



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS**

**“EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE QUITOSANO  
NANOESTRUCTURADOS ADICIONADOS CON ACEITE DE  
CANELA SOBRE LA CALIDAD POSTCOSECHA DE PEPINO”**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**EN**  
**MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES**  
**PRESENTA**

**MARÍA ALEJANDRA ISTÚRIZ ZAPATA**



**YAUTEPEC, MORELOS, JUNIO DE 2018**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14-BIS

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de Yautepec siendo las 10:00 horas del día 23 del mes de marzo del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:  
**"Evaluación de recubrimientos de quitosano nanoestructurados adicionados con aceite de canela sobre la calidad postcosecha de pepino"**

Presentada por el alumno:

<u>Istúriz</u>	<u>Zapata</u>	<u>María Alejandra</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; text-align: center;"> <tr> <td>A</td><td>1</td><td>6</td><td>0</td><td>8</td><td>0</td><td>1</td> </tr> </table>			A	1	6	0	8	0	1
A	1	6	0	8	0	1			

aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

\_\_\_\_\_  
Dra. Laura Leticia Barrera Necha

\_\_\_\_\_  
M. en C. Mónica Hernández López

\_\_\_\_\_  
Dra. Elsa Ventura Zapata

\_\_\_\_\_  
Dr. José Luis Trejo Esquivel

\_\_\_\_\_  
Dr. Rodolfo Figueroa Brito

\_\_\_\_\_  
Dra. Alma angélica Del Villar Martínez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
Dra. Gabriela Trojo Tapia





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Yautepec, Mor., siendo el día 24 del mes de marzo del año 2018, el que suscribe **María Alejandra Istúriz Zapata**, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades, con número de registro **A160801**, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Laura Leticia Barrera Necha** y **M. en C. Mónica Hernández López** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Evaluación de recubrimientos de quitosano nanoestructurados adicionados con aceite de canela sobre la calidad postcosecha de pepino”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o director (es) del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6.0, Calle CeProBi No.8, Col. San Isidro, C.P. 62731 11 Yautepec, Morelos, México, Fax: (52) (01) (55) 57296000 ext. 82512 o 01-7353941896, e-mail: [ceprobi@ipn.mx](mailto:ceprobi@ipn.mx) (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Alejandra Istúriz Zapata

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado 2006 y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis **"Evaluación de recubrimientos de quitosano nanoestructurados adicionados con aceite de canela sobre la calidad postcosecha de pepino"** es responsabilidad de la **Dra. Laura Leticia Barrera Necha, M. en C. Mónica Hernández López** Directores de tesis y **María Alejandra Istúriz Zapata**, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos 24 de marzo de 2018

ATENTAMENTE

Alumna

  
María Alejandra  
Istúriz Zapata

Director(es) de tesis

  
Dra. Laura Leticia  
Barrera Necha

  
M. en C. Mónica  
Hernández López

## Autorización de uso de obra

**Instituto Politécnico Nacional**

**P r e s e n t e**

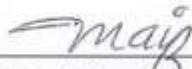
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **María Alejandra Istúriz Zapata** manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **"Evaluación de recubrimientos de quitosano nanoestructurados adicionados con aceite de canela sobre la calidad postcosecha de pepino"** en adelante **"La Tesis"** y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales **"La Tesis"** por un periodo de dos años contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a **"El IPN"** de su terminación.

En virtud de lo anterior, **"El IPN"** deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de **"La Tesis"**.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de **"La Tesis"**, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de **"La Tesis"**, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de **"La Tesis"** o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México, 24 de marzo de 2018

Atentamente



---

**María Alejandra Istúriz Zapata**

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Tecnologías Postcosecha de Productos Agrícolas** del Departamento de Interacciones Planta Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la **Dra. Laura Leticia Berrera Necha** y la **M. en C. Mónica Hernández López**. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de **CONACyT (781289)**, y del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de investigación y Posgrado del IPN. La investigación fue realizada con el financiamiento otorgados a los proyectos de la **SIP (20160064 y 20170443)**.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Al Instituto Politécnico Nacional Y al Instituto de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN.

A la Dr. Laura Leticia Barrera Necha y a la M. en C. Mónica Hernández López, por ser mis guías en este trabajo, ayudarme en lo personal y académico.

A mí Comité Tutorial por sus buenos consejos para el desarrollo de esta investigación: Dra. Elsa Ventura Zapata, Dr. José Luis Trejo Espino y al Dr. Rodolfo Figueroa Brito.

A la Señora Estela González por su colaboración en la toma de las mejores fotografías al microscopio que he tenido.

A las doctoras del Laboratorio: Dra. Silvia Bautista Baños, Dra. Zormy Nacary Correa Pacheco, Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar, por ser tan dedicadas, por ayudarme y darme buenos consejos para salir adelante en la investigación. Por el excelente laboratorio que tenemos.

A mis compañeros del laboratorio: "El Chamo" (Jaime), Clau, Frutilupis (Ana), Moni, Selene... Por ser incondicionales, por haberme aceptado y ayudado en muchas ocasiones. Por ser las mejores personas. Más que compañeros, amigos.

A mis amigos Faby, Judy, Isa y Héctor. Gracias por su amistad sincera.

A mis caseros: Doña Reyna y Don Beto. Gracias por su apoyo. Son como mi familia.

A la Biol. María Luisa Corona, Dra. María Elena Sotelo Boyás, Verenice García, Ola (Arnola). Al personal administrativo del CeProBi, por su apoyo.

A mis amigos, que desde cualquier parte del mundo estuvieron conmigo. Lo quiero, los extraño. Gracias por siempre estar.

A mi familia por su apoyo y por su amor. A mí tío Tomás. A los Lazcano Romano.

A mis tesoros: María Paula, Albany Cristina y María Victoria. Son las tres personitas que me llenaron de alegría en los momentos más difíciles. A mi gordita: Nala. Las amo.

A mis compañeros de MAPE-15, por tratar de hacerme sentir como en casa.

A mis profesores.

A México.

Gracias a todos por contribuir en mi trabajo de investigación y hacerme una mejor persona. Fueron tiempos difíciles, duros... pero ¡lo logré!

**GRACIAS A TODOS**

## Dedicatorias

*A mí país, Venezuela.*

*A Dios y a la Virgen.*

*A mis padres: Omar y Gladys Margarita.*

*A mis hermanos: Isabel Cristina, Omar Alfredo e Iván Alejandro.*

*A mí: Por demostrarme que soy valiente, fuerte e inteligente*

## I. Índice

	Título	Pág.
I	Índice	9
II	Índice de figuras	12
III	Índice de cuadros	13
<b>IV</b>	<b>Resumen</b>	<b>14</b>
<b>V</b>	<b>Abstrac</b>	<b>16</b>
<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>18</b>
2.1	Manejo postcosecha	18
2.1.2	Calidad postcosecha	20
2.2	Alternativas para el manejo de las enfermedades en postcosecha	21
2.2.1	Aceites esenciales	22
2.2.2	Quitosano	26
2.2.3	Recubrimientos de quitosano	28
2.2.4	Nanotecnología y nanopartículas de quitosano	31
2.2.5	Recubrimientos a base de quitosano nanoestructurado	32
2.3	Cultivo de pepino ( <i>Cucumis sativus</i> L.)	35
2.4	Caracterización e identificación de agentes patógenos postcosecha	38
2.4.1	Enfermedades fúngicas postcosecha	40
2.4.2	Enfermedades pre y postcosecha	41
2.4.2.1	Pudrición algodonosa ( <i>Pythium</i> sp.)	41
2.4.2.2	Pudrición negra ( <i>Didymella bryoniae</i> )	41
2.4.2.3	Antracnosis ( <i>Glomerella lagenaria</i> o <i>Colletotrichum orbiculare</i> )	42
2.4.2.4	Pudriciones causadas por varias especies de <i>Fusarium</i> spp.	43
2.4.2.5	Podredumbre azul ( <i>Penicillium oxalicum</i> )	44
2.4.3	Enfermedades postcosecha	45
2.4.3.1	Pudrición por <i>Alternaria cucumerina</i>	45
2.4.3.2	Podredumbre negra ( <i>Aspergillus niger</i> )	46
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>47</b>
3.1	Objetivo general	47
3.2	Objetivos específicos	47
<b>4</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Esquema general</b>	<b>48</b>
4.2	Caracterización del aceite esencial de canela por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM)	49
4.2.1	Preparación de las nanopartículas	49
4.2.2	Caracterización de las nanopartículas por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (MET)	51
4.3	Formulación de recubrimientos a base de quitosano comercial	52

4.3.1	Solución de quitosano	52
4.3.2	Formulación y estandarización de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado	52
4.3.3	Recubrimiento completo de quitosano	53
4.3.4	Recubrimiento de quitosano nanoestructurado	53
4.3.5	Aplicación de los recubrimientos	55
4.4	Variables de calidad postcosecha en pepino	55
4.4.1	Determinación cuantitativa de la calidad	56
4.4.1.1	Determinación de sólidos solubles totales	56
4.4.1.2	Determinación de la acidez titulable en muestras sólidas	56
4.4.1.3	Determinación de la firmeza	57
4.4.1.4	Determinación del cambio de color	57
4.4.2	Variables fisiológicas	58
4.4.2.1	Pérdida de peso	58
4.4.2.2	Producción de CO <sub>2</sub>	58
4.4.2.3	Producción de etileno	59
4.4.3	Variables bioquímicas	60
4.4.3.1	Determinación de las clorofilas totales	60
4.4.4	Carga microbiológica	60
4.4.5	Pruebas de aceptabilidad	61
4.5	Aislamiento de hongos fitopatógenos de frutos de pepino en postcosecha	61
4.5.1	Material vegetal para el aislamiento	61
4.5.1.1	Aislamiento de los hongos fitopatógenos de frutos de pepino en postcosecha	62
4.5.1.2	Establecimiento de grupos morfológicos	62
4.5.1.3	Pruebas de patogenicidad	63
4.5.1.4	Caracterización morfológica de los aislados	63
4.5.1.5	Identificación molecular	64
4.5.2	Evaluación de la incidencia y severidad de <i>Fusarium solani</i>	65
4.5.2.1	Preparación del inóculo de conidios de los hongos fitopatógenos postcosecha del pepino	65
4.5.2.2	Porcentaje de incidencia y severidad	65
4.6	Análisis estadístico	66
<b>5</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>67</b>
5.1	Caracterización del aceite esencial de canela por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas	67
5.1.1	Caracterización de las nanopartículas por espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier	69
5.1.2	Microscopía electrónica de transmisión	73
5.2	Formulación y estandarización de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado para los frutos de pepino	75

5.3	Calidad postcosecha	76
5.3.1	Apariencia	76
5.3.2	Determinación cuantitativa de la calidad	79
5.3.3	Variables fisiológicas	84
5.3.3.1	Pérdida de peso	84
5.3.3.2	Producción de CO <sub>2</sub>	87
5.3.3.3	Producción de etileno	89
5.3.4	Contenido de clorofilas	91
5.3.5	Carga microbiológica	93
5.3.6	Pruebas de aceptabilidad	96
5.4	Aislamiento de hongos fitopatógenos postcosecha de pepino	100
5.4.1	Pruebas de patogenicidad	104
5.4.2	Caracterización morfológica e identificación molecular de los aislados	109
5.5	Incidencia y severidad de <i>Fusarium solani</i>	118
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>130</b>

## II. Índice de Figuras

<b>Figuras</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1	Principal grupo de moléculas que se encuentra dentro de los aceites esenciales	24
Figura 2	Estructura química del cinamaldehído	25
Figura 3	Estructura química del quitosano	27
Figura 4	Esquema general	49
Figura 5	Preparación de los recubrimientos	54
Figura 6	Cromatograma aceite esencial de canela	67
Figura 7	Espectro FTIR de aceite esencial de canela y trans-cinamaldehído	70
Figura 8	Espectro FTIR de los diferentes tipos de nanopartículas de quitosano	71
Figura 9	Micrografía de los diferentes tipos de nanopartículas de quitosano	74
Figura 10	Apariencia de los frutos: cero y ocho días	77
Figura 11	Apariencia de los frutos: 16 y 20 días	78
Figura 12	Pérdida de peso	85
Figura 13	Producción de CO <sub>2</sub>	88
Figura 14	Producción de etileno	90
Figura 15	Contenido de clorofilas	92
Figura 16	Carga microbiológica: PDA	94
Figura 17	Carga microbiológica: STC	95
Figura 18	Pruebas de aceptabilidad	97
Figura 19	Grupos morfológicos	101
Figura 20	Escala de severidad hongos aislados de pepino	105
Figura 21	Severidad de los hongos más patogénicos en pepino	106
Figura 22	Incidencia de los grupos morfológicos	107
Figura 23	Resultados de las pruebas de patogenicidad	108
Figura 24	Escala de severidad	108
Figura 25	<i>Fusarium solani</i>	111
Figura 26	<i>Fusarium oxysporum</i>	113
Figura 27	<i>Aspergillus niger</i>	114
Figura 28	<i>Alternaria alternata</i>	115
Figura 29	<i>Penicillium oxalicum</i>	116
Figura 30	Efecto de los recubrimientos sobre <i>F. solani</i> : cero días	119
Figura 31	Efecto de los recubrimientos sobre <i>F. solani</i> : segundo día	117
Figura 32	Efecto de los recubrimientos sobre <i>F. solani</i> : día nueve	120
Figura 33	Efecto de los recubrimientos sobre <i>F. solani</i> : día doce	121
Figura 34	Efecto de los recubrimientos sobre <i>F. solani</i> : día trece	122
Figura 35	Severidad <i>F. solani</i>	123
Figura 36	Severidad <i>F. solani</i>	127

### III. Índice de Cuadros

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 1	Tratamientos aplicados en los frutos de pepino	55
Cuadro 2	Compuestos mayoritarios en el aceite esencial de canela	68
Cuadro 3	Variables de calidad postcosecha: SST y AT	80
Cuadro 4	Variables de calidad postcosecha: firmeza y cambio de color	81
Cuadro 5	Grupos morfológicos	103
Cuadro 6	Características de <i>Fusarium solani</i>	110
Cuadro 7	Características de <i>Fusarium oxysporum</i>	112
Cuadro 8	Características de <i>Aspergillus niger</i>	114
Cuadro 9	Características de <i>Alternaria alternata</i>	115
Cuadro 10	Características de <i>Penicillium oxalicum</i>	116
Cuadro 11	Identificación molecular de los aislados de pepino	117

#### IV. Resumen

Los pepinos se caracterizan por su firmeza, color verde-oscuro, ausencia de cicatrices, amarillamientos y pudriciones. Sin embargo, durante la postcosecha, estas características se pierden gradualmente, alcanzando una vida de anaquel de 14 días; por esta razón se buscan alternativas para reducir los efectos que inducen la pérdida de la calidad en postcosecha. Mediante el uso de recubrimientos comestibles, se ha logrado reducir estos efectos y el quitosano adicionado con aceites esenciales han mostrado tener un efecto sinérgico en el control de patógenos y preservado la calidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de recubrimientos a base de quitosano nanoestructurado adicionado con aceite esencial de canela sobre la calidad postcosecha de pepino. Para esto se elaboraron recubrimientos de quitosano (Q), quitosano con aceite esencial de canela (QAEC), quitosano con trans-cinamaldehído (QTCA), quitosano nanoestructurado (NQ), quitosano nanoestructurado con aceite esencial de canela (NQAEC) y quitosano nanoestructurado con trans-cinamaldehído (NQTCA). Después de aplicar los recubrimientos, los pepinos se almacenaron a 12°C durante 16 días. Los muestreos se realizaron cada 4 días evaluando las variables de calidad: sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), firmeza y color; las variables fisiológicas: pérdida de peso, respiración, producción de etileno, clorofilas totales, como variable bioquímica, por último, el componente microbiológico (CM) y la aceptabilidad de los frutos. También, la incidencia y severidad del patógeno *Fusarium solani*. No se encontraron diferencias estadísticas, en SST, AT y firmeza. Los frutos que mostraron mayor cambio de color fueron el control, Q, QTCA y NQAEC. Los tratamientos de Q y NQ mostraron una pérdida de peso de 5.49% y 8.47%, el resto presentaron valores superiores al 20%. La respiración en todos los tratamientos se mantuvo por debajo del valor de referencia. En los recubrimientos con nanopartículas el contenido de clorofilas totales fue mayor al final del almacenamiento. En cuanto al CM se encontró un mayor contenido de hongos y levaduras en el tratamiento con NQTCA y bacterias aerófilas en el tratamiento con QTCA, a los 4 días de almacenamiento. No se encontraron diferencias entre los tratamientos evaluados en cuanto a la aceptabilidad del consumidor. Se observó una incidencia de 75-100% en los tratamientos evaluados y con los tratamientos de Q y NQ presentaron la menor severidad. Se concluye que los recubrimientos evaluados tienen potencial para mantener la respiración, minimizar la pérdida de peso y el cambio de color durante el almacenamiento, y los tratamientos de Q y NQ disminuyen la severidad de las pudriciones causadas por *F. solani*.

## V. Abstract

Cucumbers are vegetables that are characterized by their firmness, dark green color, absence of scars, yellowing and decay. However, during postharvest, these characteristics are gradually lost, reaching a shelf life of 14 days; for this reason, alternatives are sought to reduce the effects that induce the loss of post-harvest quality. Through the use of edible coatings, these effects have been reduced and chitosan has been added with oil, it has been shown to have a synergistic effect in controlling pathogens and preserving quality. The objective of this work was to evaluate the effect of coatings based on nanostructured chitosan added with cinnamon essential oil on the postharvest quality of cucumber. For this, the coatings of chitosan (Ch), chitosan with cinnamon essential oil (ChCEO), chitosan with trans-cinnamaldehyde (ChTCA), nanostructured chitosan (NCh), nanostructured chitosan with cinnamon essential oil (NChCEO) and nanostructured chitosan with trans-cinnamaldehyde (NChTCA). After applying the coatings, the cucumbers were stored at 12 ° C for 16 days. The samples were made every 4 days evaluating the quality variables: total soluble solids (SST), titratable acidity (AT), firmness and color; the physiological variables: weight loss, respiration, ethylene production, total chlorophylls, as a biochemical variable, finally, the microbiological component (CM) and the acceptability of the fruits. Also, the incidence and severity of the pathogen *Fusarium solani*. No statistical differences were found in SST, AT and firmness. The fruits that showed the greatest color change were the control, Ch, ChTCA and NChCEO. The treatments of Ch and NCh showed a weight loss of 5.49% and 8.47%, the rest presented values higher than 20%. Breathing in all treatments remained below the reference value. In the nanoparticle coatings the total chlorophyll content was higher at the end of storage. For CM, a higher content of fungi and yeasts was found in the treatment with NChTCA and aerobic bacteria in the treatment with ChTCA, after 4 days of storage. No differences were found between the treatments evaluated in terms of consumer acceptability. An incidence of 75-100% was observed in the treatments evaluated and with the treatments of Ch and NCh presented the lowest severity. It is concluded that the coatings evaluated have the potential to maintain respiration, minimize weight loss and color change during storage, and Ch and NCh treatments decrease the severity of rots caused by *F. solani*.

## **1. Introducción**

En la actualidad existe una creciente demanda de productos hortofrutícolas de buena calidad, por lo tanto, los consumidores se han vuelto más exigentes a la hora de elegir y adquirir hortalizas y frutas. Esta demanda ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías para mantener la calidad postcosecha, ya que en esta etapa del cultivo es donde se encuentran el 50 % de pérdidas de producción en todos los cultivos económicos en el mundo. El manejo postcosecha busca prevenir la aparición de enfermedades y disminuir la velocidad de los procesos fisiológicos que llevan al deterioro, con el fin de mantener la calidad de la cosecha y aumentar la vida de anaquel. El uso de recubrimientos comestibles data de la antigua China, donde se cubrían los cítricos con ceras con la finalidad de mejorar su aspecto y que éstos duraran un mayor tiempo. Los recubrimientos comestibles están constituidos por una matriz delgada que se forma directamente sobre los frutos, estos se han elaborado de diferentes materiales de origen natural como lípidos, proteínas y polisacáridos. Uno de los polisacáridos más empleados en la actualidad y que ha dado excelentes resultados es el quitosano, el cual se extrae de la quitina del exoesqueleto de los crustáceos que se desechan en la industria pesquera. El quitosano tiene como características que es un polisacárido biodegradable, no tóxico para humanos y animales, tiene actividad antimicrobiana lo que, lo hace atractivo, para la elaboración de recubrimientos comestibles. Se han realizado estudios del uso de quitosano para mantener la calidad postcosecha en cuanto al color, sabor, textura, además se ha demostrado que tiene la capacidad de reducir la tasa de respiración, la pérdida de peso y la velocidad de deterioro, actuando como una barrera para el oxígeno y la reducción de infecciones durante el almacenamiento. En otros estudios se han empleado el quitosano mezclado con aceites esenciales, como el aceite de canela, mejorando las propiedades mecánicas y químicas del quitosano, haciéndolo más soluble en agua, aumentando la permeabilidad al vapor de agua

y ambos, componentes actúan de forma sinérgica en el control de enfermedades en postcosecha. Recientemente, se ha empleado el quitosano nanoestructurado, en forma de nanopartículas capaces de encapsular en su interior componentes como los aceites esenciales. Este tipo de recubrimientos tienen diferentes beneficios potenciales con respecto al quitosano convencional, ya que mejoran las propiedades funcionales de la cubierta comestible como resultado de una mayor superficie de contacto y se considera que las nanopartículas tienen una mayor actividad antimicrobiana y propiedades de barrera. Uno de los productos agrícolas más importantes en México, es el pepino, ya que este forma parte de la dieta diaria de la población además de que se exporta el 83 % de su producción nacional a diferentes países durante el periodo invernal. Sin embargo, una vez cosechado el pepino experimenta cambios metabólicos importantes que demeritan su calidad y se ha documentado que una vez cosechado, la vida de anaquel máxima en condiciones de almacenamiento es de 14 días. Los frutos de pepino tienen como atributos de calidad la uniformidad, firmeza, color verde oscuro de su piel, el tamaño según la variedad y carencia de cicatrices, pudriciones y amarillamientos. Por la importancia económica y de consumo en México, se planteó la búsqueda de estrategias que sean amigables con el ambiente, económicas y que permitan mantener la calidad de la cosecha de los frutos de pepino y aumentar la vida de anaquel, por ello se emplearon recubrimientos comestibles con componentes de uso comercial, de bajo costo y accesibles para los productores. Este trabajo se propuso formular y evaluar el efecto de recubrimientos a base de quitosano y quitosano nanoestructurado adicionados con aceite esencial de canela sobre la calidad postcosecha de frutos de pepino.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Manejo postcosecha**

Las pérdidas en calidad y cantidad entre la cosecha y el consumo afectan las cosechas de los productos hortofrutícolas frescos. Se calcula que estas van de 5 a 25 % en países desarrollados y hasta el 50 % en países en desarrollo dependiendo del producto, de la variedad y las condiciones de manejo, áreas de producción y época del año (Aular 2006, Kader 2007, FAO 2017). El manejo postcosecha busca reducir estas pérdidas enfocándose en los factores biológicos y ambientales involucrados en el deterioro, además, de generar tecnologías que retrasen la senescencia y mantengan la calidad de la cosecha. Las pérdidas postcosecha tienen repercusión a nivel económico y social para todos los que intervienen en la cadena de producción desde el agricultor hasta el consumidor final, quien es el que asume los sobre costos de éstas (López y col 2000).

Para extender la vida útil de las frutas en postcosecha, algunas medidas efectivas se han implementado en los últimos años incluyendo el almacenamiento a bajas temperaturas, el uso de envases o envolturas que modifiquen la atmósfera, irradiación UV, la aplicación de cubiertas y recubrimientos de diversas composiciones (Baños y col 2005, Mehyar y col 2011, Moreno y col 2013), tratamientos hidrotérmicos, fórmulas que contienen agentes de control biológico, entre otras (Quezada y col 2003; Ramos-García 2012). Se han utilizado cubiertas de ceras vegetales y químicas, materiales plásticos por sus propiedades inherentes de permeabilidad selectiva de gases (Kader 2002, Moreno y col 2013). Y más recientemente, el uso de recubrimientos comestibles a base de diferentes materiales biológicos que son de bajo costo y fácil obtención, además de que son amigables con el ambiente por su biodegradabilidad y baja toxicidad.

Las frutas y hortalizas son tejidos vivos que luego de la cosecha, experimentan cambios continuos, siendo la fisiología postcosecha la ciencia que estudia los procesos, cambios o comportamientos que presenta una fruta o una hortaliza después de ser cosechada (López y col 2000), por lo que es de especial interés el conocimiento de aspectos relacionados con la biología de estos productos en esta etapa del cultivo, de lo cual dependerá la manipulación en estado fresco, de la cosecha misma, de la selección y clasificación, del empaque en campo, el transporte y la exhibición en el punto de venta (Kader 2007).

Sin embargo, estos cambios no se pueden detener, pero sí retrasar dependiendo del tipo de hortaliza o fruto conociendo los factores fisiológicos que estos requieran controlar, permite definir las estrategias para prolongar su vida de anaquel. Uno de los procesos que se buscan retrasar en la postcosecha son la senescencia que es la etapa final de desarrollo de los vegetales, donde se originan una serie de cambios que llevan a la muerte de los tejidos. Estos procesos son: la respiración, la producción de etileno, cambios en la composición química, transpiración y pérdida de agua, crecimiento y desarrollo y algunos cambios inducidos por las condiciones ambientales en las que se almacenan las frutas y hortalizas como las fisiopatías, el daño físico, daño por calor y el daño causado por microorganismos (Kader 2007, Fatima y col 2009).

Conociendo cómo ocurren cada uno de los procesos biológicos, fisiológicos y el conocimiento de los factores ambientales que afectan a los productos hortofrutícolas, se pueden establecer estrategias de manejo adecuadas para cada uno y así prolongar la vida de anaquel y reducir las pérdidas de producción y económicas.

### **2.1.2. Calidad postcosecha**

El término calidad tiene muchas acepciones. La palabra “calidad” proviene del latín *qualitas*, que significa atributo, propiedad o naturaleza básica de un objeto (FAO 2017). Sin embargo, en la actualidad y en sentido abstracto su significado es “grado de excelencia o superioridad” (Kader y col 2007). Aceptando esta definición, se puede decir que un producto es de mejor calidad cuando es superior en uno o varios atributos que son valorados objetiva o subjetivamente (FAO 2017). La determinación de calidad en frutas y hortalizas ha ido evolucionando según las exigencias de mercado, en la actualidad las mediciones instrumentales se han preferido a las sensoriales ya que permiten automatización, objetividad y menor variabilidad a la vez el establecimiento de normas estándares entre investigadores, industria y consumidores (CAJAMAR 2014), convirtiéndose en el principal factor de preferencia del consumidor junto con el destino o uso también puede determinar distintos criterios de calidad para un mismo producto.

Las principales variables de calidad utilizadas en postcosecha según los cambios que un producto hortofrutícola pueda experimentar se mencionan: el cambio de color, siendo el cambio más obvio. El color es el más importante, puesto que, si un producto no tuviese una buena presencia colorimétrica, el consumidor no podría llegar nunca a juzgar las otras variables como sabor y textura (CAJAMAR 2014), y muchas veces es utilizado para saber si un fruto está maduro o no (Cruz-Gómez 2015), e indica la degradación de ciertas sustancias como las clorofilas y la síntesis de otras como las xantofilas y antocianinas (amarillos y colores rojos, respectivamente). Otra de las variables que definen la calidad son las medidas morfométricas como el peso, el tamaño, la uniformidad; son características que definen a su vez la geometría de un producto en particular (CAJAMAR 2014). En el caso de pepino, tomate, entre otros; existen pliegos o normativas de calidad donde se

definen numéricamente los valores estándares para el color y el tamaño que son considerados como “calidad suprema” (PC-021-2005). Para el pepino de exportación existen manuales de producción como el “United State Agency International Development April 2007”, “United States Department of Agriculture Cucumbers Shipping Point and Market Inspection Instructions January 1998”, “Guía práctica para la exportación de pepinos a EE. UU” del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Representación del IICA en Nicaragua Managua, Julio del 2007. En México existen manuales donde también se describen los estándares de calidad para el cultivo de pepino como “Proyecto SAGARPA-CONACYT 126183 Inteligencia de mercado de pepino” y “PC-021-2005 Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México Calidad Suprema en pepino”. Cada país tiene su normatividad para la producción y exportación de frutas y hortalizas.

Existe una creciente demanda de calidad superior tanto externa como interna. Los aspectos externos (presentación, apariencia, uniformidad, madurez, frescura) son los componentes principales de la decisión de compra, la que normalmente es tomada por el consumidor. La calidad interna (sabor, aroma, textura, valor nutritivo, ausencia de contaminantes bióticos y abióticos), está vinculado a aspectos generalmente no perceptibles, pero no por ello menos importante para los consumidores (FAO 2017).

## **2.2. Alternativas para el manejo de las enfermedades en postcosecha**

En la actualidad, los productos naturales gozan de gran aceptación, reemplazando el uso de compuestos sintéticos o materiales generados artificialmente (Martínez 2003). El control de hongos fitopatógenos requiere aplicar técnicas alternativas, pues el manejo tradicional con agroquímicos ha ocasionado diversos problemas como la toxicidad a los usuarios (Guerrero-Rodríguez 2007), ya que dichas sustancias persisten en altas concentraciones, tóxicas para el ser humano (Barrera y Bautista 2008).

### 2.2.1. Aceites Esenciales

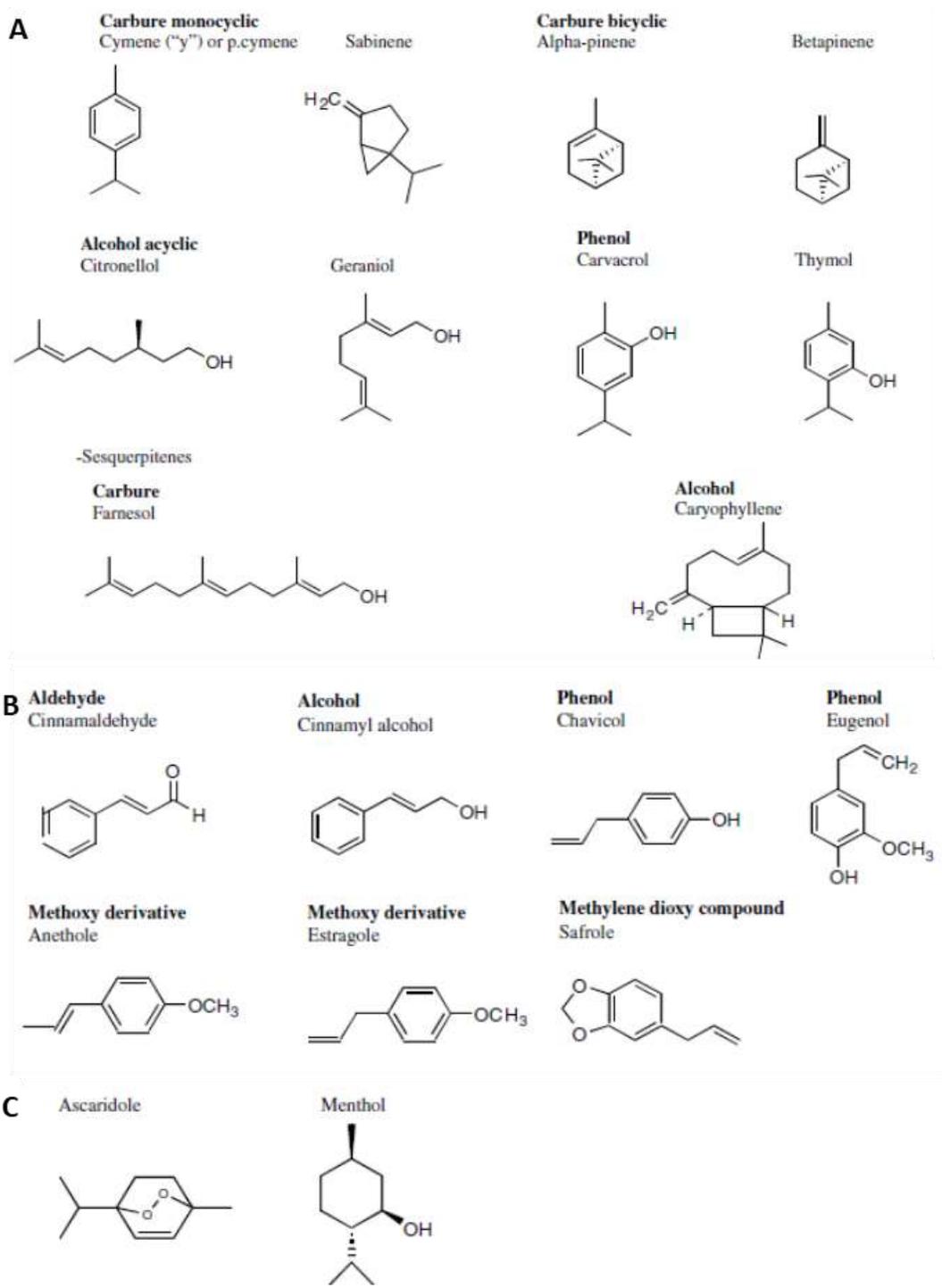
Los aceites esenciales son sustancias responsables del aroma de las plantas y son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Martínez 2003). Otros investigadores, los definen como sustancias odoríferas de naturaleza oleosa, con distribución en toda la planta (hojas, raíces, tallos, flores, frutos). En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados (Martínez 2003).

Debido a sus características químicas los aceites esenciales son compuestos orgánicos producto del metabolismo secundario de las plantas, volátiles y complejos; se encuentran en una mezcla de componentes heterogéneos (Vásquez y col 2001, Bakkali y col 2008, Arya y Perelló 2010, Juárez-Becerra y col 2010); de hasta más de 100 componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos) (Figura 1). Se caracterizan por tener uno o dos componentes mayoritarios, principalmente en altas concentraciones (20-70%), comparado con otros compuestos presentes en concentraciones traza. Generalmente, el compuesto mayoritario es el que determina la propiedad biológica del aceite esencial y a su vez, éstos compuestos pueden tener distinto origen biosintético.

El grupo principal de moléculas que se encuentra dentro de los aceites esenciales son los terpenos y terpenoides, junto con otros compuestos alifáticos y aromáticos, caracterizados todos por su bajo peso molecular. En la Figura 1 podemos observar otras moléculas que se encuentran presentes en los aceites esenciales son carburos (mirceno,  $\beta$ -cimeno), alcoholes (mentol,  $\alpha$ -terpinol), ésteres (propionato), cetonas (germacrona), alcoholes (cinámico), fenoles (eugenol), entre otros (Bakkali y col 2008).

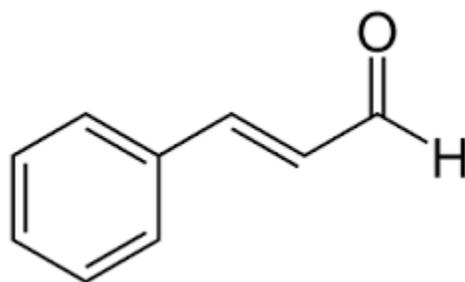
La concentración y característica de cada uno de estos compuestos dependerá de la especie de planta de donde es extraído. El aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) contiene casi en su totalidad un único compuesto, metil-chavicol (cerca del 90%), mientras que otras especies del mismo género como *O. tenuiflorum* presenta una mezcla de compuestos sin que ninguno sea dominante (Oxenham y col 2005).

La función de los aceites esenciales en las plantas es principalmente como mecanismos de defensa contra plagas y patógenos (Oxenham y col 2003), los aceites esenciales han mostrado tener capacidades antimicrobianas y fungicidas (Oxenham y col 2005).



**Figura 1.** Principal grupo de moléculas que se encuentra dentro de los aceites esenciales: A) terpenos; B) compuestos de alifáticos y/o aromáticos; C) Terpenoides. Tomado de: F. Bakkali et al. / Food and Chemical Toxicology 46 (2008) 446–475.

El aceite esencial de la canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.), es rico en cinamaldehído, así como  $\beta$ -cariofileno, linalol y otros terpenos. El cinamaldehído (Figura 2), es el componente principal del aceite de tallo y proporciona el olor y el sabor distintivos asociados con canela. Estudios recientes han demostrado que el aceite esencial de canela es un buen antioxidante y tiene potencial antimicrobiano (Mahdi Ojagh y col 2010).



**Figura 2.** Estructura molecular del cinamaldehído.

Existen reportes en los que se ha utilizado el aceite esencial de canela para evitar la aparición de infecciones microbianas en postcosecha. Barrera y García (2008), evaluaron el efecto antifúngico del aceite esencial de canela sobre de *Fusarium* sp. aislado de *Carica papaya*, reportando que éste aceite disminuyó la tasa de crecimiento, con un efecto dosis-respuesta. En una investigación realizada por Nanasombat y Wimuttigol (2011), sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de especias contra varios microorganismos, reportan que el aceite esencial de canela tiene la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*, además indican que este aceite fue el que mostró una alta actividad antibacteriana y una fuerte capacidad antioxidante. El uso de aceites esenciales ésta de acuerdo con la investigación sobre la reducción del uso de aditivos químicos en la industria alimentaria (Bonilla y col

2012). En otro estudio realizado por Xie y col (2017), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela y el aceite esencial de clavo, sobre dos hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, ya que son los más importantes causantes de pérdidas económicas durante la postcosecha en varios cultivos a nivel mundial, ellos reportan que el efecto antifúngico del aceite esencial de canela fue mayor a medida que la concentración incrementaba y este mismo efecto fue reportado para el cinamaldehído.

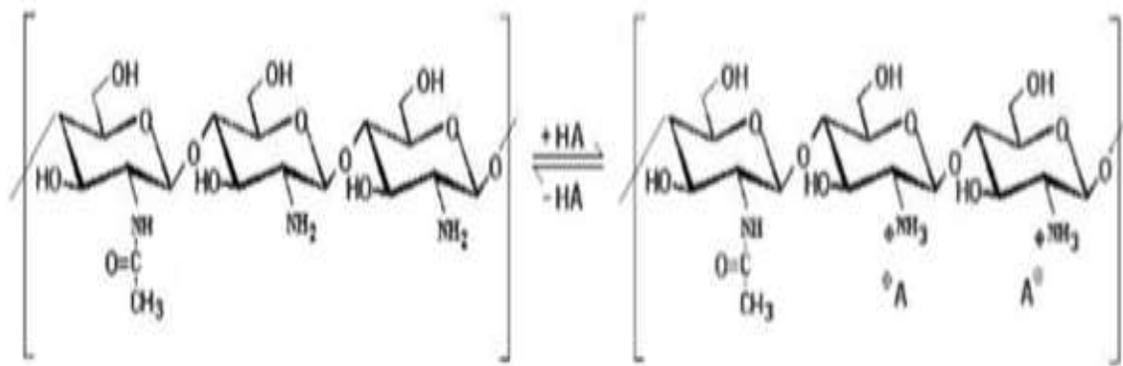
### **2.2.2. Quitosano.**

El quitosano se obtiene del exoesqueleto de los crustáceos mediante la desacetilación parcial de la quitina en un medio alcalino (Ramos-García y col 2012). Es un poliaminiasacárido producido por la N-desacetilación de la quitina, y tiene como propiedades fisicoquímicas la biocompatibilidad, no es tóxico y biodegradable, haciéndolo atractivo para su empleo como recubrimiento comestible en frutas y hortalizas, actuando como una barrera para el oxígeno y previniendo las infecciones por bacterias y hongos, ya que posee actividad antimicrobiana (Macea y col 2015). Comercialmente el uso del quitosano ha abarcado diferentes industrias: médica, farmacéutica, biotecnológica, cosmetóloga, alimentaria y agrícola (Bautista-Baños y col 2005).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves (Macea y col 2015). El carácter policationico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar moléculas (Goycoolea y col 2009), tiene la capacidad de actuar como floculante, humectante y quelante, debido al grupo amino que lo compone, además, atrapa metales pesados presentes en insecticidas y policarborunados (Bautista-Baños y col 2005).

Tiene alto peso molecular y presenta actividad antioxidante. Posee buenas propiedades mecánicas, como la permeabilidad selectiva a gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ), y reducir la permeabilidad al vapor de agua sí se mezcla con lípidos como el ácido oleico, aceite de canola, cera de abeja, aceites esenciales, entre otros (De Ancos y col 2015).

Su actividad fungicida ha sido reportada en varios estudios inhibiendo el crecimiento de los hongos causantes de enfermedades postcosecha, manifestándose en la inhibición del crecimiento micelial y la esporulación, siendo muy efectivo en la inhibición, induciendo quitinasas e interfiriendo con el crecimiento fúngico (Bautista-Baños y col 2006).



**Figura 3. Estructura química del quitosano**

Se ha mencionado que el efecto fungicida del quitosano está en función de la concentración utilizada, el peso molecular y el grado de desacetilación (Bautista-Baños y col 2017). Además, el quitosano, es un compuesto que presenta características biofuncionales, por lo que podría ser una alternativa viable para sustituir los métodos de control tradicionales en

el control de microorganismos, además que puede utilizarse sin problemas para la elaboración de recubrimientos comestibles en frutos y hortalizas (González y col 2005).

### **2.2.3. Recubrimientos a base de Quitosano**

Los recubrimientos comestibles son una capa delgada que se preforma o forma directamente sobre la superficie de los productos vegetales, como una envoltura protectora (Del Valle y col 2005, Bravin y col 2006, Ramos-García y col 2012). Se elaboran a partir de una gran variedad de compuestos como proteínas, polisacáridos y lípidos; ya sean como componentes únicos o combinados con la finalidad de desarrollarlas con mejores propiedades mecánicas. Los recubrimientos a base de polisacáridos han sido los más utilizados para cubrir frutos, y esto es debido a sus propiedades mecánicas de adherencia y flexibilidad en la superficie de los productos hortícolas (Ramos-García y col 2012).

El mecanismo por el cual los recubrimientos conservan la calidad de los frutos es debido a que crean una barrera física a los gases, produciendo una atmósfera modificada dentro del frutos que reducen la disponibilidad de oxígeno e incrementan la concentración de dióxido de carbono, además de que son semi-permeables al vapor de agua (Avena-Bustillos y col 1997, González-Aguilar y col 2005, Ramos-García y col 2012).

El quitosano fue empleado como recubrimiento en frutos de pepino por El-Ghaouth y col (1991), adicionando 0.1 % de tween 80 y se almacenó a dos temperaturas encontrando que el recubrimiento de quitosano redujo la pérdida de peso y con el incremento en la concentración, se redujo la tasa de respiración, la pérdida de color y el marchitamiento e infecciones por hongos. La combinación de constituyentes hidrofílicos y algunos lípidos pueden optimizar las características de los recubrimientos, principalmente apuntando a reducir la permeabilidad del vapor de agua (Bonilla y col 2012).

El uso de recubrimientos se presenta como un método exitoso para la conservación de frutas, debido a que ayudan a extender la vida útil de los productos. Estos pueden ser a

base de ceras y/o cubiertas plásticas, puesto que son una barrera selectiva a la difusión de gases, vapor de agua y otros solutos previniendo la pérdida de agua, disminuyendo la tasa de respiración y retardando la maduración (Barrera-Bello y col 2012). El quitosano tiene la propiedad de formar recubrimientos (Bonilla col 2012), haciéndolo interesante para su uso como un material biodegradable activo, y para mejorar la estabilidad de los alimentos perecederos (Hromiš y col 2015). Anteriormente, se ha utilizado el quitosano para la elaboración de recubrimientos en diferentes cultivos en la etapa de postcosecha.

Los recubrimientos se pueden utilizar como vehículos de aditivos como los aceites esenciales, los cuales pueden proporcionar al producto vegetal funciones más específicas como una actividad antimicrobiana, evitando o reduciendo el crecimiento de microorganismos en su superficie (Rodríguez y col 2005). Mantener la textura, incorporar nutrientes e ingredientes bioactivos capaces de mejorar el valor nutricional y funcional del alimento vegetal (De Ancos y col 2015).

Los aditivos naturales con propiedades antimicrobianas que ha sido empleados en la protección de la calidad en postcosecha durante los últimos años son: enzimas como las lactoperoxidasas (leche) y lisozimas (clara de huevo); bacteriocinas como la nisina, ácidos orgánicos (ácido ascórbico, cítrico, oxálico), aceites esenciales y compuestos fenólicos (plantas y especias) (De Ancos y col 2015). También se han incorporado aditivos antipardeamiento, sales que mejoran la textura del recubrimiento. También se ha observado un creciente interés en añadir a estos recubrimientos ingredientes funcionales como vitamina E o C, minerales, ácidos grasos, probióticos, con el fin de incrementar las propiedades beneficiosas para la salud de los alimentos (Rojas-Grau y col citado en De Ancos y col 2015).

Como ya se ha dicho antes, una alternativa potencialmente viable para la conservación de frutas y vegetales frescos es la utilización de recubrimientos comestibles multicomponentes,

los cuales pueden elaborarse con ingredientes básicos adecuados al producto para brindarle la protección de barrera deseada además de que sirvan como vehículos para aditivos específicos que refuercen la funcionalidad como agentes antioxidantes, colorantes, antimicrobianos, que en el caso de estos últimos evitarán el crecimiento de microorganismos patógenos en la superficie de los productos vegetales (Nussinovitch y Lurie 1995, Cagri y col 2004, Martín y col 2005, Ramos-García y col 2010).

El quitosano tiene la habilidad de formar recubrimientos comestibles de alta calidad, sin embargo, en muchos casos su uso se ha visto limitado por la baja solubilidad que tiene en soluciones acuosa a pH neutro (Ge y Luo 2005, Zhang 2015). Pero en la actualidad, esto se ha resuelto, por la incorporación de compuestos que mejoran la solubilidad del quitosano en agua, como son los aceites esenciales y el tween, y se ha observado, que se requiere de pequeñas aplicaciones para que sus atributos de calidad no se vean afectados (Miny y Krochta 2005). Dentro de estos agentes antimicrobianos incorporados a los recubrimientos en vegetales pueden considerarse a los aceites esenciales (Ramos-García y col 2010). En el 2010, Mahdi-Ojagh y col, elaboraron una cubierta de quitosano (1 % p/v), con aceite esencial de canela (0.4; 0.8; 1.5 y 2 %), y 0.2 % v/v de Tween 80, en donde evaluaron la actividad antimicrobiana, propiedades físicas y mecánicas. La incorporación de AEC en películas de quitosano aumentó la actividad antimicrobiana, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua y elongación a la rotura de las películas. Por su parte, Zahid y col (2012), demostraron que al mezclar el quitosano con aceite esencial de canela se incrementa su capacidad antimicrobiana y antioxidante. En 2015, Xing y col. elaboraron un recubrimiento de quitosano 1 % y 0.1 % aceite esencial de canela sobre frutos de *Ziziphus jujuba* y observaron que después de los 60 días de almacenamiento de los frutos, se redujo la pérdida de peso y el deterioro, manteniendo su calidad sensorial

En la actualidad, se está incrementando el uso de los recubrimientos, más amigables con el medio ambiente y la salud humana. La incorporación de aceites esenciales en recubrimientos de quitosano no sólo puede mejorar el poder antimicrobiano y antioxidante, también reducen la permeabilidad al vapor de agua y los lípidos reducen la oxidación del producto sobre el que se aplica la película (Gordon y Raneva 1999, Mahdi Ojagh y col 2010). Sin embargo, la capacidad de polimerización y las propiedades mecánicas de los recubrimientos se pueden ver afectadas por la incorporación de alguno de estos elementos, por lo que cada combinación de recubrimiento debe ser estudiada por separado y estandarizado para cada grupo de alimentos (Silva-Weiss y col 2013).

#### **2.2.4. Nanotecnología y Nanopartículas de Quitosano.**

La Nanotecnología es una ciencia relativamente nueva, aplicada a muchos campos de investigación. Consiste en el estudio, análisis, estructuración, formación, diseño y operación de materiales a escalas nanométricas. La nanotecnología ha sido en los últimos 20 años un complemento importante de la evolución de la ciencia. El prefijo *nano* en la palabra nanotecnología significa un “billón” ( $1 \times 10^{-9}$ ). En esta ciencia parte de las estructuras de la materia tienen dimensiones del orden de un billón de partes de un metro. La importancia de la nanotecnología radica en que en mundo nanométrico los materiales pueden adquirir o realzar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica (Mendoza y Rodríguez 2006).

En la actualidad, las líneas de investigación se dirigen a la formación de matrices poliméricas e incorporación de nutrientes o ingredientes bioactivos mediante el empleo de nanotecnologías como la microencapsulación, la formación de nano películas o recubrimientos nanoestructurados mediante el sistema multicapas (De Ancos y col 2015).

En la última década, diferentes tipos de nanopartículas han sido empleadas para la liberación de medicamentos y estos sistemas también pueden ser empleados en la

agricultura para la aplicación de plaguicidas y fungicidas en el campo, ya que estos compuestos estarían dentro de la matriz polimérica y se maximizaría su efecto a bajas concentraciones.

El alginato y el quitosano han sido los polisacáridos más usados para la preparación de nanopartículas y resultan interesantes, debido a que son polisacáridos biodegradables y biocompatibles; y su preparación se realiza en medio acuoso, de este modo se evita el uso de solventes orgánicos que impactan el ambiente (Abreu y col 2012).

Las nanopartículas de quitosano y alginato tienen rangos hidrodinámicos de 400 nm y han sido empleadas para encapsular agentes anticancerígenos en el colon (Laroui y col 2010 citado en Abreu y col 2012).

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo '*bottom-up*' o de abajo hacia arriba: técnica en la que los materiales nanoestructurados se producen a partir de "nanobloques" de átomos o moléculas (Mendoza y Rodríguez 2006), como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente (Goycoolea y col 2009).

#### **2.2.5. Recubrimientos a base de quitosano nanoestructurado**

En años recientes, el quitosano ha recibido un gran interés en la encapsulación de compuestos activos debido al estatus general de reconocimiento como seguros GRAS (*Generally Recognized As Safe*, por sus siglas en inglés: generalmente reconocido como seguro), es biocompatible y tiene una excelente biodegradabilidad (Keawchaon y Yoksan 2011, Mohammadi y col 2015). Además de las propiedades antes mencionadas, las nanopartículas de quitosano han mostrado la capacidad de cargar y entregar compuestos como drogas lipofílicas (medicamentos), compuestos polifenólicos, y vitaminas (Agnihotri y col 2004).

La cantidad efectiva de quitosano usada para recubrir frutas puede disminuir cuantiosamente, ya que la penetración y absorción de quitosano aumenta considerablemente en forma de nanoemulsión o nanopartículas (Zahid y col 2012).

Las nanopartículas de quitosano tienen diferentes beneficios potenciales con respecto al quitosano convencional (recubrimientos), ya que mejoran las propiedades funcionales como resultado de su mayor superficie de contacto, son más reactivas y aumentan el área relativa de la masa (Sotelo-Boyas 2016). Se considera que las nanopartículas tienen una mayor actividad antimicrobiana y propiedades de barrera. Los recubrimientos nanoestructurados mejoran significativamente la vida de anaquel y preserva los componentes bioactivos en frutos, según lo expresa Eshghi y col (2014).

En un trabajo reportado por Sahraei Khosh y col (2016), evaluaron el efecto del recubrimiento basado en quitosano nanoestructurado sobre la calidad y la vida de almacenamiento de manzana cv. Golab Kohanz. Los resultados mostraron que el recubrimiento reduce significativamente la pérdida de peso, la tasa de respiración, la producción de etileno y la actividad peroxidasa en las muestras en comparación con el control. El recubrimiento de quitosano nanoestructurado aumentó significativamente la calidad y evitó la pérdida de peso en los frutos durante el almacenamiento. Estos hallazgos confirmaron los beneficios del uso de recubrimientos a base de quitosano nanoestructurado, capaz de extender la vida útil y mantener la calidad de las manzanas. En la actualidad, las películas y revestimientos comestibles de quitosano han mostrado ser gran promesa para su aplicación en la conservación de alimentos y también son sistemas prometedores para ser utilizados como portadores de aceites esenciales, con la finalidad de incrementar la vida de anaquel de los frutos y hortalizas (Yuan y col 2016).

Los aceites esenciales han recibido mucha atención por tener actividad biológica potencial. Muchos, como clavo, orégano, tomillo, nuez moscada, albahaca, mostaza o canela, han sido clasificados como GRAS por la USFDA (*United States Food and Drugs Administration*) (Manso y col 2014), y están ganando popularidad debido su volatilidad que facilita el uso de pequeñas concentraciones que son seguras para el consumo. Estos atributos potenciales y una creciente demanda de las opciones de aditivos alimentarios han llevado a un interés en el uso de los aceites esenciales como potenciales antimicrobianos alternativos (Sivakumar y Bautista-Baños 2014).

En la mayoría de los casos, el quitosano se ha utilizado como un material de pared para envolver los compuestos activos, ya que este polisacárido catiónico puede unirse con otras sustancias que tienen cargas negativas múltiples, ha sido utilizado como un material encapsulante (envolvente) externo para una variedad de fármacos, vitaminas, proteínas, nutrientes y compuestos fenólicos (Lee 2008), debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para formar películas, geles, perlas y partículas. Sin embargo, no hay informes sobre el efecto de la encapsulación de aceites esenciales y la incorporación de estas nanopartículas en recubrimientos comestibles nanoestructurados (Woranuch y Yoksan 2013), tal cual como los que se emplean en este trabajo de investigación. En los últimos años, los aceites esenciales también han sido ampliamente estudiados como aditivos en películas comestibles y recubrimientos. La adición del aceite esencial de canela usando nanopartículas de quitosano aún no han sido muy estudiados (Mohammadi y col 2015). Por lo que es novedoso realizar experimentos con este tipo de recubrimiento en hortalizas de exportación que permitan mantener la calidad durante el almacenamiento. En un estudio realizado por Mohammadi y col (2016), elaboraron un recubrimiento de nanopartículas de quitosano, encapsulando aceite esencial de *Zataria*

*multiflora* y lo aplicaron sobre frutos de pepino que fueron almacenados durante 21 días a 10 °C y encontraron que la encapsulación del aceite esencial dentro de nanopartículas dio protección a los compuestos bioactivos sensibles, permitió aumentar la bioactividad de los compuestos y en condiciones ambientales prolongan la vida de anaquel del pepino protegiendo compuestos con propiedades antioxidantes. Sin embargo, la calidad y la apariencia de los frutos al final del almacenamiento, era baja, es decir, eran frutos que ya no podían ser comercializados.

### **2.3. Cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.)**

El pepino (*Cucumis sativus* L.), pertenece a la familia *Cucurbitaceae*. Esta familia está ampliamente distribuida en los trópicos y climas templados del sur, sureste y este de Asia, África incluyendo Madagascar y América Central (Rahman y col 2006). Es originario de la India y ha sido cultivado desde la antigüedad en Asia y Europa, se dice que fue traído a América por Cristóbal Colón. Este cultivo prospera en los climas tropicales y subtropicales, pero también se ha convertido en un cultivo de importancia en la zona templada gracias al uso de invernaderos (Snowdon 1991).

El pepino, cuya parte comestible es un fruto inmaduro, tiene mucha demanda en todo el mundo, por sus cualidades refrescantes, debido a que el mayor porcentaje en su composición es agua. Dentro de la familia de las cucurbitáceas, ocupa el cuarto lugar en importancia por la superficie sembrada (CONABIO 2014). Al ser una planta anual y cultivada, esta especie presenta variantes en tiempo para la aparición de flores y frutos, lo cual también depende de la variedad. En México, generalmente florecen de julio a septiembre y de enero a marzo y fructifican, de agosto a noviembre y febrero a mayo respectivamente (CONABIO 2014).

En Sinaloa, en el 2009, se sembraron cerca de 3000 hectáreas de pepino, de las cuales se obtuvieron aproximadamente 170,000 toneladas que generaron alrededor de 350 millones de pesos por su comercialización (SIAP, 2009; Yáñez-Juárez, 2012). Para el 2009, México ocupaba el tercer lugar a nivel mundial como exportador (FAO, 2009; Moreno-Velázquez y col., 2013). El cultivo se ha consolidado en México como una de las hortalizas que más se exporta a Estados Unidos durante el periodo invernal (Ríos-Herrera y col., 2014). Este fruto en México se comercializa tanto a nivel nacional como internacional, generando aproximadamente unas 700 mil toneladas al año y actualmente ocupa el octavo lugar a nivel mundial con el 0.98 % de la producción global. Los principales estados productores son Sinaloa, Michoacán, Baja California Sur, Morelos y Veracruz; y del total de la producción de estos estados se exporta el 83 % a Estados Unidos y Canadá. Según datos de la SAGARPA (2015), la producción pepino en promedio es mayor en el ciclo otoño - invierno con 68 % del total de la producción, mientras que el restante 32 % se genera en primavera – verano, donde seis estados producen 81 % de la producción nacional entre los que destacan: Sonora con 38 % y Michoacán 18 %. El pepino se produce todo el año, pero en los meses de febrero, marzo y abril, se genera el 44 % de la producción nacional anual. Debido a la importancia económica y la demanda de frutos de pepino de buena calidad tanto para el consumo interno como para la exportación, se escogió este cultivo como modelo de estudio además de que son muy pocos los estudios realizados sobre el desarrollo de recubrimientos para este fruto que sean biodegradables y no contaminantes. Generalmente, el pepino se almacena por menos de 14 días debido a que pierde su calidad visual y sensorial rápidamente. Después de dos semanas pueden incrementar las pudriciones, el amarillamiento y la deshidratación, especialmente después de que los frutos son transferidos a condiciones normales de venta. El principal problema postcosecha del

pepino es la pérdida de turgencia, causada por la pérdida de agua a través de la transpiración y respiración del fruto; en consecuencia, ocurre marchitamiento y pérdida de consistencia del fruto (Walter y col 1990, Muy-Rangel y col 2004). La degradación de clorofilas y la síntesis de xantofilas afectan la calidad del fruto en postcosecha (Suslow y Cantwell, 2013), ya que estos pierden el color verde volviéndose amarillos. Para reducir estos problemas, los productores enceran con productos naturales o cubren con plásticos los frutos durante el proceso de selección, posterior al lavado y secado (Muy-Rangel y col 2004).

La calidad del pepino está principalmente representada por la uniformidad, la firmeza, el color verde oscuro, tamaño y ausencia de defectos de crecimiento o manejo, así como la ausencia de pudriciones y amarillamientos (Barraza-Álvarez, 2015). El manejo postcosecha de este cultivo, coadyuva en el mantenimiento de la calidad del producto hasta el consumidor final; dentro de los principales problemas postcosecha se encuentran la pérdida de turgencia, cambios de color y otros cambios fisicoquímicos que demeritan la apariencia y calidad final. La velocidad de deterioro del fruto presenta un comportamiento diferente de acuerdo a las condiciones de almacenamiento (Moreno-Velásquez y col 2013).

Dentro de las tecnologías usadas para conservar la calidad del pepino, está el almacenamiento en frío, debido a que reduce la tasa de respiración y otros procesos metabólicos y extender su vida de anaquel (Zhang y col 2015), sin embargo, el pepino por ser una fruta tropical, cuando se almacena a temperaturas inferiores a los 10 °C, este se vuelve susceptible al daño por frío generando cambios en la superficie del fruto (picado o *pitting*, en inglés), de consistencia acuosa y oscura, aumentando la velocidad de deterioro. Es un daño, acumulativo que puede iniciarse desde el campo hasta las cadenas en frío que

se usan para su almacenamiento y transporte (Kader 2007, Zhang 2015), y dependerá principalmente, de las variedades (Suslow y Cantewell 2013).

Los pepinos se cosechan en diferentes estados de desarrollo, siendo el periodo de la floración y la cosecha entre 55 y 60 días (Madurez de consumo), dependiendo del cultivar y de la temperatura. Por lo general, los frutos se cosechan en un estado ligeramente inmaduro, próximos a su tamaño final, pero antes de que las semillas completen su crecimiento y se endurezcan (Madurez comercial). Como ya se explicó antes, la firmeza junto con el brillo externo, son indicadores del estado pre-maduro deseado (Suslow y Cantewell 2013). El pepino es un fruto no climatérico (Barraza-Álvarez 2015), es decir, son frutos que maduran gradual y constantemente, sin mostrar un aumento significativo de la actividad respiratoria ni de la producción de etileno al inicio de la maduración. Sin embargo, éstos se ven afectados cuando la temperatura de almacenamiento es superior a los 10 °C, debido a las diferencias en madurez o desarrollo. Teniendo los pepinos menos maduros una mayor tasa de respiración, haciéndolos susceptibles a la presencia de etileno en el ambiente, acelerando el amarillamiento y la pudrición durante su distribución y almacenamiento a corto plazo (Suslow y Cantewell 2013).

#### **2.4. Caracterización e identificación de patógenos postcosecha**

El deterioro causado por infecciones microbianas, especialmente por microorganismos que crecen en la superficie de frutas y verduras, son la causa principal de la reducción en la vida de anaquel (Jay y col 2005). Las enfermedades en postcosecha destruyen entre el 10 y 30 % de rendimiento total de los cultivos (Agrios 2005, Kader 2007). Las frutas y verduras son altamente perecederas, la calidad se ve afectada por la manipulación, el transporte, el almacenamiento y su venta (Fatima y col 2009). Estas se encuentran expuestas a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha.

El éxito en diagnóstico de una enfermedad depende de la identificación oportuna y correcta. Cuando no se define a tiempo y correctamente el agente causal de un problema fitosanitario, se pierde tiempo en su manejo y se aumentan los costos de producción en los cultivos (Toma, Conservación y Envío de Muestras Pecuarias y Agrícolas al Centro de Diagnóstico; 2009). El lograr una identificación exitosa depende de varios factores, que deben ser considerados desde el momento mismo de la planeación para la búsqueda de la muestra para procesar. El muestreo, aunque no lo parezca, es fundamental en la identificación y caracterización de un agente etiológico. Se deben tomar datos precisos en cuanto a las condiciones de almacenamiento, de donde provienen las muestras, si en campo se observó alguna enfermedad, historial de cultivos previos, aplicación de insecticidas, fungicidas, etc. Para finalmente, realizar una correlación de estos datos con la bibliografía pertinente. Todos esto, nos llevan a seguir método de aislamiento e identificación precisos y adecuados para cada patógeno, tomando en cuenta los signos y síntomas observados en el producto hortofrutícola y la correcta descripción de sus características morfológicas bajo el microscopio y así, poder determinar el género o la especie, mediante claves taxonómicas generales o específicas para los principales grupos de hongos en postcosecha.

Conocer esta información nos permite determinar cuál es el medio de cultivo idóneo para su cultivo, temperatura de incubación, etc. Así como los procedimientos para el aislamiento del ADN (micelio fresco, liofilización, congelamiento). Para obtener un análisis molecular adecuado, el aislamiento debe ser realizado con precisión y exhaustividad. Esto quiere decir, que se deben seguir pasos minuciosos para evitar falsos positivos, mezclas de ADN (lo que lleva a errores en la lectura de las secuencias), por contaminación de los cultivos.

Los hongos son los más importantes y patógenos prevalentes, infectando una amplia gama de plantas hospedantes y causando efectos destructivos y pérdidas económicamente

importantes de la mayoría de las frutas y verduras frescas durante el almacenamiento y transporte (Sommer 1985 citado en Fatima y col 2009). Por lo que las necesidades futuras en cuanto a la producción de alimentos deben estar inclinada hacia la reducción la reducción de las pérdidas postcosecha, principalmente por infecciones causadas por hongos.

#### **2.4.1. Enfermedades fúngicas de pepino**

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causante de enfermedades pre y postcosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo éstos responsables de grandes pérdidas económicas (Juárez-Becerra y col., 2010); el daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios 2005).

Las enfermedades más comunes en postcosecha en el cultivo de pepino que son causadas por hongos fitopatógenos como *Phytium* sp. (pudrición algodonosa), *Didymella bryoniae* (pudrición negra), *Alternaria cucumerina* (pudrición por alternaria), *Glomerella lagenaria* (antracnosis), las pudriciones causadas por varias especies de *Fusarium* spp., entre otros *Aspergillus niger* (pudrición mohosa negra) y pudriciones blandas causadas por varias especies de bacterias (Snowdon 1991). Sin embargo, se han reportado muchas más especies de hongos que provocan enfermedades en precosecha y debido a su ciclo biológico pueden causar daños en postcosecha provocando pérdidas en la calidad de los frutos en almacenamiento y traslado.

## **2.4.2. Enfermedades pre y postcosecha**

### **2.4.2.1. Pudrición algodonosa (*Phythium sp.*)**

La pudrición algodonosa generalmente aparece en porciones de frutos que se encuentran en contacto con el suelo, se observan pequeños puntos húmedos que se expanden rápidamente, hasta formar un tejido necrótico y blando. El micelio es de color blanco y profuso. Este hongo se encuentra con una mayor incidencia en áreas podridas de la planta y cuando la humedad es alta (Shankar y col 2014).

Varias especies de *Phythium*, se han implicado en esta enfermedad. Estos patógenos del suelo pueden pasar el invierno como esporas en estado de latencia en los residuos del suelo de muchos cultivos o en malas hierbas. La infección ocurre a través heridas o donde la fruta toca el suelo húmedo. *Phythium* spp. se disemina fácilmente a través del agua y las partículas del suelo, siendo favorecido por las condiciones de humedad y por la debilidad de las plantas (Shankar y col 2014).

### **2.4.2.2. Pudrición negra (*Didymella bryoniae*)**

Es un hongo cosmopolita y se encuentra restringido exclusivamente en las cucurbitáceas. Cuando la infección ocurre en los tallos y se incrementa la severidad las plantas se marchitan y mueren (Godoy-Angulo y col 2010). Los síntomas en los tallos consisten en lesiones ennegrecidas que pueden agrietarse y producir gomosis de color ámbar. Los síntomas en las hojas consisten en bronceado de los márgenes y algunos se pueden tener lesiones en forma de “V”, y a menudo con un halo amarillo, pero finalmente se secan, bajo ciertas condiciones puede observarse una defoliación generalizada de las plantas. Típicamente, los síntomas más severos se dan en la última parte del ciclo del cultivo (Shankar y col 2014). Inicialmente aparecen pequeñas manchas en la superficie de los

frutos que posteriormente se desarrolla en una pudrición apical que puede avanzar hacia todo el fruto, disminuyendo considerablemente la producción. Sobre el fruto desarrolla gran cantidad de picnidios, los cuales son hialinos inmersos en una matriz gelatinosa transparente (Godoy-Angulo y col 2010).

El hongo *Didymella bryoniae* ha sido reportado como *Mycosphaerella melonis*, *Mycosphaerella citrullina*, *Didymella melonis*. Es considerado como un saprófito facultativo (Godoy-Angulo y col 2010). El tizón gomoso del tallo se desarrolla en condiciones de alta humedad y pequeñas cantidades de agua libre sobre la superficie de las de las hojas (5 °C a 35 °C), siendo el óptimo entre 24 °C a 25 °C en octubre (Shankar y col 2014). Su dispersión se da por salpicaduras y a través del viento, por insectos vectores como coleópteros de las especies *Diabrotica undecimpunctata* y *Acalymma vittatum*, los cuales causan heridas durante su alimentación facilitando la infección por el hongo (Godoy-Angulo y col 2010).

#### **2.4.2.3. Antracnosis (*Glomerella lagenaria* o *Colletotrichum orbiculare*)**

La infección se caracteriza por manchas foliares y los síntomas iniciales observados en campos cuando las partes aéreas son empapadas por agua y luego se convierten en pequeñas manchas amarillentas y circulares. Las lesiones pueden expandirse, cambian a marrón y ocupan la mitad de las hojas. Cuando los tallos y los pecíolos son infectados, los signos de la enfermedad se inician como lesiones alargadas, ovalada o de forma de diamante de color marrón claro, que al avanzar la infección se cubren de esporas color rosa claro. Bajo condiciones de alta humedad los canchales forman un cinturón en los tallos causando marchitez en las partes aéreas de las plantas. Los frutos se encuentran infectados desde la floración, y los signos de la enfermedad sobre estos se inician como manchas circulares, hidratadas hasta convertirse en lesiones hundidas de color marrón

(Shankar y col 2014). El hongo sobrevive entre las estaciones en las semillas de cucurbitáceas y en los restos de plantas en el suelo, que sirven como inóculo principal cuando es sembrada la semilla. Las condiciones óptimas de temperatura para que la infección es el intervalo de 22 - 27 °C y una humedad relativa del 100 %. Los síntomas de la enfermedad en las plantas aparecen alrededor del cuarto días después de la infección (Shankar y col 2014).

#### **2.4.2.4. Pudriciones causadas por varias especies de *Fusarium* spp.**

En las cucurbitáceas se producen tres tipos de enfermedades producidas por hongos del género *Fusarium*, las que se reconocen con los nombres de “fusariosis vasculares”, “pudrición de los frutos por fusariosis” (enfermedad de transporte y almacenamiento), y “pudrición del pie por fusariosis” (Busto-Concepción y col 2005). La “fusariosis vascular” tiene como agente causal a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumeris*. Schlecht y “pudrición del pie por fusariosis”, tiene como agente causal a *Fusarium solani* var. *cucurbitae*.

Las especies de estos hongos causan infecciones en cualquier estado de crecimiento de la planta, incluso en postcosecha. La infección del hipocótilo puede darse pre y post-emergencia en plantas jóvenes, causando “dapping-off” junto con *Rhizoctonia solani*. La infección en plantas viejas puede causar amarillamiento de las hojas más viejas, retraso en el crecimiento o marchitez, y cuando ésta ocurre, la muerte de la planta se da entre 3 y 5 días. Estos hongos afectan el sistema vascular de las plantas infectadas y no muestran síntomas notorios hasta que comienzan a aparecer en el fruto. Luego de que las plantas mueren, por lo general, éstas se cubren de micelio blanco en la superficie de la planta. No se han observado pudriciones de la raíz (Shankar y col 2014).

Dado que es un patógeno del suelo, las plantas con síntomas se producen en grupos que corresponden a la distribución del inóculo en el suelo. La marchitez por *Fusarium* spp., es generalmente más severa en suelos ligeros y ligeramente ácidos, y cuando las temperaturas están entre 25 °C y 27 °C, y temperaturas superiores a este intervalo, parecen impedir la infección, que a menudo resulta en plantas con hojas cloróticas y atrofiadas, pero sin marchitez. Sin embargo, las plantas infectadas a comienzos de la temporada muestran síntomas más severos, a medida que la temperatura aumenta, se incrementa la demanda de agua y la transpiración de la planta (Shankar y col 2014). Se trata de una infección sistémica.

#### **2.4.2.5. Podredumbre azul (*Penicillium oxalicum*)**

La podredumbre azul es una enfermedad que se inicia en invernadero y ataca principalmente el tallo, más específicamente en los nudos. Inicialmente éstos se vuelven acuosos y translúcidos, especialmente si estos han sido podados. En un par de días la lesión se convierte en un cancro marrón pálido y sobre de este se observan las esporas de color azul-grisáceo a azul-verdoso, con aspecto polvoriento haciendo al tallo más débil y en el interior se encuentra creciendo el hongo, haciendo que, al cabo de 4 o 5 días, la parte superior de la planta se marchite y muera. Las esporas se esparcen mediante el viento, las herramientas de poda infectando las zonas recién podadas y por medio de heridas en los frutos, en especial cuando la humedad relativa es alta (Shankar y col 2014). Este tipo de infección es más frecuente en cultivos con alto contenido de nitrógeno. *Penicillium oxalicum* ha sido reportado como uno de los hongos del género *Penicillium* asociado a las raíces en diferentes sustratos en donde es cultivado el pepino (Menzies y col 2005), además fue la primera enfermedad reportada en invernaderos (Jarvis y col 1989).

### **2.4.3. Enfermedades postcosecha**

#### **2.4.3.1. Pudrición por *Alternaria cucumerina***

*Alternaria cucumerina*, pertenece a la división *Eucomycota*, clase *Deuteromycetes* (*Hyphomycetes*). La infección en la fruta comienza como manchas circulares a ovales, convirtiéndose luego en lesiones hundidas de color marrón profundas en el fruto. La infección también puede comenzar al germinar la flor en la fruta entera, eventualmente se vuelve marrón y el fruto se encoge. Afecta primero la piel oscureciendo el tejido, pero bajo condiciones de alta humedad, son rápidamente cubiertas por un moho oscuro y abundantes esporas de color gris o verde oliva a negro (Snowdon 1991). El micelio es de apariencia polvoriento cuando el hongo esporula. (Shankar y col 2014).

La infección por *A. cucumerina* se favorece en los períodos de clima cálido y húmedo, especialmente, en los períodos donde la humedad foliar permite a las esporas germinar y penetrar la cutícula de la hoja. El intervalo de temperatura óptimo para su desarrollo es de 21 – 32 °C, con un tiempo de germinación de 18 horas, dependiendo de la humedad (80 - 95 % HR). Tanto las plantas jóvenes como plantas viejas son más susceptibles y también aquellas que se encuentran debilitadas por la mala nutrición y condiciones adversas de crecimiento. El hongo sobrevive el invierno y luego de la cosecha, como micelio y esporas sobre el material vegetal y puede ser diseminado por las corrientes de aire (Shankar y col 2014). El tizón foliar causado por *A. cucumerina* puede causar la defoliación y exponiendo a los frutos al sol, generando debilitamiento que los predisponen al ataque de otras especies de *Alternaria*. De forma similar, los frutos que son almacenados por largos periodos o bajas temperaturas, con el consecuente daño por frío, los predispone principalmente a la pudrición por *Alternaria*, a sufrir varias lesiones en las aberturas naturales (Snowdon 1991).

#### **2.4.3.2. Podredumbre negra (*Aspergillus niger*)**

*Aspergillus niger* es un hongo filamentoso que se encuentra comúnmente como saprófito en las hojas muertas, en granos almacenados, pilas de compostas y vegetales en descomposición (Li y col 2008). Es muy común encontrarlo contaminando alimentos y también es considerado un patógeno importante de postcosecha en diferentes cultivos como cacahuete, cebolla, uva, mango, tomate, papaya, limón, naranja dulce y pepino (Naureen y col., 2009). También ha sido reportado como una patógeno importante en humanos ya que causa infecciones pulmonares y de la piel (Abarca 2000).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

Formular recubrimientos a base de quitosano nanoestructurado para evaluar su efecto sobre los parámetros de calidad y las enfermedades causadas por hongos sobre frutos de pepino (*Cucumis sativus* L.) en postcosecha.

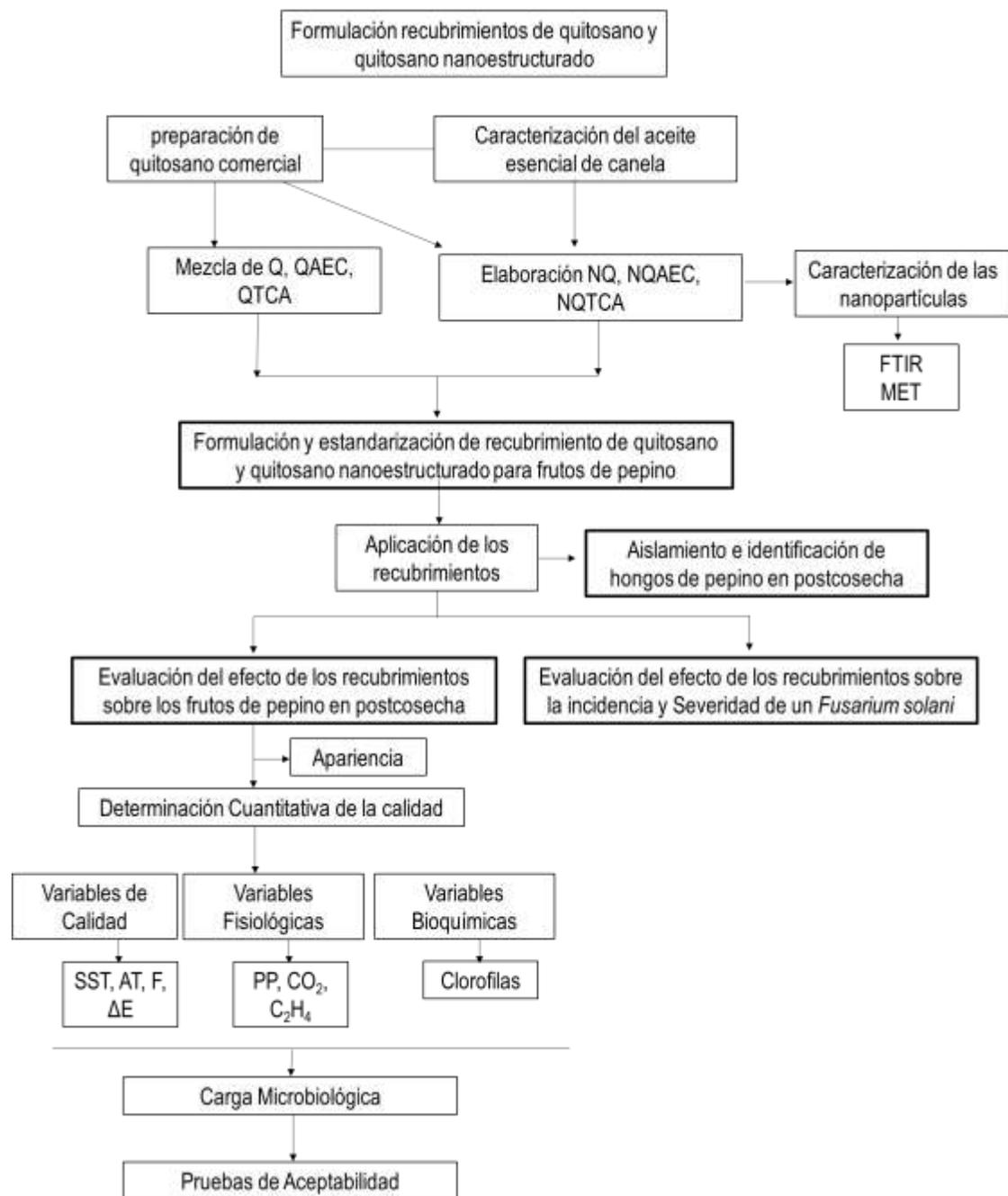
#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Elaborar y evaluar recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado mezclados con aceite esencial de canela y trans-cinamaldehído.
- Evaluar el efecto de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado sobre los parámetros de calidad postcosecha en frutos de pepino.
- Aislar y caracterizar los hongos responsables de enfermedades en postcosecha de frutos de pepino.
- Analizar el efecto de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado mezclados con aceite esencial de canela y trans-cinamaldehído, sobre la incidencia y severidad de un hongo en postcosecha.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Esquema general**

Para cumplir los objetivos de este trabajo se llevaron a cabo los pasos que se describen en la Figura 4. Se inició con la estandarización de una fórmula de recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado adecuado para los frutos de pepino. Se realizaron varias pruebas de ajuste en cuanto a la concentración de los componentes del recubrimiento, esto debido a que el exocarpo del pepino es muy ceroso e hidrófobo, causando que el quitosano no se adhiera adecuadamente sobre el fruto. Una vez estandarizado los recubrimientos, se aplicaron los tratamientos en los frutos y se evaluó la calidad postcosecha determinando cuantitativamente las variables de calidad, las variables fisiológicas más importantes en la postcosecha, una variable bioquímica y el efecto de los recubrimientos sobre el componente microbiológico. Además, se valoró cómo estos recubrimientos afectaban la apariencia en general de los frutos y fueron sometidos al análisis de jueces para que indicaran su apreciación en cuanto al color, el aroma y la apariencia en general dando una puntuación en una escala hedónica. Otra de las actividades llevadas a cabo en la evaluación de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado fue, evaluar el efecto de estos sobre la incidencia y severidad de un patógeno postcosecha de pepino. Para ello se inició con el aislamiento de hongos en frutos. Posteriormente, se realizó la clasificación morfológica de los mismos, se evaluó su patogenicidad a través de los postulados de Koch y se escogieron aquellos hongos que fueron positivos en las pruebas de patogenicidad a partir de las cuales, se elaboró una escala de severidad; y, por último, se realizó la caracterización e identificación de estos aislados. Se escogió el aislado que resultó más patogénico para ser utilizado en la evaluación del efecto de los recubrimientos mediante la determinación de la incidencia y la severidad.



**Figura 4.** Esquema general de la metodología empleada.

## **4.2. Caracterización del aceite esencial de canela por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM)**

La detección de compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, USA) acoplado a un detector de masas EVOQ triple cuadrupolo (TC), y un muestreador PAL-COMBI xt (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA). El sistema se operó con el software MS Workstation 8.2 (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA). Se usó una columna BR-1mx capillary (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA), con una longitud de 30 metros, un diámetro de 0.25 mm y un espesor de 0.25  $\mu\text{m}$ . El inyector se mantuvo en modo sin división a 250 °C y el colector a 230 °C. El horno se mantuvo a 40 °C por 20 min, calentándose a una velocidad de 8 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta llegar a 250 °C. Los muestreos del espacio de cabeza se hicieron a 36 °C durante 20 min. La identificación de los compuestos volátiles se realizó al comparar el espectro de masas con los valores en la biblioteca del NIST. Esta evaluación se realizó en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional.

### **4.2.1. Preparación de las nanopartículas (NQ)**

Se preparó una solución al 1 % v/v de vinagre blanco comercial (Bakers & Chefs), y se le adicionó 0.05 % p/v de quitosano comercial y comestible de alta densidad y bajo peso molecular 89,306  $\text{g mol}^{-1}$  con un grado de desacetilación de 10.66 %. Este quitosano se envió a caracterizar al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (América Alimentos), se dejó en agitación a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C) durante 24 horas. Se ajustó el pH a 5.6 con NaOH al 1 N. Para la elaboración de las nanopartículas de quitosano se usó el método de nanoprecipitación propuesto por Alcaraz y col., (2012). Se tomaron 18.75 mL de quitosano 0.05 % p/v y se hicieron pasar a través de una bomba peristáltica a una velocidad de 0.05 mL/minuto, se dejó caer en 300 mL de etanol de caña 96 % (Milab

Distribuidora). Una vez terminado el paso de todo quitosano, la solución de nanopartículas se colocó en un matraz de evaporación de 500 mL para ser concentradas en una Rotavapor® R-300 (marca BUCHI, Suiza). Las condiciones de concentración fueron las siguientes: temperatura del baño de María 40 °C, velocidad de rotación 20 - 25 r. p. m., temperatura del condensador 4 °C y con un vacío de 125 psi. La solución de quitosano nanoestructurado obtenida fue centrifugada a 1000g durante 5 minutos a temperatura de 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

Se usó el mismo método para elaboración de nanopartículas de quitosano encapsulado con aceite esencial de canela (AEC) (corteza) o trans-cinnamaldehído (TCA), se preparó una solución de etanol de caña y 0.3 % v/v de Tween 20 y se le adicionaron 0.1 % v/v de aceite esencial de canela, dejándolo en agitación durante 10 minutos antes de su uso. De la misma forma se preparó una solución de etanol de caña con 0.3 % v/v de Tween 20 y se le añadió 0.05 % v/v de trans-cinnamaldehído.

#### **4.2.2. Caracterización de las nanopartículas por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las interacciones de los grupos funcionales de quitosano y del aceite esencial de canela en las nanopartículas se observaron por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), en un intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  en un espectrómetro Shimadzu FTIR, equipado con un módulo ART de zinc-selenio. Para la determinación se colocó 0.5  $\mu\text{l}$  de nanopartículas de quitosano (NQ), nanopartículas de quitosano con aceite esencial de canela (NQAEC), nanopartículas de quitosano con trans-cinamaldehído (NQTCa), aceite esencial de canela (AEC) y trans-cinamaldehído (TCA). Esta técnica es utilizada comúnmente para estudiar y verificar la incorporación de los compuestos en hidrogeles

como quitosano; además de que permite observar la presencia de grupos funcionales característicos de cada elemento de la mezcla (Ramírez y col 2016).

La morfología de las nanopartículas se analizó por microscopía electrónica de transmisión usando un microscopio electrónico JEOL-JEM 2010. Con un voltaje de aceleración de 200kV. Se colocó 0.5  $\mu$ l de NQ, NQAEC y NQTCA en la rejilla portamuestras de cobre. Estos análisis fueron realizados en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional.

### **4.3. Formulación de recubrimientos a base de quitosano comercial**

El quitosano comercial (grado alimenticio), de alta densidad y bajo peso molecular 89,306 g mol<sup>-1</sup> con un grado de desacetilación de 10.66 % (América Alimentos).

#### **4.3.1. Solución de quitosano (Q)**

Se preparó una solución al 1 % v/v de vinagre blanco comercial (Bakers & Chefs), se le adicionó 1 % p/v de quitosano comercial y comestible (América Alimentos), se dejó en agitación a temperatura ambiente (28 °C  $\pm$  2 °C) durante 24 horas. Se ajustó el pH a 5.6 con NaOH al 1 N (Ramos-García y col 2012).

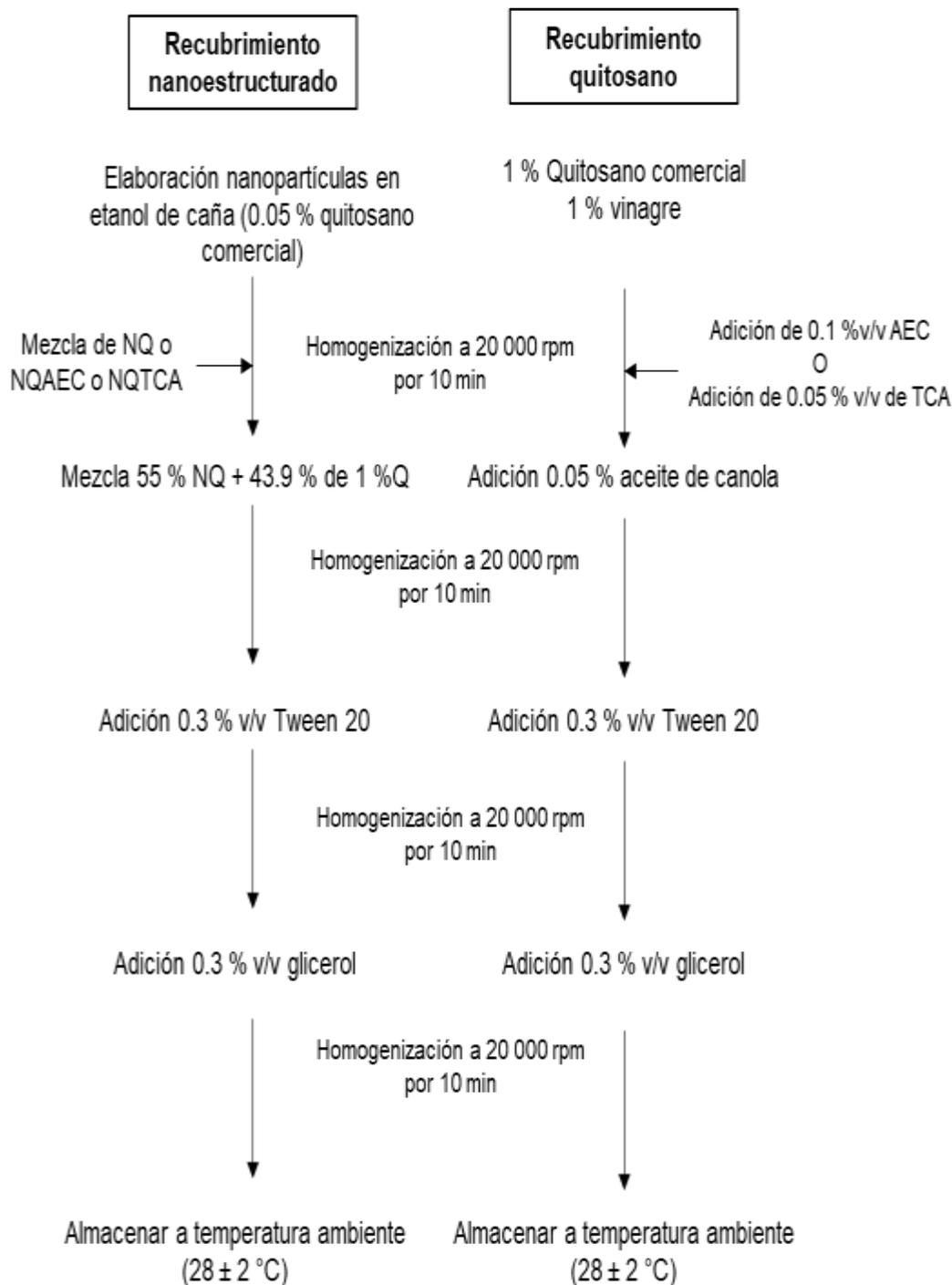
#### **4.3.2. Formulación y estandarización de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado para los frutos de pepino**

Para la formulación de los recubrimientos a base de quitosano y quitosano nanoestructurado se emplearon varias formulaciones derivadas de la propuesta por Ramos y col (2010) y Correa-Pacheco y col (2017), a partir de la cual se modificó la concentración y algunos de los componentes, hasta lograr una estandarización en la fórmula de los recubrimientos adecuadas para el exocarpo ceroso de los frutos de pepino. La formulación

final de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado con los antifúngicos naturales se realizó de la siguiente forma (Figura 5).

**4.3.3. Recubrimiento de quitosano:** se tomó 98.9 % p/v de quitosano al 1 % p/v y se le añadió 0.5 % v/v de aceite de canola. La solución fue homogenizada a 20 000 r. p. m. durante 10 minutos en un homegenizador de aspas “Virtris”. Posteriormente se agregaron 0.3 v/v de tween 20 y la solución fue homogenizada nuevamente a 20 000 r. p. m. durante 10 minutos. Por último, se agregaron 0.3 % v/v de glicerol, y se homogenizó la solución por 10 minutos a 20 000 r. p. m.

**4.3.4. Recubrimiento de quitosano nanoestructurado:** se tomó 55 % v/v de nanopartículas de quitosano y se mezcló con 43.9 % v/v de quitosano al 1 % p/v, la solución fue homogenizada a 20 000 r. p. m. durante 10 minutos en un homegenizador de aspas “Virtris”. Posteriormente, a la mezcla se le agregó 0.5% v/v de aceite de canola. La solución fue homogenizada a 20 000 r. p. m. durante 10 minutos en un homegenizador de aspas “Virtris”. Posteriormente se agregaron 0.3 % v/v de tween 20 y la solución fue homogenizada nuevamente a 20 000 rpm durante 10 minutos. Por último, se agregaron 0.3 % v/v de glicerol, y se homogenizó la solución por 10 minutos a 20 000 r. p. m. (Correa-Pacheco y col 2017).



**Figura 5.** Esquema de preparación de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado.

#### 4.3.5. Aplicación de los recubrimientos de quitosano sobre los frutos de pepino

La aplicación de los recubrimientos quitosano y quitosano nanoestructurado se realizó sobre frutos de tamaño homogéneo y que no presentaran daños mecánicos, daños por patógenos e insectos. Antes de colocar los recubrimientos, los frutos fueron lavados con agua corriente y jabón; posteriormente, fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % v/v durante 1 minuto, luego se enjuagaron con agua destilada por 30 segundos por duplicado. Los frutos se arreglaron en cada tratamiento en un diseño completamente al azar (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Tratamientos que fueron aplicados en los frutos de pepino

Tratamiento	Composición
T1	Control sin recubrimientos
T2	Quitosano 1% v/v
T3	Quitosano 1% v/v + AEC 0.1% v/v
T4	Quitosano 1% v/v + TCA 0.05% v/v
T5	Quitosano nanoestructurado 0.05% v/v
T6	Quitosano nanoestructurado 0.05% v/v + AEC 0.1% v/v
T7	Quitosano nanoestructurado 0.05% v/v + TCA 0.05% v/v

Para cada tratamiento se usaron 36 pepinos, de los cuales cada cuarto día se tomaban muestras de seis frutos, hasta completar los 16 días de almacenamiento a  $12 \pm 2$  °C. Posteriormente los frutos se almacenaron a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C).

#### 4.4. Variables de calidad postcosecha en pepino

Estas evaluaciones se realizaron cada cuatro días durante 24 días. Al inicio, se observó la apariencia, el color y el brillo de la cáscara, el arrugamiento de la superficie y si aparecían pudriciones o daños. Se realizó un análisis descriptivo de los frutos con cada uno de los recubrimientos evaluados durante el almacenamiento. Esto se realizó siguiendo el pliego de condiciones para el uso de la Marca Oficial México Calidad Suprema en pepino (PC-

021-2005), en donde indica que la superficie de los frutos debe ser lisa con cicatrices pequeñas de las aristas a lo largo del fruto. Frutos rectos en la medida de lo posible y de color verde oscuro en la piel. De tamaño moderado y ausencia de defectos de crecimiento, cicatrices, raspaduras, quemaduras de sol, amarillamiento, daños por insectos y daño mecánico o magulladuras.

#### **4.4.1. Determinación cuantitativa de calidad postcosecha del pepino**

4.4.1.1. **Determinación de sólidos solubles totales (SST).** El contenido de SST se determinó mediante el uso de un refractómetro (Atago N-1E, Japón) (0 - 32 % en la escala °Brix). Se tomó una alícuota de aproximadamente 2 mL de jugo del fruto y se colocó sobre el lector del refractómetro. Se determinó el porcentaje de azúcares totales y como blanco se usó agua destilada estéril. Cada muestra se evaluó por triplicado.

4.4.1.2. **Determinación de la acidez titulable en muestras sólidas.** Se determinó siguiendo la metodología propuesta por Martínez-Bolaños y col (2008). Se pesaron 10 gramos de pulpa de pepino y se maceró en 50 mL de agua destilada. Una vez filtrada, se tomó una alícuota de 5 mL y se le añadieron 2 gotas de fenolftaleína al 1 % p/v (etanólica). La muestra se tituló con NaOH 0.025 N. La reacción terminó cuando se alcanzó un pH de 8.3 y físicamente se observó un rosado tenue en la mezcla. Se realizó por triplicado en cada muestra. El porcentaje de acidez titulable (% AT), se reportó en función del ácido orgánico predominante en la muestra, en el caso del pepino es el ácido cítrico (peso en miniequivalente 0,006404), y se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\%AT = \frac{(ml\ NaOH) \times (N\ NaOH\ miniequivalentes) \times (miniequivalentes\ \acute{A}c.C\acute{I}trico) \times (volumen\ total)}{(volumen\ al\acute{I}cuota) \times (peso\ de\ la\ muestra)} \quad (1)$$

4.4.1.3. **Determinación de la firmeza.** Se midió con un penetrómetro 53205 Fruit Pressur Tester (Technical System Ltd), se realizaron dos mediciones por fruto en la zona media. La firmeza fue expresada como el promedio de las mediciones en Newton (Nw).

4.4.1.4. **Determinación del cambio de color ( $\Delta E$ ).** Para obtener el color de los frutos de pepino, se usó un Colorímetro (Konika Minolta Sensing, Japan) y se describió la coloración de la epidermis en tres parámetros,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (luminosidad, saturación y tono, respectivamente). Esta determinación se realizó por triplicado en la zona ecuatorial del fruto. Con este equipo se disminuyen la variabilidad en la medición del color, cuantifica pequeñas diferencias de color. La función del colorímetro es describir la coloración del exocarpo en tres parámetros,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . El factor  $L^*$  indica la luminosidad, con valores que van de 0 a 100, el color negro presenta una luminosidad de (0) cero, mientras que, el blanco presenta una luminosidad de (100) cien. Los parámetros  $a^*$  que determina los colores del amarillo (valores positivos) al azul (valores negativos) y  $b^*$  que determina los colores que van del rojo (valores positivos) al verde (valores negativos) (Sistema postcosecha y sus cumplimientos con requisitos de calidad e inocuidad de los alimentos 2004; Villalobos-Acuña, 2009). Como estándar se usó una lámina de cerámica blanca, cuyos valores son cero (0) para cada uno de los factores. Para el análisis de la variación del color se analizaron directamente las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  sobre tres puntos constantes en el eje ecuatorial de los frutos (Barrera-Bello y col 2012), y se calculó el cambio de color. Estas mediciones se realizaron por triplicado en cada fruto. El color blanco fue tomado como estándar. Se calculó la diferencia de color ( $\Delta E$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

Donde;  $L_0^*$  es el valor de  $L^*$  en el tiempo uno,  $a_0^*$  es el valor de  $a^*$  en el tiempo uno y  $b_0^*$  es el valor de  $b^*$  en tiempo uno.

#### 4.4.2. Variables fisiológicas

**4.4.2.1. Pérdida de peso.** Los frutos de cada tratamiento se pesaron individualmente al inicio y al final del periodo de almacenamiento. La pérdida de peso se evaluó a partir de la siguiente ecuación (Díaz-Pérez 1998):

$$\text{Pérdida de Peso} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (3)$$

**4.4.2.2. Producción de CO<sub>2</sub>.** Para este análisis se midió con la técnica de espacio de cabeza. Cada día de muestreo, los pepinos se guardaron en envases de plástico sellados herméticamente con una tapa equipada con un septo de goma de silicona. Después de 2 h a 25 ± 2 °C, se tomaron muestras de los gases con una jeringa de 5.0 mL (Nipro Medical Corporation, U.S.A) y se guardaron en tubos BD vacutainer, capacidad 6 mL. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su posterior evaluación. Para determinar los valores de CO<sub>2</sub> se inyectó un volumen de 0.5 mL en un Cromatógrafo de gases 7890B GC (Agilent Technologies, U.S.A). El helio se utilizó como gas acarreador a una velocidad de flujo de 10 mL min<sup>-1</sup>. Se utilizaron dos detectores (FID/TCD) y dos columnas HP-PLOT/Q y CPMOLSIEVE 5A (Agilent Technologies, U.S.A). Las temperaturas del inyector y detectores fueron de 220, 300 y 250°C, respectivamente. La respiración se expresó en ml CO<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

$$\text{Producción de } CO_2 = \left( \frac{\Delta\%CO_2 \times 10 \times \text{volumen libre del contenedor } L}{\text{peso del fruto } Kg \times \text{tiempo almacenamiento } h} \right) \times \frac{556 \text{ mL } CO_2}{1000 \text{ mg}} \quad (4)$$

Donde;  $\Delta\%CO_2 = \%CO_2 - 0.03\% \text{ del aire}$  (5)

y;

$$\%CO_2 = (\text{área bajo la curva}) \times 0.005 + 0.3947 \quad (6)$$

#### 4.4.2.3. Producción de etileno

Para este estudio se midió con la técnica de espacio-cabeza. Cada día de muestreo, los pepinos se guardaron en envases de plástico sellados herméticamente con una tapa equipada con un septo de goma de silicona. Después de 2 h a  $25 \pm 2$  °C, se tomaron muestras de los gases con una jeringa de 5.0 mL (Nipro Medical Corporation, U.S.A) y se guardaron en tubos BD vacutainer, capacidad 6 mL. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su posterior evaluación. Para determinar los valores de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> se inyectó un volumen de 1 mL (Agilent Technologies, U.S.A), en un Cromatógrafo de gases 7890B GC (Agilent Technologies, U.S.A). El helio se utilizó como gas acarreador a una velocidad de flujo de 10 mL min<sup>-1</sup>. Se utilizaron dos detectores (FID/TCD) y dos columnas HP-PLOT/Q y CPMOLSIEVE 5A (Agilent Technologies, U.S.A). Las temperaturas del inyector y detectores fueron de 120, 200 y 150 °C, respectivamente. El detector se utilizó en modo Split 1:10.

La producción de etileno se expresó en  $\mu\text{L etileno Kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Producción de etileno} = \left( \frac{\text{vol. etileno inyectado ppm} \times \text{vol. libre contenedor L} \times \text{vol. esp. etileno}}{\text{peso del fruto Kg} \times \text{tiempo almacenamiento h}} \right) \quad (8)$$

Donde;

$$\text{Volumen específico del etileno} = 847 \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \quad (9)$$

### **4.4.3. Variables Bioquímicas**

#### **4.4.3.1. Determinación del contenido de clorofilas totales**

Se tomaron 10mg de epidermis del fruto de pepino, la cual fue cortada en trozos pequeños y se colocaron en 3 mL de una solución de 80 % v/v de acetona, dejándolo en incubación durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se maceró el tejido en un mortero. El homogenizado se filtró en papel whatman No. 1. El filtrado se aforó a 10 mL con acetona 80 % v/v. Para determinar la concentración de clorofilas se midió la absorbancia a 645 nm y 663 nm. Los resultados se reportaron como: mg de clorofilas por gramo de tejido (Moreno-Velázquez y col., 2013).

$$\text{Clorofilas Totales} = 20.2A_{645} + 8.02A_{663} \quad (10)$$

#### **4.4.4. Carga microbiológica**

Los pepinos fueron tratados del mismo modo que el inciso (4.6.). Se tomaron 10 gramos de tejido y se homogenizaron en 90 mL de agua peptonada al 1% p/v. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas a partir de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , de cada dilución se sembró una alícuota de 100  $\mu$ L en cajas Petri con agar soya trisptica caseína (TSA), para las bacterias aerobias totales incubadas a 35°C por 2 días y para mohos y levaduras agar papa-dextrosa (PDA) incubadas a 25°C por 5 días. Se sembraron cuatro placas por cada tratamiento por cada día de muestreo y después del periodo de incubación se contó el número de unidades formadoras de colonias totales (UFC). Se tomaron muestreos a uno, cuatro y dieciséis días de almacenamiento.

#### **4.4.5. Pruebas de aceptabilidad**

Se prepararon los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado del mismo modo que en el inciso 4.4. Se colocaron seis pepinos en bandejas con los tratamientos (cuadro 1), se colocaron en refrigeración a  $12 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16 días. La evaluación consistió en la valoración de las características físicas de los frutos de pepino: color, olor y apariencia, por parte de un jurado, seleccionado al azar y calificando la muestra dentro de una escala donde:

- |                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| (1) Me disgusta extremadamente; | (6) Me gusta poco;           |
| (2) Me disgusta mucho;          | (7) Me gusta moderadamente;  |
| (3) Me disgusta moderadamente;  | (8) Me gusta mucho;          |
| (4) Me disgusta poco;           | (9) Me gusta extremadamente. |
| (5) Ni me disgusta ni me gusta; |                              |

#### **4.5. Aislamiento de hongos fitopatógenos de frutos de pepino en postcosecha**

##### **4.5.1. Material Vegetal para el aislamiento**

Los frutos de pepino que se utilizaron para este análisis fueron de primera calidad de tamaño uniforme de 25-30 centímetros y de un peso aproximado de 350-400 gramos cada uno. Provenientes de varias localidades del Estado de Morelos (sin especificar por el vendedor). Se seleccionaron 50 frutos con ausencia de daños físicos o enfermedades causadas por patógenos. Estos frutos fueron llevados al Laboratorio de Tecnología

Postcosecha de Productos Agrícolas de CEPROBI-IPN para su procesamiento (inciso 4.5.1.1).

#### **4.5.1.1. Aislamiento de los hongos fitopatógenos de frutos de pepino en postcosecha**

Los frutos de pepinos se limpiaron con papel secante y estéril, con la finalidad de eliminar los residuos del polvo y tierra. Se colocaron 10 frutos por cámara húmeda, enumerándose del 1 al 50 y se incubaron a temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ), haciendo revisiones cada 2 días durante un periodo de 15 días. Una vez que se observó el desarrollo de crecimiento micelial, se tomaron muestras de micelio con la ayuda de una aguja de disección en condiciones de esterilidad o asépticas, y se colocaron en cajas de Petri con PDA (agar papa-dextrosa) y se incubaron a temperatura ambiente. Se seleccionaron 20 frutos completamente al azar. Una vez desarrolladas las colonias en las cajas Petri con PDA, éstas se purificaron por resiembra en nuevas cajas de PDA e incubaron a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **4.5.1.2. Establecimiento de grupos morfológicos**

Cada morfología encontrada se agrupó según sus características culturales, tomado en cuenta el color de la colonia y aspecto, zonación, color del envés y borde de la colonia. Después de la agrupación de cada morfología se calculó la frecuencia de aparición mediante la siguiente ecuación:

$$fa1 = \frac{N1}{Nt} \quad (11)$$

donde  $N_1$  es el número de veces que apareció una morfología y  $N_t$  es el número total de morfologías encontradas (Pérez-Bocourt y col., 2010).

#### 4.5.1.3. Pruebas de patogenicidad

Del total de grupos morfológicos establecidos, se seleccionaron aquellos aislados de los grupos con una mayor frecuencia de aparición (Fa) y de cada grupo se escogió un aislado y se comprobó su patogenicidad a través de los Postulados de Koch. Para ello se tomaron discos de micelio de 5 mm de diámetro con crecimiento de cada hongo en medio PDA, y se inocularon en los frutos Posteriormente, se colocaron en cámara húmeda con una humedad relativa del 100% y se dejaron a temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ), durante 20 días, con revisiones cada dos días hasta la aparición de los síntomas. En aquellos frutos que desarrollaron síntomas de infección fúngica, se realizó el aislamiento del hongo en las zonas de avance de la enfermedad para determinar así, la presencia del hongo inoculado y que cumplieran con los postulados de Koch. Se inocularon 4 frutos, 3 discos por cada uno de ellos. Como control negativo se usaron discos de PDA. Se calculó a partir de estos resultados el porcentaje de incidencia de aparición (% I), de la enfermedad para cada hongo, usando la siguiente ecuación:

$$\%Incidencia = \frac{N_d}{N_t} \times 100 \quad (12)$$

Donde  $N_d$  es el número de discos que causaron síntomas;  $N_t$  es el número total de discos inoculados por pepino (Pérez-Bocourt y col., 2010).

#### 4.5.1.4. Caracterización morfológica de los aislados

Los aislados que ocasionaron síntomas de infección sobre los frutos, se evaluaron sus características culturales y micromorfológicas en los medios de cultivo agar Czapek (Cz), agar extracto de malta (AEM) y PDA, observándose el aspecto de la colonia, color, presencia de exudados, zonación, color del envés y la formación de estructuras reproductivas (esporodoquios, cirros, etc.). Para ello se partió de una solución de esporas

de cultivos monospóricos (Frisvad y Samson 2004), y para las mediciones micrométricas se establecieron microcámaras de crecimiento (Moreno y col 2005), a partir de los cuales se hicieron montajes de cada aislado para observarlas en un microscopio compuesto Olympus CX31 objetivo 40x. En las preparaciones se utilizó una solución de lactofenol al 1% v/v y se midieron 30 cuerpos fructíferos y 100 esporas por aislado. Se midió el diámetro del conidio, la longitud, el tamaño del conidióforo y la fiálide. Estas mediciones se analizaron mediante el uso del programa Image J (Schneider, 2006). La tasa de crecimiento se determinó a partir de discos de 5mm de diámetro de los cultivos de hongos creciendo en PDA, Cz y MEA. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente hasta que la colonia alcanzara su máximo crecimiento micelial y se realizaron evaluaciones diarias del crecimiento micelial midiendo el diámetro de la colonia, para calcular la tasa de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

$$Tasa\ de\ crecimiento = \frac{(Diámetro\ final - Diámetro\ inicial)}{tiempo\ de\ incubación} \quad (13)$$

donde  $D_f$  es el diámetro final del aislado y  $D_i$  es diámetro inicial. El comportamiento de cada aislado se comparó con una especie de referencia a través de las claves taxonómicas de Barnet & Hunter (1998) y Ellis (1971).

#### **4.5.1.5. Identificación molecular**

Para la identificación molecular de los aislados, los hongos fueron enviados al Laboratorio de BioPath, México.

#### **4.5.2. Evaluación de la incidencia y severidad de *Fusarium solani***

##### **4.5.2.1. Preparación del inóculo de conidios de los hongos fitopatógenos postcosecha del pepino**

Para la preparación del inóculo de cada hongo fitopatógeno, se tomaron 5 cajas Petri en medio PDA con un cultivo de *F. solani* de aproximadamente 8 días de crecimiento y con esporas. Se agregaron 20 mL de agua destilada en la caja de Petri y con ayuda de una aguja de disección se raspó el micelio, se filtró a través de un embudo con una gasa en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. El número de conidios se determinó usando una cámara de Neubauer ajustando a una solución de  $1 \times 10^5$  esporas / mL. El conteo se llevó a cabo en 5 campos del cuadro central de la cámara con ayuda de un microscopio compuesto marca Nikon (Modelo ALPHAPHOT-2YS-H), con un objetivo de 40X y con ayuda de un contador manual de cuatro dígitos.

##### **4.5.2.2. Porcentaje de incidencia y severidad**

Se seleccionaron 63 pepinos de tamaño, forma y color uniforme sin daños mecánicos o deterioro. Estos frutos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% v/v y se dejaron secar en la campana de flujo laminar. Se realizaron tres punciones de 1.2cm de profundidad y 1.5 cm de diámetro con ayuda de un horadador o sacacorchos en cada fruto de pepino, colocándose 30  $\mu$ L de la mezcla de los recubrimientos (cuadro 1). Se dejaron en incubación por dos horas a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C). Posteriormente, se inoculó en cada herida 10  $\mu$ L de conidios a una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios / mL. Los frutos fueron almacenados por siete días a  $10 \pm 2$  °C y luego se dejaron a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C) por tres días más y así observar el desarrollo de los signos de la

infección. Cada réplica estuvo constituida por tres frutos de pepino y cada tratamiento se realizó por triplicado. La incidencia de la enfermedad se expresó:

$$Incidencia = \frac{\text{número de heridas infectadas}}{\text{número total de heridas}} * 100 \quad (14)$$

y la severidad fue determinada el área de la lesión calculada:

$$Severidad = \Sigma(\text{anchura}) * \Sigma(\text{longitud}) \quad (15)$$

expresada como el área de deterioro en mm<sup>2</sup> (Askarne y col., 2012).

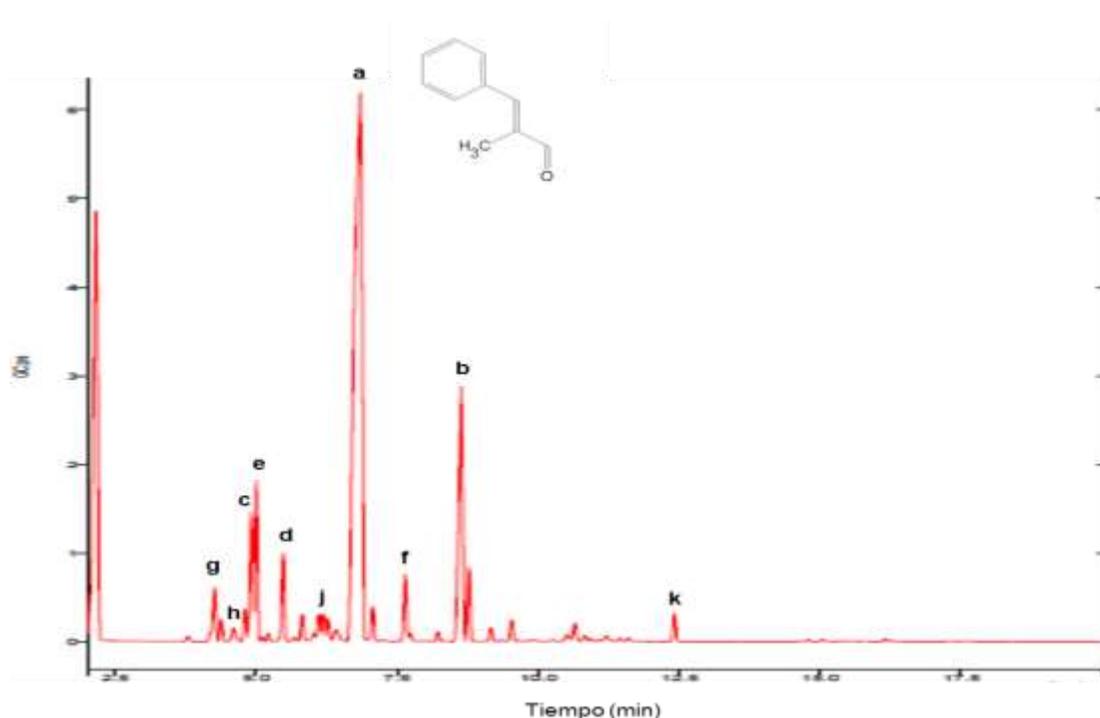
#### **4.6. Análisis Estadístico**

Para cada uno de los ensayos se tuvo como unidad experimental un pepino, con seis repeticiones por día de evaluación. En total se tuvieron seis tratamientos y más el control, por lo tanto, el número total de frutos usados para la determinación de los parámetros de calidad fue de 440. Se realizaron evaluaciones durante 20 días, con evaluaciones cada cuarto día. Se realizó un ANOVA bifactorial LSD Fisher con una prueba posterior de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Para el análisis de las pruebas de aceptabilidad de los recubrimientos se realizó estadística descriptiva. El análisis de Incidencia y Severidad de los aislados se usaron 63 frutos, con nueve repeticiones en cada tratamiento. Se aplicó un ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis, con una significancia de  $\alpha = 0.05$  y una prueba de comparación de medias de Tukey,  $\alpha = 0.05$ . Para el análisis de datos se usó el programa SigmaPlot 12.5.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Caracterización del aceite esencial de canela por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM)

En este estudio se logró caracterizar mediante cromatografía de gases el aceite esencial de canela, identificando 23 compuestos, según sus picos de absorción y tiempos de retención específicos (Figura 6). Éstos representaban el 87.60 % del total del aceite, siendo el cinamaldehído, compuesto mayoritario. Seguido del cinamil-acetato, 1, 3, 8-mentatrieno, linalool y pseudolimoneno, el resto de los compuestos analizados representan menos del 2 %. La mayor parte de los compuestos identificados son terpenos (sólo se muestran los compuestos que tuvieron una mayor área bajo la curva) (Cuadro 2).



**Figura 6. Cromatograma del aceite esencial de canela.** a) cinamaldehído; b) cinamil-acetato; c) 1,3,8-mentatrieno; d) linalool; e) pseudolimoneno; f) 3-alil-2-metoxifenol; g) trans- $\beta$ -cimeno; h) L- $\alpha$ -terpineol; i) anetol; k) benzilbenzoato. El resto de los picos observados en el cromatograma representan compuestos minoritarios. Se destaca en el pico (a) la estructura química del cinamaldehído. Figuras obtenidas en: [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)

**Cuadro 2:** Compuestos mayoritarios presentes en el aceite de canela.

Compuesto	%	Tiempo retención (min)	Formula Molecular	Tipo Molécula
cinamaldehído	41.408	6.862	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	aldehído
cinamilacetato	8.592	8.637	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	éster
1,3,8-mentatrieno	5.934	4.926	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	terpeno
linanool	5.27	5.494	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	monoterpeno
pseudolimoneno	5.006	5.01	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	terpeno
3-alil-2-metoxifenol	3.767	7.664	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	alcohol
trans-β-ocimeno	2.823	4.269	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	monoterpeno
L-α-terpineol	2.646	6.196	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	alcohol
mentadieno	1.719	4.812	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	terpeno
anetol	1.681	7	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub>	terpeno
benzilbenzoato	1.126	12.426	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	cicloalcano

Dias de Castro y Oliverira-Lima (2013), reportaron la composición del AEC de hoja encontrando que el compuesto mayoritario fue eugenol (73.27 %), en la mezcla de metabolitos también encontraron terpenos como el linalool, terpineol y cinamilacetato; compuestos que también se encontraron en el AEC usado en este estudio. Unlu y col (2010), Jayawardena y Smith (2010), Şimşek y col (2013) y Jeon y col (2017), reportan al cinamaldehído como compuesto mayoritario en los análisis de CG-EM del aceite de canela extraído de corteza mediante diferentes métodos. (68.95 %; 80 % y 88.2 %).

En un estudio realizado por Barrera y García (2008), donde evaluaron el efecto antifúngico del aceite esencial de canela sobre *F. oxysporum* y *R. solani*, indican que de los compuestos derivados del cinamaldehído, de estos, tres tuvieron actividad antifúngica sobre ambos hongos a 100 µg/mL. Estos fueron: trans-cinamaldehído, α-metil-cinamaldehído y ácido α-metil-cinámico.

En otro estudio realizado por Xie y col (2017), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela y el aceite esencial de clavo, además de la relación que existe entre la estructura y la actividad de los compuestos mayoritarios en estos aceites, el

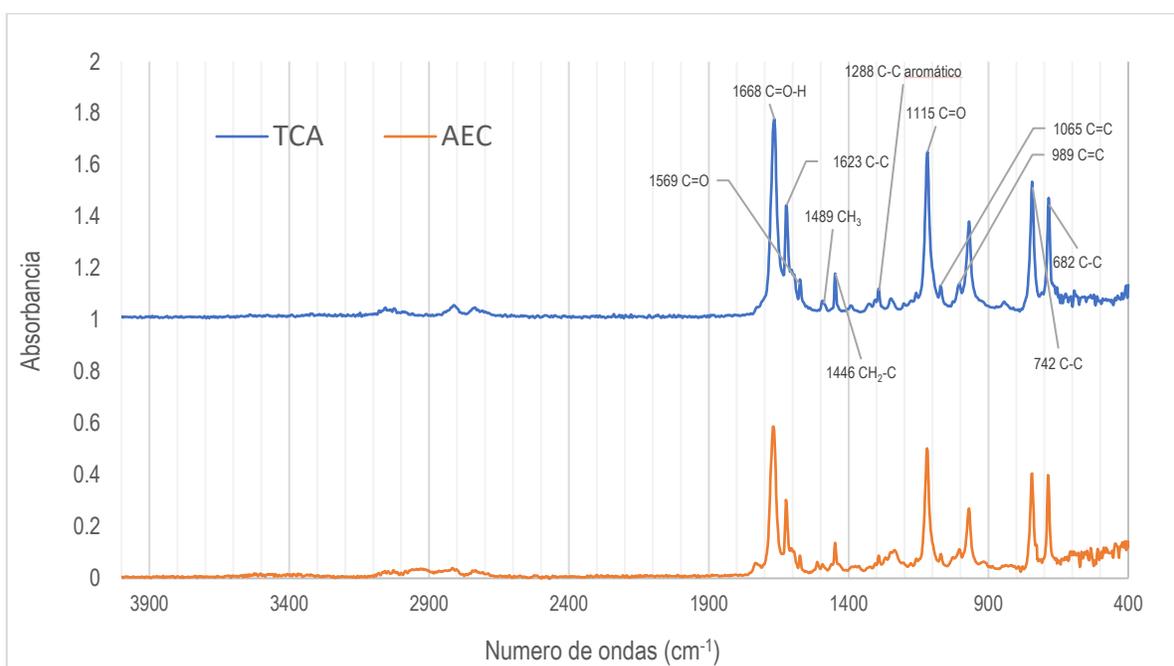
cinamaldehído y el eugenol sobre dos hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Ellos reportan que el cinamaldehído muestra una potente actividad contra ambos hongos, indicando que aquellos compuestos que tenían una estructura similar al cinamaldehído, la actividad antifúngica era más fuerte, llegando a la conclusión de que estos compuestos presentaban en su estructura un anillo benceno y dobles enlaces de carbono conjugados: cinamaldehído > cinamil-acetato > cinamil-alcohol > ácido cinámico, indicando que el grupo aldehído es el responsable de la actividad antifúngica. Aunque no se muestran en el cuadro 3, en la CG-EM se identificó el alcohol cinámico con un 0.292 % del total del aceite.

#### **5.1.1. Caracterización de las nanopartículas por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

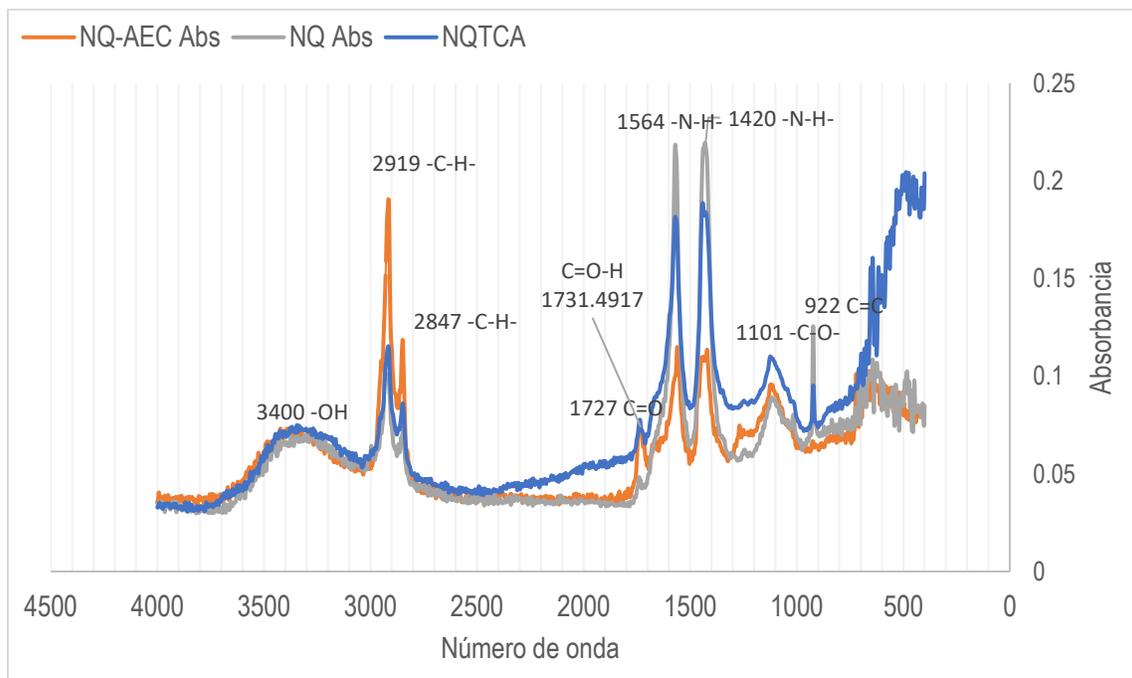
La composición, presencia y ubicación de los grupos funcionales del AEC, TCA y las nanopartículas se muestran en la Figuras 7 y 8, respectivamente. Ambas curvas del espectro presentan picos similares, lo que indica que en el AEC se encuentra el TCA. El aceite esencial de canela está compuesto de varias moléculas como terpenos, aldehídos y alcoholes; el más abundante en su composición como se mencionó anteriormente, fue el cinamaldehído (Şimşek y col 2013). Estas moléculas están compuestas de enlaces C-C, C=C, grupos metilo, grupos carboxílicos, anillos aromáticos y lo que vemos en el espectro infrarrojo es precisamente la absorción de estos grupos químicos en su composición.

En ambos espectros (Figura 7), vemos una banda a de  $1668\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un grupo aldehído (C=O-H). En la banda de  $1263\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los enlaces (C-C) de los anillos aromáticos, a  $1623\text{ cm}^{-1}$ ,  $742\text{ cm}^{-1}$  y  $682\text{ cm}^{-1}$  los enlaces (C-C) de las cadenas de hidrocarburos. Los dobles enlaces de carbonos (C=C) corresponden a las bandas de  $969\text{ cm}^{-1}$  y  $1065\text{ cm}^{-1}$ . Los grupos éter (C=O) se encontraron en las bandas de  $1115\text{ cm}^{-1}$  y  $1569\text{ cm}^{-1}$ .

$\text{cm}^{-1}$  y sólo un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) en la posición  $1489 \text{ cm}^{-1}$ . Como se mostró en la CG-EM, los compuestos con mayor actividad antifúngica en el AEC son los derivados del cinamaldehído y aquí en el FTIR, se pudo comprobar la presencia de los grupos aldehído, doble enlaces conjugados, enlaces C-C formando parte del anillo de benceno en su estructura.



**Figura 7.** Espectro de FTIR del aceite esencial de canela (AEC) y trans-cinamaldehído comercial (TCA). El grupo aldehído se encuentra en las bandas de  $1740\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 8.** Espectro de las nanopartículas de quitosano encapsulando aceite esencial de canela (NQAEC) y nanopartículas de quitosano encapsulando trans-cinamaldehído (NQTCA).

Debido a su composición química del quitosano vemos en la Figura 8, el espectro infrarrojo de las nanopartículas de quitosano encapsulando AEC y el TCA. En la región entre los 1564  $\text{cm}^{-1}$  y 1420  $\text{cm}^{-1}$ , dos picos característicos de los grupos amina ( $-\text{NH}_2$ ) constitutivos de la N-acetilglucosamina ( $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$ ). La línea color gris muestra los picos de absorción de las nanopartículas de quitosano (NQ), son las más altas (sólo se encuentra el quitosano). Seguido la línea azul, que representa a las nanopartículas encapsulando trans-cinamadehído (NQTCA) y en la línea naranja, las nanopartículas encapsulando aceite esencial de canela (NQAEC).

La molécula de N-acetilglucosamina está constituida por una aldohexosa, es decir, un azúcar de seis carbonos, donde en el carbono 2 se ha sustituido el grupo hidroxilo ( $-\text{OH}$ ),

por una amina (-NH<sub>2</sub>), que en reacciones posteriores sufre acetilación por la incorporación de un grupo acetilo (-CO-CH<sub>3</sub>). Estos monómeros están unidos por enlaces β-1,4, formando la estructura química del quitosano. Lo que vemos en el espectro infrarrojo de la Figura 8, es precisamente estos grupos químicos en los diferentes tipos de nanopartículas empleadas en este estudio (NQ, NQAEC y NQTCA).

En el espectro también podemos encontrar los grupos funcionales del AEC y TCA (Figura 8) y es precisamente la presencia de estos picos de absorción, lo que confirman que dentro de las nanopartículas se encuentran encapsulados estos dos compuestos. En la banda de 922 cm<sup>-1</sup> se encontraron los enlaces de doble carbono (C=C), en la banda de 1101 cm<sup>-1</sup> vemos los enlaces carbono-oxígeno (-C-O-), en la banda de 1731 cm<sup>-1</sup> encontró el grupo aldehído (-C=O-H); grupos funcionales que forman parte de la estructura química del AEC y TCA.

En la banda de 3400 cm<sup>-1</sup> corresponde al grupo hidroxilo (-OH). Según Macea y col (2015), las bandas correspondientes a los estiramientos -OH y -NH (3250-3600 cm<sup>-1</sup>), característicos de los alcoholes, aminas y amidas presentes en la estructura del quitosano desacetilado y reportan una banda de 3456 cm<sup>-1</sup> como producto de la sobreposición de las bandas originadas por los alargamientos y tensiones de los grupos -OH y -NH presentes en el quitosano. En el espectro también se observa una banda a 2919-2847 cm<sup>-1</sup> que corresponde a los enlaces -C-H- y una banda a 1727 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los dobles enlaces carbono-oxígeno (C=O).

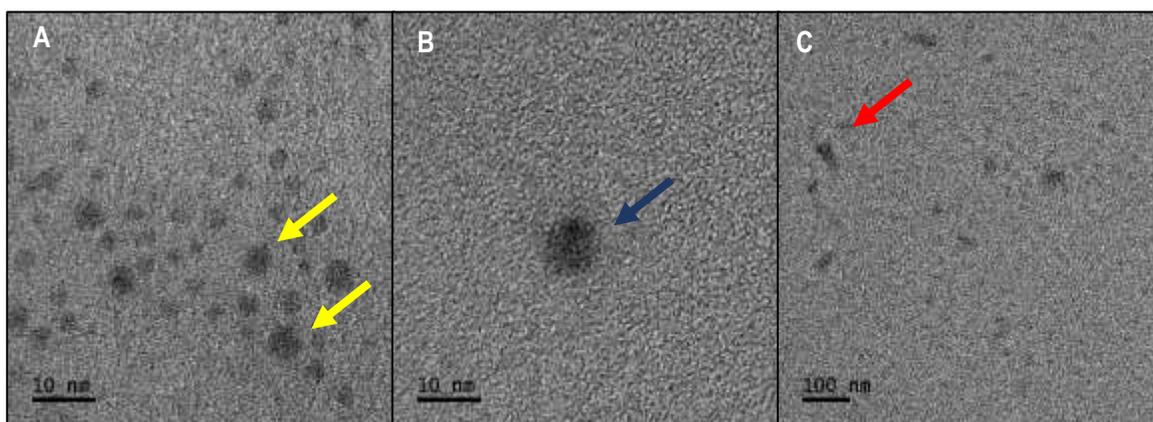
Todas las moléculas presentes en el AEC de canela tienen dentro de su estructura química grupos funcionales que coinciden con los presentes en la molécula de quitosano, por ejemplo, grupos -OH, C-C, C=C, C-O. Cuando analizamos el espectro infrarrojo de las nanopartículas, encontramos que hay zonas o bandas comunes de menor o mayor

absorción (tamaño del pico). Esto nos indica, que las moléculas presentes en el AEC tienen algún tipo de interacción con la molécula de quitosano, por enlaces del tipo puentes de hidrógenos (-OH-O; -OH-C), o enlaces del tipo covalente en los grupos amino y las cadenas de los grupo -R. Conocer la presencia de los grupos funcionales nos permite suponer como el quitosano es capaz de encapsular aceites esenciales, sin que ambos compuestos pierdan actividad como antimicrobianos y que además, puedan ser mucho más efectivos y reactivos al encontrarse estructurados a nivel nanométrico. Además, estas interacciones en los grupos funcionales de las moléculas presentes en el AEC mejoran la solubilidad del quitosano en soluciones acuosas, le confieren una mayor elasticidad, permeabilidad al vapor de agua (Mahdi-Ojagh y col 2010), y en el caso del pepino, permite una mejor adhesión a la superficie del fruto. Estas son estimaciones que se derivan del análisis de FTIR.

### **5.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Las micrografías de las nanopartículas de quitosano y quitosano nanoestructurado encapsulando aceite esencial de canela o trans-cinamaldehído se muestran en la Figura 9. Se observa que las NQ (Figura 9A), tienen forma esférica con un diámetro promedio de  $5 \pm 2.76$  nm, son densas y que se encuentran agregadas, señaladas con la flecha de color amarillo. En la figura 9B señaladas con la flecha azul, se muestran las NQAEC éstas son mucho más densas y de mayor tamaño que las NQ, con un tamaño promedio de  $8 \pm 3.89$  nm, algunas tienen morfología esférica, no se encontraban agregadas y en menor cantidad. En la figura 9C, vemos la micrografía de NQTCA. A pesar de que los tres tipos de nanopartículas fueron realizadas por la misma metodología, las NQTCA (flecha roja), muestran ser amorfas, no esférica y presentaban diferentes tamaños, superior a los 50nm, lo que se puede evidenciar por la escala en la que se encuentran las micrografías.

Con el método de nanoprecipitación se observó que las NQ tenían un menor tamaño en comparación con las NQAEC y NQTCA. Esto se debe a que el quitosano al entrar en contacto con la solución alcohólica en donde se encontraba disuelto el aceite o la del aldehído, éste inmediatamente se insolubiliza capturándolos en su interior ambos compuestos en su interior, por lo tanto, se forman partículas de dimensiones mayores.



**Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de A)** quitosano (NQ) 10nm, **B)** nanopartículas de quitosano encapsulando aceite esencial de canela (NQAEC) 10nm y **C)** nanopartículas de quitosano encapsulando trans-cinamaldehído (TCA) 100nm. Se muestra la media de cien mediciones.

Otra explicación para el incremento del tamaño de nanopartículas con el AEC o el TCA, se debe a que el quitosano tiene la capacidad de formar hidrogeles, los cuales están formados por una red tridimensional que tiene la capacidad de absorber gran cantidad de agua, hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder la forma (Ramírez y col 2016).

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo “*bottom-up*” (de abajo hacia arriba), como resultado de la autoasociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras

nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas, en este caso, el aceite o el TCA, queda atrapado o ligado a la matriz polimérica semi-sólida de quitosano (Goycoolea y col 2009).

## **5.2. Formulación y Estandarización de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado para los frutos de pepino**

Para la formulación y estandarización de recubrimientos adecuados para los frutos de pepino, se realizaron ensayos preliminares mediante modificaciones parciales al recubrimiento propuesto por Ramos y col (2012) y complementando dichas modificaciones con los propuesto por Correa-Pacheco y col (2017). Sin embargo, es importante mencionar que los compuestos usados en los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado fueron de uso comercial.

En todas las mezclas empleadas en este estudio se evaluó cualitativamente el color, la adherencia y la vida de anaquel de los frutos de pepino bajo condiciones controladas. Gracias a los resultados obtenidos por un estudiante del Laboratorio de Tecnologías Postcosecha, se logró modificar la concentración de AEC y TCA sin que se viera afectada su actividad antifúngica y mediante pruebas de aceptabilidad, se determinó que a la concentración de 0.1 % v/v, los frutos no presentaban un olor dulce.

También se determinó que el aceite de canola era el mejor adherente para el pepino, en comparación con la cera de abeja y el ácido oleico. El glicerol permitió la formación de una emulsión capaz de integrar los elementos hidrofóbicos del recubrimiento (quitosano, AEC, TCA y aceite de canola) y la adición de tween 80, mejoró sustancialmente la incorporación de todos los elementos en solución. Es importante mencionar que los recubrimientos nanoestructurados de quitosano (NQ, NQAEC, NQTCA), mostraron en todas las pruebas una mejor adhesión a los frutos de pepino, pero al ser usadas en altas concentraciones

afectaban la calidad visual y fisicoquímica de los frutos. Lo que nos llevó a modificar la concentración en las que estas fueron usadas en los recubrimientos. Para mayor detalle de la composición final de los recubrimientos empleados ver el inciso 4. 5. (cuadro 1), de la sección de materiales y métodos.

### **5.3. Calidad Postcosecha de pepino**

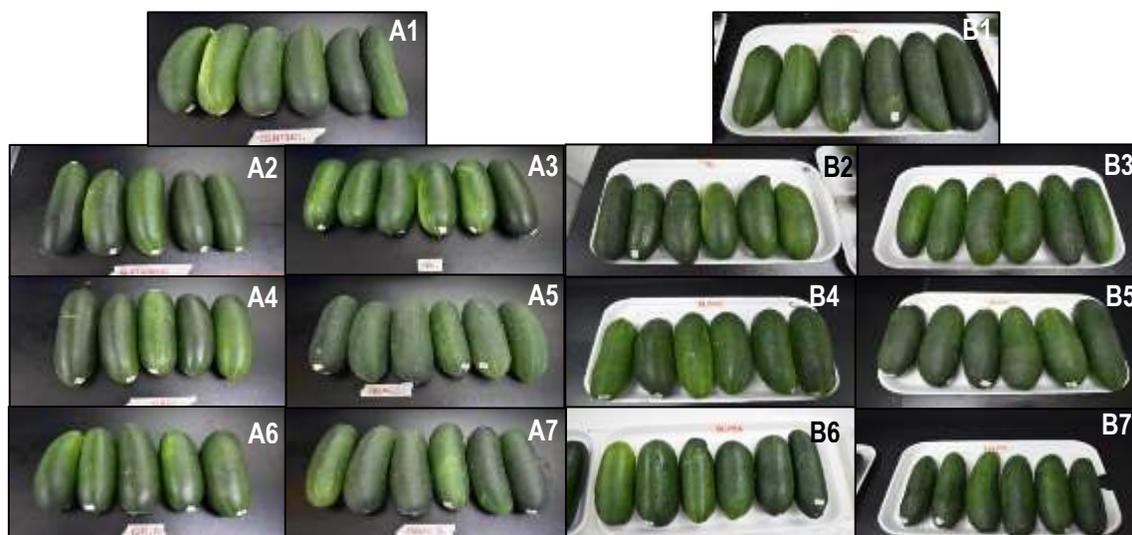
#### **5.3.1. Apariencia**

En el estudio de apariencia se realizó un análisis descriptivo de los frutos con cada uno de los recubrimientos evaluados durante el almacenamiento según el PC-021-2005. Los frutos usados cumplieron con lo referido en la norma de calidad y al momento en que se colocaron los recubrimientos (Figura 10A), tenían color verde oscuro uniforme en todos los tratamientos al igual que el control. Los frutos que estaban recubiertos con NQAEC y NQTCA. Es importante mencionar, que los frutos usados en este ensayo tenían un día de cosechados.

En los primeros ocho días de almacenamiento (Figura 10B), el brillo de los frutos se hizo más homogéneo en todos los tratamientos. se observó que los frutos con tratamiento de QAEC y QTCA, comenzaron a mostrar amarillamiento de la cáscara y arrugamiento en los extremos y, por el contrario, los tratamientos con nanopartículas se volvieron más oscuros. A los 16 días de almacenamiento los frutos en los tratamientos de QAEC, QTCA, NQAEC y control, comenzaron a mostrar síntomas de deterioro en la calidad visual, tenían manchas en la superficie de color amarillo y en algunos casos asociados con el inicio de una infección microbiana en los extremos (control y QAEC). Los tratamientos que mostraron mayor arrugamiento de la superficie fueron QAEC y NQAEC, ya que los frutos perdieron mayor cantidad de agua y los frutos con mejor apariencia eran los que estaban recubiertos con Q, NQ y NQTCA. La norma para la comercialización de pepino (PC-021-2005), indica que la

vida de anaquel es de 14 días como máximo bajo condiciones de almacenamiento entre 10-12 °C, sin que estos pierdan su calidad comercial y con el uso de estos recubrimientos se logró aumentar la vida de anaquel a 20 días de almacenamiento, sin que los frutos perdieran la calidad comercial, especialmente en aquellos frutos fueron los tratamientos de Q, NQ y NQTCA.

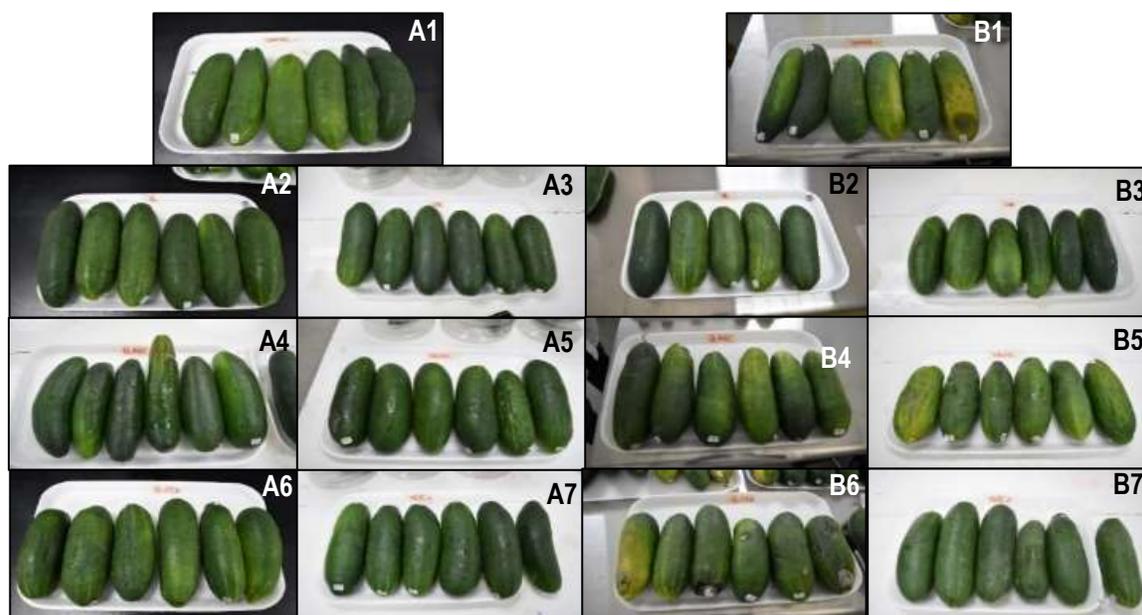
Una vez colocados a temperatura ambiente (20 días de haber colocado el recubrimiento), los frutos que mostraron mayor deterioro fueron los tratamientos control, QAEC, QTCA, NQAEC (Figura 11B). Mostrando amarillamiento en los extremos de los frutos, zona en las que se iniciaron infecciones causadas por hongos; el caso más severo visualmente fueron el control y los tratamientos con QTCA y NQAEC, los cuales tenían una mayor cantidad de frutos dañados y del 50% de la superficie del fruto con amarillamiento. Los frutos tratados con QAEC sólo presentaron amarillamientos y arrugamientos en los extremos.



**Figura 10. A) Apariencia a los cero días de almacenamiento a 12°C.** A1) Control; A2) quitosano; A3) quitosano nanoestructurado; A4) quitosano con aceite esencial de canela; A5) quitosano nanoestructurado con aceite esencial de canela; A6) quitosano con trans-cinamaldehído; A7) quitosano nanoestructurado con trans-cinamaldehído. **B) Apariencia a los ocho días de almacenamiento a 12°C.** B1) Control; B2) quitosano; B3) quitosano nanoestructurado; B4) quitosano con aceite esencial de canela; B5) quitosano nanoestructurado con aceite esencial de canela; B6) quitosano con trans-cinamaldehído; B7) quitosano nanoestructurado con trans-cinamaldehído.

Los tratamientos de Q, NQ y NQTCA aún después de los 20 días de almacenamiento mantuvieron la apariencia del inicio del experimento. Esto es un resultado importante, ya que estos recubrimientos podrían ser una alternativa para mantener la apariencia y la calidad sensorial aún en condiciones no controladas.

La apariencia de los frutos es un aspecto importante para la comercialización, ya que las personas muchas veces adquieren los productos hortofrutícolas por cómo se ven externamente. La calidad de un producto es importante para los consumidores y comerciantes, y es un factor clave que usan los supermercados (Kader 2007).



**Figura 11. A) Apariencia a los 16 días de almacenamiento a 12°C.** A1) Control; A2) quitosano; A3) quitosano nanoestructurado; A4) quitosano con aceite esencial de canela; A5) quitosano nanoestructurado con aceite esencial de canela; A6) quitosano con trans-cinamaldehído; A7) quitosano nanoestructurado con trans-cinamaldehído. **B) Apariencia a los 20 días de almacenamiento a 28°C.** B1) Control; B2) quitosano; B3) quitosano nanoestructurado; B4) quitosano con aceite esencial de canela; B5) quitosano nanoestructurado con aceite esencial de canela; B6) quitosano con trans-cinamaldehído; B7) quitosano nanoestructurado con trans-cinamaldehído.

Un fruto con un buen aspecto, indica que tienen buen sabor y se hace más apetecible. Sin embargo, la alta calidad de un fruto está en segundo plano sólo después de la limpieza y el orden, que son los primeros factores que intervienen en la elección en el supermercado (Kader 2007). La apariencia sensorial de un producto alimenticio y la apariencia visual ejercen, en particular una fuerte influencia sobre la aceptación de un producto (Tuorila y Pangborn 1988 citado en de Oliveira Silva y col 2005).

### **5.3.2. Determinación Cuantitativa de la Calidad**

Se evaluó cuantitativamente la calidad de frutos tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. Se encontró que los recubrimientos mantuvieron algunos de los parámetros de calidad postcosecha durante el almacenamiento en condiciones controladas hasta por 16 días a 12°C.

Los valores para los sólidos solubles totales y acidez titulable se muestran en el cuadro 3. Durante el almacenamiento los frutos no mostraron diferencias significativas en cuando al contenido de azúcares y ácidos grasos con respecto a los recubrimientos evaluados y el tiempo de almacenamiento ( $P = 0.307$ ). El pepino es un fruto no climatérico, por lo tanto, los cambios en el contenido de azúcares y ácidos grasos no varían durante su desarrollo en la planta y en postcosecha. Estos frutos son cosechados en madurez comercial, es decir, cuando ha alcanzado el tamaño (longitud y grosor), según la variedad. Por lo tanto, el contenido de azúcares se mantiene relativamente constante, desde la cosecha hasta el consumo y este parámetro está muy relacionado con el sabor en los frutos. Sólo se observan el contenido de SST cuando los frutos se encuentran infectados por hongos, aumentan. Ya que estos microorganismos degradan el tejido del fruto mediante la acción de enzimas hidrolíticas.

En los frutos climatéricos como el tomate, el mango, la banana, entre otros, el incremento en el contenido de SST se da por efecto de la maduración. Son frutos que son cosechados en estado “verde” y a medida que van madurando aumenta el contenido de azúcares, por lo tanto, su sabor cambia, se hacen más dulces. En los frutos de pepino no incrementan el contenido de azúcares durante su maduración. Con el uso de los recubrimientos a base de quitosano y quitosano nanoestructurado, se logró mantener el contenido de SST durante el tiempo de almacenamiento, además de que evitó el aumento de azúcares por la presencia de microorganismos, evitando su desarrollo.

**Cuadro 3:** variables de calidad postcosecha evaluados sobre frutos de pepino en condiciones de almacenamiento a 12°C por 16 días tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado.

Parámetro	Tratamiento <sup>γ</sup>	Día 0 <sup>β</sup>	Día 8	Día 16
SST (°Brix)	Control	3.06acA	2.91acB	2.68acC
	Q	3.25acA	3.05acB	2.78acC
	QAEC	3.05acA	2.8acB	2.61acC
	QTCA	3acA	2.78acB	2.86acC
	NQ	2.58abcA	2.83acbB	2.68acbC
	NQAEC	3.05acA	2.93acB	2.66acC
	NQTCA	3.06acA	3acB	2.56acC
	AT (% Ácido citrónico)	Control	1.25x10 <sup>-5</sup> dA	1.61x10 <sup>-5</sup> dBC
Q		7.77x10 <sup>-6</sup> abA	1.14x10 <sup>-5</sup> abBC	1.08x10 <sup>-5</sup> abD
QAEC		9.05x10 <sup>-6</sup> aA	9.05x10 <sup>-6</sup> aBC	1.08x10 <sup>-5</sup> aD
QTCA		1.01x10 <sup>-5</sup> bcA	1.12x10 <sup>-5</sup> bcBC	1.24x10 <sup>-5</sup> bcD
NQ		1.16x10 <sup>-5</sup> bcA	1.14x10 <sup>-5</sup> bcBC	1.32x10 <sup>-5</sup> bcD
NQAEC		1.31x10 <sup>-5</sup> dA	1.36x10 <sup>-5</sup> dBC	1.36x10 <sup>-5</sup> dD
NQTCA		1.25x10 <sup>-5</sup> cA	1.07x10 <sup>-5</sup> cBC	1.36x10 <sup>-5</sup> cD

Análisis de Varianza de dos vías ( $P = 0.001$ ); Separación de medias Tukey ( $P = 0.005$ ). <sup>γ</sup> Letras minúsculas representa la comparación entre tratamientos. <sup>β</sup> Letras mayúsculas la comparación en el tiempo. Se muestra la media de seis repeticiones por día por tratamiento. Se muestra la media de seis mediciones.

**Cuadro 4:** variables de calidad postcosecha evaluados sobre frutos de pepino en condiciones de almacenamiento a 12°C por 16 días tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado.

Parámetro	Tratamiento <sup>γ</sup>	Día 0 <sup>β</sup>	Día 8	Día 16
<b>Firmeza</b>  (N)	<b>Control</b>	70.83aA	64.61aA	57.80aA
	<b>Q</b>	65.65aA	61.54aA	70.35aA
	<b>QAEC</b>	66.95aA	57.32aA	55.51aA
	<b>QTCA</b>	75.85aA	58.95aA	64.05aA
	<b>NQ</b>	56.12aA	66.81aA	63.57aA
	<b>NQAEC</b>	65.73aA	62.36aA	67.56aA
	<b>NQTCA</b>	69.37aA	51.92aA	59.7aA
	<b>Color</b>  (ΔE)	<b>Control</b>	0aA	6.18bA
<b>Q</b>		0aA	4.38dB	6.61bD
<b>QAEC</b>		0aA	4.44dB	3.93eC
<b>QTCA</b>		0aA	3.90eC	4.83fE
<b>NQ</b>		0aA	3.70eC	3.99eC
<b>NQAEC</b>		0aA	3.30eC	5.56fE
<b>NQTCA</b>		0aA	3.53eC	3.87eC

Análisis de Varianza de dos vías ( $P = 0.001$ ); Separación de medias Tukey ( $P = 0.005$ ). <sup>γ</sup> Letras minúsculas representa la comparación entre tratamientos. <sup>β</sup> Letras mayúsculas la comparación en el tiempo. Se muestra la media de seis repeticiones por día por tratamiento. Se muestra la media de seis mediciones.

En cuanto a la firmeza no se encontraron diferencias significativas ( $P=0.036$ ), en los efectos de los tratamientos evaluados, ni a través de tiempo (Cuadro 4). La firmeza de los pepinos con los recubrimientos presentó los valores más altos comparados con el control sin recubrimiento. Después de 16 días, la pérdida de firmeza en porcentaje del control fue de 18.39 %, mientras que los valores más bajos fueron en los tratamientos de Q (0.67 %) NQAEC (4.61 %). La firmeza de los frutos en el tratamiento control en el día 0 fue de 70 N y luego de los 16 días de almacenamiento, no se encontraron diferencias con respecto a los otros tratamientos ( $P = 0.358$ ).

En un estudio realizado por Adetunji y col (2014), evaluaron el efecto de un recubrimiento de quitosano al 1.5 % p/v y 1.5 % v/v con gel de *Aloe vera* sobre la firmeza en cestas de plástico durante siete semanas. En cuanto a la firmeza ellos reportan disminución de 30 y 45 N en los frutos con los recubrimientos en comparación con el control a las cuatro semanas de almacenamiento a temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C), éstos valores son muchos menores a los encontrados con los recubrimientos de Q y NQ, donde se registraron valores por encima de los 50 N durante tres semanas de almacenamiento bajo condiciones controladas de temperatura. Es importante recordar, que la firmeza está asociada a la transpiración y a su vez a la respiración, por la pérdida de agua. Debido al alto contenido de agua del pepino (96 %, CONABIO 2014), al estar almacenados a una temperatura adecuada donde no se alteró la tasa de respiración y la presencia de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado, evitaron que la pérdida de agua mediante la transpiración. La firmeza es una variable que indica calidad en muchos productos hortofrutícolas y en especial, en los frutos de pepino, ya que está relacionada con la estructura de la pared celular y con el estado de madurez (CAJAMAR 2014). La firmeza de las frutas y hortalizas depende de la turgencia, cohesión, forma y tamaño de las células que

conforman la pared celular (López y col 2000, CAJAMAR 2014), por lo que se puede deducir que los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado mantienen estas estructuras evitando la degradación de las paredes celulares por la presencia de enzimas hidrolíticas de hongos como las hemicelulosas, las celulosas y las pectinasas y retrasando la maduración. En un estudio realizado por Zhang y col (2015), donde utilizaron recubrimientos de un complejo quitosano-ácido salicílico sobre frutos de pepino almacenados a 2 °C por 12 días y a temperatura ambiente (20 °C) durante dos días, reportan que las variables de calidad firmeza, sólidos solubles totales y contenido de ácido ascórbico, no mostraron cambios durante el almacenamiento, concluyendo que el recubrimiento de quitosano en complejo con otros elementos, es más eficiente preservando la calidad en postcosecha.

Otro de los parámetros de calidad evaluados fue el cambio de color calculado por  $\Delta E$  (Cuadro 4). La aplicación de los recubrimientos ayudó a mantener el color en los frutos y se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $P = 0.064$ ). Los frutos del tratamiento control a los 8 días de almacenamiento mostraron un cambio en la coloración del exocarpo y al final del almacenamiento fueron los frutos con un mayor valor de  $\Delta E$  (más amarillos). En el cuadro 4, se observa cómo los frutos en los tratamientos con QTCA, NQ, NQAEC y NQTCA tuvieron valores de  $\Delta E$  más bajos con respecto al control, lo que indica que estos frutos mostraron cambios en el color verde oscuro de la cosecha. En un estudio realizado por Mohammadi y col (2016), reportan el uso de recubrimientos con nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano encapsulando aceite esencial de *Zataria multiflora* sobre frutos de pepino, a una concentración de 1500 ppm, mostraron un menor cambio en el color durante el almacenamiento a 4 °C. Estos resultados son consistentes con los encontrados en este estudio, donde los frutos de pepino tratados con Q, NQ y NQTCA, presentaron valores menores de  $\Delta E$  en comparación con el control. Estos investigadores

explican, que el efecto del recubrimiento es debido a que este crea una atmósfera modificada entre la superficie del fruto y el recubrimiento evitando así la degradación de clorofilas, como se puede observar en la figura 23. Los recubrimientos mantienen el color verde de los pepinos debido a que previenen el pardeamiento oxidativo o enzimático (Mohammadi y col 2016).

Los tratamientos con Q, QTCA y NQAEC tuvieron un valor similar al del tratamiento control, lo que indica que estos frutos presentaron una mayor coloración amarilla al final del almacenamiento ( $P = 0.001$ ). Por otra parte, los tratamientos con QAEC, NQ, NQAEC y NQTCA tuvieron valores más pequeños de  $\Delta E$  con respecto al control, es decir, se encontraban aún verdes.

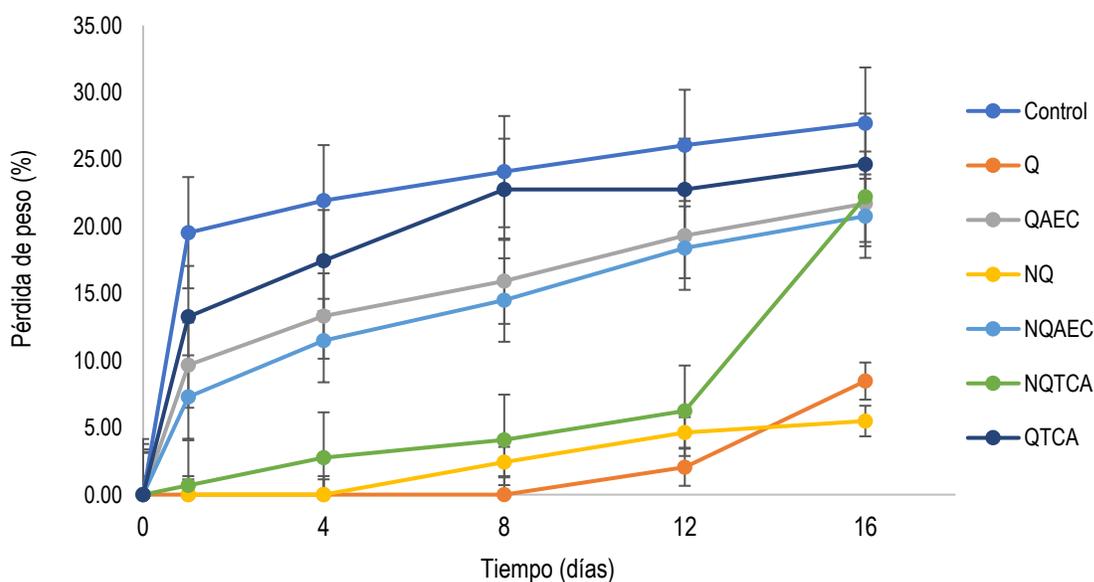
### **5.3.3. Variables Fisiológicas**

#### **5.3.3.1. Pérdida de peso**

En la Figura 12 se muestra la pérdida de peso en los frutos de pepino tratados con los recubrimientos. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos  $P < 0.001$ ). Se puede observar que el tratamiento control fue el que registró una mayor pérdida de peso acumulada de 27.71 % con respecto al peso inicial en promedio de 315 gr. De forma similar los frutos con los recubrimientos de QTCA (24.65 %), NQAEC (20.77 %) y NQTCA y QAEC mostraron una pérdida de peso acumulada de 22.22 %. Los tratamientos de Q y NQ, registraron una menor pérdida de peso con respecto al control (8.74 % y 5.49 %, respectivamente). Los resultados indican que los tratamientos de Q y NQ con o sin AEC y TCA, son efectivos en reducir el porcentaje de pérdida de peso a los 16 días de almacenamiento, ya que tienen la capacidad de reducir la pérdida de agua mediante la reducción de la tasa de respiración, como se muestra más adelante (Figura 13), y reducir la evapotranspiración ya que forman una barrera selectiva al vapor de agua. Sin embargo,

todas estas pérdidas resultan significativas ya que, la norma exige que durante el almacenamiento los frutos deben tener una pérdida de peso acumulada menor al 5%.

La pérdida de peso en los frutos está asociada directamente con la respiración y la evapotranspiración, siendo uno de los parámetros que determinan la calidad y la vida de anaquel en los frutos. (Adetunji y col (2014)). Los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado forman una capa en la superficie del fruto que actúa como una barrera a los gases de la respiración y a los gases ambientales. Esto causa que estos dos procesos, reduzcan sus tasas trayendo como consecuencia que velocidad de deterioro sea menor. Este efecto se observó en los tratamientos con Q, NQ y NQTCA durante y al final del almacenamiento, y cuando los frutos fueron colocados a temperatura ambiente.



**Figura 12. Porcentaje de pérdida en condiciones de almacenamiento a 12°C por 16 días, tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. A).** Valor de referencia según la norma es de una pérdida de peso acumulada de 5 %. LSD, tratamiento:  $F = 24.411$ ;  $gl = 6, 209$ ;  $P < 0.001$ . Tiempo:  $F = 11.662$ ;  $gl = 4, 209$ ;  $P < 0.001$ . Tratamiento x Tiempo:  $F = 0.378$ ;  $gl = 24, 209$ ;  $P = 0.997$ . Recubrimiento: **Q**, quitosano; **QAEC**, quitosano y aceite esencial de canela; **QTCA**, quitosano y trans-cinamaldehído; **NQ**, quitosano nanoestructurado; **NQAEC**, quitosano nanoestructurado y aceite esencial de canela, **NQTCA**, quitosano nanoestructurado y trans-cinamaldehído. Se muestra la media de seis mediciones. Las barras indican la desviación estándar.

Este efecto fue reportado por Zhang y col (2015), donde utilizaron recubrimientos formados por un complejo de quitosano y ácido salicílico sobre frutos de pepino almacenados a 2 °C por 12 días y posteriormente puestos a temperatura ambiente (20 °C) durante dos días, encontrando que la pérdida de peso en los frutos con el recubrimiento fue sólo de 2.29 % en comparación con el control 3.52 %.

En un trabajo realizado por Adetunji y col (2014), evaluaron el efecto de un recubrimiento de quitosano y gel de *Aloe vera* sobre la pérdida de peso en frutos de pepino almacenados a temperatura ambiente (25 °C ± 3 °C), durante siete semanas. Reportan un porcentaje de pérdida de peso de 5.17 % para los frutos recubiertos con quitosano + *Aloe vera*, de 16.71 % para los frutos recubiertos con *Aloe vera* y de 19.22 % para los frutos recubiertos sólo con quitosano, en comparación con el control que tuvo un porcentaje de pérdida de peso de 26.91 %. En este trabajo se encontraron porcentajes de pérdida de peso menores en los frutos de pepino que sólo están recubiertos con Q (Figura 12).

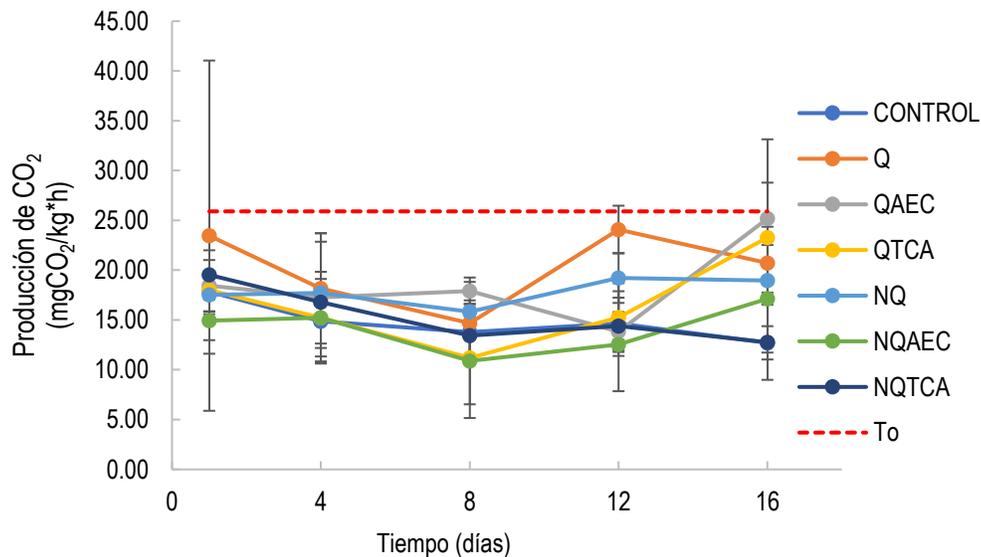
En un estudio realizado por Paul y Chen (1989), indicaron por primera vez que una menor tasa de pérdida de humedad en los frutos de pepino cubiertos con quitosano puede ser atribuido a que éste actúa como una barrera adicional contra la difusión a través de los estomas. En un estudio reportado en Irán, se usaron recubrimientos nanoestructurados de quitosano encapsulando aceite esencial de *Zataria multiflora* sobre frutos de pepino en postcosecha, e indican que lograron reducir la pérdida de peso, mantener la firmeza, disminuir la tasa de respiratoria y los recuentos microbianos durante el almacenamiento a 10 ° C (Mohammadi y col 2016). El pepino es 97 % agua y durante el proceso de respiración y senescencia, esta agua es gastada por el metabolismo de la fruta.

### 5.3.3.2. Producción de CO<sub>2</sub>.

Los resultados acerca de la producción de CO<sub>2</sub> de los frutos de pepino tratados con los recubrimientos se muestran en la Figura 13. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos evaluados durante el tiempo de almacenamiento ( $P = 0.148$ ). Estos resultados difieren de los obtenidos por Mohammadi y col., 2016, quienes reportan una reducción significativa de la tasa respiratoria en pepinos tratados con recubrimientos de NQ y NQAEC comparados con el control. Se ha reportado que la tasa respiratoria de los pepinos a 25° C es en promedio 23 mL CO<sub>2</sub>/Kg\*h, en este estudio los pepinos en condiciones de almacenamiento presentaron una tasa respiratoria menor (Suslow y Cantwell 2013).

En cuanto al tiempo de almacenamiento, se encontró que a partir del día 8 los frutos en el tratamiento de Q muestran un pequeño incremento en la producción de dióxido de carbono de 14.68 mL CO<sub>2</sub>/Kg\*h a 24.07mL CO<sub>2</sub>/Kg\*h a los 12 días ( $P = 0.036$ ). También se observa, que el tratamiento de QAEC alcanza un valor de 25.9 mL CO<sub>2</sub>/Kg\*h y el tratamiento de QTCA alcanzó un valor de 23.27 mL CO<sub>2</sub>/Kg\*h, para el día 16 de almacenamiento La producción de CO<sub>2</sub> es un buen indicador de calidad durante el almacenamiento (Mohammadi y col 2016). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en la tasa de respiración con los recubrimientos evaluados.

Por otro lado, durante la respiración, se pierde agua y los frutos de pepino están constituidos por el 96 % de agua. Como se sabe, durante la respiración se genera dióxido de carbono, liberándose agua y energía en forma de calor. Al existir una mayor tasa de respiración, en el pepino tendrá como consecuencia una mayor pérdida de peso, como lo observamos en la Figura 12. Y como existe una degradación de carbohidratos que forman parte de las estructuras celulares, la firmeza de los frutos también disminuye (Cuadro 4).



**Figura 13. Producción de CO<sub>2</sub> de frutos de pepino en condiciones de almacenamiento a 12°C por 16 días, tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado.** Kruskal-Wallis, tiempo:  $H = 10.282$ ;  $gl = 4$ ;  $P = 0.036$ . Tukey  $\alpha = 0.05$ . Recubrimientos: **Q**, quitosano; **QAEC**, quitosano y aceite esencial de canela; **QTCA**, quitosano y trans-cinamaldehído; **NQ**, quitosano nanoestructurado; **NQAEC**, quitosano nanoestructurado y aceite esencial de canela, **NQTCA**, quitosano nanoestructurado y trans-cinamaldehído. **T<sub>0</sub>**, valor de referencia para la tasa de respiración de los pepinos a una temperatura de 25 °C. Se muestra la media de seis mediciones. Las barras indican la desviación estándar.

Todo esto ocurre porque ya los frutos no se encuentran unidos a la planta madre, por lo tanto, usan sus reservas para generar energía y mantener sus procesos fisiológicos (López y col 2000). Al existir una menor tasa de respiración, el fruto sufre un proceso de deterioro menor o a una velocidad más reducida. Los recubrimientos comestibles a base de quitosano muestran reducir la tasa de respiración y conservar la calidad en condiciones de almacenamiento.

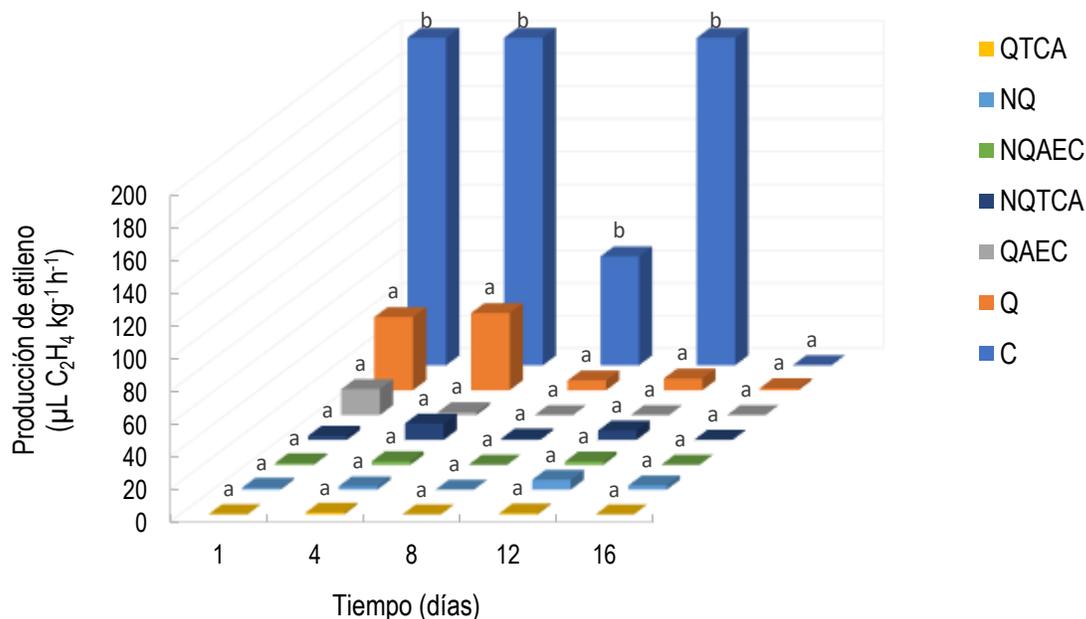
### 5.3.3.3. Producción de Etileno.

Se evaluó la producción de etileno de los frutos de pepino en cada uno de los tratamientos bajo condiciones de almacenamiento. El pepino es considerado un fruto que no emite grandes cantidades de etileno ( $0.1 - 1.0 \mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ), ya que es un fruto no climatérico. Sin embargo, es un fruto sensible a la presencia de etileno ambiental (1-5 ppm), acelerando el amarillamiento y haciéndolos más susceptibles a las pudriciones durante el almacenamiento (Suslow y Cantwell 2013). Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ( $P = 0.0055$ ). Todos los tratamientos presentaron menores valores de emisión de etileno durante todo el almacenamiento.

Cuando se colocó el recubrimiento a los frutos (Figura 14), se midió la producción de etileno, y se obtuvieron los siguientes valores: en el control ( $411.61 \mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y los tratamientos con Q ( $44.98 \mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), NQAEC ( $15.89 \mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), emitían el gas. La concentración encontrada para el resto de los tratamientos fue menor de  $2 \mu\text{l}$ . Al cuarto día de almacenamiento en condiciones controladas, la producción de etileno en el control disminuyó a el 50.18 % y al día ocho alcanzó 16.23 %. Posteriormente, al día 12 de almacenamiento la producción de etileno se elevó cuatro veces con respecto al día uno del almacenamiento.

De forma similar ocurrió con los tratamientos de Q y QAEC a medida que el tiempo de almacenamiento era mayor, la producción de etileno en ambos tratamientos disminuyó, hasta llegar a  $1 \mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  a los 16 días de almacenamiento. En el tratamiento con NQTCA se observó una producción de  $2.61 \mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  y al cuarto día de almacenamiento está se incrementó cinco veces en comparación al día uno. En el día ocho la emisión del gas fue cero, para luego incrementarse dos veces con respecto al inicio del ensayo. En el resto de

los tratamientos no se observó esta tendencia, la producción de etileno fue muy baja y en algunos casos no hubo emisión.



**Figura 14. Producción de etileno de frutos de pepino en condiciones de almacenamiento a 12°C por 16 días, tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado.** Duncan  $\alpha = 0.05$ , Tratamiento  $F = 3.39$ ;  $gl = 6$ ;  $P = 0.0055$ ; Tiempo  $F = 1.40$ ;  $gl = 4$ ;  $P = 0.2448$ ; Tratamiento x Tiempo  $F = 1.40$ ;  $gl = 6, 24$ ;  $P = 0.1412$ . Recubrimiento: **Q**, quitosano; **QAEC**, quitosano y aceite esencial de canela; **QTCA**, quitosano y trans-cinamaldehído; **NQ**, quitosano nanoestructurado; **NQAEC**, quitosano nanoestructurado y aceite esencial de canela, **NQTCA**, quitosano nanoestructurado y trans-cinamaldehído. Se muestra la media de seis mediciones.

Todos los frutos en el día 16 de almacenamiento, no produjeron etileno. También es importante mencionar que los recubrimientos no estimularon la producción de este. Lo que confirma que los frutos de pepino no producen grandes cantidades de etileno, a menos que se encuentren bajo condiciones de estrés o estén infectados con hongos, ya que estos microorganismos estimulan la producción de este gas y así, acelerar los procesos de deterioro de los frutos.

#### 5.3.4. Contenido de Clorofilas

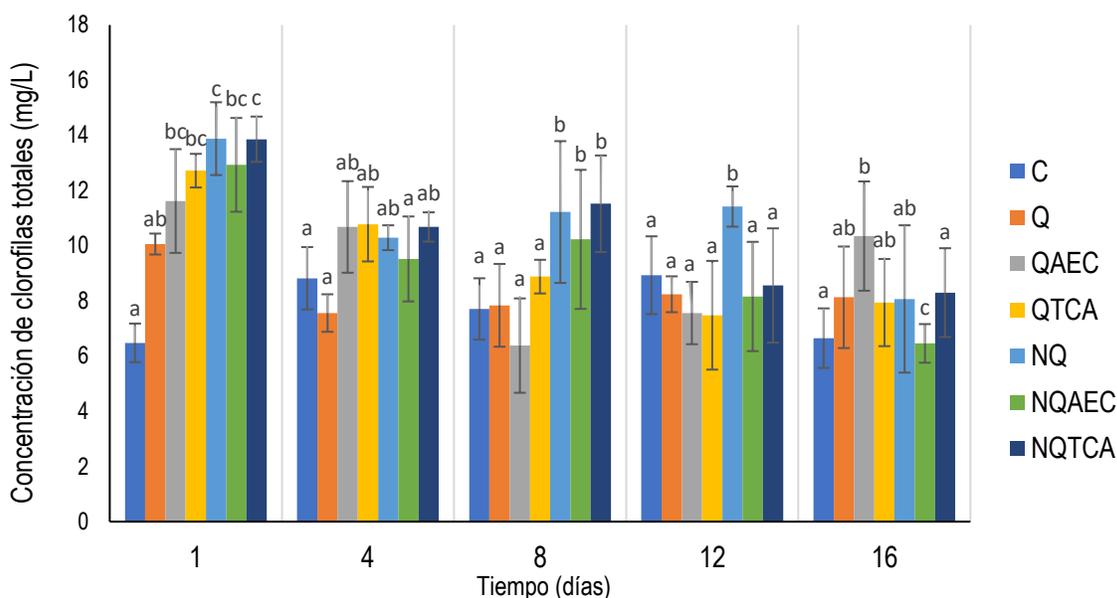
Se evaluó el contenido de clorofilas totales, ya que es la sustancia responsable del color verde de los frutos, el cual es uno de los índices de calidad más importante en el cultivo junto con la forma y la firmeza (Suslow y Cantwell 2012, Barraza-Álvarez 2015).

Al inicio del experimento el contenido de clorofilas totales en los frutos en cada uno de los tratamientos fue diferente ( $P < 0.001$ ), obteniendo mayores valores en los tratamientos con NQ y NQTCA, seguido de los tratamientos de QAEC, QTCA y NQAEC. Los valores más bajos se encontraron en el control y el tratamiento con Q.

A los cuatro días de almacenamiento (Figura 15), el contenido de clorofilas disminuyó en todos los tratamientos, encontrándose valores más bajos en el tratamiento con Q. En los días sucesivos, los frutos que se encontraban con el tratamiento de Q mantuvieron la concentración de clorofilas totales entre 7-10 mg/L. También podemos observar en la gráfica, que existe una disminución en el contenido de clorofilas totales mucho más lenta en los tratamientos con nanopartículas en comparación con los tratamientos que sólo contenían quitosano.

Las clorofilas son las moléculas que catalizan la fotosíntesis y son conocidas universalmente como el pigmento verde de todos los tejidos fotosintéticos de las plantas y se ubican dentro de los cloroplastos en grandes cantidades (Harbone 1984). En el proceso de maduración, está relacionado la concentración de etileno, el cambio en la coloración y la degradación de las clorofilas. Los frutos al producir una mayor cantidad de etileno, el amarillamiento es mayor y la síntesis de xantofilas se incrementa. La degradación de clorofilas puede estar dada por tres factores que incluyen cambios en el pH, sistemas

oxidativos y la actividad de las clorofilasas y estos procesos son acelerados por la respiración y la maduración (Hamzah y col 2013).



**Figura 15. contenido de clorofilas en frutos de pepino en condiciones de almacenamiento a 12°C por 16 días, tratados con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado.** Fisher  $\alpha = 0.05$ , Tratamiento F = 28.27; gl = 6;  $P = 0.0001$ ; Tiempo F = 60.85; gl = 4;  $P = 0.001$ ; Tratamiento x Tiempo F = 10.08; gl = 24;  $P = 0.0001$ . Recubrimiento: **Q**, quitosano; **QAEC**, quitosano y aceite esencial de canela; **QTCA**, quitosano y trans-cinamaldehído; **NQ**, quitosano nanoestructurado; **NQAEC**, quitosano nanoestructurado y aceite esencial de canela, **NQTCA**, quitosano nanoestructurado y trans-cinamaldehído. Letras diferentes significan diferencias estadísticas significativas. Se muestra la media de seis mediciones. Las barras indican la desviación estándar.

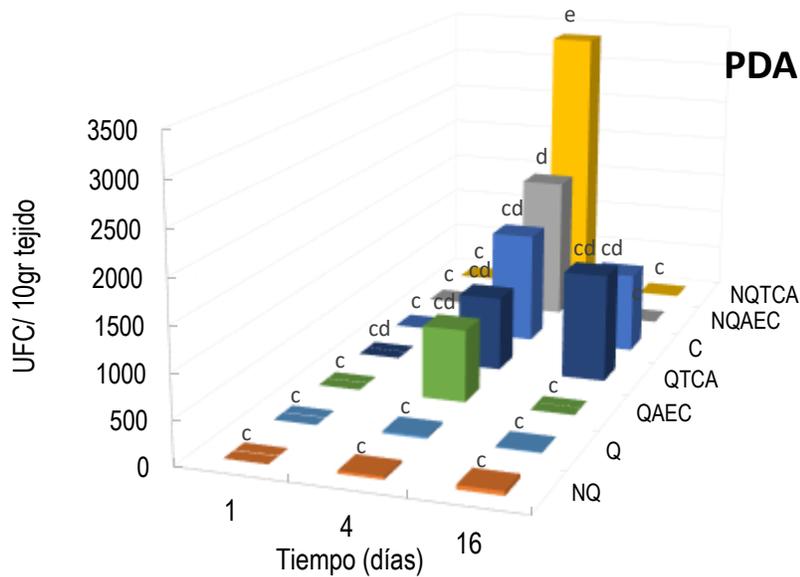
En los resultados obtenidos en este estudio, aunque no se encontraron diferencias en la tasa respiratoria de los frutos de pepino en los recubrimientos evaluados, vemos que aquellos que se encontraban recubiertos con NQ y NQTCA, mostraron mayores contenidos de clorofilas totales al final del almacenamiento, resultados que coinciden con los de

Mohammadi y col (2016), donde también se encontró una reducción de la tasa respiratoria en los frutos que se encontraban recubiertos con nanopartículas y por lo tanto un retraso en la degradación de clorofilas.

### **5.3.5. Carga Microbiológica**

La evaluación del componente microbiológico se realizó con la finalidad de conocer la cantidad de bacterias aerófilas, hongos y levaduras presentes en los frutos y evaluar su comportamiento frente a los recubrimientos empleados. En la Figura 16 y 17, se muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por cada uno de los tratamientos en dos medios de cultivos especializados para cada tipo de microorganismo.

El crecimiento de hongos y levaduras fue inhibido efectivamente con los recubrimientos aplicados con excepción del tratamiento de QTCA a los 16 días de almacenamiento. Los frutos con recubrimiento tuvieron menores cuentas microbianas ( $P = 0.0004$ ) en comparación con el control. En el día cero del almacenamiento no se observó crecimiento de hongos ni levaduras y luego de cuatro días de almacenamiento se observa un incremento del número de colonias en el tratamiento con NQTCA de 3350 UFC ( $P = 0.039$ ), pero al final del almacenamiento, no se registró el crecimiento de estos microorganismos. En los tratamientos de control, QAEC, QTCA y NQAEC hubo crecimiento microbiano cerca del 50 % observado en el tratamiento con NQTCA, siendo el más elevado para el tratamiento con NQAEC con 1693 UFC. Por el contrario, en los tratamientos con Q y NQ no hubo crecimiento o el crecimiento fue mínimo (promedio de 40 UFC en ambos tratamientos), en comparación con los tratamientos con AEC, TCA y nanopartículas.

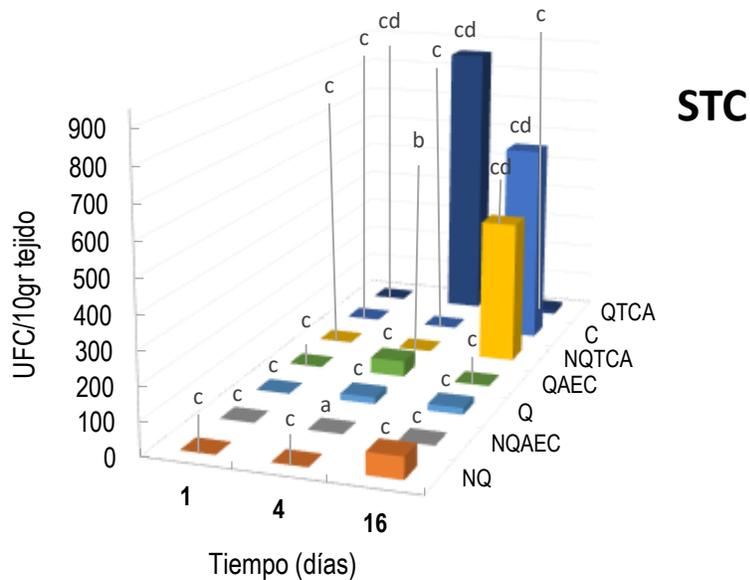


**Figura 16. Carga Microbiológica de los frutos de pepino tratados con los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado, a los 0, 4 y 16 días de almacenamiento a 12 °C.** Se muestran el promedio de UFC de hongos y levaduras en medio de cultivo papa-dextrosa (PDA). Tratamiento F = 3.24; p = 0.039; gl = 6; medio F = 12.82; P = 0.0004; gl = 1 Tratamiento x medio F = 1.30; P = 0.2569; gl = 6, 42. Letras diferentes muestran las diferencias entre los tratamientos en el tiempo. Se muestra la media de seis mediciones.

Para el caso de las bacterias aerófilas, se observó un comportamiento similar al observado con los hongos. En el día cero de almacenamiento, no se observó crecimiento de bacterias en ninguno de los tratamientos evaluados (Figura 17). Pero al cuarto día del almacenamiento se observó un incremento en el conteo de UFC en el tratamiento con QTCA (860 UFC, P = 0.039). También, hubo crecimiento en el tratamiento con Q y QAEC, pero estos se consideraron bajos en comparación con lo antes expresado. El resto de los tratamientos no mostraron crecimiento microbiano en este tiempo de almacenamiento. Para este mismo tiempo, no se observó crecimiento bacteria no en el control, NQ, NQAEC y NQTCA.

A los dieciséis días de almacenamiento, al contrario de lo observado en el día 4 el tratamiento que mayor cantidad de bacterias mostró fue el control y NQTCA (610 UFC y

435 UFC, respectivamente). No se observó crecimiento bacteriano en los tratamientos con QAEC y NQAEC.



**Figura 17. Carga Microbiológica de los frutos de pepino tratados con los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado, a los 0, 4 y 16 días de almacenamiento a 12 °C.** Se muestran el promedio de UFC de bacterias en medio de cultivo soya-tricaseína (STC). Tratamiento F = 3.24;  $P = 0.039$ ;  $gl = 6$ ; medio F = 12.82;  $P = 0.0004$ ;  $gl = 1$  Tratamiento x medio F = 1.30;  $P = 0.2569$ ;  $gl = 6, 42$ . Letras diferentes muestran las diferencias entre los tratamientos en el tiempo. Se muestra la media de seis mediciones. Las barras indican la desviación estándar.

En ambos casos, tanto para las bacterias como los hongos, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el tiempo de almacenamiento ( $P = 0.2569$ ). Esto quizás pudo estar debido a que los ensayos fueron diseñados para realizar muestreos destructivos para cada tiempo de almacenamiento, por lo que se presume que el número de microorganismos presentes en cada fruto es diferente, por lo que no se pudieron establecer diferencias

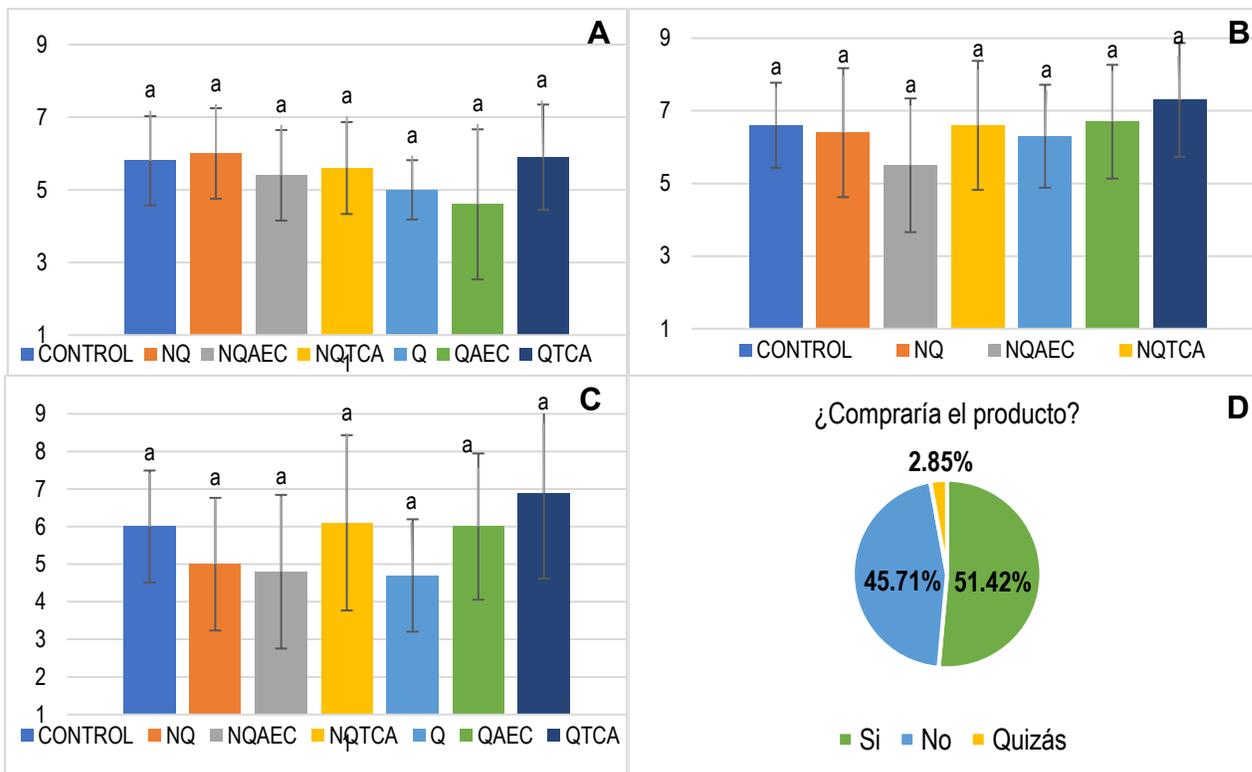
exactas en cuando al desarrollo de estos a lo largo del tiempo. Cada uno presentó un comportamiento.

En el estudio realizado por Mohammadi y col (2015), evaluaron el efecto de recubrimientos con nanopartículas de quitosano encapsulando aceite esencial y encontraron que este recubrimiento disminuyó las cuentas microbiológicas y calidad fisicoquímica de los pepinos. Los frutos recubiertos tenían un color más intenso, eran más firmes, mantuvieron el contenido de agua y mostraron recuentos microbianos más bajos ( $P < 0.05$ ) durante el almacenamiento. De acuerdo con estos resultados los recubrimientos nanoestructurados de quitosano encapsulando aceite esencial de canela pueden ser un método efectivo para extender la vida útil del pepino. Los resultados encontrados en este estudio resultaron ser mejores a los encontrados en la literatura, ya que se disminuyen las cuentas microbianas sin afectar la calidad comercial de los frutos de pepino. Ya que, la tasa de respiración se puede ver alterada por las malas condiciones de almacenamiento, por la temperatura inadecuada, por la presencia de etileno ambiental o por una infección fúngica. Este último factor, se vio reducido en este experimento, ya que el componente microbiológico fue bajo, a excepción del tratamiento con QTCA y NQTCA. También la presencia de hongos puede estimular, la producción de etileno ya que el hongo degrada el tejido y crea una condición de estrés (Figura 14), para los tratamientos de QTCA y NQTCA.

### **5.3.6. Pruebas de Aceptabilidad**

Para la evaluación de la aceptabilidad de las características principales en la calidad de los pepinos, se aplicó una prueba sensorial analítica discriminativa del tipo Escalar del control. Las pruebas discriminativas consisten en comparar dos o más muestras de un producto alimenticio (Hernández 2005). En este estudio se aplicó este tipo de prueba con la finalidad

de ver cuál era la respuesta de los comensales ante los frutos de pepino con cada uno de los recubrimientos empleados.



**Figura 18. Resultados de las pruebas de Aceptabilidad realizada a los frutos de pepino tratados con los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado, luego de 16 días de almacenamiento a 12 °C.** Aceptación por parte de 70 jueces. **A) color** de los frutos  $F = 1.12$ ;  $p = 0.3610$ ;  $gl = 6$ ; Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $gl = 63$ . **B) Aroma** de los frutos  $F = 0.96$ ;  $P < 0.4416$ ;  $gl = 6$ ; Tukey  $\alpha = 0.05$   $gl = 63$ . Escala: 1 = me disgusta extremadamente; 9 = me gusta extremadamente. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey  $\alpha = 0.05$ ). **C) Apariencia** de los frutos.  $F = 1.45$ ;  $P = 0.2100$ ;  $gl = 6$  Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $gl = 63$ ; error = 3.8254; EE = 0.62. Escala: 1 = me disgusta extremadamente; 9 = me gusta extremadamente Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey  $\alpha = 0.05$ ) y **D) Resultados de la encuesta**.

Cada persona fue escogida al azar dentro de la población del Ceprobi para que evaluaran el aroma y el color (Figura 18A y 18B). Para la mayoría de los jueces no hubo diferencias entre los frutos de pepino recubiertos con quitosano o nanopartículas ( $P = 0.3610$ ). Sin embargo, al evaluar el aroma, el tratamiento con QAEC obtuvo una mayor cantidad de

respuestas (“ni me gusta; ni me disgusta”), ya que tenían un olor dulce, característico del AEC. Los que mayor aceptación tuvieron en cuanto a el aroma, fueron el control, QTCA, NQ, NQTCA, (“Me gusta poco”). Quizás estos valores estuvieron debidos, a que los jueces indicaban no estar familiarizados con el olor natural de un fruto de pepino, sin que este se cortara (comunicación verbal).

En cuanto al color, se encontró que hubo una mayor aceptación por parte de los jueces, ya que para esta variable encontramos una calificación mucho mayor. Siendo el tratamiento con QTCA el que mostró una mayor aceptación (“Me gusta moderadamente”), seguido de los tratamientos QAEC, NQ, NQTCA y control. Como se explicó en los resultados de la apariencia, los frutos mostraron un color mucho más verde en los tratamientos con nanopartículas y el contenido de clorofilas en estos, fue más alto en el día 16 de almacenamiento. Los frutos que menos aceptación tuvieron fueron aquellos que se encontraban recubiertos con NQAEC (“ni me gusta; ni me disgusta”).

En cuanto a la apariencia en general, los frutos que mejor apariencia tenían eran aquellos que se encontraban recubiertos con QTCA (“me gusta moderadamente”), ya que estos frutos se mantenían con un color verde intenso, firmes al tacto y sin olores dulces ni desagradables (respuestas de las encuestas). Para los jueces, los frutos que peor apariencia mostraban eran los del tratamiento Q, NQ y NQAEC (“ni me gusta; ni me disgusta”). Y los que tuvieron una aceptación moderada, fueron aquellos que se encontraban en los tratamientos de QAEC, NQTCA y control (“Me gusta poco”).

Como vemos la apreciación (Figura 18C), de las personas para cada uno de los frutos con los diferentes recubrimientos, varía cuando se analizan por separado, pero en un análisis global, no encontraron diferencias en los frutos con recubrimiento de quitosano o nanopartículas, con respecto a un fruto que no tuviera ningún tipo de recubrimiento como

el control. Desde mi punto de vista esto es un resultado positivo, ya que los recubrimientos aquí empleados, pueden ser usados sin que estos modifiquen la apariencia de los frutos de pepino y en algunos casos (Q, NQ y NQTCA), sin que varíe su calidad comercial durante un tiempo prolongado de almacenamiento en condiciones controladas ( $12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) y su posterior exposición a la temperatura ambiente ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Además de considerar la opinión de los jueces, se les pidió que respondieran una pregunta en particular: ¿estaría usted dispuesto a comprar este producto? ¿por qué? El resultado a esta encuesta se muestra en la Figura 18D. Donde la mayoría de las personas comprarían los pepinos con los diferentes recubrimientos, y casi la mitad de las personas no adquirirían los frutos por diversas razones.

Haciendo un resumen de todos los efectos que tuvieron lugar y que tenían alguna relación entre sí de los fenómenos que se observaron en estos ensayos se vio que, al tener una mayor tasa de respiración, habrá una mayor degradación de carbohidratos estructurales por lo que se genera un cambio en la composición química en el interior del fruto, aumentando la cantidad de azúcares disponibles y pérdida en la firmeza. Como se mostró en estos resultados el uso de los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado, mostraron la capacidad de reducir estos efectos bajo condiciones de almacenamiento y en los tratamientos de Q, NQ y NQTCA, mantuvieron la apariencia y la calidad comercial de los frutos a temperatura ambiente.

Durante el proceso de maduración se pueden relacionar la producción de etileno, la degradación de clorofilas y el cambio de color. Como ya se dijo anteriormente, los frutos de pepino son susceptibles a la presencia de bajas concentraciones de etileno en el ambiente. Esto se logró observar en el control, donde la cantidad producida de etileno fue mucho

mayor a la que producen bajo condiciones normales de almacenamiento además, fueron los frutos que mostraron un mayor cambio de color al final del almacenamiento

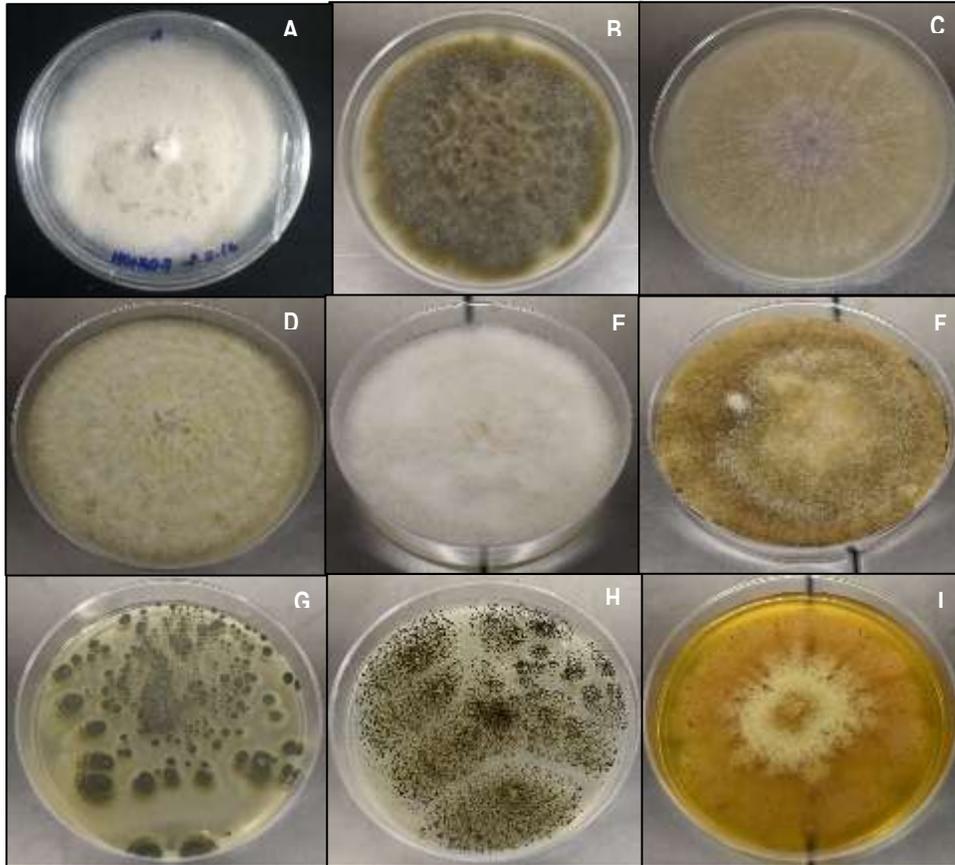
#### **5.4. Aislamiento de hongos fitopatógenos postcosecha de pepino.**

Se obtuvo el aislamiento de 133 hongos, se diferenciaron en 10 grupos morfológicos según las características culturales de cada colonia. El grupo morfológico uno (GM1, Figura 19A), constituido por 9 aislamientos, presentaron colonias planas con margen entero, de color oliváceos a gris oliváceo cubiertos de micelio aéreo muy blanquecino, avellanado inverso, con sectores gris pálido oliváceo a gris oliváceo y masas de conidios no visibles (Cuadro 5). El grupo morfológico dos (GM2), con 17 aislados, la mayoría de sus colonias fueron de color pardo aceituna a negro parduzco, chatas y algodonosas, esporulación moderada mostrando el micelio gris (Figura 19B).

El grupo morfológico tres (GM3), con 24 aislados, presentó colonias de color blanco a violeta claro con micelio aéreo lanoso de color blanco y borde entero, mostrando gran parecido con las colonias de *Fusarium oxysporum* (Figura 19C). El grupo morfológico cuatro (GM4), con 5 aislados, mostraron colonias de textura algodonosa de color amarillo oscuro, con zonación difusa desde el centro de la colonia al borde. Abundante micelio aéreo de color amarillo a crema y envés de color pardo. Estas colonias mostraron similitud con las de *Fusarium solani* (Figura 19D).

Las colonias del grupo morfológico cinco (GM5), con 5 aislados, fueron colonias con micelio aéreo lanoso de color rosado muy claro y en el centro rosado más oscuro y abundantes gúttulas hialinas (Figura 19E). El envés era de color blanco. En el grupo morfológico seis (GM6), con 6 aislados, las colonias presentaron abundante micelio aéreo de color amarillo

oscuro y envés de color marrón claro. El micelio presentaba una textura lanosa-algodonosa (Figura 19F).



**Figura 19. Fotografías de los grupos Morfológicos encontrados en el aislamiento de hongos de pepino postcosecha y la frecuencia de aparición** A) GM1, *Colletotrichum*; B) GM2, *Alternaria*; C) GM3, *Fusarium oxysporum*; D) GM4, *Fusarium solani*; E) GM5, *Fusarium*; F) GM6, *Fusarium*; G) GM7, *Penicillium*; H) GM8, *Aspergillus*; I) GM9, *Pythium*.

El grupo morfológico siete (GM7), con 11 aislados (Figura 19G), presentaron la mayor diversidad morfológica y de colores que iban del verde-grisáceo hasta el verde limón. Todos los aislado reunían las características culturales del género *Penicillium*, colonias ralas, sin micelio aéreo a colonias con aspecto algodonoso y de textura polvorienta. Algunas

presentaban bordes irregulares o circulares enteros de color blanco. Algunos tiñeron el medio de cultivo.

El grupo morfológico ocho (GM8), con 4 aislados, mostraron colonias de color negro, micelio blanco apenas visible, reverso incoloro y de textura granular a flocosa. Otras colonias de color oliváceo y ocasionalmente verde oscuras, micelio blanco, apenas visible, reverso generalmente incoloro y a veces amarillo pálido. Colonia flocosa, especialmente en la zona central (Figura 19H).

El grupo morfológico nueve (GM9), con 3 aislados, presentaron colonias de color blanco con abundante micelio aéreo con textura lanosa. Luego de 7 días de crecimiento el aislado tiñó el medio de color amarillo, se formaron zonaciones con un micelio mucho más denso en el centro de la colonia y hundido hacia los bordes (Figura 19I).

El grupo morfológico diez (GM10), con 39 aislados, estuvo constituido por colonias de diferentes macromorfologías y con frecuencias muy bajas, lo que no permitió agruparlos según sus características. Estos fueron considerados saprófitos y no se incluyeron dentro del presente estudio. En el cuadro 8 se muestran las frecuencias de aparición para cada grupo morfológico encontrado. Los grupos con mayor frecuencia de aparición fueron el GM2, GM3 y GM7. Seguidos de los grupos GM1, GM4, GM5, GM6, GM8 y GM9.

**Cuadro 5: Grupos Morfológicos encontrados en el aislamiento de hongos de pepino postcosecha y la frecuencia de aparición  $fa=N/Nt$ .**

<b>Grupo Morfológico</b>	<b>Género<sup>£</sup></b>	<b>Frecuencia de Aparición</b>	<b>Número de Aislados</b>
<b>GM1</b>	<i>Colletotrichum</i>	0,0676	9
<b>GM2</b>	<i>Alternaria</i>	0,1278	17
<b>GM3</b>	<i>Fusarium</i>	0,1804	24
<b>GM4</b>	<i>Fusarium</i>	0,0375	5
<b>GM5</b>	<i>Fusarium</i>	0,0375	5
<b>GM6</b>	<i>Fusarium</i>	0,0451	6
<b>GM7</b>	<i>Penicillium</i>	0,0827	11
<b>GM8</b>	<i>Aspergillus</i>	0,0300	4
<b>GM9</b>	<i>Pythium</i>	0,0225	3
<b>GM10</b>	Saprófitos	-	39

£: se determinó el género mediante el uso de la clave taxonómica de Barner y Hunter, Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 1998.

En un estudio realizado en Pakistán, Fatima y col (2009), reportaron la prevalencia de hongos fitopatógenos postcosecha en frutas y vegetales. Lograron identificar 14 especies de hongos en 25 especies de frutas y vegetales. En frutos de pepino reportaron a las especies *Fusarium solani*, *Cladosporium cladosporoides* y *Geotrichum candidum*, siendo este último el que presentó una mayor incidencia. En 2011, Meyhar y col., realizaron el aislamiento de los mohos predominantes en manzanas, pepinos y tomates frescos almacenados en bolsas plásticas a 4 °C. Encontraron siete especies de hongos *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger* en manzanas, *Penicillium oxalicum* y *Cladosporium cucumerum* en pepino y *P. expansum* y *Cladosporium fulvum* en tomate. Concluyen que los hongos del género *Penicillium* fueron los más abundantes en los tres frutos, siendo *P. oxalicum* el más abundante en pepino.

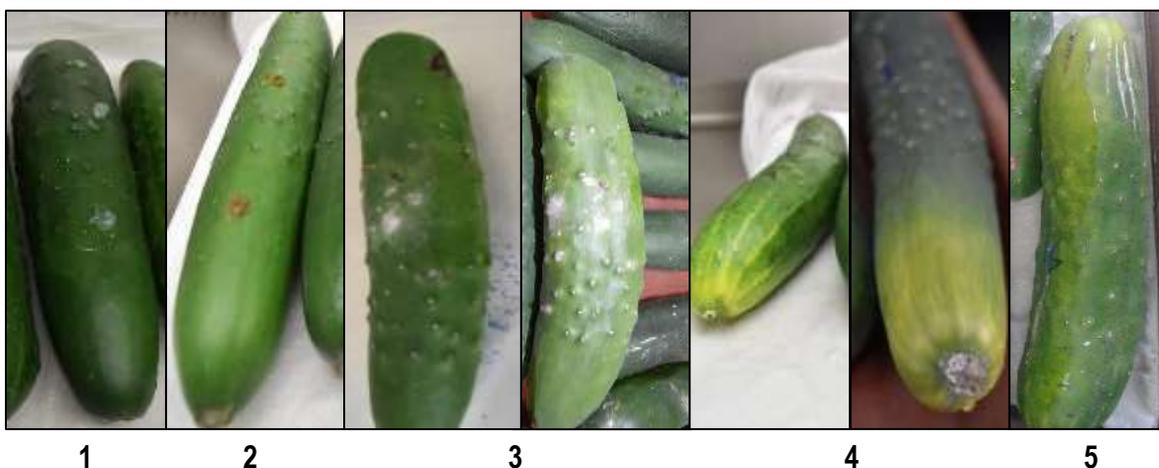
Núñez-Ríos y col (2012), realizaron un estudio de aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos en el cultivo de pepino para determinar el agente responsable de la necrosis de las flores y la pudrición de los frutos en el Estado de Morelos. Reportaron una incidencia

de la enfermedad entre el 40 y 50 % de los cultivos, logrando aislar 200 hongos a partir del síntoma de tizón, y el 88 % de éstos estaba representado por 74 % *Botrytis*, 10 % *Alternaria* y 2 % *Aspergillus*. De los frutos con síntomas de pudrición lograron aislar 100 hongos representados por los géneros *Botrytis* (74 %), *Aspergillus* (15 %), *Fusarium* (6 %) y *Cladosporium* (5 %). Estos resultados son consistentes con los encontrados en este estudio, ya que de los frutos de pepino se logró el aislamiento de hongos del género *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Lo que indica que la inoculación de estos hongos se da durante su desarrollo en campo causando pérdidas económicas durante la cosecha y aquellos frutos que llegan al almacenamiento para su distribución se ven severamente afectados por las pudriciones causadas por estos hongos en postcosecha.

Todos estos trabajos nos muestran que existe una diversidad de especies de hongos que son responsables del deterioro en postcosecha de los frutos y vegetales, sin embargo, cada cultivo tiene ciertas especies asociadas y otros resultan ser más cosmopolitas, como las del género *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, reportados como causantes de pudriciones en postcosecha. El deterioro microbiano, es causado especialmente por microorganismos que crecen sobre la superficie de los frutos y vegetales frescos, siendo esto la primera causa de la disminución de su vida útil (Jay y col 2005).

#### **5.4.1. Pruebas de Patogenicidad**

De los nueve aislados inoculados, sólo cuatro causaron síntomas severos de infección y los otros cinco aislados no causaron síntomas en los frutos. De estos resultados se creó una escala de severidad (Figura 20), para los hongos postcosecha de frutos de pepino.



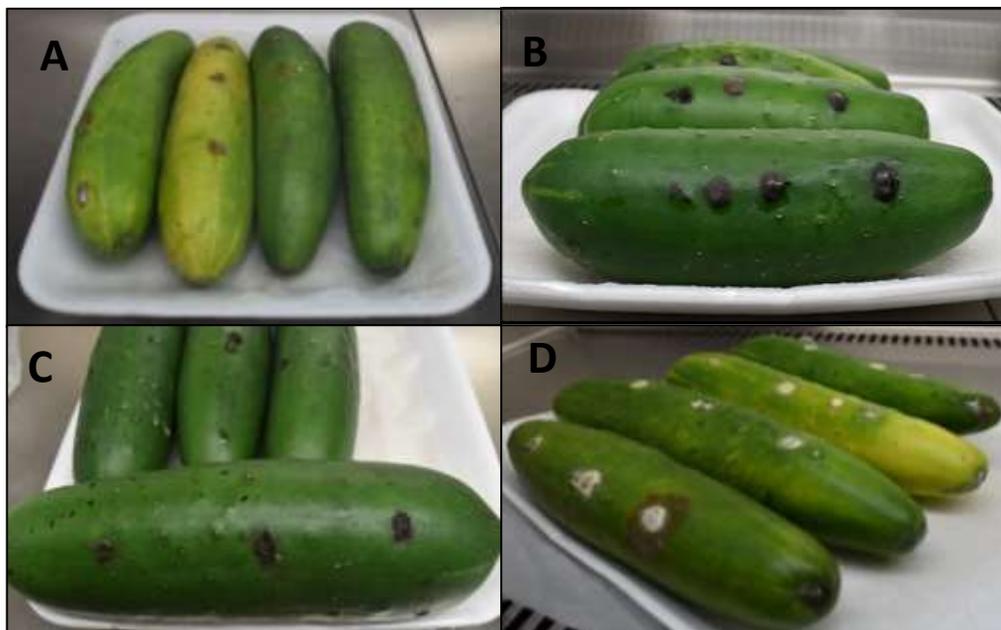
**Figura 20. Escala de Severidad.** 1) Sin cambios de color, textura ni crecimiento micelial; 2) Crecimiento micelial sin causar cambios en el color y la textura; 3) Crecimiento micelial con cambios en el color del fruto de verde a verde amarillento, pérdida del 10-20% de la firmeza; 4) Crecimiento micelial, ablandamiento del tejido, cambios de color en 1/3 del tamaño del fruto, pérdida de la firmeza entre 30-50%; 5) Crecimiento sobre el tejido, amarillamiento en más de 2/3 del tamaño del fruto, pérdida de la firmeza entre 50-70%, oscurecimiento en el sitio de inoculación.

El aislado No. 53GM4, a las 24 horas de inoculado ya mostraba crecimiento sobre la superficie del fruto. Una vez transcurridas 72 horas en todos los discos inoculados, había crecimiento micelial de 3mm sobre la superficie del fruto, formándose un pequeño halo amarillo en el punto de inoculación. Ya a las 120 horas más del 50% había perdido el color verde intenso y se tornó amarillo, en el sitio de inoculación se observó hundimiento del tejido, ablandamiento y abundante esporulación (Figuras 21A). Se obtuvo una incidencia de 91.66%. Este hongo fue el más severo de todos los aislados inoculados alcanzando un valor de cinco en la escala.

El aislado No. 3GM1, a las 72 horas ya se observó crecimiento micelar sobre el tejido de 5mm y las 120 horas ya había colonizado el tejido causando ablandamientos, ennegrecimiento alrededor de la zona de crecimiento. Por lo que se le asignó un valor de la escala tres. Su incidencia fue del 100 % a las 192 horas de inoculado (Figura 21B).

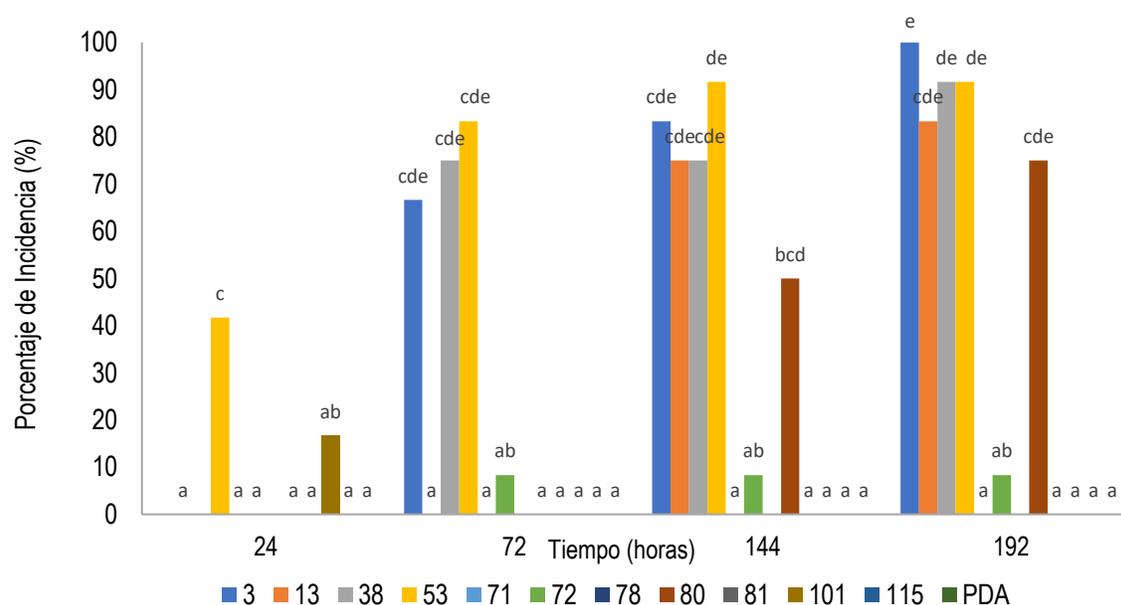
El aislado No. 80GM8, mostró síntomas de infección a las 144 horas alcanzando una incidencia de 49.95 % causando clorosis alrededor del sitio de inoculación y producción de abundantes esporas (Figura 21C). A las 192 horas después de la inoculación el hongo alcanzó una severidad de 74.99% y se hicieron más visibles los síntomas amarillamiento del fruto, un halo clorótico alrededor del sitio de inoculación y abundante producción de esporas.

El aislado No. 38GM3, no mostró síntomas de infección hasta las 72 horas de inoculado causando ablandamiento y con abundante esporulación, alcanzando el 70% de incidencia. Una vez transcurridas las 192 horas, todos los sitios de inoculación mostraban daños sobre el tejido de fruto, ablandamientos, oscurecimiento y amarillamiento en el 50% de la superficie de los frutos. Según la escala de severidad se obtuvo un valor para éste aislado de cuatro (Figura 21D).

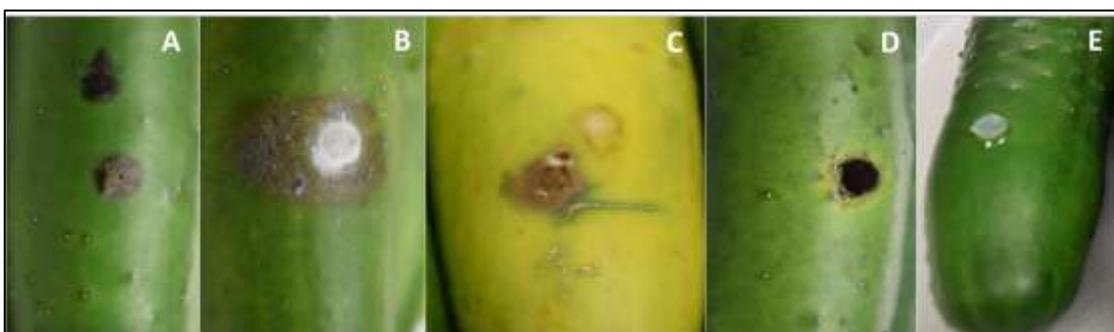


**Figura 21. Severidad de los aislados de pepino. A)** No. 53GM4, *Fusarium* a las 120 horas de inoculación; **B)** No. 3GM1, *Colletotrichum*; **C)** No. 80GM8; *Aspergillus* **D)** No. 38GM4 *Fusarium*.

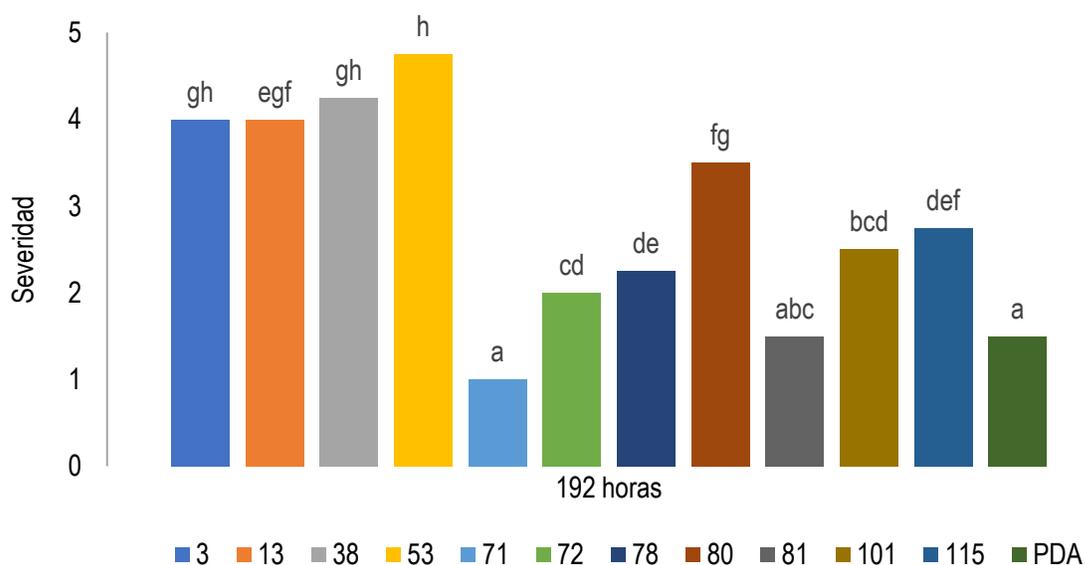
Estos resultados muestran que los aislados No. 3GM1, No. 38GM3, No. 53GM4 y No. 80GM8 fueron los que causaron mayor daño a las 192 horas de inoculados sobre pepinos sanos, y tuvieron los mayores porcentajes de incidencia, más no una frecuencia de aparición alta. La escala de severidad refleja que No. 53GM4 fue el hongo que causó mayor daño en los frutos de pepino.



**Figura 22. Incidencia de un aislado de cada grupos Morfológicos encontrados en el aislamiento de hongos de pepino postcosecha.** No. 3GM1, *Colletotrichum*; No. 13GM2, *Alternaria*; No. 38GM3, *Fusarium*; No. 53GM4, *Fusarium*; GM7, No. 71 y 72 *Penicillium*; GM8, No. 78, 80 y 81 *Aspergillus*. Hongo:  $F= 60.56$ ;  $p< 0.001$ ;  $gl=11$  Tiempo:  $F=44.05$ ;  $p < 0.0001$ ;  $gl= 3$  tiempo x hongo:  $F= 8.37$ ;  $p< 0.001$ ;  $gl= 33, 142$ . Se muestra la media de tres mediciones.



**Figura 23. Fotografías de los resultados de las pruebas de patogenicidad con los hongos de pepino postcosecha.** A) GM1, *Colletotrichum* (aislado 3); B) GM3, *Fusarium* (aislado 38) C) GM4, *Fusarium* (aislado 53); D) *Aspergillus* (aislado 80); E) Control negativo, discos de PDA.



**Figura 24. Severidad grupos morfológicos encontrados en el aislamiento de hongos de pepino postcosecha.** No. 3GM1, *Colletotrichum*; No. 13GM2, *Alternaria*; No. 38GM3, *Fusarium*; No. 53GM4, *Fusarium*; GM7, No. 71 y 72 *Penicillium*; GM8, No. 78, 80 y 81 *Aspergillus* Severidad hongo:  $F=7.74$ ;  $p < 0.0001$ ;  $gl= 1$ . Se muestra la media de tres mediciones.

En un estudio publicado por Jarvis y col (1991), realizaron pruebas de patogenicidad sobre frutos maduros de tres cultivares de pepino con tres aislados del género *Penicillium* encontrando que, las tres variedades desarrollaron síntomas de infección en las heridas hechas sobre los frutos y los frutos que no fueron heridos no desarrollaron síntomas. Estos resultados son semejantes a los encontrados en este estudio donde los aislados de *Penicillium* no causaron síntomas tan severos sobre los frutos de pepino, ya que estos hongos infectan el tejido vegetal mediante heridas o daños mecánico y la inoculación se realizó mediante una pequeña punción de la superficie del tejido y con discos de micelio, retardando así, el proceso de infección.

#### **5.4.2. Caracterización morfológica e identificación molecular de los aislados**

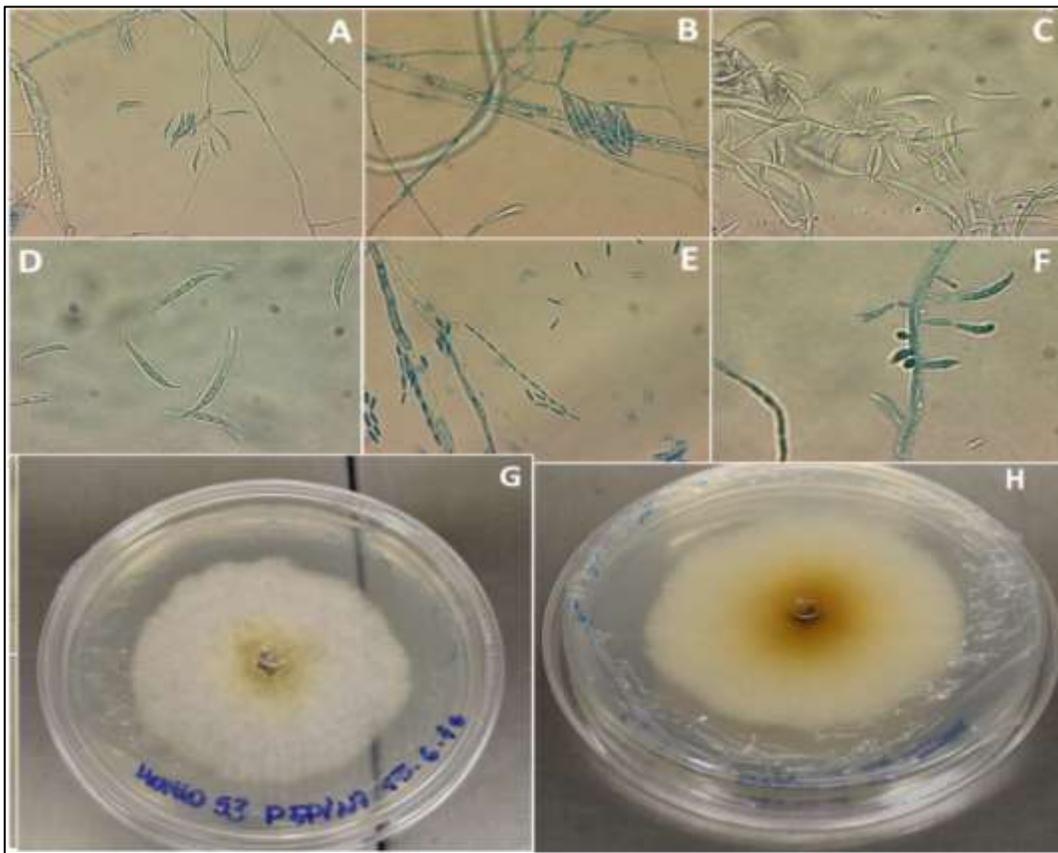
Los hongos seleccionados fueron identificados morfológicamente como *Fusarium solani* (aislado No. 53GM4), *Fusarium oxysporum* (aislado No. 38GM3), y *Aspergillus niger* (aislado No. 80GM8). No todos produjeron estructuras reproductivas en los medios de cultivos evaluados: los aislados No.3GM1 (*Colletotrichum*), No.13GM2 (*Alternaria*), No.73GM7 (*Penicillium*). A pesar de ello, se logró la identificación molecular. *Fusarium solani* (Figura 25A-H). Las características micromorfológicas se describen en el cuadro 8.

**Cuadro 6:** Características morfológicas y del cultivo del aislado *Fusarium solani* aislado de pepinos en postcosecha.

	<i>Fusarium solani</i>	Referencia literatura
<b>Tasa de crecimiento</b>		
PDA 28°C	5.21mm día <sup>-1</sup>	
Czpaek 28°C	7.38mm día <sup>-1</sup>	
Extracto de Malta 28°C	7.55mm día <sup>-1</sup>	
<b>Color</b>		
micelio	Crema	Blanco a crema
envés	Centro marrón, borde amarillo	Violeta a marrones
<b>Aspecto de micelio</b>		
textura	Algodonosa	Escaso
envés	zonado	-
<b>Macroconidios</b>		
Esporodoquios	ausentes	Abundantes
Forma	Largos, ligeramente curvados	Anchos, rectos
Célula apical	papilada	Roma y redondeada
Célula basal	pie	Marcadamente en forma de pie, o redondeada
Abundancia	abundantes	Abundantes en esporodoquios
Número de septos	3	5-7
<b>Microconidios</b>		
Forma	Cadenas, ovals	Oval, elipside, reniforme o fusiforme
Septos	Sin septos	0-1
Presencia en el micelio aéreo	pocos	En falsas cabezas
Célula conodiógena	monofiálides	Monofiálides alargadas
<b>Clamidosporas</b>		
PDA	ausentes	Abundantes a las 2 semanas
Czapek	ausentes	
Extracto de malta	ausentes	

Referencia: *The Fusarium Laboratory Manual*

Leslie, J F, Summerell B A, Bullock S. 2006



**Figura 25. Características macro y micromorfológicas de *Fusarium solani*.** A) Esporodocios; B, C, D y F) macroconidios en monofialides; E) Microconidios y micelio; G-H) Colonias circulares de color amarillo en el centro y crema hacia los extremos, aspecto algodonoso-umbulado (medio AEM).

En la colonia de *Fusarium oxysporum* no se observó la presencia de exudados ni esporodocios (Figura 26D y E). La caracterización del hongo se hizo en medio Czapek (Cuadro 7). Las clamidosoras son abundantes en agar hoja de clavel (CLA). Este hongo ha sido reportado como uno de los más importantes en el cultivo de pepino, en el cual se han encontrado dos formas especiales: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J. H.

Owen, responsable de la marchitez y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* D.

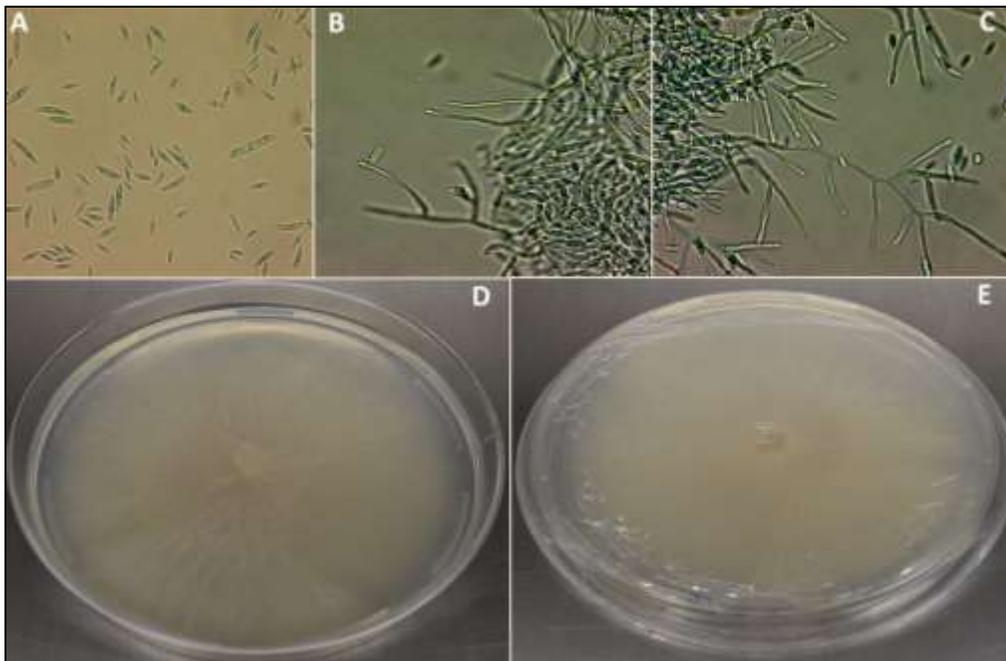
J. Vakalounakis causante de la pudrición de la raíz y el tallo (Vakalounakis y col 2004)

**Cuadro 7:** Características morfológicas y del cultivo del aislado *Fusarium oxysporum* aislado de pepinos en postcosecha.

	<i>Fusarium oxysporum</i>	Referencia literatura
<b>Tasa de crecimiento</b>		
PDA 28°C	7.72 mm día <sup>-1</sup>	8.38 mm día <sup>-1</sup>
Czpaek 28°C	7.44 mm día <sup>-1</sup>	-
Extracto de Malta 28°C	8 mm día <sup>-1</sup>	-
<b>Color</b>		
micelio	Blanco-violeta claro	Blanco a violeta claro
envés	Amarillo-violeta	Violeta claro a oscuro hasta magenta
<b>Aspecto del micelio</b>		
textura	Escaso/algodonoso	flocosa
<b>Macroconidios</b>		
Esporodocios	Ausentes	Naranjas y abundantes
Forma	-	Rectos, delgados y paredes delgadas
Célula apical	-	Cónica y curvada
Célula basal	-	En forma de pie o punteaguda
Abundancia	ausentes	escasos
Número de septos	-	3
<b>Microconidios</b>		
Forma	Truncados	Ovales, elípticos o forma de riñón
Septos	0	0
Presencia en el micelio aéreo	En falsas cabezas	En falsas cabezas
Célula conodiógena	Corta en momofiálides largas	Cortas en monofiálides
<b>Clamidosporas</b>		
PDA	Ausentes	-
Czapek	Ausentes	-
Extracto de malta	Ausentes	-

Referencia: *The Fusarium Laboratory Manual*

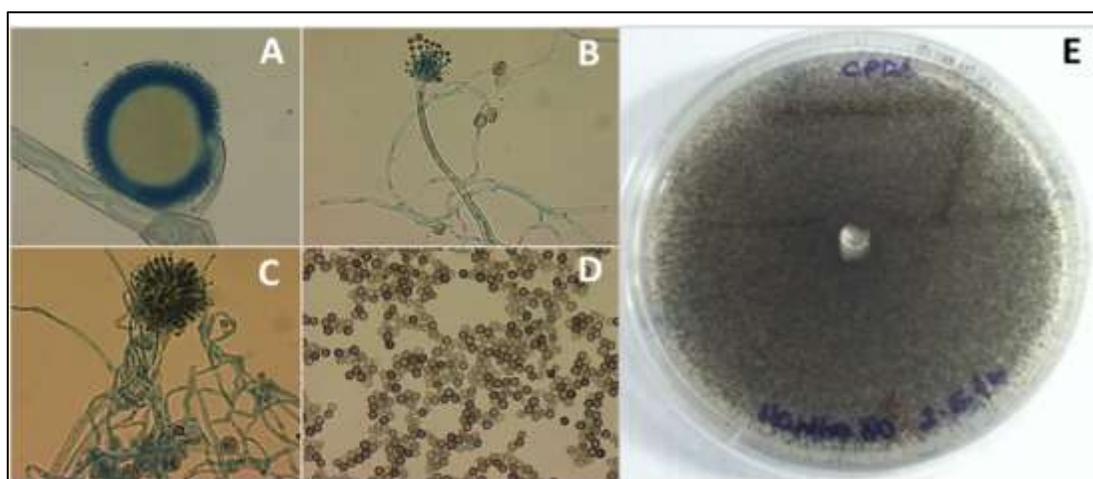
Leslie, J F, Summerell B A, Bullock S. 2006



**Figura 26. Características macro y micromorfológicas de *Fusarium oxysporum*.** A) microconidios; B) monofiálides y microconidios; C) polifiálide, células conidiogénicas D) Colonias circulares algodonosas de color blanco y centro violeta claro, envés de color amarillo y centro violeta (Medio Cz).

**Cuadro 8:** Características morfológicas y del cultivo del aislado *Aspergillus niger* aislado de pepinos en postcosecha.

		<i>Aspergillus niger</i>	Referencia literatura
<b>Tasa de crecimiento</b>	PDA 28°C	5.58 mm día <sup>-1</sup>	50-70 mm día <sup>-1</sup>
	Czpaek 28°C	5.38 mm día <sup>-1</sup>	
	Extracto de Malta 28°C	5.64 mm día <sup>-1</sup>	
<b>Micelio</b>	color	negro	negro
	aspecto	granuloso-flocoso	granuloso
	envés	Incoloro	blanco
<b>Estipe</b>	longitud		400-3000 µm
	color	Hialinos/lisos de color verde olivo	
<b>Vesícula</b>	anchura	-	30-75 µm
	forma	esférica	esférica
<b>Métulas</b>	tamaño	-	12-20 µm
<b>Fiálides</b>	longitud	-	7-10 x 3 x 6 µm
<b>Conidios</b>	longitud	-	7-10 x 3 x 6 µm
	tamaño	-	3.5-4.5 µm



**Figura 27. Características macro y micromorfológicas de *Aspergillus niger*.** A) Conidióforo 20X; B) Fiálides y conidios; C) conidióforo 40X, D) Conidios y E) Colonias circular de color negro de aspecto granular-flocosa, envés de color blanco (medio Cz).

**Cuadro 9:** Características morfológicas del aislado *Alternaria alternata* aislado de pepinos en postcosecha.

		<i>Alternaria alternata</i>	Referencia literatura
<b>Tasa de crecimiento</b>			
	Czpaek 27°C	-	56-63 mm día <sup>-1</sup>
	Extracto de Malta 28°C	-	40-45 mm día <sup>-1</sup>
<b>Color</b>			
	micelio	Verde oliváceo	Verde grisáceo
	envés	Negro, borde claro	Negro parduzco
<b>Aspecto de micelio</b>			
	textura	Algodonosa	Algodonosa/plana
<b>Conidios</b>			
	Forma	De botella septada	dictosporas
	color	marrón	pardos

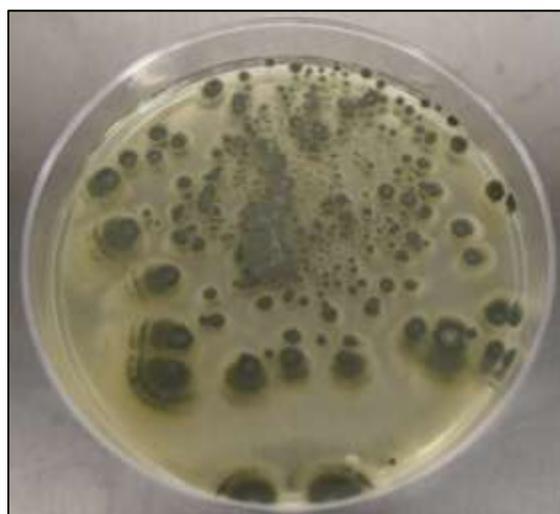


**Figura 28.** Cultivo de *Alternaria alternata* en medio de cultivo papa-dextrosa.

La especie *Penicillium oxalicum* fue reportada por primera vez en pepino postcosecha por Jarvis y Barrie (1988), causando pudriciones en tallo y pudriciones en frutos almacenados, posteriormente Jarvis y col (1991), hacen un segundo reporte de esta especie como el potencial responsable de las pudriciones en tomate durante el almacenamiento. Los hongos del género *Penicillium* producen toxinas que son almacenadas en los tejidos de los frutos *P. oxalicum* produce en los medios de cultivo cristales de oxalato de calcio entre otras.

**Cuadro 10:** Características morfológicas del aislado *Penicillium oxalicum* aislado de pepinos en postcosecha.

	<i>Penicillium oxalicum</i>	Referencia literatura
<b>Tasa de crecimiento</b> Czpaek 22-24 °C	-	5 cm/semana
<b>Color</b>		
micelio	Blanco en el borde verde grisáceo	Borde blanco y azul verdoso centro de la colonia
envés	blanco	amarillo
<b>Aspecto de colonia</b>		
textura	Aterciopelada	Planas aterciopeladas



**Figura 29.** Cultivo de *Penicillium oxalicum* en medio de cultivo papa-dextrosa.

Se logró la identificación de los aislados de hongos de frutos de pepino en postcosecha. Como ya se explicó se tomó un aislado de cada grupo morfológico, se realizaron las pruebas de patogenicidad y sólo aquellos aislados que causaron síntomas de infección fúngica, fueron identificados. En el cuadro 11, se muestra los resultados de la secuenciación de los ITS enviados por el Laboratorio BioPath, México.

**Cuadro 11.** Identificación molecular de un aislado de cada grupo morfológico y que causaron síntomas de infección en las pruebas de patogenicidad.

Muestra	Especie propuesta	Especie identificada	Similitud (%)
53	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	99.8
38	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
80	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	99.8
13	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100
72	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	100

Como se puede apreciar se logró la identificación de cinco, corroborando la identificación realizada por descripción de la morfología de cada hongo. El aislado No.53 se identificó como *Fusarium solani*. Este hongo ha sido reportado como un patógeno importantes en las pudriciones en postcosecha del fruto de pepino. La inoculación de este hongo se da en el campo, causando infecciones vasculares en las plantas de pepino y muchas de las esporas quedan atrapadas en el interior de las flores. La mayoría de los hongos encontrados en el género *Fusarium*, han sido reportados como importantes patógenos del suelo y recordando cómo es la biología del cultivo de pepino, las plantas se desarrollan al ras del suelo y en consecuencia sus frutos. Si no existe un buen manejo de los frutos durante la cosecha (limpieza, lavado, etc.), las esporas presentes en el suelo quedan adheridas a la superficie de los frutos, causando en almacenamiento infecciones.

Es importante mencionar, que los hongos del género *Fusarium*, tienen dentro de su metabolismo una batería de encimas (quitinasas, glucanasas, peroxidasas), que le permiten

ingresar dentro del tejido vegetal sin la necesidad de que exista una herida o abertura natural. Estos mecanismos de penetración hacen a los hongos del género *Fusarium*, en este caso *Fusarium solani*, uno de los hongos más exitosos en cuanto a la infección de plantas, ya que la cantidad de hospederos en diferentes familias es elevada.

### **5.5. Incidencia y severidad de *Fusarium solani***

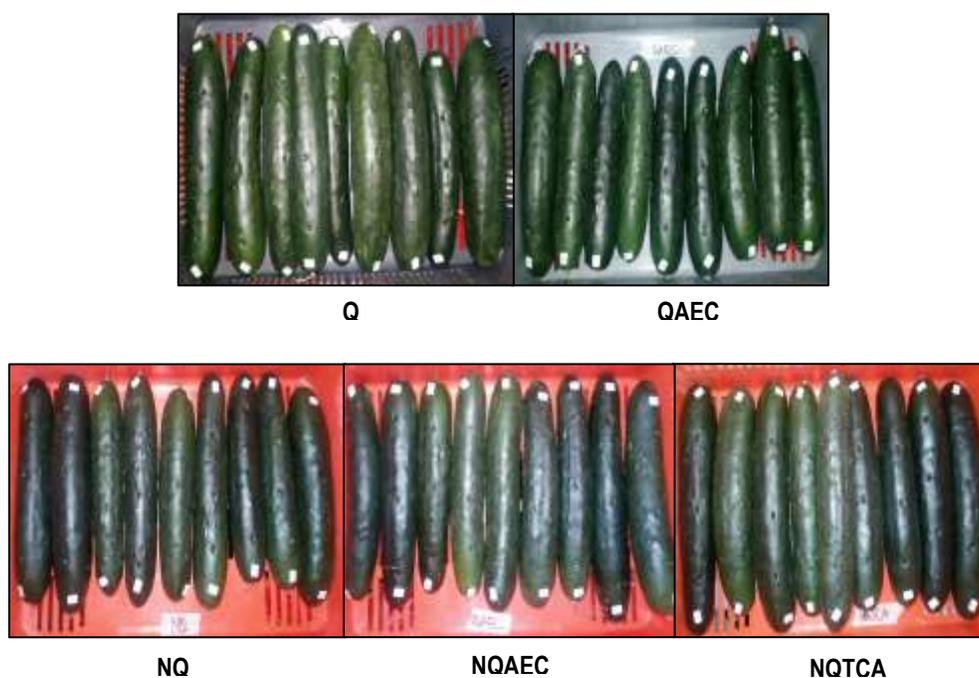
Se evaluó la capacidad de los recubrimientos en inhibir el desarrollo de la infección causada por *Fusarium solani* sobre frutos de pepino en postcosecha bajo condiciones de almacenamiento y posteriormente a temperatura ambiente. Durante los primeros dos días de almacenamiento, no se observó el desarrollo de la infección (Figura 30). Esta comenzó a aparecer al día cinco, con crecimiento micelial dentro de las heridas (Figura 31).

Cuando se realizó la revisión de los frutos luego de ocho días de almacenamiento bajo condiciones controladas, se observó el crecimiento profuso dentro de la herida el *F. solani*. El control tuvo el 62.96 % de incidencia, los tratamientos de QTCA con 48.14 %, NQ con 55 %, Q y QAEC ambos con 77.77 %, NQAEC y NQTCA ambos con 81.48 % de incidencia. Los frutos ya presentaban un 25 % de la superficie con amarillamiento comenzando desde los extremos, pérdida de peso y algunos frutos mostraron daño por frío (NQAEC).

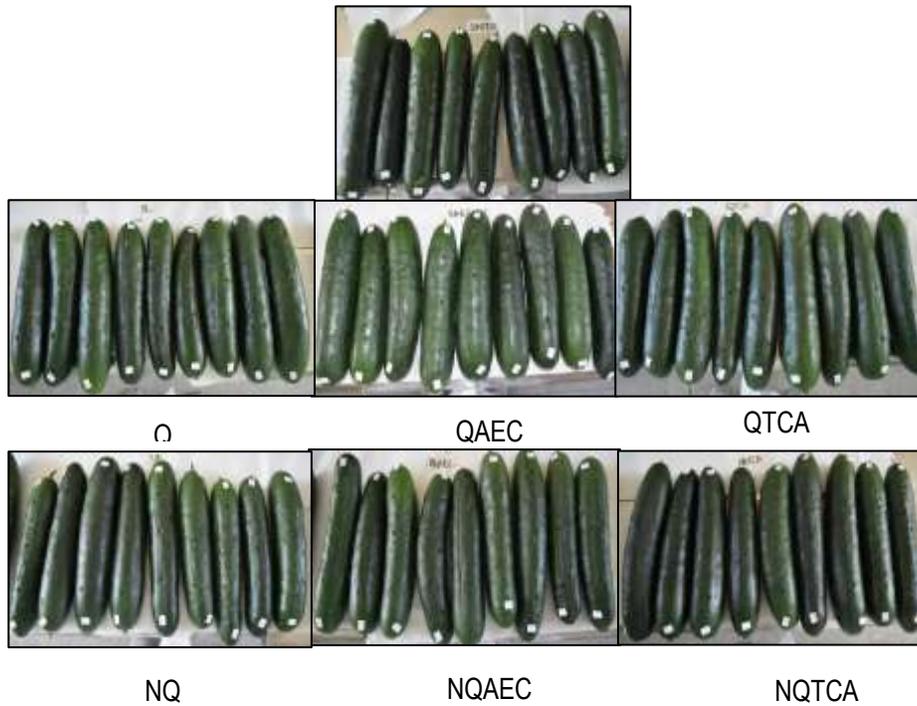
Para el día nueve de inoculación (Figura 32). Los frutos ya mostraban síntomas de infección. El control tuvo un 66.66 % de incidencia los frutos presentaban amarillamiento leve en el 75 % de la superficie del fruto, arrugamiento en los extremos y algunas de las heridas (3/27), secretaban carbohidratos. Los frutos con el recubrimiento de Q en el noveno día de almacenamiento tuvieron el 70.04 % de incidencia, no mostraban amarillamientos generalizados en la superficie de los frutos, más de la mitad mostraba arrugamiento en los

extremos de los frutos y con abundantes pecas o pústulas de color verde intenso en toda la piel de los frutos.

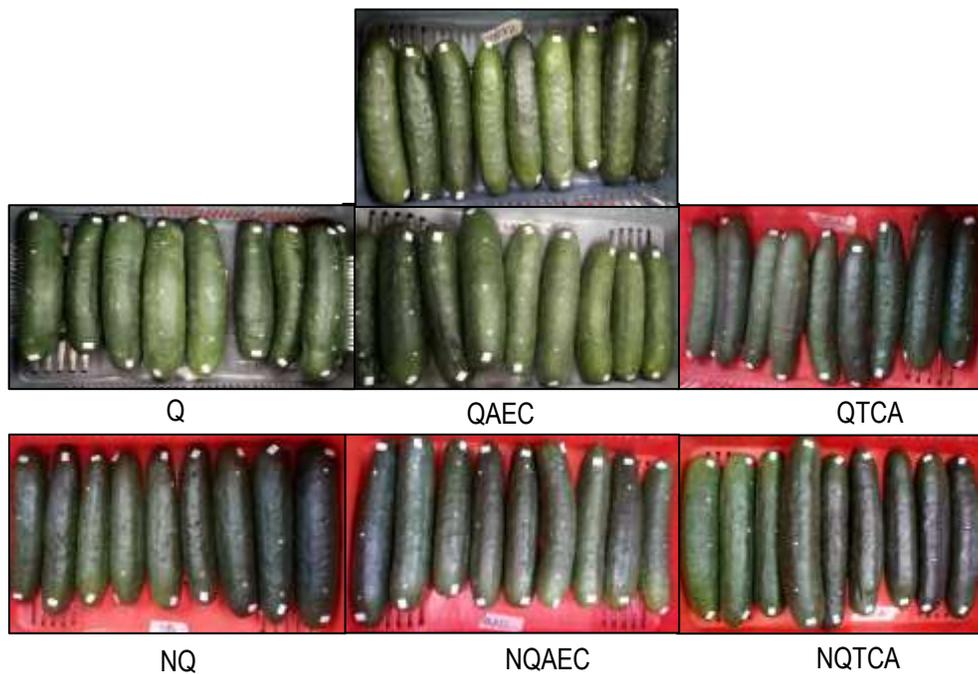
En los tratamientos de QAEC y NQAEC, se encontró una incidencia de 85.15 %. Los frutos tenían amarillamiento intenso en cerca del 75 % de la superficie del fruto y pústulas elevadas de color verde (Figura 33). Además, presentaban arrugamiento en los extremos de los frutos y un olor dulce (como de fermentación). Algunas de las heridas en el tratamiento con NQAEC secretaban una sustancia cristalina, semejante a carbohidratos.



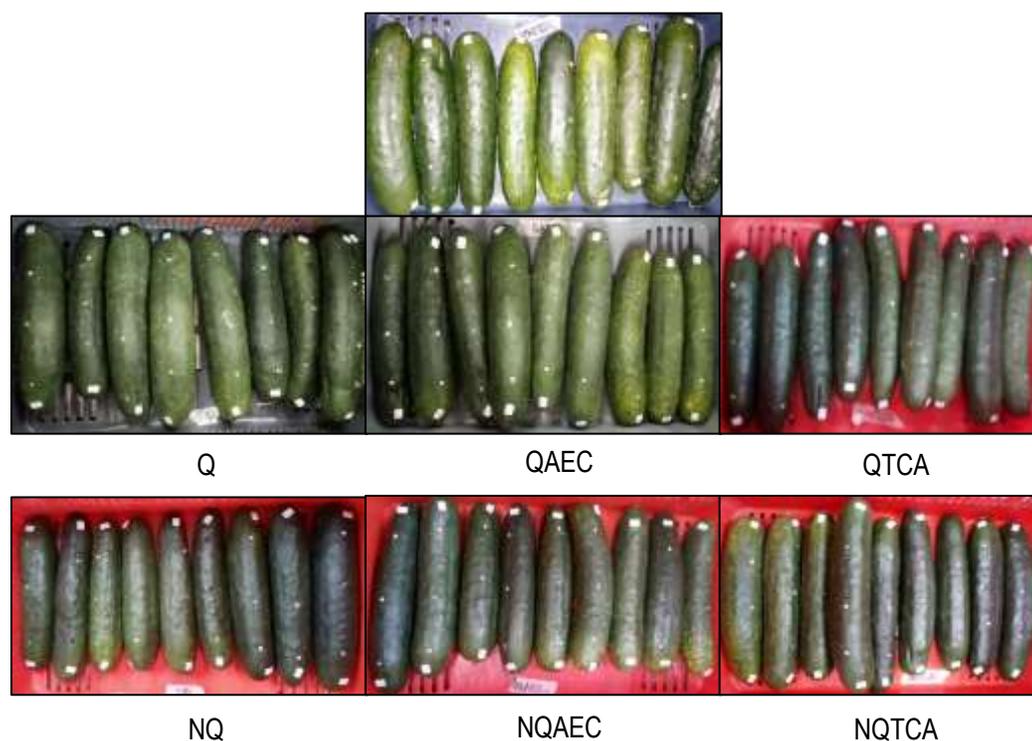
**Figura 30.** Frutos de pepino inoculados con *Fusarium solani* y con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. Día uno de la inoculación.



**Figura 31.** Frutos de pepino inoculados con *Fusarium solani* y con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. Día dos de la inoculación



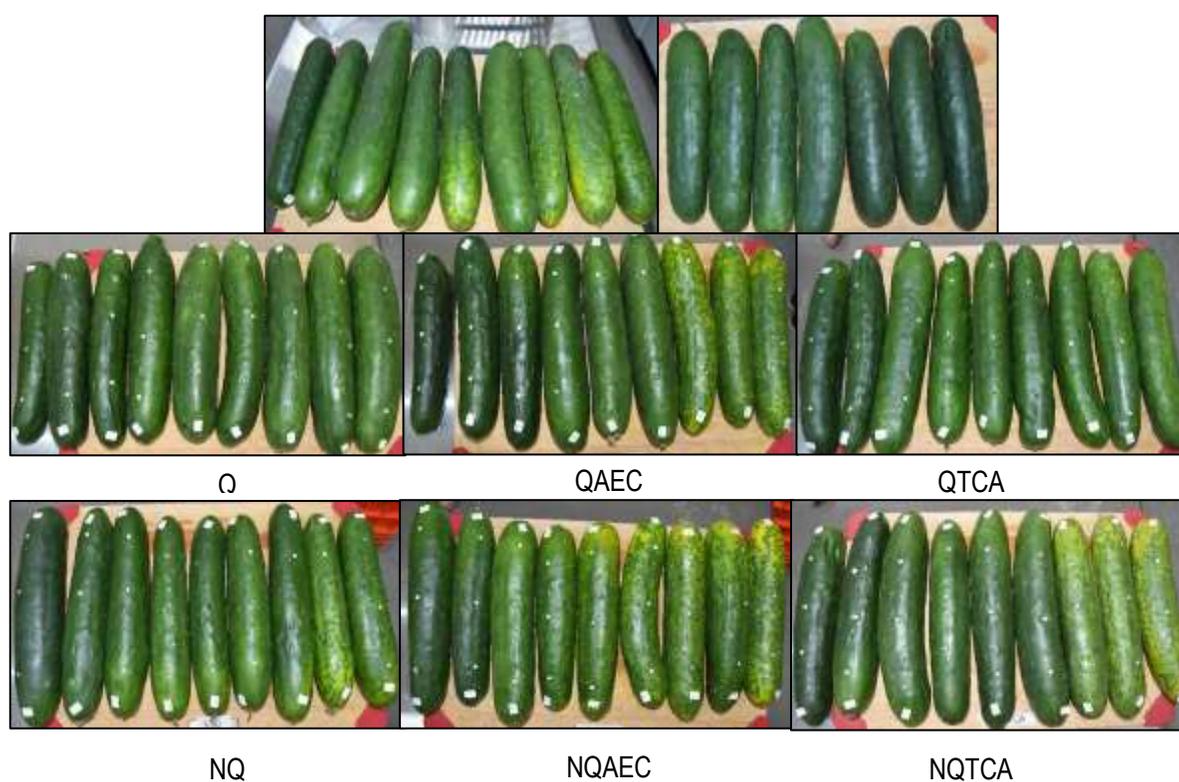
**Figura 32.** Frutos de pepino inoculados con *Fusarium solani* y con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. Día nueve de la inoculación y el segundo día a temperatura ambiente.



**Figura 33.** Frutos de pepino inoculados con *Fusarium solani* y con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. Día diez de la inoculación y tercer día a temperatura ambiente.

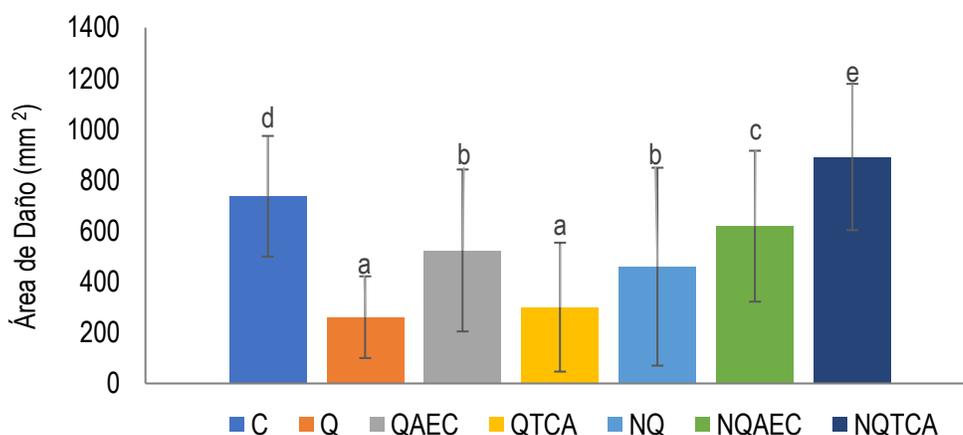
En los frutos con el recubrimiento de QTCA y NQTCA (77.77 % Y 88.88 % de incidencia; respectivamente). Los frutos en ambos tratamientos mostraban amarillamiento moderado y abundantes pústulas de color verde y elevadas sobre la superficie. Todos los frutos de los tratamientos antes descritos perdieron turgencia, es decir, al tacto estaban blandos. Para este día de evaluación, los frutos que mostraban una menor incidencia fue el de NQ (62.93 %). Sólo mostraban un amarillamiento leve en uno de los extremos de los frutos, con la presencia de las pústulas de color verde intenso, pero planas y aún se mostraron turgentes.

Para el día diez de almacenamiento el control junto al tratamiento de Q, NQAEC y NQTCA tenían 100 % de incidencia, es decir, en todas las heridas se observó el crecimiento de *F. solani*. Sin embargo, los frutos en cada uno de los tratamientos mostraban diferentes síntomas, ya que los frutos con el recubrimiento de Q presentaban un amarillamiento leve sin la presencia de las pústulas verdes, características de la infección por *Fusarium solani*. En cambio, los frutos en el control y en los tratamientos de QAEC (96.29 % de incidencia), NQAEC y NQTCA se volvieron más amarillos (cerca del 75 % de la superficie del fruto) en comparación con los frutos en el tratamiento de QTCA (88.88 % de incidencia) y NQ (85.18 % de incidencia), que sólo mostraban amarillamiento leve en los extremos de los frutos (Figura 33).



**Figura 34.** Frutos de pepino inoculados con *Fusarium solani* y con recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado. Día diez de la inoculación y tercer día a temperatura ambiente.

El último día de almacenamiento se midió el área de la lesión causada por *F. solani* en el tejido interno de los frutos de pepino con cada uno de los recubrimientos evaluados (Figura 34). Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos evaluados. Todos los tratamientos presentaron una menor área de daño en comparación con el control. Los recubrimientos que detuvieron el crecimiento del hongo fueron Q y QTCA, los cuales limitaron el crecimiento del hongo en la entrada del punto de inoculación ( $P = 0.001$ ). Seguido de estos tratamientos, QAEC y NQAEC, mostraron severidades similares, pero menores con respecto al control y el tratamiento de NQTCA, este último fue el que mayor severidad mostró. Ya que el área de daño encontrada en el interior del fruto fue incluso mayor, que el control.



**Figura 35. Severidad de *Fusarium solani* inoculados en frutos de pepino postcosecha.** Se muestra severidad medida como el área de daño causada por el hongo sobre el tejido (mm<sup>2</sup>). LSD F= 34.24; gl= 371;  $P < 0.0001$  Tukey  $\alpha = 0.05$ . Letras diferentes muestran diferencias significativas. Se muestra la media de nueve mediciones. Las barras indican la desviación estándar.

En un estudio, se evaluó el efecto antifúngico del quitosano y extractos de plantas contra *Fusarium oxysporum* y *Penicillium digitatum*. El quitosano al 1.5 % inhibió el crecimiento micelial y la esporulación de *F. oxysporum*, y el efecto sinérgico fue sólo observado sobre *P. digitatum* tratados con quitosano y extracto de semillas de papaya (Bautista-Baños y col., 2004). Los resultados obtenidos en el presente estudio están en línea con aquellos que reportados por Bautista-Baños y col (2004), donde el crecimiento micelial radial y la germinación de esporas de *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*, fueron inhibidos cuando se fueron tratados con quitosano, siendo *Fusarium* más sensibles contra el quitosano entre estos tres hongos probados.

En el trabajo de Barrera y García (2008), donde se evaluó el efecto antifúngico del aceite esencial de canela sobre un aislado de *Fusarium* sp. aislado de *Carica papaya*, reportaron que éste aceite disminuyó la tasa de crecimiento de 4.16 a 2.76 mm d<sup>-1</sup> al incrementar la dosis de 100 a 300 µL/mL, que es la misma concentración evaluada en este estudio y se observa una reducción del crecimiento de *F. solani* en los frutos. En un estudio realizado por Sahab y col (2014), sobre la aplicación de aceites esenciales de para el control de especies de *Fusarium* asociadas al maíz recién cosechado, encontraron que los aceites de *Eruca sativa* y *Malaleuca alternifolia* inhibieron el 100 % de crecimiento micelial de tres aislados de *Fusarium solani* al incrementar la concentración de 0.05 a 0.4 %. Mientras que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* a esas mismas concentraciones alcanzó un porcentaje de inhibición de 84.42 %.

En otro estudio realizado por Xie y col (2017), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela y el aceite esencial de clavo, sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* mediante el método de disolución del aceite o los compuestos mayoritarios en cajas de agar PDA en concentraciones que iban desde 100 a 400 µg/mL e

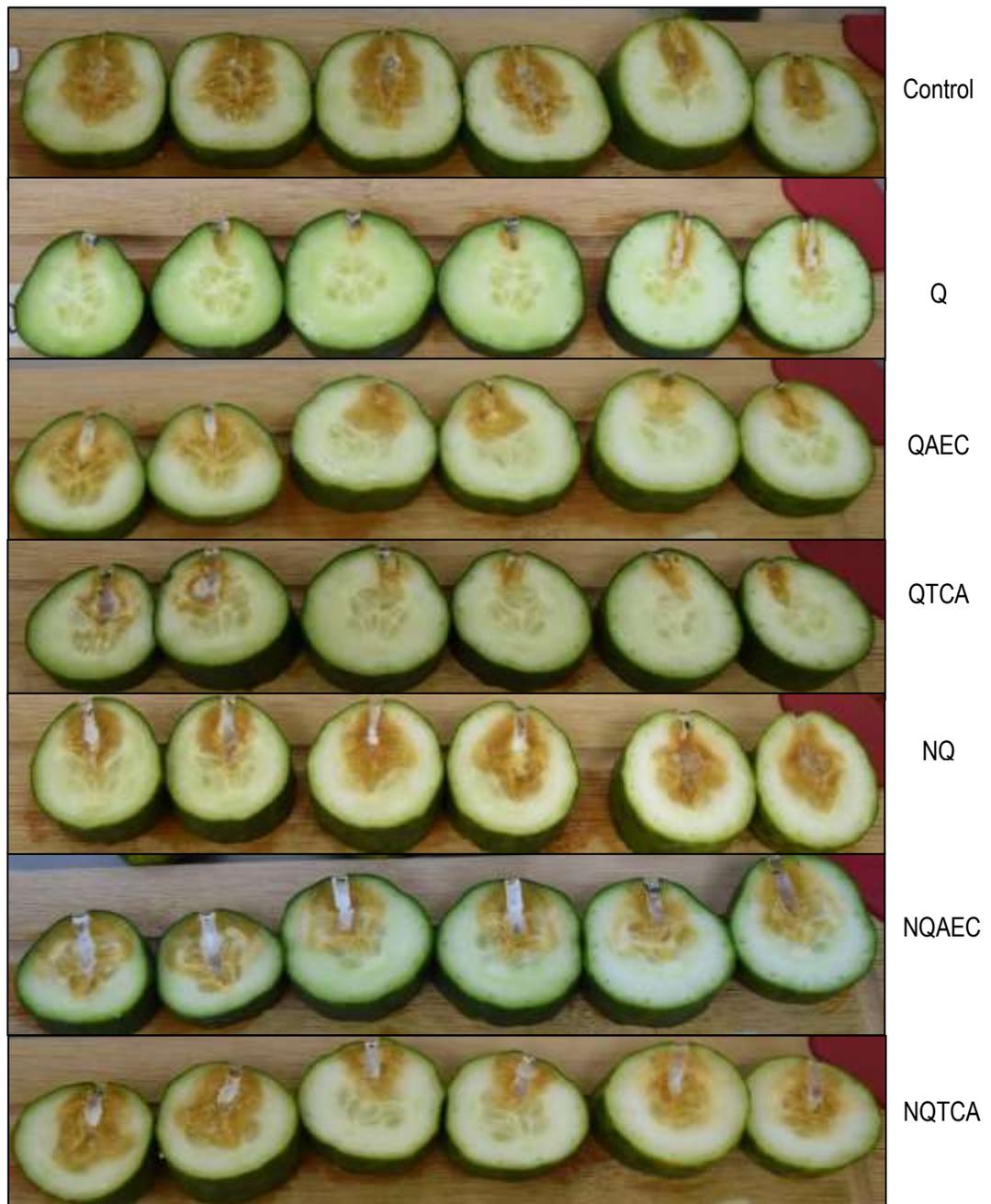
incubados por 7 días, el efecto antifúngico del aceite esencial de canela fue mayor a medida que la concentración incrementaba, teniendo un mayor efecto sobre *R. solani* que sobre *F. oxysporum* (54.8 y 28.5 % inhibición de crecimiento, respectivamente). Este efecto también fue encontrado con el cinamaldehído, donde la concentración inhibitoria del crecimiento al 50 % fue de 75.4 µg/mL para *R. solani* y 156.9 µg/mL para *F. solani*, una concentración más elevada que la utilizada en este estudio.

Zahid y col (2012), reportaron el uso quitosano en nanoemulsiones para el control de diferentes especies de *Colletotrichum* aislado de papaya, “dragon fruit” (*C. gloesporioides*) y banana (*C. musae*) y evaluaron la calidad de frutas tropicales en almacenamiento a baja temperatura. El uso de quitosano inhibió el crecimiento micelial de los tres hongos, encontrando un máximo de inhibición con 2 % de quitosano, seguido de 1.5 % y por último a una concentración de 1 % (inhibición dependiente de la concentración). En cuanto al quitosano en nanoemulsión, reportan que la mayor inhibición del crecimiento radial con *C. musae* fue con la nanoemulsión de 2 % de quitosano y 200 nm del tamaño de la partícula (83.2 %) y 1.5 % (82.5 %) con el mismo tamaño de partículas. En cuanto a *C. gloesporioides* la máxima inhibición de crecimiento micelial fue a 2 % de quitosano, pero con un tamaño de partícula de 600 nm (87.43 %), obteniendo resultados similares para concentraciones de 1 % de quitosano con el mismo tamaño de partícula. Estos resultados son consistentes con los reportados en este trabajo, donde a una concentración del 1 % de Q, se logró reducir el crecimiento de *F. solani* en mezclado con los antifúngicos y nanoestructurado.

En un estudio se usaron nanopartículas de quitosano encapsulado aceite esencial de canela contra *Phytophthora drechsleri*, agente causal de la podredumbre de la fruta en pepino en ensayos *in vitro* y además de evaluar el efecto recubrimientos sobre la calidad de os frutos. El experimento *in vivo* también mostró que los aceites encapsulados a una

concentración de 1.5 g. L<sup>-1</sup> disminuyeron significativamente la severidad de la enfermedad y la incidencia de pepinos inoculados con *Phytophthora* durante 7 días de almacenamiento a 4 ° C, seguido de 2-3 días más a 20 ° C (Mohammadi y col 2015).

Correa-Pacheco y col (2017), elaboraron un recubrimiento nanoestructurado con nanopartículas de quitosano encapsulando aceite esencial de tomillo, y reportaron que la mejor formulación para el control postcosecha de *C. gloesporioides* en aguacate cv. Hass, fue con 55% de nanopartículas con aceite esencial de tomillo, reduciendo la incidencia del hongo hasta un 60%. Estos resultados son similares a los reportados en este estudio, donde la formulación del recubrimiento con los diferentes tipos de nanopartículas (NQ, NQAEC y NQTCA), muestran cierta inhibición del crecimiento de *F. solani* en los frutos de pepino (Figura 36).



**Figura 36. Severidad de *Fusarium solani* inoculados en frutos de pepino postcosecha.** En la fotografía se muestra el daño causado por el hongo (tejido de color marrón claro), en el interior del tejido de los frutos.

## 6. Conclusiones

En este estudio se logró la formulación de recubrimientos a base de quitosano y quitosano nanoestructurado mezclado con antifúngicos naturales como el aceite esencial de canela y trans-cinamaldehído adecuados el exocarpo ceroso de los frutos de pepino, sin que estos afectaran su apariencia. Se determinó cuantitativamente que los recubrimientos evaluados no afectaron las variables de calidad como los sólidos solubles totales, la acidez titulable y la firmeza; así como las variables fisiológicas de respiración y producción de etileno. Otro resultado positivo fue que los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado tuvieron porcentajes menores en pérdida de peso. Los tratamientos constituidos por los recubrimientos de quitosano más aceite de esencial de canela, quitosano nanoestructurado y quitosano nanoestructurado encapsulando trans-cinamaldehído, mostraron un menor cambio de color en los frutos al final del almacenamiento. Otro resultado importante, fue que todas las combinaciones usadas en los recubrimientos evitaron el crecimiento de microorganismos, excepto aquellos frutos que se encontraban recubiertos con quitosano nanoestructurado encapsulando trans-cinamaldehído. Todos estos resultados nos mostraron que los recubrimientos de quitosano y quitosano nanoestructurado tuvieron la capacidad de conservar la calidad del pepino en condiciones de almacenamiento controladas y a temperatura ambiente, además se logró un incremento en la vida de anaquel de los frutos de pepino de dos días bajo estas condiciones de almacenamiento y sin que se observaran cambios en la apariencia de los frutos.

Por otro lado, se logró el aislamiento e identificación de tres hongos patógenos postcosecha de pepino: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* y mediante las pruebas de patogenicidad para *Fusarium solani*, se encontró que los recubrimientos de quitosano y quitosano más trans-cinamaldehído reducen la severidad del patógeno.

## **7. Perspectivas**

La nanotecnología es una ciencia reciente en la preservación de la calidad de las frutas y hortalizas, mostrando resultados prometedores en la industria alimentaria. Sin embargo, aún faltan estudios por realizar para garantizar que el uso de nanopartículas en los alimentos no represente un peligro para la salud humana y el medio ambiente.

Antes de proponer la salida al mercado las nanopartículas deben pasar por estudios de toxicidad, tanto en células vegetales como animales. Ya que alguno de los resultados en este estudio muestra que, a una concentración elevada de nanopartículas, tienen efectos contrarios y aumentan la velocidad de deterioro de los frutos. Se debe evaluar como es el proceso de degradación de las nanopartículas de quitosano en el interior de la célula y evaluar qué tipo de interacciones están ocurriendo. Conocer cuáles son los mecanismos de acción a nivel celular y ultracelular que tienen las nanopartículas sobre los microorganismos, en especial los hongos fitopatógenos.

## 8. Bibliografía

- Abarca L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. Vol 17: S79-S84.
- Abreu F, Oliveira E, Paula H, de Paula R. 2012. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers* 89: 1277– 1282.
- Adetunji C, Fadiji A. and Aboyeji O. 2014. Effect of chitosan coating combined Aloe Vera gel on cucumber (*Cucumis sativa* L.) post-harvest quality during ambient storage. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences* 5(6): 391-397.
- Agnihotri S, Mallikarjuna N, Aminabhavi T. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100 (2004): 5 -28.
- Agrios, George N. 2005. *Plant Pathology* 5th Edition. Elsevier Academic Press. New York, USA. 922p.
- Arya A y Perelló A.E. 2010. (Ed.) *Management of Fungal Plant Pathogens*. CAB International. Pp: 388.
- Askarne L, Talibi I, Boubaker H, Boudyach E, Msanda F, Saadi B, Serghini M. Ait Ben Aoumar A. 2012. In vitro and in vivo antifungal activities of several Moroccan plants *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Journal of Crop Protection*. 40: 53-58.
- Aular, J. Consideraciones sobre el manejo postcosecha de frutas en Venezuela. Salamanca, G. (ed) *Anales del II Seminario Hortofrutícola Colombiano y I Congreso Iberoamericano sobre Sistemas de Procesados*. Ibagué-Tolima: 59-62 (Resumen).
- Avena-Bustillos R, Krochta J, y Saltveit E. 1997. Water vapor resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate- acetylide monoglyceride films. *Journal of Food Science*. 62: 351-354.

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Barnet H. y Hunter H. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company. Edition Minneapolis, USA. 1998. Pp: 237.
- Barraza-Álvarez F. V. (2015). Calidad Morfológica y fisiológica de pepinos cultivados en diferentes condiciones nutrimentales. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 9 (1): 60-71.
- Barrera-Bello E, Gil-Loaiza M, García-Pajón C, Durango-Restrepo D, Gil-González J. 2012. Empleo de un recubrimiento formulado con propóleos para el manejo postcosecha de frutos de papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiana). *Revista de la Facultad de Agronomía Medellín*. 65 (1): 6497-6506.
- Barrera-Necha L. y García-Barrera L. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola* 8 (1): 33-41.
- Barrera-Necha L. y Bautista-Baños S. 2008. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Enhrenb.: Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26 (1): 27-31.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, y Wilson CL. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E. 2004. Growth Inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol (22): 178-186.
- Bautista-Baños S, Hernández-Luzardo AN, Velázquez del Valle MG, Bosquez-Molina E, Sánchez-Domínguez D. 2005. Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. Vol 7 (1): 1-6.

- Bautista-Baños S, Hernández-Luzardo A, Velázquez del Valle M, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson C. 2006. Chitosan as a Potential natural compound to control pre- and postharvest disease of horticultural commodities. *Journal of Crop Protection*. 25: 108-118.
- Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar R, Correa-Pacheco Z, y Corona-Rangel M. 2017. Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest. A review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 23(2): 103-121.
- Bellemain C. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in-silico approach reveals potential PCR bases. *BioMed Central of Microbiology*, Vol10: 189.
- Bonilla J, Atarés L, Chiralt. 2012. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids* 26: 9-16.
- Bravin B, Peressini D, y Sensidoni A. 2006. Developement and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Journal of Food Engineering*. 76: 280-290.
- Busto-Concepción A, Capote-Selier Y, León-Sánchez L, Lekeisha-Murphy S, Palomino-Morejón L. 2005. Estudio de la dinámica de las plagas fungosas en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.), bajo condiciones semicontroladas. Tesis de grado para obtener el título de Ingeniería Agronómica. Universidad de Pinar del Rio. Cuba.
- Cagri A, Ustunol Z, Ryser E. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*. 67: 833-848.
- CAJAMAR. 2014. Ficha de transferencia. Parámetros de calidad de la industria agroalimentaria. No. 3, mayo.
- CONABIO. 2014. *Cucumis sativus*. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad.
- Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Valle-Marquina M, y Hernández-López. 2017. The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth in vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. *Journal of Phytopathology*. 165:297–305.

- Cruz- Gómez BA. 2015. Efectos de la aplicación de biofertilizantes y fosfitos de potasio durante cultivo y un recubrimiento de poli(acetato de vinilo - co - alcohol vinílico) sobre la calidad y vida poscosecha de pepino (*Cucumis sativus* L.). Maestría en Ciencias en Agroplasticultura. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coahuila. México.
- De Ancos B, González-Peña D, Colina-Coca C, Sánchez-Moreno C. 2015. Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. Vol 16 (1): 8-17.
- Del-Valle V, Hernández-Muñoz P, Guarda A, Galotto M. 2005. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia picus indica*) and application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. Food Chemistry Vol 91: 751-756.
- Díaz-Pérez J. 1998. Transpiration rates in eggplant fruit as affected by fruit and calyx size. Postharvest Biology and Technology Vol 13: 45 - 49.
- Dias de Castro R y Oliverira-Lima E. 2013. Anti-Candida Activity and Chemical Composition of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Essential Oil. Vol56 (5): 749-755.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Agricultura Bureaux, England. Pp: 507.
- El-Ghaouth A, Arul J, Ponnampalam R. 1991. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. Journal of Food Processing and Preservation. Vol (15): 359-368.
- Eshghi S, Hashemi M, Abdorreza Mohammadi A, Fojan Badii F, Mohammadhoseini Z, Ahmadi K. 2014. Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne) During Storage. Food Bioprocess Technol Published on line: february 26, 2014.
- Fatima N, Batool H, Sultana V, Ara J y Ehteshamul-Haque S. 2009. Prevalence of post-harvest rot of vegetables and fruits in Parachi, Pakistan. Pakistan Journal Botany. Vo 41(6): 3185-3190.
- FAO. 2017. Capitulo 5. Calidad de frutas y hortalizas. Página web:

<http://www.fao.org/docrep/006/Y4893S/y4893s08.htm#bm08>.

FAOSTAT 2009. Datos estadísticos del cultivo de pepino, <http://faostat.fao.org/>

Frisvad J y Samson R. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 49:1-174.

Ge HC y Luo DK. 2005. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. *Carbohydrate Research*, 340, 1351–1356.

Godoy-Angulo T, Gastélum-Luque R, Yáñez-Juárez M, Almodovar-Pérez T, Cruz-Ortega J, López-Meza M. 2010. Capítulo VIII. Identificación de *Didymella bryioniae* en el cultivo de pepino Valle de Culiacán, Sinaloa-México.

González-Aguilar G, Monroy-García L, Goycoolea-Valencia F, Díaz-Cinco M, y Ayala-Zavala. 2005. Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada. *Simposium Nuevas Tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales Frescos Cortados Vol 1: 121-133.*

Goycoolea F, Remuñán-López M, Alonso J. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. No. 3. Universidad de Santiago de Compostela.*

Gruda N. 2005. Impact of environmental factors on products quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol 24 (3): 227-242.

Guerrero-Rodríguez E, Solís-Gaona S, Hernández-Castillo F, Flores-Olivas A, Sandoval-López V, y Jasso-Cantú D. 2007. Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Volumen 25 (1): 48-53.

- Hamzah H, Osman A, Tan C, y Ghazali F. 2013. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *Postharvest Biology and Technology* 75, 142–146.
- Harbone, J B. 1984. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Third Edition University of Reading, United Kingdom.
- Hernández E. 2005. *Evaluación sensorial. Curso Tecnología de cereales y oleaginosas. Guía didáctica. Primera edición. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia.*
- Cagri A, Ustunol Z, Ryser E. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*. 67: 833-848.
- Hromiš N, Lazić V, Markov S, Vaštag Ž, Popović S, Šuput D, Džinić N, Velićanski A, y Popović L. 2015. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. *Journal of Food Engineering*. Vol 158: 86-93.
- Hu P, Pan C, Hou Z, Ye H, y Zeng X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticules for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 56:7451-7458.
- Jang K. y Lee H. 2008. Stability of chitosan nanoparticules for L-ascorbic acid during head treatment in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol 56: 1936-1941.
- Jay J M. 2000. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. United States. Sixth Edition. 625p.
- Jianglian D y Shaoying Z. 2013. Application of chitosan-based coating in fruit and vegetable preservation: A Review. *Journal Food Process Technology*. Vol (4): 5.
- Jmvrš W, Barw S, y Tmquair J. 1989. Morphological and chemical studies of *Penicillium oxolicum*, newly identified as a pathogen on greenhouse cucumbers. *Canadian Journal of Botany*. Vol 68: 21-25.

- Jayawardena B. and Smith R. 2010. Superheated Water Extraction of Essential Oils from *Cinnamomum zeylanicum* (L.) Phytochemistry Annales. Vol 21: 470–472.
- Jeon Y, Lee S, Yanga Y, y Lee H. 2017. Insecticidal activities of their components derived from the essential oils of *Cinnamomum* sp. barks and against *Ricania* sp. (Homoptera: Ricaniidae), a newly recorded pest. Pest Management Science Vol 73: 2000–2004.
- Juárez-Becerra G, Sosa-Morales M, y López-Malo A. 2010. Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Vol 2- 4: 14 -23.
- Kader, A. 1992. Postharvest Technology of horticultural crops. Second Edition. Oakland, California. United States. Division of Natural Resources. University of California. 535p.
- Kader, A. 2002. Biología y Tecnología de Postcosecha: Una revisión general. Curso de Invernaderos INCAPA. Postharvest Technology of Horticultural Crops (A. A., ed). Universidad de California. Publicación 3311.
- Kader, A. y Pelayo, C. 2007. Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. Tercera edición. Universidad Davis de California, Centro de Investigación en Tecnología Postcosecha Estados Unidos. 580p.
- Keawchaon L, Yoksan R. 2011. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol 84: 163-171.
- Khosh-Gardesh A, Badii F, Hashemi M, Yasini Ardakani A, Maftoonazad N, Mousapour Gorji, A. 2016. Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. Food Science and Technology. Vol 70: 33-40.
- Krestes, J. y Fannema, O. 1986. Edible films and coatings: A review. Food Technology Vol 40: 47-59.
- Leslie, J F, Summerell B A, Bullock S. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa, United States. Pp: 387.

- Li X, Feng X, Yang S, Wang T, y Su Z. 2008. Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus niger*. Iranian Polymer Journal Vol 17 (11): 843-852.
- López J H. 2000. Manejo postcosecha de frutas y hortalizas. Curso – Taller Hacia una agricultura sostenible. FEMPAG. Municipio de Granada.
- Macea R, Flórez Y, González E, Meza E y Inés Rodríguez J. 2015. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. Polímeros. Vol 25(1): 58-69.
- Manzo A y Rodríguez J L. 1995. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.
- Mahdi-Ojagh S, Rezaei M, Hadi-Razavi S, Hashem-Hosseini S. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry Vol 120: 193 –198.
- Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R, y Baldwin A. 2009 Conservación de recubrimientos comestibles. En: Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Editores. Centro de Investigaciones en Alimentación y desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora, México 558p.
- Martínez M., Alejandro.2003. Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia Facultad Química Farmacéutica Medellín, febrero.
- Menzies J, Ehret D, Koch C, Hall J, Seifert K, Bissett J, y Barr D. 2005. Fungi associated with roots of cucumber grown in different greenhouse root substrates. Canadian Journal Botany Vol 83: 8-92.
- Mehyar G, Al-Qadiri H, Hifzi Abu-Blan A, y Barry Swanson B. 2011. Antifungal Effectiveness of Potassium Sorbate Incorporated in Edible Coatings Against Spoilage Molds of Apples, Cucumbers, and Tomatoes during Refrigerated Storage. Journal of Food Science Vol 76 (3): 210-217.
- Mendoza Uribe G y Rodríguez J L. 2006. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Perfiles Latinoamericanos No. 29: 161-186.

- Miller KS y Krochta JM. 2005. A Review Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. Trends in Food Science & Technology. July Vol: 81.
- Mohammadi A, Hashemi M, Masoud Hosseini S. 2015. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the self-life of cucumber during cold storage. Postharvest Biology and Technology. Vol 110: 203-213.
- Mohammadi A, Hashemi M, Masoud Hosseini S. 2016. Postharvest treatment of nonchitosan-based coating loaded with *Zataria multiflora* essential oil improves antioxidant activity and extends shelf-life of cucumber. Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol 33: 580-588.
- Moreno-Velázquez D, Cruz-Romero W, García-Lara E, Ibáñez-Martínez A, Barrios-Díaz J, y Barrios-Díaz. 2013. Cambios fisicoquímicos postcosecha en tres cultivares de pepino con y sin película plástica. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol 4(6): 909-920.
- Muy-Rangel D, Siller-Cepeda J, Díaz-Pérez J, y Valdés-Torres B. 2004. Efecto de las condiciones de almacenamiento y el encerado en el estatus hídrico y la calidad postcosecha de pepino de mesa. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 27 (2): 157 – 165.
- Naureen F, Humaira B, Viqar S, Jehan A, y Syed E. 2009) Prevalence of post-harvest rot of vegetables and fruits in Karachi, Pakistan. Pakistan Journal of Botany. Vol 41(6): 3185-3190.
- Nanasombat S, and Wimmattigol P. 2011. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Spice Essential Oils. Food Science Biotechnology. Vol 20(1): 45-53.
- Núñez-Ríos T, Leyva-Mir S, Rodríguez-Pérez J, Mariscal-Amaro, L. 2013. Etiología y control de la necrosis de flores y pudrición de frutos de pepino en Morelos, México. Revista Chapingo Serie Horticultura. Vol 19(2): 255-266.
- Nussinovitch, A., and Lurie, S. 1995. Edible coatings for fruits and vegetables. Postharvest News and Information Vol (6): 53-57.

- Oxenham, SK. 2003. Classification of an *Ocimum basilicum* germplasm collection and examination of the antifungal effects of the essential oil of basil. Ph.D. thesis, University of Glasgow, Glasgow, UK.
- Oxenham S, Svoboda K, y Walters D. 2005. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). Journal Phytopathology. Vol 153:174 –180.
- PC-021-2005 Pliego de Condiciones para el uso de la Marca Oficial México Calidad Suprema en Pepino.
- Pérez-Bocourt Y, Rebolledo-Ríos R, Martínez-Silva J. 2010. Aislamiento e identificación de hongos en compost elaborado a partir de residuos sólidos urbanos. Agro Sur. Vol 38(1): 1-7.
- Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticules. Carbohydrate Research. Vol 339: 2693 - 2700.
- Quezada J, Días M, Gutiérrez M, y Debeaufdt F. 2003. Aplicación de recubrimientos comestibles para mejorar la vida útil de la guayaba mexicana. Acta Horticulturae. Vol 599: 589 - 594
- Rahman A, Anisuzzaman M, Alam M, Islam A, y Zaman A. 2006. Taxonomic Studies of the Cucurbits Grown in the Northern Parts of Bangladesh. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. Vol 2(6): 299 - 302
- Ramírez A, Benítez J, Rojas de Astudillo L, y Rojas de Gáscue B. 2016. Materiales polímeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB, MET. Revista Latinoamericana Metal y Materiales. Vol 36 (2): 1 – 23.
- Ramos-García M, Bautista-Baños S, Barrera-Necha L, Bosquez-Molina E, Alía-Tejagal I, Estrada-Carrillo M. 2010. Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol 28 (1): 44 - 57.
- Ramos-García M, Bosquez-Molina E, Hernández-Romano J, Zavala-Padilla G, Terrés-Rojas, E. Alía-Tjagal, I, Barrera-Necha, L, Hernández-López M, Bautista-Baños S. 2012. Use of Chitosan-based edible coatings in combination with other

natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in fresh tomatoes. *Crop Protection*. Vol 38:1 – 6.

Ríos-Herrera G, Carrillo-López A, Camacho-Hernández I, Zazueta-Morales J, Sañudo-Barajas A. 2014. Caracterización física y química de pepino (*Cucumis sativus* L.) en sus diferentes partes estructurales: cáscara, pulpa y placenta. XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. México, D. F. 2014. Libro de Resúmenes.

Rodríguez-Hamamura N, Valderrama-Negrón A, Alarcón-Cavero H, López-Milla A. 2010. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química de Perú*. Vol 76 (4): 336-354.

Rodríguez S, Albertengo L, Debbaudt, A, y Argullo E. 2005. Uso de quitosano en alimentos In: Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. González-Aguilar, G; Gardea, A.; Cuamea-Navarro, F. Editores. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México p. 558.

Ryall, L. A. y Lipton, J. 1982. Refrigerated storage. In: handling transportation and storage of fruits and vegetables. Ryall, I. L. and Lipton, M. (Eds.). AVI Publishing Company. INC. Westport, Connecticut. 293-306 pp

Sahaba AF, Alyb S, Hathoutb AS., Ziedana EH y Sabryb BA. 2014. Application of Some Plant Essential Oils to Control *Fusarium* Isolates Associated with Freshly Harvested Maize in Egypt. *Journal of Essential Oil Bearing Plants TEOP*. Vol17 (6):1146 – 1155.

Sahraei A, Badii F, Hashemi M, Yasini A. Maftoonazad N, Mousapour-Gorji A. 2016. Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. *LWT. Food Science and Technology*. Vol 70: 33 - 40

SAGARPA .2015. Márgenes de comercialización hortalizas, febrero. Pepino.

- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. 2006. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods*. Vol 9(7): 671-675, PMID 22930834 (on Google Scholar).
- Shankar R, Harsha S, y Bhandary R. 2014. Practical guide to identification and control of cucumber diseases. Tropical seeds PVT LTD No 54.
- Sivakumar D, y Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*. Vol 64: 27-37.
- Snowdon, A. L. A. 1991. Color Atlas of Post-Harvest Disease & Disorder of Vegetables and Fruits. Vol. 2: Vegetables. Wolfe Scientifics LTD, Aylesbury, England. 450p
- Suslow T. y Cantwell M. 2013 <http://www.tecnicoagricola.es/calidad-postcosecha-en-pepino/> visitada el 8/8/2016. Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, CA 95616 Traducido por Clara Pelayo.
- Toma, conservación y envío de muestras pecuarias y agrícolas al centro de diagnóstico 2009. Gobernación de Antioquia Convenio ICA- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Medellín- Colombia.
- Vakalounakis D, Wang Z, Fragkiadakis G, Skaracis G, Li D. 2004. Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolates Obtained from Cucumber in China by Pathogenicity, VCG, and RAPD. *Plant Disease*. Vol. 88 (6): 645 - 649.
- Vázquez-Aguilar LE, Fernández-Escartín E, Arias-Ríos EV. 2010. Incidencia de *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Salmonella* en pepino colectado durante la precosecha y poscosecha. Facultad de Química. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Villalobos Acuña L. 2009. Metodologías de análisis de factores de calidad en frutas tropicales y subtropicales, implementadas por el laboratorio de postcosecha de la Universidad de California en Davis, Estados Unidos. Práctica de especialidad presentada a la Escuela de Agronomía para obtener el grado de Bachillerato en Ingeniería en Agronomía. Instituto tecnológico de Costa Rica sede regional San Carlos.

- Vakalounakis DJ, Wang Z, Fragkiadakis GA, Skaracis GN, Li BD. 2004. Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolates Obtained from Cucumber in China by Pathogenicity, VCG, and RAPD. *Plant Disease*. June 645 - 649
- Woranuch S. y Yoksan R. 2013. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*. Vol 96: 578-585.
- Xie Y, Huang Q, Wang Z, Cao H, Zhang D. 2017. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. Vol 97: 388–394.
- Xing Y, Lin H, Cao D, Xu Q, Han W, Wang R. 2015. Effect of Chitosan Coating with Cinnamon Oil on the Quality and Physiological Attributes of China Jujube Fruits. *BioMed Research International*.
- Zhenming Che,<sup>1</sup> and Xihong Li<sup>3</sup>Yáñez-Juárez G, León de la Rocha J, Godoy-Angulo T, Gastélum-Luque R, López-Meza M, Cruz-Ortega J, y Cervantes-Díaz L. 2012. Alternativas para el control de la cenicilla (*Oidium* sp.) en pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol (3): 259-270.
- Yuan G, Chen X, Li D. 2016. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. Review. *Food Research International* IN PRESS.
- Zahid N, Ali A, Manickam S, Siddiqui Y, y Maqbool M. 2012. Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 113: 925-939.
- Zhang Y, Zhang M, Yang H. 2015. Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage. *Food Chemistry* Vol 174: 558–563.