012. Chía: fuente antioxidante Agroforestal. [En línea]. Consultado en marzo, 2013. Disponible en: [<http://agroforestal.com.mx/content/ch%C3%AD-fuente-antioxidante>]

Bushway, A. A., P. R. Belya, R. J. Bushway. 1981. Chia seed as a Source of Oil, Polysaccharide, and Protein. *Journal of Food Science* 46:1349-1356.

Bushway, A. A., P. R. Belya, R. J. Bushway. 2000. Chia seed as a Source of Oil, Polysaccharide, and Protein. *Journal of Food Science* 46:1349-1356.

Castellanos, J. Z; Ojodeagua, J.L. Fernando, S.M.; Villalobos, S.; Sosa, A.; Badillo. V. 2000. Nutrición de ajo (*Allium sativum*) en condiciones de riego por goteo. Resúmenes técnicos 1er foro Nacional en el Cultivo de Ajo. Celaya Guanajuato.

Chien, P.; Chou, Ch. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). Journal of the Science of Food and Agriculture 86: 1964-1969.

Cohenete, J. 2010. Análisis de la Composición química de las diferentes variedades de ajo (*Allium sativum* L.) cultivadas en México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología.

Donoso, A; Latorre, B.A. 2006. Caracterización del moho azul causado por *Penicillium spp.* en uva de mesa almacenada en frío. Ciencia e Investigación Agraria (Artículo de investigación). Departamento de Fruticultura y Enología, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 306- 22, Santiago, Chile.

Fernández, M. 2010. Semillas de Chía, un alimento completo. El bazar natural. Productos naturales de calidad. Disponible en: <http://www.semillasdechia.com/propiedades.html>

Fernández, M. 2010. Semilla de Chía- Propiedades. Grupo Elbazar natural. Galicia- España. Disponible en: <http://www.semillasdechia.com/index.html>

Gottau, G. 2012. Alimentos procesados: ¿Buenos para la salud? Directo al paladar. [En línea]. Consultado en mayo, 2013. Disponible en: [<http://www.directoalpaladar.com/salud/alimentos-procesados-buenos-para-la-salud>].

Hernández *et al.*, 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades post-cosecha. Revista Mexicana de Fitopatología, A.C. Ciudad Obregón, México.

Licata, Marcela. Ácidos grasos Omega 3 y Omega 6. [En línea]. Consultado en mayo, 2013. Disponible en: [<http://www.zonadiet.com/alimentacion/omega3.htm>].

Lizcano, A.J., Vergara, J. L., 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos

y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C., Colombia. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>

Lyn, K.Y., Daniel, J.D., Whistler R.L. 2007. Structure of chía seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polym.* Page 23: 23-18.

Moreu, M. C. 2013. Propiedades nutricionales de la semilla de chía y sus beneficios para la salud. *Farmacéutica y Tecnóloga de los Alimentos. Diplomada en Nutrición. Puleva Salud.*

Moreno, S. González L.N., Salcedo, S.M., Cárdenas., M.L., Perales, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* Polibotánica. Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los Garza, N.L. México.

Moreu, M. C. 2013. Puleva Salud (Propiedades Nutricionales de la semilla de chía y sus beneficios para la salud). Disponible en: www.compromisopuleva.es

Pacheco, C. 2009. Efecto del extracto hidroetanólico de higuera *Ricinus communis L.* sobre el adulto del picudo del agave *Scyphophorus acupuntatus* Gyllenhal. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos.

Pawar, V. C. y Thaker, V. S. 2006. In Vitro efficacy of 75 essential oil against *Aspergillus niger*. *Group Clinical Nutrition.*

Rodríguez, A.I. 2010. Efecto del aceite esencial de cinco especies nativas chilenas sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Memoria presentada a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Chillan- Chile.

Rodríguez, A.T.; Ramírez, M.A.; Rivero, D.; Bosquez, E.; Barrera, L.L.; Bautista. S. 2009. Propiedades Químico- Estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Revista Chapingo. Serie Horticultura, Vol. 15,

Núm. 3, septiembre- diciembre, pp 307-317. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/609/60912186012.pdf>

Rodríguez, C. 2012. Higuera: La opción contra plagas. Disponible en:
http://www.caata.org/la_higuera_opcin_contra_plagas.html

Rodríguez, H. C. 2005. Plantas contra plagas 2; epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higuera y sabadilla. RAP-AL, RAPAM, SOMAS, CP e ITA Tlaxcala. Primera edición. Texcoco, Estado de México. México. 290p.

Rodríguez, N. E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Universidad Autónoma Indígena de México. Ra Ximhai, vol.7, núm. 1, enero-abril, pp. 153-170. El fuerte, México. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

Rojas, M.A; Soliva, R., Belloso, O.M 2009. Edible Coatings as Carriers of Active Ingredients for Fresh-cut fruits.

Ronceros, B. 2012. Fisiología de la fruta. Tecnología de Productos vegetales

Saavedra, N; Algecira, N.A. 2010. Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_ARTORIG4.pdf

Saucedo, S.; Sáenz, A.; Jasso, D.; Aguilar, M.A.; Aguilar, C.N. 2007. Influencia del ácido eláico y de cera de Candelilla de Cubiertas comestibles en la vida de anaquel de manzanas. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" No. 1923, Saltillo, Coahuila, México.

Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. American Journal of Clinical Nutrition 70(3):560S-569S.

Tenorio Lezama, Pedro. 2000. Salvia hispánica. México, URL: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/salviamex.htm>

Turner, C., Whitehand, L.C., Nguyen, T. y Mckeon, T. 2004. Optimization of a supercritical fluid/ reaction methodology for the analysis of castor oil using experimental design. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52:26-32.

8. ANEXOS

8.1 Determinación del porcentaje de inhibición de los extractos vegetales

Anexo 1. Gobernadora

Modelo lineal general: Gobernadora vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para Gobernadora, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	2	0.35389	0.35389	0.17694	15.92	0.004	
Error	6	0.06667	0.06667	0.01111			
Total	8	0.42056					

S = 0.105409 R-cuad. = 84.15% R-cuad.(ajustado) = 78.86%

Observaciones inusuales de Gobernadora

Residuo

Obs	Gobernadora	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	estándar
3	0.850000	0.650000	0.060858	0.200000	2.32 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T N Media Agrupación

1 3 0.6500 A

2 3 0.4500 A

3 3 0.1667 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 2. Ajo

Modelo lineal general: Ajo vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para Ajo, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	---------	-----------	-----------	---	---

T	2	0.11167	0.11167	0.05583	1.02	0.416
---	---	---------	---------	---------	------	-------

Error	6	0.32833	0.32833	0.05472		
-------	---	---------	---------	---------	--	--

Total	8	0.44000				
-------	---	---------	--	--	--	--

S = 0.233928 R-cuad. = 25.38% R-cuad. (ajustado) = 0.51%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

t	N	Media	Agrupación
---	---	-------	------------

2	3	1.500	A
---	---	-------	---

1	3	1.417	A
---	---	-------	---

3	3	1.233	A
---	---	-------	---

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 3. Higuera

Modelo lineal general: Higuera vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para Higuera, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	---------	-----------	-----------	---	---

T	2	0.49847	0.49847	0.24924	6.16	0.035
---	---	---------	---------	---------	------	-------

Error	6	0.24292	0.24292	0.04049		
-------	---	---------	---------	---------	--	--

Total	8	0.74139				
-------	---	---------	--	--	--	--

S = 0.201212 R-cuad. = 67.23% R-cuad.(ajustado) = 56.31%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T N Media Agrupación

2 3 2.217 A

1 3 2.025 A B

3 3 1.650 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4. Oligosacáridos de Quitosán 8h

Modelo lineal general: OQ8h vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1; 2; 3

Análisis de varianza para OQ8h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	----	------	-----------	-----------	---	---

T	2	0,30056	0,30056	0,15028	7,51	0,023	
---	---	---------	---------	---------	------	-------	--

Error	6	0,12000	0,12000	0,02000			
-------	---	---------	---------	---------	--	--	--

Total	8	0,42056					
-------	---	---------	--	--	--	--	--

S = 0,141421 R-cuad. = 71,47% R-cuad.(ajustado) = 61,96%

Observaciones inusuales de OQ8h

EE de Residuo

Obs	OQ8h	Ajuste	ajuste	Residuo	estándar
-----	------	--------	--------	---------	----------

3	2,10000	1,86667	0,08165	0,23333	2,02 R
---	---------	---------	---------	---------	--------

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T N Media Agrupación

2 3 1,933 A

1 3 1,867 A B

3 3 1,517 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 5.Oligosacáridos de Quitosán 12 h de hidrólisis

Modelo lineal general: OQ12h vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para OQ12h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	---------	-----------	-----------	---	---

T	2	0.67167	0.67167	0.33583	151.12	0.000
---	---	---------	---------	---------	--------	-------

Error	6	0.01333	0.01333	0.00222		
-------	---	---------	---------	---------	--	--

Total	8	0.68500				
-------	---	---------	--	--	--	--

S = 0.0471405 R-cuad. = 98.05% R-cuad.(ajustado) = 97.40%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T N Media Agrupación

1 3 2.067 A

2 3 1.983 A

3 3 1.450 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 6. Oligosacáridos de Quitosán 16 h de hidrólisis

Modelo lineal general: OQ16h vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para OQ16h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	----	------	-----------	-----------	---	---

T	2	1.00722	1.00722	0.50361	95.42	0.000	
---	---	---------	---------	---------	-------	-------	--

Error	6	0.03167	0.03167	0.00528			
-------	---	---------	---------	---------	--	--	--

Total	8	1.03889					
-------	---	---------	--	--	--	--	--

S = 0.0726483 R-cuad. = 96.95% R-cuad.(ajustado) = 95.94%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T	N	Media	Agrupación
---	---	-------	------------

1	3	1.950	A
---	---	-------	---

2	3	1.600	B
---	---	-------	---

3	3	1.133	C
---	---	-------	---

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 7. Oligosacáridos de Quitosán 20h de hidrólisis

Modelo lineal general: OQ20h vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1, 2, 3

Análisis de varianza para OQ20h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	----	------	-----------	-----------	---	---

T	2	0.79056	0.79056	0.39528	177.88	0.000	
---	---	---------	---------	---------	--------	-------	--

Error	6	0.01333	0.01333	0.00222			
-------	---	---------	---------	---------	--	--	--

Total 8 0.80389

S = 0.0471405 R-cuad. = 98.34% R-cuad.(ajustado) = 97.79%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T N Media Agrupación

1 3 2.033 A

2 3 1.850 B

3 3 1.333 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Determinación de la Concentración mínima Inhibitoria

Anexo 8. CLAVO

Modelo lineal general: CLAVO vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1; 2; 3

Análisis de varianza para CLAVO, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	2	2,1806	2,1806	1,0903	5,94	0,038	
Error	6	1,1017	1,1017	0,1836			
Total	8	3,2822					

S = 0,428499 R-cuad. = 66,44% R-cuad.(ajustado) = 55,25%

Observaciones inusuales de CLAVO

Obs	CLAVO	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar
4	0,30000	1,00000	0,24739	-0,70000 -2,00 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T	N	Media	Agrupación
1	3	1,08333	A
2	3	1,00000	A B
3	3	0,00000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 9. Gobernadora

Modelo lineal general: Gobern Vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 16 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16

Análisis de varianza para Gobern, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	15	0,0353646	0,0353646	0,0023576	2,38	0,067
Error	32	0,0316667	0,0316667	0,0009896		
Total	47	0,0670313				

S = 0,0314576 R-cuad. = 52,76% R-cuad.(ajustado) = 30,61%

Observaciones inusuales de Gobern

Residuo

Obs	Gobern	Ajuste	EE de ajuste	Residuo estándar
-----	--------	--------	--------------	------------------

26 0,150000 0,083333 0,018162 0,066667 2,60 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T N Media Agrupación

6 3 0,100000 A

7 3 0,100000 A

9 3 0,083333 A

14 3 0,083333 A

13 3 0,066667 A

11 3 0,066667 A

8 3 0,050000 A

3 3 0,050000 A

5 3 0,050000 A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 10. Ajo

Modelo lineal general: AJO vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 29 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29

Análisis de varianza para AJO, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente GL SC Sec. SC Ajust. MC Ajust. F P

T 28 0.0060345 0.0060345 0.0002155 0.26 1.000

Error 58 0.0483333 0.0483333 0.0008333

Total 86 0.0543678

S = 0.0288675 R-cuad. = 11.10% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T N Media Agrupación

27 3 1.083 A

25 3 1.083 A

23 3 1.083 A

21 3 1.083 A

19 3 1.083 A

17 3 1.083 A

15 3 1.083 A

13 3 1.083 A

11 3 1.083 A

9 3 1.083 A

7 3 1.083 A

5 3 1.083 A

3 3 1.083 A

1 3 1.083 A

29 3 1.083 A

28 3 1.067 A

26 3 1.067 A

24 3 1.067 A

22 3 1.067 A

20 3 1.067 A

18 3 1.067 A

16 3 1.067 A

14 3 1.067 A

12 3 1.067 A

10 3 1.067 A

8 3 1.067 A

6 3 1.067 A

4 3 1.067 A
 2 3 1.067 A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 11. Higuera

Modelo lineal general: Hig vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 20 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16;
 17; 18; 19; 20

Análisis de varianza para Hig, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	19	0,100167	0,100167	0,005272	1,66	0,087
Error	40	0,126667	0,126667	0,003167		
Total	59	0,226833				

S = 0,0562731 R-cuad. = 44,16% R-cuad.(ajustado) = 17,63%

Observaciones inusuales de Hig

Obs	Hig	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
17	0,600000	0,500000	0,032489	0,100000	2,18 R
31	0,650000	0,550000	0,032489	0,100000	2,18 R
35	0,350000	0,466667	0,032489	-0,116667	-2,54 R
57	0,300000	0,433333	0,032489	-0,133333	-2,90 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T	N	Media	Agrupación
5	3	0,5667	A
11	3	0,5500	A
14	3	0,5167	A
4	3	0,5167	A
1	3	0,5167	A
2	3	0,5167	A
18	3	0,5000	A
6	3	0,5000	A
3	3	0,4833	A
13	3	0,4667	A
12	3	0,4667	A
16	3	0,4500	A
7	3	0,4500	A
17	3	0,4500	A
9	3	0,4500	A
19	3	0,4333	A
8	3	0,4333	A
10	3	0,4333	A
20	3	0,4333	A
15	3	0,4333	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 12. Steribox 0.5%

Modelo lineal general: STERIBOX vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 3 1; 2; 3

Análisis de varianza para STERIBOX, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	2	2,3117	2,3117	1,1558	832,20	0,000	
Error	6	0,0083	0,0083	0,0014			
Total	8	2,3200					

S = 0,0372678 R-cuad. = 99,64% R-cuad.(ajustado) = 99,52%

Observaciones inusuales de STERIBOX

Obs	STERIBOX	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar
2	1,00000	1,06667	0,02152	-0,06667 -2,19 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T	N	Media	Agrupación
2	3	1,08333	A
1	3	1,06667	A
3	3	0,00000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 13. Oligosacáridos de Quitosán 8h

Modelo lineal general: OQ8h vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 17 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17

Análisis de varianza para OQ8h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	16	0,34667	0,34667	0,02167	1,23	0,293	

Error	34	0,59667	0,59667	0,01755			
-------	----	---------	---------	---------	--	--	--

Total	50	0,94333					
-------	----	---------	--	--	--	--	--

S = 0,132473 R-cuad. = 36,75% R-cuad.(ajustado) = 6,98%

Observaciones inusuales de OQ8h

Obs	OQ8h	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar	
16	0,90000	1,15000	0,07648	-0,25000	-2,31 R
18	1,45000	1,15000	0,07648	0,30000	2,77 R
23	1,20000	0,98333	0,07648	0,21667	2,00 R
28	0,90000	1,13333	0,07648	-0,23333	-2,16 R
31	1,45000	1,20000	0,07648	0,25000	2,31 R
33	0,90000	1,20000	0,07648	-0,30000	-2,77 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T	N	Media	Agrupación
---	---	-------	------------

11	3	1,2000	A
----	---	--------	---

1	3	1,2000	A
---	---	--------	---

13	3	1,1500	A
----	---	--------	---

6	3	1,1500	A
---	---	--------	---

10	3	1,1333	A
----	---	--------	---

12	3	1,1167	A
----	---	--------	---

9	3	1,1167	A
---	---	--------	---

5	3	1,1167	A
---	---	--------	---

4	3	1,1000	A
---	---	--------	---

3	3	1,1000	A
---	---	--------	---

2	3	1,0833	A
---	---	--------	---

14	3	1,0500	A
----	---	--------	---

16	3	1,0333	A
----	---	--------	---

7	3	1,0333	A
---	---	--------	---

17	3	0,9833	A
----	---	--------	---

8	3	0,9833	A
---	---	--------	---

15	3	0,8667	A
----	---	--------	---

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 14. Oligosacáridos de Quitosán 12 h de hidrólisis

Modelo lineal general: OQ12h vs. T

Factor	Tipo	Niveles	Valores
--------	------	---------	---------

T	fijo	17	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
---	------	----	---

Análisis de varianza para OQ12h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	16	0.205784	0.205784	0.012862	3.20	0.002	
Error	34	0.136667	0.136667	0.004020			
Total	50	0.342451					

S = 0.0634004 R-cuad. = 60.09% R-cuad.(ajustado) = 41.31%

Observaciones inusuales de OQ12h

Obs	OQ12h	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar	
30	0.80000	0.95000	0.03660	-0.15000	-2.90 R
34	1.05000	0.93333	0.03660	0.11667	2.25 R
36	0.75000	0.93333	0.03660	-0.18333	-3.54 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T	N	Media	Agrupación
11	3	1.0500	A
5	3	1.0333	A
4	3	1.0333	A
1	3	1.0167	A
2	3	1.0167	A
9	3	1.0000	A B
10	3	0.9500	A B
17	3	0.9500	A B
3	3	0.9500	A B
16	3	0.9333	A B

12 3 0.9333 A B
 15 3 0.9167 A B
 13 3 0.9000 A B
 6 3 0.9000 A B
 7 3 0.8833 A B
 8 3 0.8833 A B
 14 3 0.8167 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 15. Oligosacáridos de Quitosán 16 h

Modelo lineal general: OQ16h vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 21 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16;
 17; 18; 19; 20; 21

Análisis de varianza para OQ16h, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	20	0,150794	0,150794	0,007540	2,79	0,002
Error	42	0,113333	0,113333	0,002698		
Total	62	0,264127				

S = 0,0519462 R-cuad. = 57,09% R-cuad.(ajustado) = 36,66%

Observaciones inusuales de OQ16h

Obs	OQ16h	Ajuste	ajuste	Residuo	Residuo estándar
10	0,75000	0,85000	0,02999	-0,10000	-2,36 R
46	0,85000	0,95000	0,02999	-0,10000	-2,36 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T N Media Agrupación

14	3	1,0000	A
13	3	1,0000	A
10	3	0,9833	A B
17	3	0,9667	A B
11	3	0,9667	A B
16	3	0,9500	A B
15	3	0,9500	A B
3	3	0,9333	A B
8	3	0,9333	A B
9	3	0,9167	A B
1	3	0,9167	A B
2	3	0,9000	A B
20	3	0,9000	A B
12	3	0,8833	A B
5	3	0,8833	A B
7	3	0,8667	A B
6	3	0,8667	A B
18	3	0,8667	A B
21	3	0,8667	A B
4	3	0,8500	A B
19	3	0,8333	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 16. Oligosacáridos de Quitosán 20 h

Modelo lineal general: OQ20hrs vs. T

Factor Tipo Niveles Valores

T fijo 21 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16;

17; 18; 19; 20; 21

Análisis de varianza para OQ20hrs, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
T	20	0,149365	0,149365	0,007468	3,09	0,001
Error	42	0,101667	0,101667	0,002421		
Total	62	0,251032				

S = 0,0491999 R-cuad. = 59,50% R-cuad.(ajustado) = 40,21%

Observaciones inusuales de OQ20hrs

Obs	OQ20hrs	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar	
7	0,90000	0,98333	0,02841	-0,08333	-2,07 R
48	1,05000	0,96667	0,02841	0,08333	2,07 R
57	1,10000	1,01667	0,02841	0,08333	2,07 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

T	N	Media	Agrupación
1	3	1,0833	A
2	3	1,0500	A B
19	3	1,0167	A B C
14	3	1,0000	A B C
10	3	1,0000	A B C
13	3	0,9833	A B C
3	3	0,9833	A B C

16 3 0,9667 A B C
 15 3 0,9667 A B C
 12 3 0,9667 A B C
 11 3 0,9667 A B C
 8 3 0,9667 A B C
 18 3 0,9500 A B C
 7 3 0,9333 A B C
 6 3 0,9333 A B C
 20 3 0,9333 A B C
 17 3 0,9333 A B C
 21 3 0,9167 B C
 9 3 0,9167 B C
 5 3 0,9000 B C
 4 3 0,8667 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 17. Pérdida de peso de los frutos sin daño

Modelo lineal general: Peso vs. Tratamientos

Factor Tipo Niveles Valores

t fijo 11 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

Análisis de varianza para peso, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
t	10	120.790	120.790	12.079	1.55	0.153
Error	44	342.214	342.214	7.778		
Total	54	463.003				

S = 2.78883 R-cuad. = 26.09% R-cuad.(ajustado) = 9.29%

Observaciones inusuales de peso

Obs	peso	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar	
23	26.4033	19.8637	1.2472	6.5396	2.62 R
26	28.3721	22.7052	1.2472	5.6669	2.27 R
37	14.9755	20.5581	1.2472	-5.5826	-2.24 R
39	26.0105	20.5581	1.2472	5.4524	2.19 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

t	N	Media	Agrupación
6	5	22.71	A
10	5	20.99	A
8	5	20.56	A
9	5	20.14	A
1	5	20.07	A
5	5	19.86	A
11	5	19.55	A
3	5	19.10	A
4	5	18.76	A
2	5	17.49	A
7	5	17.21	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 18. Pérdidas de peso de los frutos con daños

Modelo lineal general: % Peso vs. Trat

Factor Tipo Niveles Valores

Trat fijo 11 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

Análisis de varianza para % Peso, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Trat	10	246.21		246.21	24.62	0.81	0.242
Error	11	332.68		332.68	30.24		
Total	21	578.89					

S = 5.49940 R-cuad. = 42.53% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Observaciones inusuales de % Peso

Obs	% Peso	EE de Ajuste	Residuo ajuste	Residuo estándar	
15	19.2389	30.5160	3.8887	-11.2771	-2.90 R
16	41.7930	30.5160	3.8887	11.2771	2.90 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Trat N Media Agrupación

8	2	30.52	B
6	2	21.52	B
4	2	21.37	B
11	2	20.55	B
1	2	20.49	A
9	2	20.31	B
5	2	20.30	B
10	2	19.83	B
3	2	19.73	B
7	2	17.58	B
2	2	16.96	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

