



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
División de Estudios de Posgrado



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi)

T E S I S

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

BIÓL. DENISSE CÁZAREZ CHÁVEZ

Director de Tesis:

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Co-Director de Tesis:

D.C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

Morelia, Michoacán, México
Marzo de 2017

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, bajo la dirección de los Dres. Rafael Salgado Garciglia y Héctor Eduardo Martínez Flores.

DEDICATORIA

A mi abuela Salomé, mi tía Clementina y mi tío José Luis, los tres ángeles que donde quiera que se encuentren les dedico este paso más que acabo de terminar, porque siempre confiaron en que llegaré lejos en lo que me proponga.

“El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere, sino querer siempre lo que se hace”, Leon Tolstoy.

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios, por permitirme vivir este proceso a pesar de todas las dificultades que he tenido que sobrellevar durante este tiempo.

Al Dr. Rafael Salgado Garciglia, por haber confiado en mí para la realización del presente trabajo, es una excelente persona y profesionalista, por haber compartido sus enseñanzas y experiencia y sobretodo permitirme trabajar en su laboratorio. INFINITAS GRACIAS.

Al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores por su apoyo, consejos y enseñanzas como maestro y coasesor del presente trabajo, gracias por permitirme expandir mi conocimiento y aprender de una rama de la ciencia que desconocía.

Al Programa Institucional de la Maestría en Ciencias Biológicas por permitirme cursar esta Maestría y los conocimientos obtenidos.

A CONACYT por la beca otorgada durante la realización de la Maestría.

A mi comité tutorial Dra. Sylvia Fernández Pavía, Dr. Rodolfo López Gómez y Dr. Pedro Damián Loeza Lara por sus valiosas aportaciones, consejos y correcciones al presente trabajo.

A la M.C Alejandra Hernández García, técnico del laboratorio de Biotecnología Vegetal por su apoyo y paciencia brindada durante este proceso, gracias profundamente.

A Esther, técnico del laboratorio del LIDA en Químico Farmacobiología gracias por tu paciencia, apoyo y amistad durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros de ambos laboratorios en los que trabajé, a cada uno gracias por su amistad y apoyo durante este tiempo, en especial a Adrián Ávalos Rangel gracias por ayudarme y apoyarme durante el trabajo experimental.

A mi familia, a pesar de ser disfuncionales quiero agradecerles profundamente su apoyo incondicional que me han brindado en este proceso, a mis abuelitos porque siempre me han impulsado a sacar lo mejor de mí a pesar de las dificultades que tenga y motivarme a siempre ser una excelente profesionalista; mi mamá porque me

motiva a que puedo llegar hasta donde yo quiera y que nunca deje de soñar; mi papá por apoyarme durante este proceso; mi hermanita, Dafnini eres la persona más importante en mi vida, gracias por hacerme reír y ayudarme a despejarme cuando estaba muy estresada y no menos importante a mi primo Rodrigo quien me acompañó muchas veces durante los períodos de desvelo y estuvo para hacerme reír con sus ocurrencias cuando me veía estresada.

A Gaby Muratalla por apoyarme y motivarme a sacar siempre la mejor versión de mí como profesionista. Gracias por tus consejos y por escucharme.

Al Ing. Hugo por su apoyo y consejos durante la realización de este trabajo.

A mis amigos que a pesar de que no pude acompañarlos muchas de las veces que me invitaban a salir, siempre estuvieron allí para brindarme palabras de apoyo, saben que los quiero y aprecio muchísimo.

A los nuevos amigos que he conocido durante este proceso, gracias a cada uno de ustedes por los momentos de risa y consejos que me han brindado desde que los conocí.

También a cada persona que estuvo involucrada durante este proceso, cada uno hizo una valiosa aportación de la cual ha resultado como fruto este trabajo que fue realizado con mucho cariño y esfuerzo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. ZARZAMORA (<i>Rubus fruticosus</i>)	3
2.1.1. Producción de zarzamora	4
2.1.2. Problemas poscosecha	5
2.2. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr.	5
2.2.1. Control de <i>B. cinerea</i> en el campo	6
2.2.2. Métodos de preservación de alimentos.....	7
2.3. BIOPELÍCULAS COMESTIBLES	8
2.3.1. Biopelículas de naturaleza lipídica	8
2.3.2. Biopelículas de naturaleza proteica	8
2.3.3. Biopelículas formada por polisacáridos.....	9
2.4. QUITOSANO.....	10
2.4.1. Efecto antimicrobiano del quitosano	11
2.4.2. Efecto antifúngico del quitosano	12
2.4.3. Resistencia de <i>B. cinerea</i> al quitosano	13
2.5. ACEITES ESENCIALES	14
2.5.1. Usos y propiedades.....	16
2.5.2. Aceites esenciales con actividad antifúngica	16

2.5.3. Aceites esenciales adicionados a biopelículas de quitosano	18
2.6. <i>Tagetes lucida</i> Cav. (Santa María).....	19
2.6.1. Cultivo	20
2.6.2. Usos y composición del aceite esencial de <i>T. lucida</i>	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVO GENERAL	24
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1. Efecto antifúngico del aceite esencial de Santa María (<i>Tagetes lucida</i>) sobre <i>Botrytis cinerea</i> bajo condiciones <i>in vitro</i> y en frutos de zarzamora.	26
Resumen	26
Abstract.....	27
Introducción.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Material biológico	29
Plantas.	29
<i>Botrytis cinerea</i>	30
Frutos.....	30
Método de extracción del aceite esencial	30
Análisis y cuantificación de terpenos del aceite esencial de <i>T. lucida</i>	30
Ensayos <i>in vitro</i> por el método de difusión en placa	31
Obtención de la concentración mínima inhibitoria.....	31
Efecto antifúngico del aceite esencial de Santa María sobre esporas de <i>B. cinerea</i>	32
Ensayos en frutos de zarzamora inoculados con esporas de <i>B. cinerea</i>	32

Medición del índice de severidad en frutos inoculados	33
Análisis estadístico	33
Resultados y discusión	34
Conclusiones	44
Referencias	44
7.2. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y texturales de frutos de zarzamora recubiertos con quitosano adicionando aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i>	48
Resumen	48
Abstract.....	49
Introducción.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Quitosano	51
Frutos	51
Preparación de las soluciones de quitosano	52
Prueba de viscosidad	52
Pruebas de textura.....	52
Asepsia y recubrimiento de frutos	53
Ensayo de textura con frutos recubiertos con quitosano	53
Ensayo de textura con frutos recubiertos con quitosano y aceite esencial	53
Análisis estadístico	54
Resultados y discusión	54
Conclusiones	64
Referencias	64
7.3. Efecto antifúngico de una película de quitosano adicionada con aceite esencial de <i>T. lucida</i> en frutos de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> Cv. Tupi) inoculados con <i>B. cinerea</i> almacenados a diferentes temperaturas.....	68

Resumen	68
Abstract.....	68
Introducción.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Aceite esencial de <i>T. lucida</i>	71
Frutos de zarzamora Cv. Tupi	71
Botrytis cinerea.....	71
Preparación de la solución madre de quitosano.....	72
Método de asepsia y recubrimiento de frutos	72
Ensayos en frutos recubiertos con quitosano adicionando la CMI 100% inoculados con <i>B. cinerea</i>	72
Índice de severidad en frutos recubiertos e inoculados	73
Resultados y discusión	73
Conclusión.....	77
Referencias	77
8. DISCUSIÓN GENERAL	81
9. CONCLUSIONES GENERALES	86
10. PERSPECTIVAS	87
11. LITERATURA GENERAL CITADA.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Frutos de zarzamora infectados con <i>Botrytis cinerea</i> : A) Frutos en campo; B) Frutos poscosecha.	6
Figura 2. Obtención de quitosano por reacción de desacetilación de quitina en un medio alcalino.	10
Figura 3. Conjunto de flores de Santa María (<i>Tagetes lucida</i> Cav.) (Fotografía: Cázarez-Chavez D.)	20
Figura 4. Cromatograma del aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> : β -pineno (8.37), β -trans-ocimeno (9.67), β -ocimeno (10.02), β -linalol (11.56), estragol (14.78), metil eugenol (20.68), β -cariofileno (21.00), β -cubebeno (22.63).	35
Figura 5. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de micelio <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> con diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>T. lucida</i> , a los 7 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 6$)	37
Figura 6. Determinación de porcentajes de inhibición del aceite esencial de <i>T. lucida</i> en ensayos <i>in vitro</i> por difusión de placa, a los 7 días de cultivo de <i>B. cinerea</i> : 1) Control; 2) Control negativo (Etanol); 3) 0.075 $\mu\text{g/mL}$ de aceite; 4) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de aceite; 5) Tecto ₆₀ (5 mg/mL).	37
Figura 7. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de micelio <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> con diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>T. lucida</i> , a los 7 días de cultivo, para la determinación de la CMI 100%. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 6$).	38
Figura 8. Resultados del crecimiento de micelio en frutos de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> Cv. Tupi) inoculados con esporas (1×10^6 esporas/mL) de <i>B. cinerea</i> a los 3 y 7 días de incubación a temperatura ambiente (25 °C) y refrigeración (4 °C), tratados con Etanol absoluto, Tecto ₆₀ (5 mg/mL), 0.05 $\mu\text{g/mL}$ de aceite esencial de <i>T. lucida</i> y un Control. Literales se describen en el texto anterior a la figura.	43

	Pág.
Figura 9. Dureza de biopelículas en tres concentraciones de quitosano: 0.5%, 1% y 1.5% (n=6 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.	55
Figura 10. Deformación según dureza de biopelículas en tres concentraciones de quitosano: 0.5%, 1% y 1.5% (n=6 p<0.05 Tukey).	56
Figura 11. Datos de dureza (A) y porcentaje de deformación según dureza (B) de frutos recubiertos con las tres concentraciones de quitosano y control a los 1 y 7 días a 25 °C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.	57
Figura 12. Datos de dureza y porcentaje de deformación según dureza de frutos recubiertos con las tres concentraciones de quitosano y control a los 1 y 7 días a 4°C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.	58
Figura 13. Datos de dureza (A) y porcentaje de deformación según dureza (B) de frutos recubiertos con aceite esencial de <i>T. lucida</i> y con quitosano (1.5%) adicionado con la CMI 100% del aceite esencial (0.05 µg/mL), a los 1 y 7 días a 25 °C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.	61
Figura 14. Datos de dureza (A) y % de deformación según dureza (B) de frutos recubiertos con aceite esencial de <i>T. lucida</i> y con quitosano (1.5%) adicionado con la CMI 100% del aceite esencial (0.05 µg/mL), a los 1 y 7 días a 4 °C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.	62
Figura 15. Resultados del crecimiento de micelio en frutos de zarzamora inoculados con esporas (1x10 ⁶ esporas/mL) de <i>B. cinerea</i> a los 7 días de incubación a temperatura ambiente (25 °C) y refrigeración (4 °C), tratados con Etanol absoluto, Tecto ₆₀ (5 mg/mL), Quitosano 1.5% (1.5 mg/mL), CMI 100% del aceite esencial de <i>T. lucida</i> (0.05µg/mL), Quitosano 1.5% + CMI 100% y Quitosano 1.5% + CMI 100% (sin esporas).	74

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Efecto antifúngico del quitosano en ensayos <i>in vitro</i> .	13
Cuadro 2. Usos de los aceites esenciales en diferentes industrias.	17
Cuadro 3. Aceites esenciales con actividad antifúngica.	18
Cuadro 4. Frutos recubiertos con biopelículas de quitosano adicionando aceites esenciales.	19
Cuadro 5. Índice de severidad en unidades arbitrarias (1-5) para medir el grado de infección en frutos de zarzamora por <i>B. cinerea</i> (adaptado de Romanazzi <i>et al.</i> , 2013).	34
Cuadro 6. Contenido ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> .	36
Cuadro 7. Porcentajes de mortalidad de esporas de <i>B. cinerea</i> cultivadas en medio PD adicionado con aceite esencial de <i>T. lucida</i> ($0.05 \mu\text{g/mL}$), durante 7 días del cultivo. *Es indicativo de diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 6$).	39
Cuadro 8. Índice de severidad en frutos de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> Cv. Tupi) inoculados con esporas de <i>B. cinerea</i> a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en refrigeración ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) a los 3 y 7 días.	41
Cuadro 9. Valores de viscosidad en tres concentraciones de quitosano. Letras diferentes indican diferencias significativas.	54
Cuadro 10. Índice de severidad en frutos de zarzamora recubiertos con 1.5 mg/mL de quitosano, inoculados con esporas de <i>B. cinerea</i> a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en refrigeración ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) a los 1, 3 y 7 días.	72

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el efecto antifúngico del aceite esencial de *Tagetes lucida* (Santa María), obtenido de la parte aérea (tallos, hojas y flores) por el método de hidrodestilación, el que fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). La actividad antifúngica *in vitro* fue determinada como porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de micelio de *Botrytis cinerea*, determinando la concentración mínima inhibitoria 100% (CMI 100%) aplicando 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de aceite esencial/mL. Posteriormente se evaluó el efecto de la CMI 100% sobre la mortalidad de las esporas de *B. cinerea* durante 7 días de cultivo y en ensayos *in vivo* sobre frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) inoculados con 1×10^6 esporas/mL. En todos los ensayos se utilizó el etanol como vehículo de dilución, que fue probado como control negativo y el fungicida comercial Tecto₆₀ (tiabendazol) como control positivo. Con el análisis de CG-EM se identificaron los compuestos terpénicos β -pineno, β -trans-ocimeno, β -ocimeno, β -linalol, estragol, metil eugenol, β -cariofileno y β -cubebeno. El 75% del aceite esencial está compuesto por los terpenos estragol y metil eugenol con un contenido de 521.8 $\mu\text{g/mL}$ y 464.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A los 7 días del cultivo *in vitro* de *B. cinerea*, la concentración de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ fue la más baja que mostró el 100% de inhibición sobre micelio de *B. cinerea* (CMI 100%), inhibió la germinación de esporas y ejerció un 100% de mortalidad de éstas, y los frutos inoculados no presentaron síntomas de la infección, almacenado tanto a 4 °C como a 25 °C. Para determinar la concentración óptima de quitosano como recubrimiento de frutos de zarzamora Cv. Tupi, se midieron los valores de viscosidad, dureza y deformación de dureza en las biopelículas en tres concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5%). Con éstas, se determinó también la dureza y porcentajes de deformación, en frutos recubiertos almacenados a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (4 °C). Los resultados mostraron que la biopelícula de quitosano en frutos recubiertos, retrasa la pérdida de dureza de los frutos en ambas temperaturas. Además, se determinó la concentración óptima para el recubrimiento de los frutos de zarzamora con quitosano (1.5%), con la que se evaluó la dureza y el porcentaje de deformación según dureza, adicionando la CMI 100% (0.05 $\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de Santa María. Los frutos recubiertos solo con el aceite esencial mostraron los valores menores de dureza y los más altos de deformación, observando un claro ablandamiento en ellos. El adicionar la CMI 100% a los recubrimientos de quitosano, disminuyó la dureza, pero se mantuvo la deformación en valores relativamente bajos, por lo que el quitosano adicionado con el aceite esencial de *T. lucida* es una alternativa para mantener la vida de anaquel de los frutos de zarzamora y conservar la firmeza de los frutos hasta por siete días. El efecto inhibitorio *in vivo* de la biopelícula de quitosano se demostró con la concentración óptima (1.5%) adicionada con la CMI 100% (0.05 $\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de *T. lucida* (Santa María) en los frutos de zarzamora Cv. Tupi inoculados con *B. cinerea*, determinando un índice de severidad de 1, sin observar el crecimiento de micelio y síntomas de la infección.

Palabras clave: Antifúngico, Ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo*, terpenos, pruebas texturales.

ABSTRACT

In the present research the antifungal effect of the essential oil of the aerial part (stem, leaves and flowers) of *Tagetes lucida* (Santa Maria), it was determined by hydrodistillation method, which was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Antifungal activity *in vitro* was determined as a percentage of inhibition on the mycelial growth of *Botrytis cinerea*, determining the minimum inhibitory concentration 100% (MIC 100%) by applying 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 to 0.1 µg/mL of essential oil/mL. Subsequently the effect of the CMI 100% on the mortality of the spores of *B. cinerea* was evaluated during 7 days and *in vitro* assays of blackberry fruits (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) inoculated with 1×10^6 spores/mL. In all experiments ethanol was used ethanol as vehicle of dilution, that was tested as control negative and the fungicide commercial Tecto₆₀ (thiabendazole) as control positive. GC-MS analysis identified the terpene compounds β-pinene, β-trans-ocimene, β-ocimene, β-linalool, estragole, methyl eugenol and β-caryophyllene, β-cubebene. The 75% of the essential oil is composed by the terpenes estragole and methyl eugenol with a content of 521.8 µg/mL and 464.6 µg/mL, respectively. At seven days after the *in vitro* culture of *B. cinerea*, the concentration of 0.05 µg/mL was the lowest that showed 100% inhibition on mycelia of *B. cinerea* (CMI 100%), inhibited the spores germination and exerted a 100% mortality of these, and the inoculated fruits did not shows symptoms of the infection, stored at 4 °C and 25 °C. To determine the optimal concentration of chitosan as coating of blackberry fruits, viscosity, hardness and deformation of hardness were measure in the biofilms in three concentrations (0.5, 1.0 and 1.5%). With these, also determined the hardness and percentages of deformation, on coated fruits stored at room temperature (25 °C) and cooling (4 °C). The results showed that the chitosan biofilm in fruits coated, delays the loss of hardness to both temperatures. Also, the optimal concentration was determined for the coating of blackberry fruits with chitosan (1.5%), with which was analyzed the hardness and the percentage of deformation according to hardness, adding the MIC 100% (0.05 µg/mL) of the essential oil of Santa Maria. Those fruits coated only with the essential oil showed lower values of hardness and higher deformation, noting a clear softening in them. Add the MIC 100% of essential oil of *T. lucida* to chitosan coatings, the hardness declined, but remained values relatively low of deformation, so the added chitosan with essential oil of *T. lucida* is an alternative to maintain the shelf life of the blackberry fruits and retain the firmness of the fruits up to seven days. Effect inhibiting of the biofilm of chitosan was demonstrated *in vivo* with the optimum concentration (1.5%) added with the MIC 100% (0.05 µg/mL) of essential oil of *T. lucida* (Santa Maria) in fruits of blackberry Cv. Tupi inoculated with *B. cinerea*, determining an index of severity of 1, no growth of mycelia and symptoms of infection were observed.

Key words: Antifungal, *in vitro* assays, *in vivo* assays, terpenes, textural test.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Entre los polisacáridos utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles, el quitosano es uno de los más seleccionados, debido a sus características de maleabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y a sus propiedades antimicrobianas (Raafat *et al.*, 2008). Además de ser un polímero biodegradable, es un material que puede ser generado de desechos de la industria de mariscos, específicamente del exoesqueleto de crustáceos, al ser un derivado de la quitina obtenido por reacciones de desacetilación en presencia de una base alcalina (Fernandez-Saiz *et al.*, 2009).

El quitosano es utilizado en diversas áreas tales como las ciencias de los alimentos, la purificación del agua, la industria de pulpa y papel, farmacia y la medicina (Beverly *et al.*, 2008; Mathew y Abraham, 2008; Santos *et al.*, 2009). En la industria alimentaria se utiliza principalmente por sus propiedades para formar películas, las cuales funcionan como una barrera estructural semipermeable al CO₂, O₂ y agua, cuando se aplica a diversos frutos. Por la biocompatibilidad que presentan las biopelículas de quitosano con diversas moléculas, es utilizado para incorporar compuestos hidrofóbicos como son los aceites esenciales de plantas (Lin y Zhao, 2007; López-Mata *et al.*, 2012).

Las biopelículas de quitosano se han empleado para cubrir y conservar frutas y verduras como fresas (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008), mangos (Srinivasa *et al.*, 2002), manzanas (Assis y Pessoa, 2004), lechuga (Devlieghere *et al.*, 2004) y zanahorias (Cheah *et al.*, 1997), entre otros. Con ellas se ha conseguido controlar pudriciones y mejorar la calidad de los mismos, utilizando un amplio rango de concentraciones de la molécula (Devlieghere *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos, hidrofóbicos, aromáticos y volátiles constituidos por una mezcla compleja de compuestos, principalmente terpenos y alcoholes fenólicos que han sido reportados como inhibidores de hongos

poscosecha como *Botrytis cinerea* en condiciones *in vitro* (Tripathi y Dubey, 2004). Una de las características importantes en la industria alimentaria, es que la adición de este tipo de aceites mejora la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano (Hosseini *et al.*, 2008).

El aceite esencial de *Tagetes lucida* (Santa María) posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes, con un potencial alto como conservador natural en la industria alimentaria y es considerado GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) (Sacchetti *et al.*, 2005), por lo que su uso cumple con las exigencias de seguridad que demandan los consumidores por la incorporación de productos naturales en los alimentos.

La biocompatibilidad del quitosano con el aceite esencial de Santa María, podría ser explotada para mejorar las características de barrera antimicrobiana, al aplicarse en frutos de zarzamora, con la finalidad de preservar su calidad nutrimental y evitar su deterioro microbiológico. Los frutos de zarzamora son no climatéricos, por lo que deben ser siempre cosechados en la etapa de maduración de consumo, característica que le da una vida de anaquel muy corta y la necesidad de un manejo adecuado poscosecha, como de temperatura, para evitar su deterioro (Zhao, 2007).

Debido a su alta cantidad de humedad y azúcares presentes en el fruto, éste resulta susceptible al ataque de hongos. Dentro de las especies que mayormente causan problemas están *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*, siendo éste último el que predomina causando daños poscosecha, al ser un hongo altamente resistente y difícil de controlar, principalmente por ser necrotrófico (Regnier *et al.*, 2008).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Tagetes lucida* adicionado a una biopelícula de quitosano, sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora.

2. ANTECEDENTES

2.1. ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*)

La zarzamora (*Rubus sp*) pertenece al grupo de las “berries” o frutillas de la familia Rosaceae, que crecen en regiones con inviernos moderados y largos veranos. Son arbustos espinosos que alcanzan una altura entre 150 a 200 cm que se clasifican de acuerdo a la arquitectura del tallo en erecto, semi-erecto y rastrero, de follaje color verde claro que al madurar se torna oscuro y las flores pueden ser blancas o rosadas. Presentan frutos pequeños agregados que consisten de varias drupas llamados polidrupas, los cuales son de color negro cuando están maduros y típicamente pesan de 3-12 g dependiendo del cultivar. Son de sabor dulce, no climatéricos, generalmente bajos en calorías, una fuente de vitaminas y minerales y su consumo está asociado en disminuir la incidencia de enfermedades crónicas (incluyendo enfermedades del corazón y cáncer) debido a su capacidad antioxidante con un consumo anual per cápita de 0.5 kg. Se comercializan en congelado, deshidratado, procesado y en fresco. Sin embargo, al ser un fruto altamente perecedero se deben tener eficientes métodos de manejo poscosecha durante el transporte y almacenamiento (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; Zhao, 2007; Hancock, 2008; SIAP, 2016).

Existen numerosas especies y variedades de zarzamora que crecen en su mayoría silvestres, lo que dificulta su diferenciación. Entre las especies más representativas están la zarzamora común, la zarza de los rastrojos, la zarzamora enana y las llamadas moras Logan. Entre las diversas especies de zarzamosas que dan fruto, la zarzamora común o *Rubus ulmifolius* es la más característica y a la que se hace referencia al hablar de esta planta. Sin embargo, la zarzamora comercial proveniente de diversas cruza es considerada como *Rubus fruticosus*. La zarza de los rastrojos (*Rubus caesius*) da frutos de menor tamaño pero que maduran antes que ésta otra. La zarzamora enana (*Rubus chamaemorus*) es una especie que crece en Canadá, norte de Gran Bretaña, Europa septentrional y

Rusia ártica. Esta planta produce pequeños frutos dorados que se usan en la elaboración de pudines y mermeladas. En tanto, la especie *Rubus loganobaccus* produce frutos más ácidos que las zarzamoras conocidos como moras Logan, las cuales se distribuyen en los Estados Unidos como fruto enlatado (Zhao, 2007; Hancock, 2008).

2.1.1. Producción de zarzamora

El establecimiento de la zarzamora con fines de explotación comercial es muy reciente en nuestro país; ya que para 1985, de acuerdo a datos proporcionados por Muratalla (1994) se tenía solo una hectárea de la variedad Logan en Tetela del Volcán, Morelos. Para el año de 1995, el país contaba con una superficie de 380 Ha de las cuales Michoacán concentraba el 90%. En el Municipio de los Reyes Michoacán, se inició la explotación comercial de zarzamora a partir de 1995, estableciendo principalmente el cultivar Brazos, con la finalidad expresa de obtener producciones de fruta con calidad de exportación. Una gran parte de los productores han sustituido este cultivar por el cultivar Tupi, que para el 2013 se tenía una capacidad de cultivo de hasta 4,500 Ha en esta región (Sistema-Producto Zarzamora, 2013).

Además del cultivar Tupi, en México se siembran los cultivares cheyene, comanche, cherokee, shawnee, choctaw, brazos. Sin embargo, el cultivar tupi es la que ha tenido mayor aceptación, pues es una variedad altamente productiva, con aproximadamente 5,800 y hasta 12 mil cajas de 2.2 kg/Ha (Ponce de León-Bolfeta, 2007).

La producción mundial de zarzamora en sus diferentes cultivares se estimó de 154,603 ton en el 2005 (Strik *et.al.*, 2006). La creciente demanda y el aumento de las plantaciones en México, llevó a este cultivo en el 2015 a que nuestro país fuera el 5° productor mundial, con una producción de zarzamora que alcanzó las

123,090.56 ton, siendo Michoacán el principal productor con 116,166.24 ton (SIAP, 2016).

2.1.2. Problemas poscosecha

De los principales problemas poscosecha que presenta la zarzamora, se encuentra la corta vida de anaquel, pues la FAO (1995) señala que tiene una vida menor a 2 semanas, las variedades comerciales de 2 a 3 días y que son frutos con una humedad relativa de 90-95%, lo cual complica su traslado e inclusive su almacenamiento. Otro grave problema que enfrenta es el ataque por las especies de hongos *B. cinerea* y *R. stolonifer*, enfermedades poscosecha que si no son prevenidas o controladas a tiempo, la infección trae como consecuencia la pérdida completa del fruto durante el almacenamiento, transporte y comercialización (UCDAVIS, 2015).

2.2. *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.

Botrytis cinerea es la forma imperfecta o asexual del hongo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz, pertenece a la división Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae (Williamson *et al.*, 2007). Se caracteriza por los abundantes conidios (esporas asexuales) de forma oval en el extremo de conidióforos grises ramificados, además de producir esclerocios altamente resistentes a condiciones ambientales extremas, que al tener las condiciones óptimas germinan de nuevo (Phillips *et al.*, 1987). Es un agente patógeno, para productos agrícolas (alimentos) y de ornato (flores), que puede afectar su almacenamiento, transporte y vida de anaquel, causando la enfermedad llamada podredumbre o moho gris (Elad *et al.*, 2007).

En la zarzamora, este hongo suele presentarse generalmente en condiciones de alta humedad. La infección proviene de esporas producidas en residuos de tallos viejos, hojas caídas y frutos momificados, donde el hongo sobrevive como

esclerocio. Las esporas se dispersan por el viento y se depositan en las partes florales y frutos, si su superficie es húmeda y se encuentran las condiciones favorables (15 a 22 °C), la espora germina. El hongo puede infectar las partes florales y permanecer latente (sin mostrar síntomas) en frutos verdes, sin embargo, no quiere decir que no hayan sido infectados, pues la infección se va a manifestar después de la cosecha. En los frutos se manifiesta con áreas de color café claro de consistencia suave que avanzan hasta cubrir todo el fruto, posteriormente los frutos se cubren de un polvo gris y finalmente se momifican, lo cual indica que el tejido ha sido invadido por los conidios (ICA, 2011; Rebollar Alviter, 2011) (Figura 1).

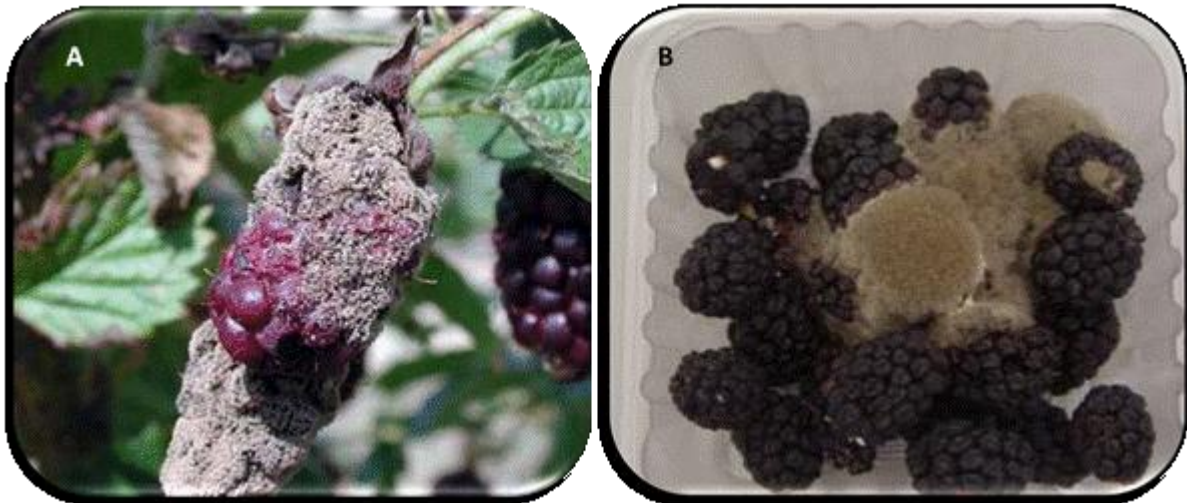


Figura 1. Frutos de zarzamora infectados con *Botrytis cinerea*: A) Frutos en campo; B) Frutos poscosecha.

2.2.1. Control de *B. cinerea* en el campo

Para el control de la enfermedad causada por *B. cinerea* en el cultivo de zarzamora, se han utilizado buenas prácticas de campo como medida de prevención entre las cuales están: 1) preparación del suelo, 2) utilizar material

para siembra debidamente desinfectado, 3) establecer el cultivo en terrenos fértiles y bien drenados, 4) distancias de siembra <3m entre plantas, 5) eliminar y quemar fuera del lote partes de planta que presenten síntomas de la enfermedad y 6) fertilización basada en el análisis de suelo y realizarse en dosis y épocas recomendadas. No obstante, el uso de fungicidas como control sigue siendo el método más utilizado, comúnmente se usa el Pormarsol (Ditiocarbamato), Elvaron (Triazol sistémico) y Frowncide (2,6-dinitroanilinas). Sin embargo, el uso excesivo de éstos presenta desventajas como es la resistencia del patógeno a los fungicidas y el riesgo para la inocuidad del producto (Elad *et al.*, 2007; ICA, 2011).

2.2.2. Métodos de preservación de alimentos

Para evitar el deterioro microbiológico y bioquímico de los alimentos, se ha recurrido a diversos métodos para su preservación. La FAO (1995) clasificó a los métodos para reducir el deterioro de los alimentos en: a) físicos, b) químicos y c) bioquímicos. De éstos, existen diversos procedimientos para la preservación de frutas y hortalizas, algunos de ellos son: 1) almacenamiento en frío, 2) congelamiento, 3) secado/deshidratación, 4) concentrados, 5) preservación con azúcar, 6) pasteurización y 7) almacenamiento en fresco.

Éste último es uno de los métodos comúnmente utilizados poscosecha para frutas y vegetales, del cual se encuentran: a) madurez de la cosecha, b) método de cosecha, c) pre-enfriamiento, d) productos químicos, e) transportación con ambiente controlado y f) recubrimientos (biopelículas).

En los últimos años, las biopelículas están siendo estudiadas con fines de aplicación para preservar frutas y verduras, ya que presentan características que las hacen tener un gran potencial en la industria alimentaria.

2.3. BIOPELÍCULAS COMESTIBLES

Una película en alimentos, se define como una capa delgada de un material comestible colocado en un alimento como un revestimiento, cuyo propósito es mantener su calidad (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). Las ventajas de utilizar biopelículas son: 1) reduce la transferencia de humedad, 2) actúan como una barrera a los gases (O₂, CO₂, etileno), 3) no son tóxicas, 4) son de bajo costo, 5) evitan el crecimiento de microorganismos y 6) extienden la vida de anaquel (Rodríguez *et al.*, 2005; Elsabee y Abdou, 2013). De los componentes empleados para la elaboración de biopelículas se encuentran los lípidos, proteínas y polisacáridos (Fernández-Pan y Maté-Caballero, 2011).

2.3.1. Biopelículas de naturaleza lipídica

Son de naturaleza hidrofóbica, se caracterizan por tener altas propiedades de barrera de vapor de agua, ofrecen una buena barrera de humedad, reducen la pérdida de agua y protegen contra oxidación. Sin embargo, presentan desventajas por poseer propiedades de barrera de oxígeno muy limitadas, su característica no polimérica limita su capacidad para formar recubrimientos cohesivos, relativamente son inflexibles, y los ácidos grasos insaturados son menos eficientes para controlar la transferencia de humedad debido a su alta polaridad (Fernandez-Pan y Mate-Caballero, 2011; Cordeiro de Azeredo, 2012; Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013; Ciolacu *et al.*, 2014).

2.3.2. Biopelículas de naturaleza proteica

Son de naturaleza hidrofílica y se derivan de diferentes fuentes animales y vegetales, son excelentes barreras de oxígeno, por lo que ayudan a controlar el intercambio de gases y proveen fuerza e integridad estructural. Sus desventajas recaen principalmente en que la estructura puede ser modificada por temperatura y presión, no son barreras efectivas contra el aroma y su funcionamiento depende

del peso molecular, conformación, propiedades eléctricas y estabilidad térmica. La conformación de la proteína se puede ver afectada por la densidad de carga y el balance hidrofílico-hidrofóbico (Fernandez-Pan y Mate-Caballero, 2011; Cordeiro de Azeredo, 2012; Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013; Ciolacu *et al.*, 2014).

2.3.3. Biopelículas formada por polisacáridos

Las biopelículas de este tipo son recubrimientos transparentes y homogéneos, mantienen el aroma, presentan óptimas propiedades mecánicas y debido a su hidrofobicidad las películas de polisacáridos proveen una buena barrera al CO₂ y O₂, por lo tanto retardan la respiración y la maduración de los frutos. También muestran algunas desventajas como: para mejorar sus propiedades mecánicas se mezclan con biopolímeros o se adicionan materiales hidrófobos (aceites, ceras); están limitadas por su solubilidad en agua y pobre barrera a la humedad y al vapor de agua (Fernández-Pan y Mate-Caballero, 2011; Cordeiro de Azeredo, 2012; Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013; Ciolacu *et al.*, 2014).

No obstante, para determinar qué sustancia es la óptima para formar la biopelícula dependerá del objetivo deseado, de la naturaleza del producto y de la aplicación específica (Quezada-Gallo, 2009). Además deben ser moléculas Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) ya que son consideradas como aditivos (Krochta, 1997).

Para recubrir frutillas los recubrimientos de proteínas y lípidos generalmente no son usados, ya que éstos deben ser transparentes y no deben interferir con el aroma y el sabor del alimento que protegen, además deben ser fáciles de aplicar en capas uniformes y deben adherirse fuertemente al alimento, evitando que los materiales circundantes interfieran (Zhao, 2007).

2.4. QUITOSANO

El quitosano es un biopolímero obtenido de la desacetilación de la quitina en un medio alcalino (Figura 2) (El Ghaouth *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2008), la cual proviene del exoesqueleto de crustáceos, insectos y de la pared celular de los hongos. La quitina es el segundo biopolímero más abundante sólo después de la celulosa. El quitosano está constituido por unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) con uniones β (1-4) (Hernández-Lauzardo, 2005; Elsabee y Abdou, 2013).

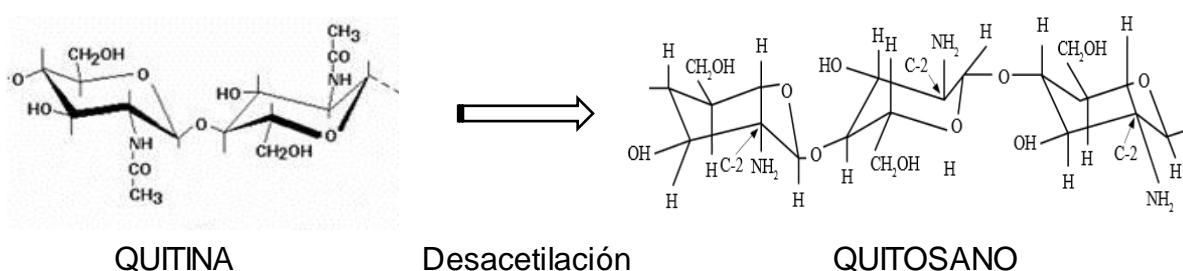


Figura 2. Obtención de quitosano por reacción de desacetilación de quitina en un medio alcalino.

El quitosano tiene diversas aplicaciones en las áreas de agricultura, farmacéutica, tratamiento de aguas residuales e industria de alimentos. Siendo ésta última donde ha tomado mayor importancia, ya que se ha empleado desde hace años como recubrimiento de alimentos. Las ventajas de emplear este material como recubrimiento son: su bajo costo, baja permeabilidad, es comestible, biodegradable y presenta propiedades antifúngicas y antibacterianas (Zivanovic *et al.*, 2015).

El potencial de uso del quitosano para la preparación de biopelículas, se debe a sus propiedades como: baja permeabilidad, biodegradable, biocompatible, flexible, durable, difícil de romper, disminuyen la tasa de respiración del alimento e inhiben el crecimiento de microorganismos. En tanto las desventajas de emplear este biopolímero son: insolubilidad en agua, actividad antimicrobiana (relacionada al

pH, a las especies de microorganismos, peso molecular y grado de desacetilación), soluble en ácidos orgánicos y alta permeabilidad al vapor de agua (Goy *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010; Elsabee y Abdou, 2013).

2.4.1. Efecto antimicrobiano del quitosano

Diversos estudios mencionan tres posibles mecanismos que describen las propiedades antimicrobianas del quitosano al ser utilizado como biopelícula comestible (Goy *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010; Martínez-Camacho *et al.*, 2010):

1. Las cargas positivas presentes en la cadena polimérica del quitosano, debido a su grupo amino, interactúan con las cargas negativas de los residuos de las macromoléculas de las membranas de los microorganismos, interfiriendo con el intercambio de nutrientes entre el interior y el exterior de la célula. Además estas cargas compiten con el Ca^+ de las zonas electronegativas de la membrana, causando la liberación del material intracelular resultando en la muerte celular.
2. Actúa como agente quelante, uniéndose a los metales traza presentes en las estructuras externas de los microorganismos causando la inhibición del crecimiento
3. El quitosano de bajo peso molecular es capaz de entrar al núcleo de la célula, interactúa con el ADN, interfiere con la síntesis del ARN afectando la síntesis de proteínas e inhibiendo el mecanismo de acción de varias enzimas.

2.4.2. Efecto antifúngico del quitosano

Estudios preliminares han evaluado el efecto antifúngico *in vitro* del quitosano, han detectado que dicho efecto depende directamente de la concentración utilizada. El Ghaouth *et al.* (1992) mencionan que el quitosano produce un retraso de los signos de infección de *B. cinerea* y *Rhizopus stolonifer* (Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004); inhibe la germinación de esporas de *Aspergillus niger* en concentraciones de 0.1% o 1% (w/v) (Sebti *et al.*, 2005); inhibe el crecimiento de *Colletotrichum musae* en un 100% a concentraciones de 0.75% o superiores (Jinasena *et al.*, 2011); y, a en una concentración del 1%, el quitosano retrasa el crecimiento del micelio de *C. capsici* (Ali *et al.*, 2015) (Cuadro 1).

Con los resultados de estas y otras investigaciones recientes, se ha demostrado que el efecto antifúngico del quitosano en forma de recubrimiento en frutos, se debe a la formación de una cubierta en la superficie de los mismos, que actúa como una barrera mecánica para proteger al fruto de las infecciones causadas por hongos (El Ghaouth *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2008).

La capacidad antifúngica del quitosano se le ha atribuido a su carácter catiónico, debido a la interacción de los grupos amino libres cargados positivamente en medio ácido con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas de la pared de los hongos, las cuales cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, provocando la alteración de sus principales funciones (Lárez-Velásquez, 2008; Quintero *et al.*, 2010). Este mecanismo de acción puede causar la inhibición de la germinación de esporas, elongación del tubo de germinativo y crecimiento de los hongos. Sin embargo, la efectividad de la acción del quitosano sobre los hongos depende de la concentración utilizada (Goy *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Efecto antifúngico del quitosano en ensayos *in vitro*.

Concentración	Especie de Hongo	Efecto	Referencia
10 mg/mL y 15 mg/mL	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	Signos de infección aparecieron 5 días después	El Ghaouth <i>et al.</i> , 1992
1.0, 1.5 y 2.0%	<i>R. stolonifer</i>	Retraso el desarrollo del hongo	Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004
0.1 o 1% (w/v)	<i>Aspergillus niger</i>	Inhibición del crecimiento fúngico al menos por 10 días. Inhibición de esporas	Sebti <i>et al.</i> , 2005
0.1 a 1% (w/v)	<i>Colletotrichum musae</i>	La completa inhibición del patógeno se observó a concentraciones de 0.75% y superiores	Jinasena <i>et al.</i> , 2011
0.5 a 1%	<i>Colletotrichum capsici</i>	A los 7 días de incubación retraso el crecimiento del micelio al 1% de quitosano	Ali <i>et al.</i> , 2015

2.4.3. Resistencia de *B. cinerea* al quitosano

A pesar de los intentos por recubrir los frutos, para evitar la infección por *B. cinerea*, éste ha presentado resistencia a las biopelículas de quitosano. Existen estudios que señalan no haber observado cambios en *B. cinerea*, lo cual indica que el efecto del quitosano puede variar con el hongo (El Ghaouth *et al.*, 1992); la germinación de esporas de *B. cinerea* fueron significativamente inhibidas solo cuando las concentraciones del quitosano fueron mayores a 0.01% e inhibidas completamente a 1% (Liu *et al.*, 2007); las esporas de *B. cinerea* tuvieron un 50% de germinación con 1% de quitosano expuestas durante 1 min a 25 °C, además de que más del 60% de las esporas germinaron en medio PDA después de 1 min de inmersión en 1% de quitosano (Xu *et al.*, 2007), en tanto que Lárez-Velásquez

(2008) menciona que el quitosano no inhibe completamente la germinación de *B. cinerea*.

Debido a estos resultados, la biopelícula de quitosano puede ser reforzada con compuestos antifúngicos para potenciar el efecto, sobre todo con aquellos hongos poscosecha que muestran resistencia a este biopolímero, como *B. cinerea*.

2.5. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son producidos por plantas aromáticas, pertenecientes a diversas familias como: Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Santalaceae, Zingiberaceae y Zygophyllaceae, entre otras (Başer y Demirci, 2007). Son una mezcla de compuestos volátiles (terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y compuesto fenólicos) que son biosintetizados por la planta en flores, frutos, tallos, hojas y raíz; producto del metabolismo secundario vegetal y representan pequeñas cantidades con respecto al peso total de la planta (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Bassolé y Juliani, 2012).

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos por diferentes métodos (Tongnuanchan y Benjakul, 2014; Preedy, 2016), entre los que destacan por ser los más usuales:

Destilación por arrastre de vapor. Método más usado para la extracción de aceites esenciales. La muestra se coloca en agua en ebullición o se calienta por vapor. El calor aplicado es la principal causa del rompimiento de la célula vegetal y como consecuencia, los compuestos aromáticos de la planta se liberan.

Hidrodestilación. Es el método estandarizado para la extracción de aceites esenciales que a partir de material vegetal como tallos, hojas, madera o flores, se aíslan productos naturales no solubles en agua con alto punto de ebullición. Este

proceso consiste en la completa inmersión de la planta en agua hasta su ebullición. Este método protege a los aceites extraídos de cierta degradación, ya que el agua circundante actúa como una barrera para evitar que se sobrecaliente.

Hidrodifusión. Es un tipo de destilación cuya diferencia está en la manera de entrada del vapor en el envase. Este método se utiliza cuando el material vegetal ha sido secado y se daña a la temperatura de ebullición. Para éste método se aplica vapor a la parte superior del material vegetal, mientras que el vapor se introduce desde el fondo para el método de destilación de vapor. Puede ser operado a baja presión o vacío y reduce la temperatura del vapor a menos de 100°C. Es superior la destilación de vapor porque utiliza menos tiempo de proceso y un mayor rendimiento de aceite.

Extracción con solventes. Se implementa para material vegetal como flores, delicado y frágil, que no toleran el calor y la destilación. Utilizan diversos solventes. Generalmente, el solvente se mezcla con la planta y se somete a calor para extraer los aceites esenciales para después filtrarlo. Posteriormente el filtrado se concentra por la evaporación del solvente. Sin embargo, los residuos de los solventes que quedan en el producto final pueden ser tóxicos para el ser humano.

Fluidos supercríticos. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas mientras que el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Este procedimiento presenta varias ventajas: alto rendimiento, fácil eliminación del solvente (que además se puede reciclar), no se alteran las propiedades químicas de la esencia por las bajas temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo el equipo requerido es

relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

Extracción por microondas. Es un método de rápida extracción para plantas aromáticas y semillas secas. Presenta la ventaja de presentar alta selectividad y obtención en corto tiempo. Es una combinación de calentamiento con microondas y destilación en seco realizada a presión atmosférica sin ningún disolvente ni agua.

Para determinar qué método emplear se debe considerar la parte de la planta de la cual se realizará la extracción y el uso del aceite esencial. Una inadecuada extracción influye en la calidad del aceite. Para la obtención de un aceite esencial considerado GRAS, los sistemas de extracción utilizando vapor de agua, son los más aceptados por presentar un alto contenido de compuestos aromáticos volátiles (terpenoides) y un mínimo de compuestos fenólicos de mediano y alto peso molecular, así como otros compuestos no deseables.

2.5.1. Usos y propiedades

Se conocen cerca de 3,000 aceites esenciales, los cuales tienen uso cosmético, farmacéutico, en perfumería y en la industria de los alimentos (saborizantes, fragancias en los alimentos) (Cuadro 2) (Brad, 2010). Esto se debe a sus propiedades antibacteriales, insecticidas, antioxidantes y antifúngicas. Al ser utilizados como aditivos en los alimentos, la FDA los ha clasificado como GRAS (Burt, 2004).

2.5.2. Aceites esenciales con actividad antifúngica

Se han realizado estudios analizando la actividad antifúngica de diversos aceites esenciales y se han probado sobre diversos hongos poscosecha (Cuadro 3). Se ha observado que los aceites esenciales con un alto contenido de compuestos

terpénicos suelen ser efectivos para inhibir hasta un 100% a hongos. Como ejemplo de esto, se ha demostrado el efecto antifúngico del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (té limón), que inhibe el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger* (Tzortakis y Economakis, 2007) o el aceite de *Lippia scaberrima* (hierba dulce) que inhibe a *Colletotrichum gloesporioides* (Regnier *et al.*, 2008). Sin embargo, existen estudios que mencionan que para inhibir a *B. cinerea* se requirieron altas concentraciones para alcanzar un 74.8% con aceite esencial de orégano (*Origanum compactum*) (Bouchra *et al.*, 2003) y un 100% de inhibición con aceites de clavo (*Syzygium aromaticum*) y mostaza (*Brassica nigra*) en fase gaseosa (Aguilar-González *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Usos de algunos aceites esenciales obtenidos de plantas en diferentes industrias.

Aceite esencial (nombre común)	Usos
Naranja (<i>Citrus x sinensis</i>)	Refrescos, dulces, fragancias, saborizantes
Menta (<i>Mentha arvensis</i>)	Pasta dental, goma de mascar, dulces, fragancias
Menta (<i>Mentha piperita</i>)	Pasta dental, goma de mascar, dulces, licor, tabaco, fragancias
Citronella (<i>Cymbopogon nardus</i> L. Rendle)	Perfumes, artículos de tocador, productos de limpieza del hogar
Limón (<i>Citrus x limón</i>)	Refrescos, dulces, fragancias, productos de limpieza del hogar, saborizante
Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Condimentos, medicamentos, tabaco
Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	Perfumes, cosméticos, artículos de tocador
Alcanfor (<i>Cinnamomum camphora</i>)	Medicamentos
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Condimentos, perfumes, alimentos procesados, artículos de tocador
Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	Fragancias, condimentos, alimentos procesados

Cuadro 3. Aceites esenciales con actividad antifúngica.

Aceite esencial	Concentración	Inhibición (%)	Hongo	Referencia
<i>Cymbopogon citratus</i> (té limón)	500 ppm	100	<i>Aspergillus niger</i>	Tzortakis y Economakis, 2007
	500 ppm	100	<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	500 ppm	60	<i>Botrytis cinerea</i>	
<i>Origanum compactum</i> (orégano)	50 ppm	74.8	<i>B. cinerea</i>	Bouchra et al., 2003
<i>Thymus glandulosus</i> (tomillo)	50 ppm	31.1	<i>B. cinerea</i>	
<i>Lippia scaberrima</i> (hierba dulce)	2400 µL/L	100	<i>Colletotricum gloesporioides</i>	Regnier et al., 2008
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	0.25 µL/L	98.5	<i>A. niger</i>	Lima de Sousa et al., 2013
	0.25µL/L	99.9	<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)	1µL/L	98.3	<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Syzygium aromaticum</i> (clavo)	92.56µL _{aceite} esencial/L _{aire}	100	<i>B. cinerea</i>	Aguilar-González et al., 2015
<i>Brassica nigra</i> (mostaza)	15.42µL _{aceite} esencial/L _{aire}	100		

2.5.3. Aceites esenciales adicionados a biopelículas de quitosano

Debido a las propiedades que se les atribuyen a los aceites esenciales, son una alternativa para ser adicionados a las biopelículas de quitosano y potenciar su efecto antimicrobiano, con fines de alargar la vida de anaquel de los frutos. Debido a la naturaleza lipídica de los aceites esenciales, éstos reducen el vapor de agua, la permeabilidad de las biopelículas y actúan como una barrera de

oxígeno debido a la capacidad antioxidante de los aceites esenciales (Xing *et al.*, 2011; Atarés y Chiralt, 2015).

Se han realizado estudios en frutos recubiertos con biopelículas de quitosano a los cuales se les añadió un aceite esencial (Cuadro 4), y que han resultado efectivos contra los microorganismos probados, ya que potencian la actividad antifúngica de las biopelículas. No obstante, mencionan que dependiendo del tipo de aceite esencial empleado, cambian las propiedades organolépticas de los frutos y en ciertas ocasiones provocan que sean poco atractivos para el consumidor.

Cuadro 4. Frutos recubiertos con biopelículas de quitosano y aceites esenciales.

Fruto	Composición de la biopelícula	Microorganismo contra el que actúa	Referencia
Uvas	Quitosano y aceite esencial de orégano	<i>Rhizopus stolonifer/Aspergillus niger</i>	Timoteo dos Santos <i>et al.</i> , 2012
Aguacate	Quitosano y aceite esencial de tomillo	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Bill <i>et al.</i> , 2014
Tomate cherry	Quitosano y aceite esencial de menta	<i>Aspergillus niger/Botrytis cinerea</i>	Dantas-Guerra <i>et al.</i> , 2015
Uvas	Quitosano y aceite esencial de menta	<i>Aspergillus niger/B. cinerea/ Penicillium expansum</i>	Dantas-Guerra <i>et al.</i> , 2016

2.6. *Tagetes lucida* Cav. (Santa María)

La especie *Tagetes lucida* Cav. es conocida comúnmente como Santa María, hierba de nubes, periquillo, hierbanís, yauhtli, cuahuayahuitli (náhuatl), mikua (otomí). Es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Asteraceae, de 80 cm de alto, con olor a anís al estrujarse, hojas todas opuestas, con numerosas glándulas oleíferas translúcidas, cabezuelas solitarias o más o menos cimoso-corimbosas, de flores liguladas generalmente presentes, fértiles, de corolas

amarillas u anaranjadas (Figura 3) (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Catalogue of Life, 2016).

En México, *T. lucida* se distribuye en zonas montañosas, pastizales y bosques de *Quercus* y de coníferas, a una altitud entre los 2250-2900 msnm hasta Centro América (Céspedes *et al.*, 2006; Catalogue of Life, 2016).



Figura 3. Conjunto de flores de Santa María (*Tagetes lucida* Cav.) (Fotografía: Cázarez-Chávez D.).

2.6.1. Cultivo

Se han realizado estudios evaluando diversos métodos para obtener éxito en el cultivo de *T. lucida*, con la finalidad de evitar la depredación del medio silvestre. Acosta de la Luz *et al.* (2010, 2011) mencionan que la multiplicación de *T. lucida* se debe efectuar mediante estacas de yemas terminales, obtenidas de ramas jóvenes de plantas madres pre-seleccionadas, logrando altos porcentajes de estacas enraizadas y que pueden ser llevadas a cultivo bajo el sol, en lugares preparados con tierra y materia orgánica bien descompuesta, manteniendo

adecuados niveles de humedad, riegos frecuentes y ligeros. Determinando que el momento óptimo para la cosecha de *T. lucida* fuese a los 6 meses de edad en plantaciones de mayo y a los 5 meses de edad en junio.

2.6.2. Usos y composición del aceite esencial de *T. lucida*

Los aceites esenciales del género *Tagetes* tienen propiedades nematocidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas y antioxidantes (Xu *et al.*, 2012). Existen reportes del uso de *T. lucida* con efecto antibacterial contra enfermedades gastrointestinales (Castillo-Juárez *et al.*, 2009), así como antifúngico (Céspedes *et al.*, 2006), insecticida (Vera *et al.*, 2014) o antioxidante (Aquino *et al.*, 2002). En tanto, en la medicina tradicional se emplea para tratar trastornos digestivos, dolores reumáticos, várices, resfriado, asma, contra áscaris o para el tratamiento de malestares del sistema nervioso central debido a la actividad ansiolítica y sedante (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

La composición química de un extracto hexánico de *T. lucida* indica como compuestos mayoritarios al estragol y al metil eugenol y en menor concentración a mirceno, o-cimeno, β -linalol y acetato de geraniol (Fulgencio-Negrete, 2013). En tanto, que un extracto metanólico contiene cumarinas (Céspedes *et al.*, 2006).

Por lo que, debido a las propiedades antimicrobianas que posee, el uso del aceite esencial de *T. lucida* resulta ser un candidato novedoso para ser incorporado en una biopelícula de quitosano que se aplique a frutos de zarzamora para el tratamiento contra *B. cinerea*.

3. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de biopelículas es un método útil para la preservación de alimentos y es una alternativa para ampliar la vida de anaquel de diversos frutos. El quitosano ha sido un excelente recubrimiento comestible de frutas y hortalizas, por sus características inocuas y por sus propiedades antifúngicas. Sin embargo, se sabe que *B. cinerea*, el principal hongo que afecta en la etapa de poscosecha en zarzamora, muestra resistencia a este tipo de biopelículas. Es por ello, que la adición al quitosano del aceite esencial de Santa María (*Tagetes lucida*) para el control del moho gris en fruto de zarzamora, se propone como un medio de estudio para determinar el efecto antifúngico.

4. HIPÓTESIS

La adición del aceite esencial de *Tagetes lucida* a una biopelícula de quitosano potencializa la actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora.

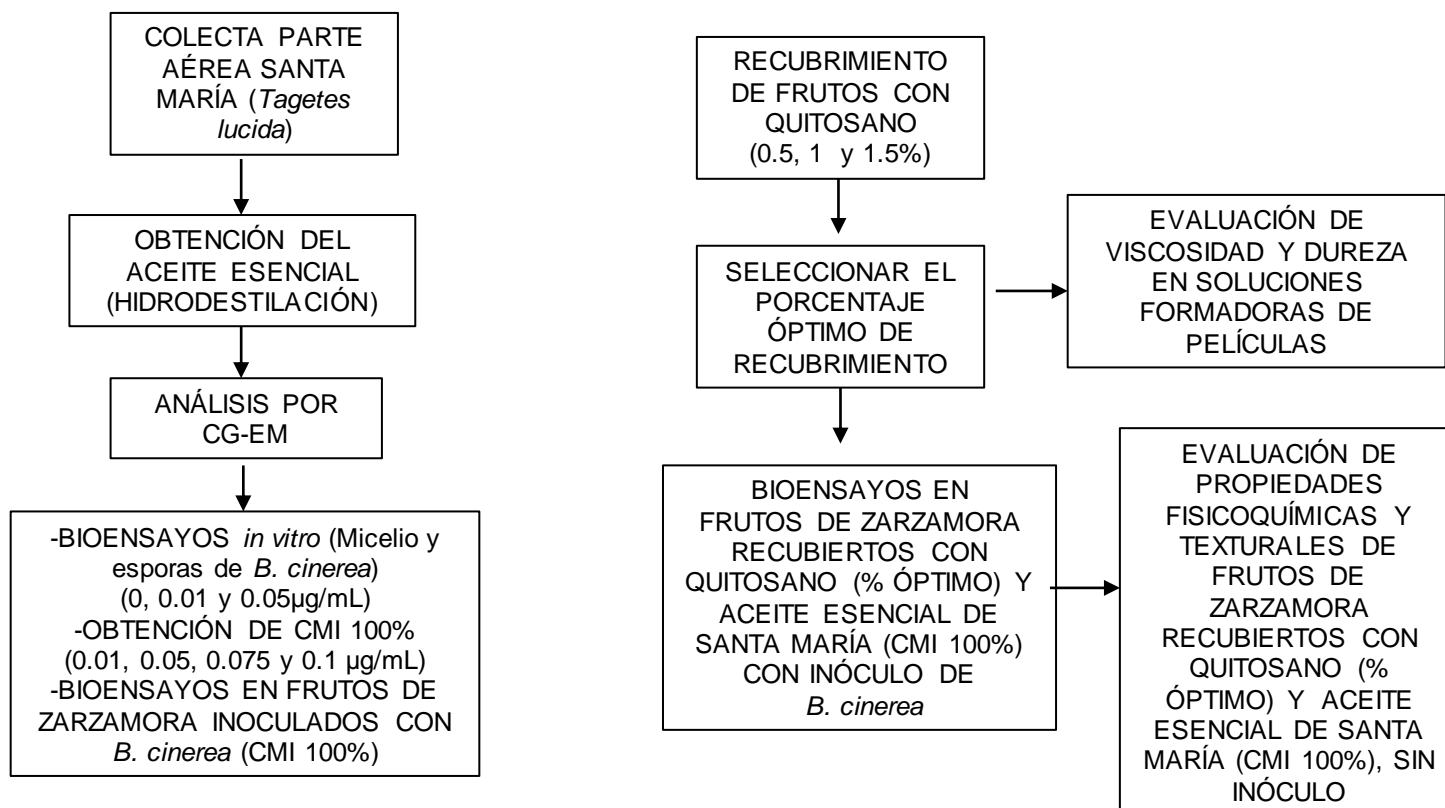
5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y cuantificar los componentes terpénicos del aceite esencial de *T. lucida* obtenido por el método de hidrodestilación.
2. Determinar el efecto antifúngico y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *T. lucida* sobre *B. cinerea*.
3. Determinar la concentración del quitosano para un óptimo recubrimiento de frutos de zarzamora y evaluar las propiedades fisicoquímicas y texturales de frutos recubiertos con la biopelícula de quitosano y aceite esencial de *T. lucida*.
4. Evaluar el efecto antifúngico de una película de quitosano adicionada con aceite esencial de *T. lucida* en frutos de zarzamora inoculados con *B. cinerea* almacenados a diferentes temperaturas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. Efecto antifúngico del aceite esencial de Santa María (*Tagetes lucida*) sobre *Botrytis cinerea* bajo condiciones *in vitro* y en frutos de zarzamora.

Resumen

En la presente investigación se determinó el efecto antifúngico del aceite esencial de *Tagetes lucida* (Santa María), una planta aromática utilizada en la medicina tradicional de México. El aceite esencial fue obtenido de la parte aérea (tallo, hojas y flores) por el método de hidrodestilación y fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para identificar y cuantificar los compuestos mayoritarios. La actividad antifúngica fue determinada como porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de micelio de *Botrytis cinerea* con el método de difusión en placa, aplicando 0, 0.075 y 0.1 µg de aceite esencial/mL, como una prueba de exploración inicial inhibitoria, utilizando etanol como vehículo de dilución, que fue probado como control negativo. El fungicida comercial Tecto₆₀ (tiabendazol) fue utilizado como control positivo. La concentración mínima inhibitoria 100% (CMI 100%) del aceite esencial sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, fue determinada con la aplicación *in vitro* de diferentes concentraciones (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 µg/mL), para posteriormente evaluar el efecto de la CMI 100% sobre la mortalidad de las esporas de *B. cinerea* durante 7 días de cultivo. La determinación del efecto del aceite esencial de *T. lucida* sobre frutos de zarzamora se realizó con la aplicación de la CMI 100%, inoculados con 1×10^6 esporas/mL, ensayando con frutos maduros sin inocular y con los tratamientos control negativo y control positivo. Con el análisis de CG-EM se identificaron los compuestos terpénicos mayoritarios: β-pineno, β-trans-ocimeno, β-ocimeno, β-linalol, estragol, metil eugenol, β-cariofileno y β-cubebeno. El 75% del aceite esencial está compuesto por los terpenos estragol y metil eugenol con un contenido de 521.8 µg/mL y 464.6 µg/mL, respectivamente. A los 7 días del cultivo *in vitro* de *B. cinerea*, con 0.05, 0.075 y 0.1 µg/mL del aceite esencial de *T. lucida*, se obtuvo un 100% de inhibición del crecimiento de micelio. La concentración de 0.05 µg/mL fue la más baja que mostró el 100% de inhibición sobre micelio de *B. cinerea* (CMI 100%), la que no solamente inhibió la germinación de esporas, sino que ejerció un 100% de mortalidad de éstas. También con los ensayos realizados sobre frutos de zarzamora, se confirmó el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. lucida*, ya que los frutos inoculados y recubiertos con 0.05 µg/mL, no presentaron síntomas de la infección después de 7 días de incubación, tanto a 4 °C como a 25 °C. Con estos resultados se confirma la inhibición del aceite esencial de Santa María sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* y un efecto

letal sobre las esporas de este hongo. Es perspectiva de esta investigación, utilizar este aceite esencial como aditivo en una biopelícula de quitosano, para recubrir frutos de zarzamora y evitar el desarrollo de hongos durante su vida de anaquel.

Palabras clave: Esporas, estragol, hongos, metil-eugenol, terpenos.

Abstract

In this research, was determined the antifungal effect of essential oil of *Tagetes lucida* (Santa María), this is an aromatic plant used in traditional medicine in Mexico. The essential oil was obtained from the aerial part (stem, leaves and flowers) by the method of hydro-distillation and was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) to identify and quantify the major compounds. The activity antifungal was measured as percentage of inhibition on the growth of mycelium of *Botrytis cinerea* using agar diffusion plate method, applying 0, 0.075 and 0.1 μg of oil essential/mL, as an exploration assay of initial inhibition, with ethanol as vehicle of dilution that was tested as control negative. The commercial fungicide, Tecto₆₀ (thiabendazole) was used as positive control. The concentration minimum inhibitory 100% (CMI 100%) of the oil essential on the mycelium growth of *B. cinerea*, was determined with the application *in vitro* of different concentrations (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), for subsequently evaluate the effect of CMI 100% on the mortality of the spores of *B. cinerea* during 7 days of culture. The effect of the essential oil of *T. lucida* was determined on mature fruits of blackberry treated with the CMI 100% and inoculated with 1×10^6 spores/mL, mature non-inoculated fruits and positive control and negative control treatments were assayed. The major terpene compound were identified by GC-MS analysis: β -pinene, β -trans-ocimene, β -ocimene, β -linalool, estragole, methyl-eugenol and β -caryophyllene, β -cubebene. The 75% of the oil essential is composed by the terpenes estragole and methyl-eugenol with a content of 521.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 464.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. An inhibition of 100% of the growth of mycelium was obtained with 0.075 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *T. lucida* essential oil, at seven days after the *in vitro* culture of *B. cinerea*. The concentration of 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was the more low that showed the 100% of inhibition on mycelia of *B. cinerea* (CMI 100%), which not only inhibited the germination of spores, but it effected 100% mortality of these. Also with this assays realized on fruits of blackberry, the effect antifungal of the oil essential of *T. lucida* was confirmed, since those fruits inoculated and coated with 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, not presented symptoms of the infection after 7 days of incubation, both to 4 °C as to 25 °C. With these results we confirm the inhibition of the oil essential of Santa María on the growth mycelia of *B. cinerea* and an effect lethal on the spores of this fungus. It is perspective of this research, to use this essential oil as an additive in a biofilm of

chitosan to coat blackberry fruit and avoid the development of fungi during its shelf life.

Keywords: spores, estragole, fungi, methyl-eugenol, terpenes.

Introducción

Los aceites esenciales de plantas aromáticas presentan metabolitos secundarios, principalmente de tipo terpénico, con propiedades antifúngicas que pueden ser utilizados para el control de enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos (Fiori *et al.*, 2000). Estos compuestos presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos ya que son considerados como GRAS (Sacchetti *et al.*, 2005), debido a que muestran una baja toxicidad, menor residualidad y una alta selectividad, por lo que son candidatos potenciales para su aplicación en alimentos (Singh *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en la capacidad que tienen para interactuar con el citoplasma del patógeno y su efecto está estrechamente relacionado con la solubilidad, por la composición de los aceites esenciales de cada planta, a la configuración estructural de cada compuesto, a sus grupos funcionales y a la posible interacción sinérgica entre sus componentes (Dorman y Deans, 2000; Ronquillo, 2007). La hidrofobicidad de los terpenos les permite incorporarse a los lípidos de membrana de los microorganismos patógenos, ocasionando trastornos en su estructura y permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros compuestos (Bosquez-Molina *et al.*, 2009).

La actividad antifúngica de diversos aceites esenciales se debe al contenido de monoterpenos como el timol y el eugenol, que se han encontrado en plantas como tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) y clavo (*Eugenia caryophyllata*). También se ha demostrado el efecto antifúngico de compuestos terpénicos del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) y de tradescantia (*Tradescantia spathacea*), que inhiben el crecimiento tanto *in vitro* como en campo

de hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. lindemuthianum*, que causan la enfermedad de la antracnosis en gran número de plantas (Bertelli *et al.*, 2003; Nguefack *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004).

El efecto antifúngico de *T. lucida* ha sido reportado sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solani* y *Trichophyton mentagrophytes*, pero principalmente por el contenido de cumarinas en extractos metanólicos (Céspedes *et al.*, 2006). Recientemente, Fulgencio-Negrete (2013) mostró la efectividad del aceite esencial de esta planta, obtenido por extracción hexánica, sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *C. acutatum*; determinó como responsable de esta actividad al compuesto terpénico metil-eugenol. Esta planta comúnmente es conocida como Santa María o tarragón mexicano, perteneciente a la familia Asteraceae y es muy importante por sus propiedades terapéuticas, en algunas regiones es consumida en ensaladas (Céspedes *et al.*, 2006).

Por el interés de determinar la efectividad del aceite esencial de *T. lucida* sobre *B. cinerea*, un hongo fitopatógeno de zarzamora (*Rubus fruticosus*), se planteó evaluar sus propiedades antifúngicas, realizando bioensayos *in vitro* y su aplicación en frutos maduros de zarzamora, así como identificar y cuantificar sus componentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Plantas.- Se colectaron ejemplares silvestres en floración de Santa María (*Tagetes lucida* Cav.) en el período entre agosto y septiembre de 2015, en la Tenencia Morelos del municipio de Morelia, Michoacán, México (19°38'43'' Norte, 101°14'13'' Oeste).

Botrytis cinerea.- La cepa utilizada para el presente trabajo pertenece al cepario del laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, donada por el Dr. Eduardo Valencia Cantero. La cepa se mantuvo en un medio de cultivo PDA (papa dextrosa-agar) en cámara de crecimiento (24 °C, fotoperiodo de 16 de luz, 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y 60% de humedad). Las transferencias a medio fresco se realizaron cada 21 días.

Frutos.- Los frutos fueron colectados en un huerto en la localidad de Ziracuaretiro, en etapa de madurez de consumo.

Método de extracción del aceite esencial

Se colectó la parte aérea (tallos, hojas y flores) de la planta de Santa María, durante los meses de agosto y septiembre del 2015. Por cada 200 g de muestra (peso fresco), se añadieron 2 L de agua y se sometió a ebullición por 12 h y por medio de hidrodestilación se obtuvo el aceite esencial. Éste fue recuperado en un matraz colocado en hielo. Después de diferentes hidrodestilaciones, las muestras de aceite fueron separadas del agua de evaporación mediante un embudo de separación. El aceite recuperado fue almacenado en refrigeración hasta su uso.

Para determinar el rendimiento del aceite esencial se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{M_1}{M_2} \times 100$$

Dónde: M_1 =masa final de aceite esencial M_2 = masa inicial de parte aérea de la planta

Análisis y cuantificación de terpenos del aceite esencial de *T. lucida*

La identificación y cuantificación de los compuestos terpénicos se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), método

reportado por Torres-Martínez *et al.* (2013). Se inyectó 1 μL de muestra en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (7 890A) equipado con un detector de masas (Agilent 5 975C), que operó utilizando helio como gas acarreador, con un flujo de 1 mL min⁻¹, con inyección dividida (split 50:1), a una temperatura de 250 °C en una columna capilar no polar HP 5MS (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μm Film), con las siguientes condiciones: temperatura inicial de 50 °C, seguida por una rampa de 5 °C min⁻¹ para alcanzar 280 °C por 1 min, otra rampa de 25 °C min⁻¹ para llegar a 380 °C, hasta 3 min. El tiempo de corrida fue de 50 min. El espectrómetro de masas funcionó a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un voltaje de ionización a 70 eV, a una temperatura de la interfase de 250 °C, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 50 - 500 m/z-1.

Ensayos *in vitro* por el método de difusión en placa

En el centro de cajas de Petri con medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Bioxon®), se colocó un segmento de 0.25 cm² de micelio del *B. cinerea*, aplicando posteriormente 50 μL del aceite esencial de cada una de las concentraciones probadas. Inicialmente se determinó el efecto inhibitorio del aceite esencial de Santa María, aplicando 0, 0.075 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como vehículo de disolución a etanol absoluto, que fue usado como el tratamiento control negativo. Como control positivo se utilizó 5 mg/mL de Tecto₆₀® (tiabendazol). Las placas fueron incubadas a 22 °C durante 7 días para determinar el porcentaje de inhibición (%) tomando en cuenta al control negativo como el 100% de crecimiento (crecimiento completo en placa de 6 cm de diámetro) que correspondió a una inhibición del 0%. Cada experimento se realizó por triplicado (método adaptado de Fulgencio-Negrete, 2013).

Obtención de la concentración mínima inhibitoria

Con el método de difusión en placa siguiendo las condiciones arriba mencionadas, se probaron diferentes concentraciones del aceite esencial de Santa María (0,

0.01, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$), para determinar la concentración mínima inhibitoria del 100% del crecimiento de micelio de *B. cinerea* (CMI 100%), a los 7 días del cultivo.

Efecto antifúngico del aceite esencial de Santa María sobre esporas de *B. cinerea*

Las esporas fueron obtenidas de cultivos de 10 días de *B. cinerea*, en medio PDA, adicionando 5 mL de agua estéril por caja Petri y recuperando las esporas después de un ligero raspado con un asa bacteriológica sobre el micelio con esporas. De esta solución de esporas se preparó una concentración de 1×10^6 esporas/mL, previo el conteo en cámara de Neubauer (Rodríguez *et al.*, 2005).

Con el método adaptado reportado por Lima de Sousa *et al.*, 2013, el ensayo antifúngico se realizó en tubos Eppendorf de 1 mL, adicionando 50 μL de 1×10^6 esporas/mL de *B. cinerea* en 50 μL de medio de cultivo líquido de Papa-Dextrosa (PD), y 10 μL de cada tratamiento: Control negativo, Etanol absoluto; Tecto₆₀ (5 mg/mL); y CMI 100% (0.05 $\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de *T. lucida*. Se incubaron a 25 °C y se observaron al microscopio durante 7 días (1, 3 y 7 días). Para determinar el porcentaje (%) de mortalidad se utilizó el método de tinción por exclusión con el colorante azul de tripano (0.1%), contando 100 esporas por cada tratamiento (Strober, 2001). Las imágenes de las esporas fueron tomadas en un microscopio óptico Zeiss a 40 x.

Ensayos en frutos de zarzamora inoculados con esporas de *B. cinerea*

Se utilizaron frutos de zarzamora colectados en estado de madurez de consumo. Éstos fueron sometidos a un proceso de asepsia superficial que consistió en enjuagarlos con agua estéril por 5 min, sin aplicación de agentes desinfectantes. La inoculación con *B. cinerea* se realizó mediante inmersión por 2 min en una solución de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL.

Posteriormente, los frutos inoculados fueron colocados sobre papel secante en la campana de flujo laminar por 5 min para eliminar el exceso de agua. Los frutos fueron sometidos por inmersión en diferentes tratamientos: Control (sin nada), Control negativo (Etanol), Control positivo (Tecto₆₀) y la aplicación de la CMI 100% (0.05 µg/mL), del aceite esencial de *T. lucida*. Estos mismos tratamientos fueron aplicados a frutos sin inoculación con esporas de *B. cinerea*. Para su incubación, los frutos fueron colocados de forma individual en una charola con divisiones, para evitar el contacto entre ellos. Se probaron dos temperaturas de incubación, a 4 °C (refrigeración) y a 25 °C (Fraire *et al.*, 2003).

Medición del índice de severidad en frutos inoculados

Con el fin de estimar el grado de infección en frutos de zarzamora, ocasionado por inoculación de esporas de *B. cinerea*, se utilizó un índice de severidad adaptado de Romanazzi *et al.* (2013) basado en el crecimiento de micelio que va del 1 al 5, correspondiendo del 0% (sin aparición de micelio) al 100% (recubrimiento completo del fruto del micelio), respectivamente. En el Cuadro 5 se indican los índices establecidos según el porcentaje de crecimiento del micelio sobre el fruto de zarzamora.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de diferenciación de medias de TUKEY ($p < 0.05$), analizando una $n=6$ (Minitab 16). Para realizar la prueba de ANOVA, los datos en porcentajes se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980), donde X es el valor en porcentaje a transformar:

$$\sqrt{X + 0.5}$$

Cuadro 5. Índice de severidad en unidades arbitrarias (1-5) para medir el grado de infección en frutos de zarzamora por *B. cinerea* (adaptado de Romanazzi *et al.*, 2013).

Índice de severidad	Porcentaje de crecimiento de micelio en el fruto	Características
1	0%	Sin aparición de micelio
2	>0-24%	Crecimiento de micelio en menos del 25% del fruto
3	25-50%	Crecimiento de micelio entre el 25 y 50% del fruto
4	50-75%	Crecimiento de micelio entre el 50 y 75% del fruto
5	75-100%	Crecimiento de micelio entre el 75 y 100% del fruto

Resultados y discusión

La obtención del aceite esencial de Santa María por el método de hidrodestilación presentó un rendimiento de 0.41%, por lo que fue necesario someter a extracción una cantidad de 1.2 kg de parte aérea de la planta hasta obtener 5 mL de aceite, que fue utilizado en toda la fase experimental.

El aceite esencial de *T. lucida* fue analizado por CG-EM para la identificación y cuantificación de los compuestos terpénicos mayoritarios. La identificación se obtuvo por la comparación de los espectros de masas de cada compuesto y fueron cuantificados por relación directa con el estándar interno Tetradecano (Sigma Aldrich®). En la Figura 4 se muestra el cromatograma del aceite esencial de *T. lucida* en el que se observan 7 picos correspondientes de los terpenos siguientes: β -pineno, β -trans-ocimeno, β -ocimeno, β -linalol, estragol, metil

eugenol, β -cariofileno y β -cubebeno. Las concentraciones de estos compuestos están expresadas en $\mu\text{g/mL}$ del aceite esencial (Cuadro 6). El 75% del aceite esencial está compuesto por los terpenos estragol y metil eugenol con un contenido de $521.8 \mu\text{g/mL}$ y $464.6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Éstos son mayormente los responsables del efecto antifúngico, de acuerdo a lo reportado por Fulgencio-Negrete (2013). La concentración de dichos compuestos del aceite esencial de *T. lucida* obtenido por el método de hidrodestilación, es más del doble que el extracto hexánico, ya que en el extracto hexánico se reportaron $182 \mu\text{g/mL}$ y $208 \mu\text{g/mL}$, para estragol y metil eugenol, respectivamente. Con estos resultados se demuestra que el aceite esencial obtenido en esta investigación presenta un mayor contenido de sus compuestos mayoritarios, indicativo de un posible mayor efecto antifúngico.

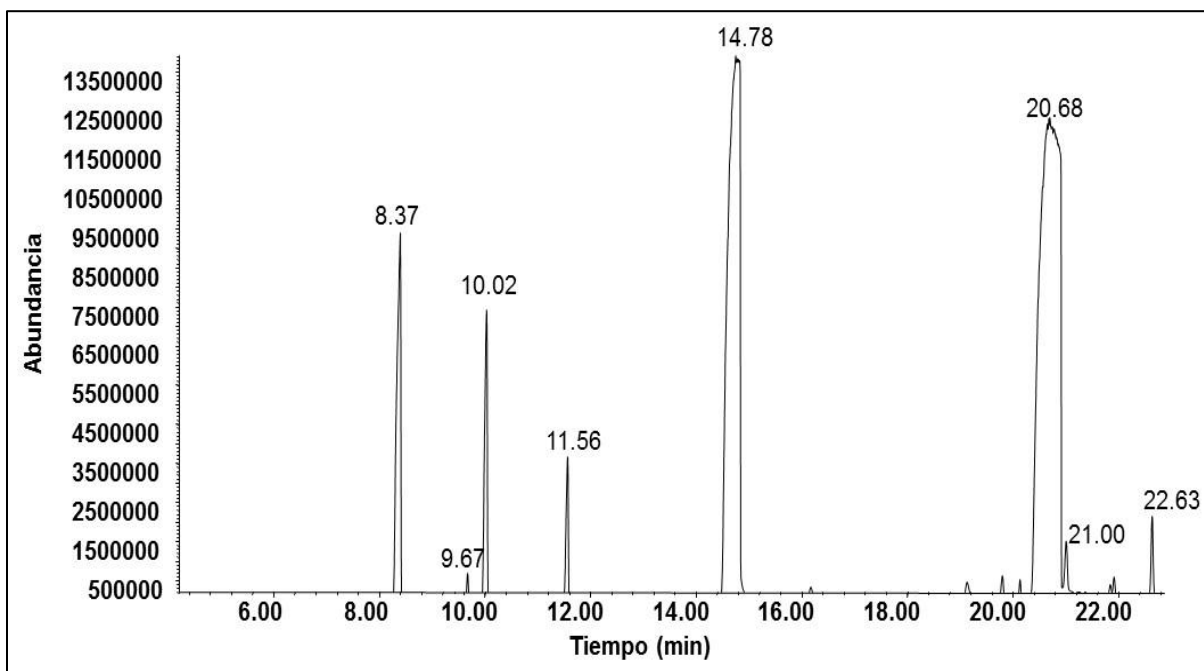


Figura 4. Cromatograma del aceite esencial de *Tagetes lucida*: β -pineno (8.37), β -trans-ocimeno (9.67), β -ocimeno (10.02), β -linalol (11.56), estragol (14.78), metil eugenol (20.68), β -cariofileno (21.00), β -cubebeno (22.63).

Con la determinación del efecto antifúngico del aceite esencial de *T. lucida* mediante los ensayos *in vitro*, se observó una alta inhibición sobre el crecimiento de micelio de *B. cinerea*, ejerciendo un 100% de inhibición con las concentraciones de 0.075 y 0.1 µg/mL. El crecimiento del hongo fue del 100% presentando 6 cm de diámetro cuando no se le aplicó ningún tratamiento y no fue afectado al incubarse con el vehículo de disolución (etanol absoluto), el fungicida comercial Tecto₆₀ (control positivo) mostró un 100% de inhibición.

Cuadro 6. Contenido (µg/mL) de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Tagetes lucida*.

COMPUESTO	Tr	Abundancia (%)	Área	Concentración (µg/mL)
β-PINENO	8.37	12	46456956	9.7
β-TRANS-OCIMENE	9.67	0.5	1557786	0.5
β-CIS-OCIMENO	10.02	10	27540868	5.8
β-LINALOL	11.56	6	11928288	35.24
ESTRAGOL	14.78	35	153167763	521.8
METIL EUGENOL	20.68	30	147386151	464.6
β-CARIOFILENO	21.00	2	4451265	1.8
β-CUBEBENO	22.63	3	6451289	2.2

Estos resultados demuestran la alta capacidad antifúngica de este aceite esencial en las concentraciones probadas (Figura 5). Este efecto se muestra en la Figura 6, en la que se aprecia el crecimiento uniforme en el medio de cultivo PDA sin tratamiento alguno (Figura 6A) y con la aplicación de etanol (Figura 6B); la inhibición total (100%) con 0.075 y 0.1 µg/mL del aceite esencial de Santa María (Figuras 6C y 6D, respectivamente); y, la inhibición ejercida con Tecto₆₀ (Figura 6E).

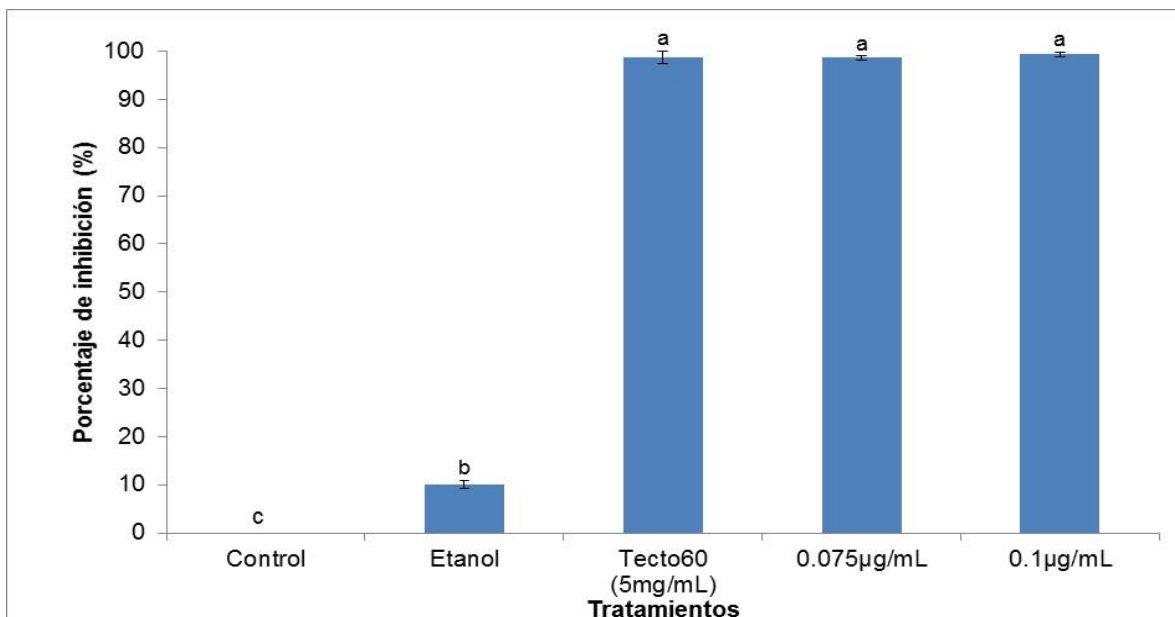


Figura 5. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de micelio *in vitro* de *B. cinerea* con diferentes concentraciones del aceite esencial de *T. lucida*, a los 7 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 6$).

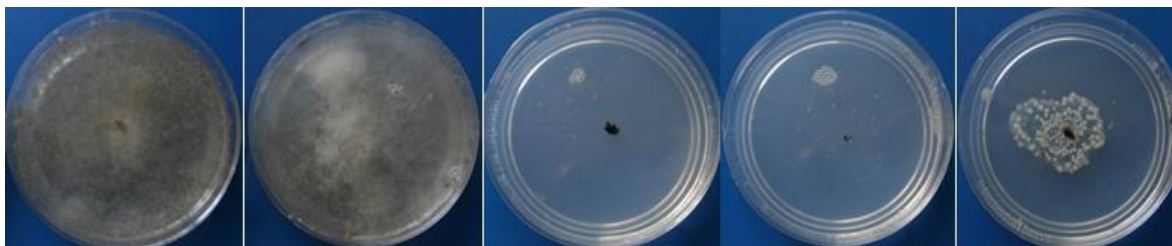


Figura 6. Determinación de porcentajes de inhibición del aceite esencial de *T. lucida* en ensayos *in vitro* por difusión de placa, a los 7 días de cultivo de *B. cinerea*: 1) Control; 2) Control negativo (Etanol); 3) 0.075 µg/mL de aceite; 4) 0.1 µg/mL de aceite; 5) Tecto₆₀ (5 mg/mL).

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Santa María con una actividad del 100% de inhibición (CMI 100%) sobre el crecimiento de micelio de *B. cinerea*, encontrando que este porcentaje de inhibición se mantuvo aun a la concentración de 0.05 µg/mL de aceite. En

concentraciones más bajas, el porcentaje de inhibición fue dependiente de la concentración, observándose que a 0.025 y 0.01 $\mu\text{g/mL}$, hubo una inhibición solamente del 52.33 y 34.33%, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 0.05, 0.075 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ con el fungicida comercial Tecto₆₀, sin embargo, se observó una alta diferencia significativa con 0.01 y 0.025 $\mu\text{g/mL}$ y el control negativo (Figura 7).

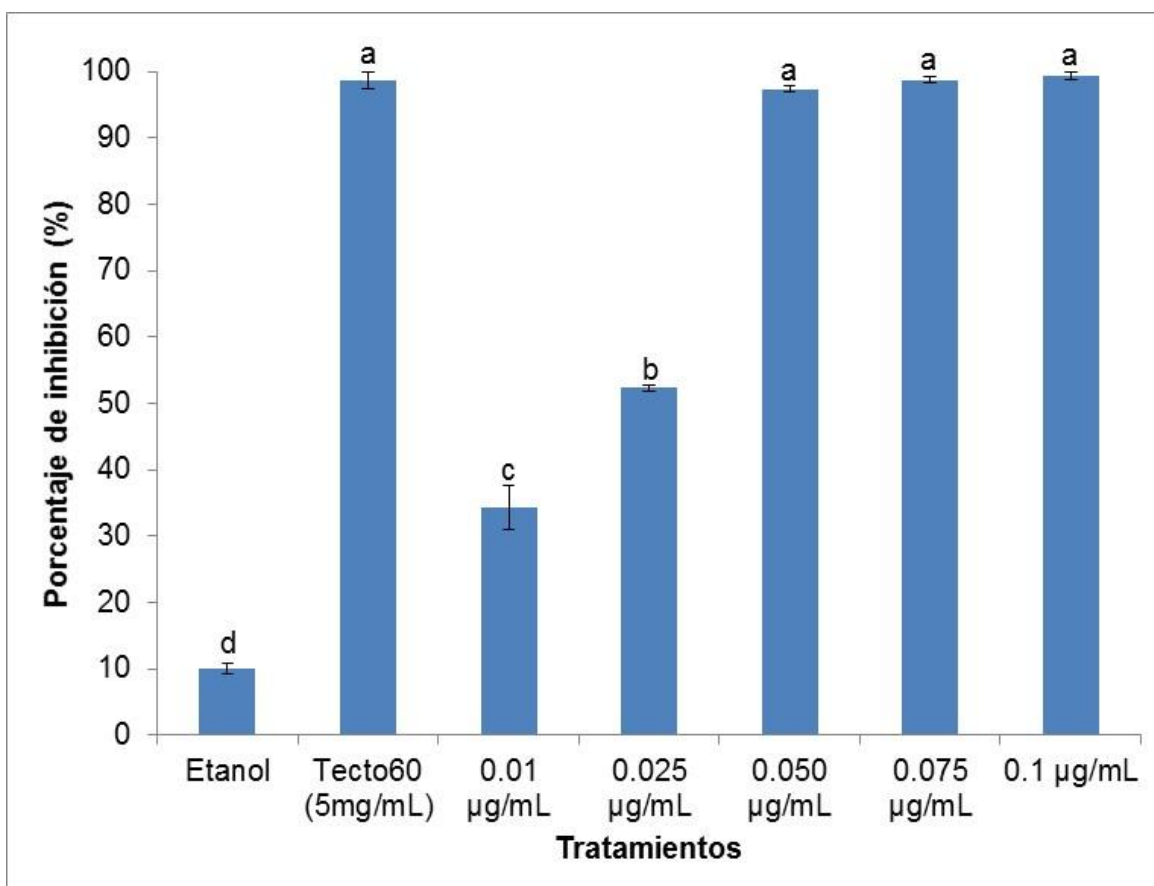
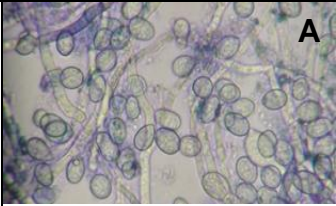




Figura 7. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de micelio *in vitro* de *B. cinerea* con diferentes concentraciones del aceite esencial de *T. lucida*, a los 7 días de cultivo, para la determinación de la CMI 100%. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 6$).

Una vez determinada la CMI 100% del aceite esencial de *T. lucida*, su efecto fue probado sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*, observando la inhibición de este proceso a los 7 días de cultivo con una nula germinación de éstas. Con la

tinción con azul de tripano se comprobó que las esporas mostraron un 100% de mortalidad, las que evidenciaron una tinción azul completamente. En el tratamiento con el fungicida comercial se obtuvo un 92% de mortalidad, mientras que las esporas tratadas con etanol alcanzaron altos porcentajes de germinación (72%) y crecimiento de micelio a los 7 días de cultivo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentajes de mortalidad de esporas de *B. cinerea* cultivadas en medio PD líquido adicionado con aceite esencial de *T. lucida* (0.05 µg/mL), durante 7 días del cultivo. *Es indicativo de diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n=6$).

TRATAMIENTOS	MORTALIDAD (%)			GERMINACIÓN (%)			RESULTADO A LOS 7 DÍAS DE CULTIVO
	1d	3d	7d	1d	3d	7d	
Etanol Abs.	0	10	18	0	45	72*	
Tecto₆₀ (5 mg/mL)	22	55	92	0	0	8	
Aceite Esencial (0.05 µg/mL)	10	45	100*	0	0	0	

Las esporas tratadas sólo con etanol, no presentaron cambios a las 24h y a partir de los 3 días inició la germinación y el desarrollo de micelio, observándose un bajo porcentaje de mortalidad de esporas y un alto crecimiento de micelio, como se muestra en la imagen A del Cuadro 7. Las esporas viables tratadas con el fungicida Tecto₆₀ también lograron germinar y pudo observarse el desarrollo de hifas a los 7 días del cultivo (Imagen B, Cuadro 7). En el tratamiento con 0.05

$\mu\text{g/mL}$ de aceite esencial de *T. lucida*, la totalidad de las esporas presentaron tinción azul, indicativa de la mortalidad de éstas (Imagen C, Cuadro 7).

Con estos resultados se demostró que el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. lucida* no solo es sobre el crecimiento de micelio de *B. cinerea*, sino también sobre las esporas, en las que afecta drásticamente su viabilidad, no permitiendo la germinación. Debido a que el metil eugenol y estragol son los compuestos de mayor concentración del aceite esencial de *T. lucida*, éstos son considerados como responsables del efecto antifúngico, lo cual confirma lo reportado por Fulgencio-Negrete (2013) que menciona al metil eugenol como el compuesto con efecto antifúngico en el extracto hexánico de *T. lucida*.

Estos compuestos terpénicos, el metil eugenol y el estragol, son componentes de diversos aceites esenciales, principalmente de albahaca (*Ocimum basilicum*) (El-Soud *et al.*, 2015), de varias especies de crotón (*Croton* spp) (Fontenelle *et al.*, 2008) y de tarragón (*Artemisia dracuncululus*) (Obolskiy *et al.*, 2011). El efecto antifúngico de estos compuestos sobre *Candida albicans* ha demostrado que son los responsables de muerte celular por irrumpir la integridad de la membrana en concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 2 y 3.5 $\mu\text{g/mL}$, ocasionada por la generación de radicales libres, principales agentes que alteran la permeabilidad de la membrana (Khan *et al.*, 2011). El efecto inhibitorio de la germinación de las esporas de *B. cinerea* con la CMI 100% del aceite esencial de *T. lucida* fue debido a que se ocasiona la muerte de éstas, esto es un resultado que no ha sido reportado para otros aceites esenciales, lo cual es un hallazgo relevante para su uso potencial como un antifúngico en plantas o como aditivo de alimentos, principal aplicación objeto de estudio de la presente investigación.

Para ello, se realizaron los ensayos antifúngicos del aceite esencial de Santa María sobre frutos de zarzamora inoculados con esporas de *B. cinerea* y tratados con 0.05 $\mu\text{g/mL}$, para determinar su efecto en frutos almacenados a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (4 °C) a los 3 y 7 días. Los resultados se

encuentran en la Figura 8 y el Cuadro 8. A los 3 días de incubación, los frutos almacenados a temperatura ambiente pero no tratados con el aceite esencial, mostraron un índice de severidad de 3, con un 50% de crecimiento de micelio (Figura 8A y 8B). Con la aplicación del fungicida comercial se observó un índice de severidad de 2, con crecimiento de micelio en la base del pedúnculo (Figura 8C); y con la CMI 100% del aceite esencial no hubo desarrollo de micelio y síntomas de la infección (índices de severidad de 1), a este tiempo de cultivo (Figura 8D). A los 7 días, los frutos inoculados no tratados y almacenados a temperatura ambiente presentaron un índice de severidad de 5, en los que el micelio cubrió por completo a los frutos (Figura 8E y 8F); a este tiempo y condiciones de incubación, los frutos con Tecto₆₀ presentaron un índice de severidad de 3 (Figura 8G) y los recubiertos con el aceite esencial no mostraron crecimiento de micelio (Figura 8H).

Cuadro 8. Índice de severidad en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) inoculados con esporas de *B. cinerea* a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (4 °C) a los 3 y 7 días.

Tratamiento	Índice de severidad			
	25 °C		4 °C	
	3d	7d	3d	7d
Control	4	5	3	4
Etanol Abs.	3	5	1	3
Tecto ₆₀ (5 mg/mL)	2	3	1	2
Aceite esencial (0.05 µg/mL)	1	1	1	1

Los índices de severidad en condiciones de refrigeración fueron diferentes para los tres tratamientos, con un claro retraso en la aparición y crecimiento de micelio, no obteniendo crecimiento de éste en todos los tratamientos a los 3 días del cultivo (Figuras 8J, 8K y 8L). A los 7 días del cultivo, los frutos no tratados con el aceite esencial alcanzaron solamente un índice de severidad de 3 (Figura 8N), sin embargo a los 9 días el micelio cubrió en un 100% a los frutos. Los tratados con el

control negativo (Tecto₆₀) mostraron un índice de severidad de 2, ya que hubo crecimiento de micelio en la base del pedúnculo del fruto (Figura 8S). Sin embargo, en los frutos recubiertos con la CMI 100% (0.05 µg/mL) del aceite esencial de Santa María, no hubo crecimiento de micelio, con signos claros de inhibición de la germinación de las esporas de *B. cinerea* (Figura 8T).

La CMI 100% (0.05 µg/mL) establecida para el aceite esencial de *T. lucida* obtenido por hidrodestilación contra *B. cinerea*, está en el rango de la CMI reportadas para aceites esenciales con actividad antifúngica en hongos patógenos tanto de humano como de plantas. Por ejemplo, las CMI 100% de los aceites esenciales de *Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Mentha arvensis* y *Pimenta racemosa*, están en un rango de 0.3 a 1 µg/mL contra *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Aspergillus niger*.

Uno de los aceites con una CMI 100% de las más bajas reportadas, es el derivado de *Thymus vulgaris* (tomillo), que presenta valores menores a 0.15 µg/mL, contra estos mismos hongos (Zabka *et al.*, 2014). Sin embargo, no todos los aceites esenciales derivados de plantas son activos contra hongos en concentraciones bajas, muchos de ellos presentan CMI en el orden de mayor a 1 o incluso mayor a 100 µg/mL, como es el caso para los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*) y de orégano (*Origanum vulgare*), de los que se requiere 110 µg/mL y 230 µg/mL, respectivamente, para tener efectividad contra *C. albicans* (Delić *et al.*, 2013); o los aceites esenciales de *Lavandula angustifolia* (lavanda) y de *Salvia sclerea* que muestran unas CMI 100% por arriba de 1.0 µg/mL, para inhibir a *Aspergillus niger* (Zabka *et al.*, 2014).

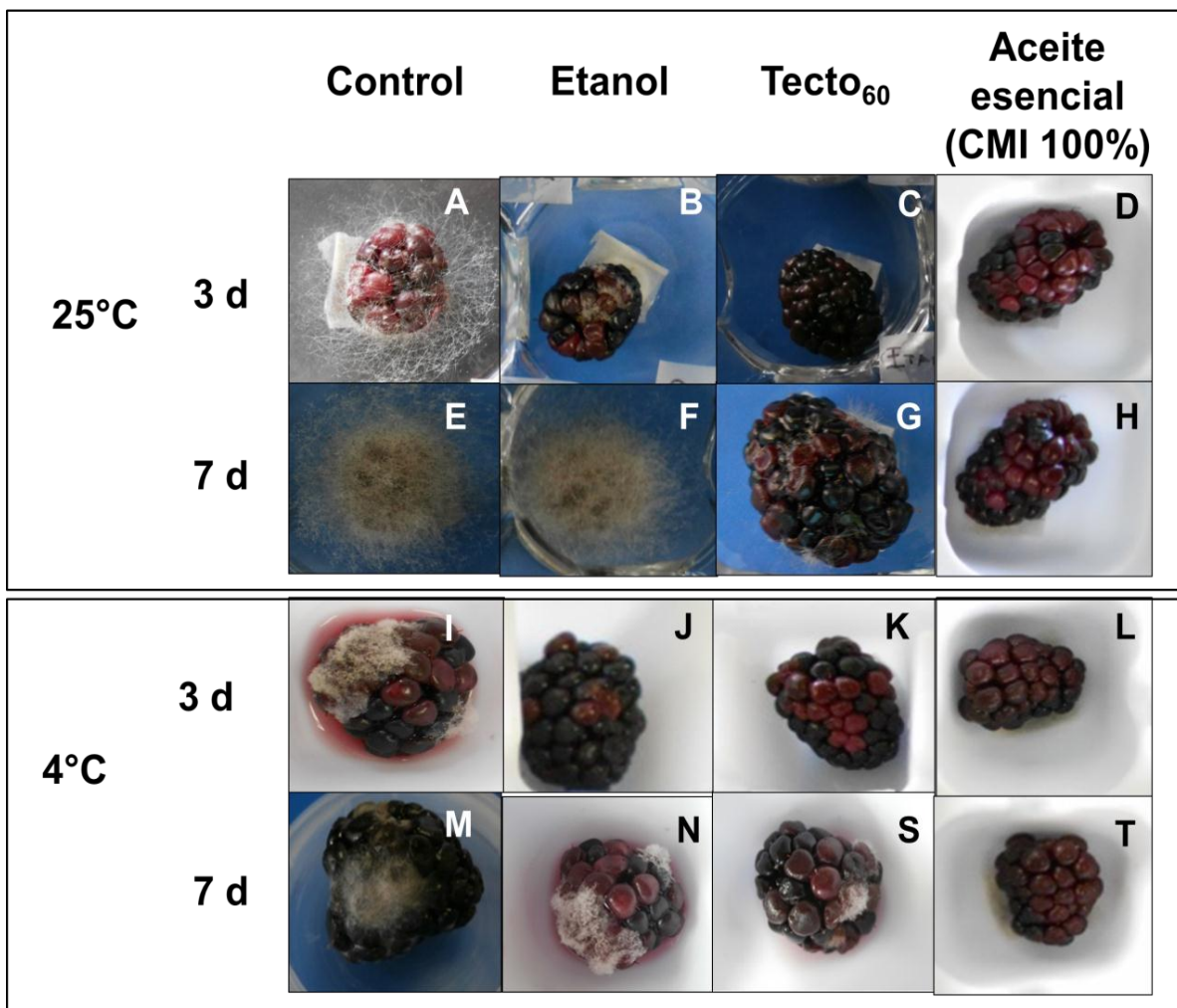


Figura 8. Resultados del crecimiento de micelio en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) inoculados con esporas (1×10^6 esporas/mL) de *B. cinerea* a los 3 y 7 días de incubación a temperatura ambiente (25 °C) y refrigeración (4 °C), tratados con Etanol absoluto, Tecto₆₀ (5 mg/mL), 0.05 µg/mL de aceite esencial de *T. lucida* y un Control. Literales se describen en el texto anterior a la figura.

Solo algunos de los aceites esenciales que se han aplicado a frutos inoculados con *B. cinerea* han demostrado un efecto antifúngico, como en los estudios realizados en fresas, las que al ser tratadas con el aceite esencial de mostaza y clavo tuvieron un 100% de inhibición (Aguilar-González *et al.*, 2015). Sin embargo, los reportes indican que algunas de las cepas de *B. cinerea* tratadas con los aceites esenciales de diversas plantas, presentan resistencia o bien es necesario

utilizar concentraciones relativamente altas para inhibir el crecimiento de micelio o la germinación de las esporas. Lo anterior fue observado en uvas tratadas con aceite de hoja de canela, en las que la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* se obtuvo solamente en altas concentraciones (Melgarejo-Flores *et al.*, 2013).

Para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* en frutos, los reportes indican mayormente la inhibición sobre el crecimiento micelial y que ejercen solamente una reducción en la germinación de esporas. Los aceites esenciales de orégano y té de limón controlan el crecimiento de micelio de *B. cinerea* en frutos de tomate, fresa y pepino, en concentraciones de 0.30 µg/mL y 0.5 µg/mL, respectivamente, sin producir una inhibición del 100% (Vitoratos *et al.*, 2013). Con lo anterior queda de manifiesto que la CMI 100% que presenta el aceite esencial de *T. lucida* probado en esta investigación, es a una concentración relativamente baja, al compararse con otros aceites esenciales, además de inhibir en un 100% la germinación de esporas.

Conclusiones

El aceite esencial de *T. lucida* (Santa María) obtenido por hidrodestilación presentó una alta actividad antifúngica sobre el crecimiento de micelio y germinación de las esporas de *B. cinerea*. Con la concentración de 0.05 µg/mL, considerada la CMI, se obtuvo un 100% de inhibición del crecimiento de micelio y un 100% de mortalidad de las esporas, en ensayos *in vitro* y en frutos inoculados.

Referencias

Aguilar-González, A.E., Palou E. y López-Malo A. 2015. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 32:181-185.

- Bertelli, D., Plessi M. y Miglietta F. 2003.** Effect of microwaves on volatile compounds in origanum. *LWT- Food Science and Technology*, 36(6):555–560.
- Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños S. y Morales-López J. 2009.** Aceites esenciales bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. *Industria Alimentaria*, 31:12-24.
- Céspedes, C.L., Ávila G.J., Martínez A., Serrato B., Calderón-Múgica J.C. y Salgado-Garciglia R. 2006.** Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:3521-3527.
- Delić, D.A., Skrobonja J.R., Karamn M.A., Matavul M.N. y Bogavac M.A. 2013.** Antifungal activity of essential oils of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against three *Candida albicans* strains. *Journal of Natural Sciences*, 124:203-211.
- Dorman, H.J. y Deans S.G. 2000.** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2):308-16.
- El-Soud, N.H.A., Deabes M., El-Kassem L.A. y Khalil M. 2015.** Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3(3):374-379.
- Fiori, A.C.G., Schwan K.R.F., Stangarlin J.R., Vida J.B., Scapim C.A., Cruz, M.E.S. y Pascholati S.F. 2000.** Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryonia*. *Journal of Phytopathology*, 148:483-487.
- Fontenelle, R.O., Morais S.M., Brito E.H., Brilhante R.S., Cordeiro R.A., Nascimento N.R., Kerntopf M.R., Sidrim J.J., Rocha M.F. 2008.** Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5):1383-1390.
- Fraire-Cordero, M.L., Yáñez-Morales M.J., Nieto-Ángel D. y Vázquez-Gálvez G. 2003.** Hongos patógenos en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 285-291.
- Fulgencio Negrete, R. 2013.** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (Nurite, Santa María y Toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 96 pp.

- Khan, A., Ahmad A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A. y Manzoor N. 2011.** Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Research*, 11(1):114-22.
- Lima de Sousa, L., Albuquerque de Andrade S. C., Aguiar-Athayde A.J.A., Vasconcelos de Oliveira C.E., Veríssimo de Sales C., Madruga M.S. y Leite de Souza E. 2013.** Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165(3):312–318.
- Melgarejo-Flores, B.G., Ortega-Ramírez L., Silva-Espinoza B., González-Aguilar G., Miranda M.R. y Ayala-Zavala J.F. 2013.** Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil. *Postharvest Biology and Technology*, 86:321-328.
- Nguefack, J., Leth V., Amvam Zollo P.H. y Mathur S.B. 2004.** Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94:329-334.
- Obolskiy, D., Pischel I., Feistel B., Glotov N. y Heinrich M. 2011.** *Artemisia dracuncululus* L. (Tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9:17-45.
- 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. Edis.). Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México p. 558.
- Ronquillo, E. 2007.** Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales *in vitro* e *in situ*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Iztapalapa, D.F., México. 46 p.
- Romanazzi G, Feliziani E, Satini M. y Landi L. 2013.** Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and others resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75:24-27.

- Sacchetti, G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. y Bruni R. 2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in foods. *Food Chemistry*, 91:621-632.
- Sahin, F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G. y Özer H. 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7):549-557.
- Singh, G., Marimuthu P., Catalan C. y De Lampasona M.P. 2004.** Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:1878-1884.
- Steel, R.G.D y Torrie J.H. 1980.** Principles and procedures of statistics: A biomedical approach. 2° Edición. McGraw-Hill Book Co. New York, EUA. 622p.
- Strober, W. 2001.** Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, Apendix 3, Apendix 3B.
- Torres-Martínez, R., Bello-González M.A, Molina-Torres J., Ramírez-Chávez E., García-Rodríguez Y., Fulgencio-Negrete R., García-Hernández A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M. y Salgado-Garciglia R. 2014.** Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* "Benth" Briq. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21):122-134.
- Vitoratos, A., Bilalis D., Karkanis A. y Efthimiadou A. 2013.** Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horticulturae Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1):86-92.
- Zabka, M., Pavela R. y Prokinova E. 2014.** Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. *Chemosphere*, 112:443-448.

7.2. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y texturales de frutos de zarzamora recubiertos con quitosano adicionando aceite esencial de *Tagetes lucida*.

Resumen

En esta investigación se determinó la concentración óptima de quitosano para recubrir frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), midiendo los valores de viscosidad, dureza y deformación de dureza en las biopelículas. Posteriormente se determinaron los mismos parámetros en frutos recubiertos con quitosano adicionando el aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. (Santa María). Las biopelículas de quitosano se prepararon con 0.5, 1.0 y 1.5%, observando una mayor viscosidad en la mayor concentración de quitosano (952.6 cP), una dureza de 22 N con 0.5%, menor que con 1 y 1.5% (28.1 N y 28.4 N, respectivamente), y una tendencia a presentar una menor deformación cuando se aumenta la concentración de quitosano. Las pruebas de recubrimiento en zarzamora, se realizaron en frutos en estado de madurez de consumo, utilizando el método de inmersión con las tres concentraciones de quitosano, en dos temperaturas de almacén (temperatura ambiente a 25 °C y en bajo refrigeración a 4 °C). Los valores de dureza y deformación se obtuvieron a los 1 y 7 días de almacenamiento. A los siete días a 25 °C, los frutos recubiertos con 1.5% de quitosano mantuvieron la dureza y tuvieron el menor porcentaje de deformación con un 6%, en tanto que los recubiertos con 0.5% fueron los que obtuvieron el mayor porcentaje de deformación con un 9%. A este tiempo de almacén, los frutos a 4 °C no presentaron diferencias en los valores de dureza y en los de porcentaje de deformación, indicativo de que la biopelícula de quitosano retrasa la pérdida de dureza de los frutos a ambas temperaturas. Con estos resultados se determinó la concentración óptima para el recubrimiento de los frutos de zarzamora con quitosano (1.5%). La evaluación de la dureza y el porcentaje de deformación según dureza, se realizó en frutos recubiertos con la concentración óptima de quitosano (1.5%) adicionando la CMI 100% (0.05 µg/mL) del aceite esencial de Santa María. Los valores fueron comparados con el recubrimiento de frutos con otras dos concentraciones del aceite esencial (0.025 y 0.075 µg/mL) sin quitosano y quitosano solo. Los frutos recubiertos solamente con quitosano presentaron una mayor dureza (5N) y una deformación de 8%, en comparación con el resto de los tratamientos, aunque los frutos recubiertos con quitosano +CMI100% mantuvieron una dureza de 3N y se deformaron en un 10%. Los frutos recubiertos solo con el aceite esencial mostraron los valores menores de dureza y los más altos de deformación, observando un claro ablandamiento en ellos. El adicionar la CMI 100% a los recubrimientos de quitosano, disminuyó la dureza, pero se mantuvo la deformación en valores relativamente bajos, por lo que el quitosano adicionado con el aceite esencial de *T. lucida* es una alternativa para mantener la vida de anaquel de los frutos de zarzamora y conservar la firmeza de los frutos hasta por siete días.

Palabras clave: Biopelículas, deformación, dureza, vida de anaquel, viscosidad.

Abstract

In this research the optimal concentration of chitosan was determined to coat blackberry fruits (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), by measuring the values of viscosity, hardness and deformation of hardness in biofilms. Subsequently, these parameters were determined in chitosan-coated fruits adding essential oil of *Tagetes lucida* Cav. (Santa Maria). Chitosan biofilms were prepared with 0.5, 1.0 and 1.5%, noting a higher viscosity at the highest concentration of chitosan (952.6 cP), a hardness of 22 N with 0.5%, lower that with 1 and 1.5% (28.1 N and 28.4 N, respectively), and a tendency to present a low deformation when increases the concentration of chitosan. The coating tests in blackberry were performed in fruits in edible maturity stage, using the method of immersion with the three concentrations of chitosan, in two temperatures of storage (room temperature at 25 °C and under refrigeration at 4 °C). Hardness and deformation values were obtained at the 1 and 7 days of storage. Seven days at 25 °C, the fruits coated with 1.5% of chitosan keeping hardness and they had the lower percentage of deformation with a 6%, while fruits coated with 0.5% obtained the higher percentage of deformation with a 9%. At this time of storage, the fruits at 4 °C did not show differences in the values of hardness and deformation percentage, indicative of the chitosan biofilm is delaying the loss of hardness of the fruits at both temperatures. With these results was determined the optimal concentration (1.5%) for coating the blackberry fruits with chitosan. The evaluation of the hardness and the deformation percentage according to hardness, was realized in fruits coated with chitosan (1.5%) incorporating the CMI 100% (0.05 µg/mL) of the Santa Maria oil essential. Those values were compared with the fruits coating with other two concentrations of the oil essential (0.025 and 0.075 µg/mL) without chitosan and only with chitosan. The fruits chitosan-coated presented a higher hardness (5N) and a deformation of 8%, compared to the rest of the treatments, although the fruits coated with chitosan + CMI100% maintained a hardness of 3N, and deformation of 10%. Blackberry fruits coated only with the oil essential showed low values of hardness and higher of deformation, noting a clear softening in them. When the CMI 100% essential oil of Santa Maria was incorporated to chitosan coatings, declined the hardness, but remained deformation values relatively low, so the added chitosan with essential oil of *T. lucida* is an alternative to maintain the shelf life of the blackberry fruits and retain the firmness of the fruits up to seven days storage.

Key words: biofilms, deformation, hardness, shelf life, viscosity.

Introducción

La calidad de los frutos depende de la variedad, maduración, condiciones del clima y almacenamiento. En frutos blandos como la zarzamora, el mantenimiento de la calidad del fruto es un problema debido a que son fácilmente susceptibles al daño mecánico (Redgwell y Fischer, 2008; Giongo *et al.*, 2013). Una alternativa es el uso de recubrimientos comestibles, los cuales son matrices preparadas de proteínas, lípidos o polisacáridos que son colocados como revestimiento sobre el alimento y actúan como una barrera a los gases, controlan sabor, humedad y la transferencia de aroma entre el alimento y la atmósfera que lo rodea (Malik *et al.*, 2014). Se utilizan para recubrir frutas los elaborados a partir de polisacáridos, tales como: almidón, alginato, pectinas, carrageninas, quitosano, entre otros; ya que son recubrimientos con excelentes propiedades de permeabilidad a los gases (O_2 , CO_2 y etileno) permitiendo ambientes que aumentan la vida de anaquel del producto (Nussinovitch, 2013).

Entre los polisacáridos más utilizados, se encuentra el quitosano, el cual es un biopolímero derivado de la desacetilación de la quitina (la cual es el mayor componente del exoesqueleto de crustáceos, insectos y paredes celulares de hongos), no tóxico, biodegradable y biocompatible. Debido a que forma recubrimientos transparentes, preservando color y firmeza, actúa como una barrera al O_2 y CO_2 , reduciendo la tasa de respiración y humedad prolongando la vida de anaquel del fruto; además de proteger al alimento del decaimiento causado por microorganismos ya que se le atribuyen propiedades antimicrobianas (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Embuscado y Huber, 2009; Dhanapal *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2012; Elsabee y Abdou, 2013 y Malik *et al.*, 2014).

El adicionar aceites esenciales a recubrimientos comestibles como agentes antimicrobianos alarga la vida de anaquel de los frutos, pero puede afectar ciertas propiedades fisicoquímicas de los mismos. Los recubrimientos de alginato y aceite

esencial de hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) en rebanadas de piña, disminuyeron significativamente la firmeza y las propiedades sensoriales (sabor, textura y aceptabilidad) (Azarakhsh *et al.*, 2014); en ciruelas recubiertas con hidroxipropil metil celulosa y aceite de orégano y bergamota, la incorporación de los aceites esenciales disminuyeron la pérdida de peso que sólo con el polímero, además de mostrar una firmeza estable en comparación con el control y el polímero (Choi *et al.*, 2016). Mientras que en frambuesas recubiertas con pectina y alginato adicionado con aceites esenciales de *Arbutus unedo* (madroño), tuvieron una firmeza ligeramente superior a las control y la pérdida de peso aumentó significativamente a través del almacenamiento en todos los tratamientos (Guerreiro *et al.*, 2015).

Por lo que, el adicionar la CMI 100% del aceite esencial de Santa María a un recubrimiento de quitosano a frutos de zarzamora, puede alargar la vida de anaquel de los frutos debido a los efectos antifúngicos reportados en la sección anterior, manteniendo las propiedades fisicoquímicas y texturales de los mismos, las cuales fueron evaluadas en el presente estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Quitosano

Se empleó quitosano (Sigma-Aldrich© Chemistry) con $\geq 75\%$ de desacetilación.

Frutos

Se utilizaron frutos de zarzamora colectados en un huerto en la localidad de Ziracuaretiro, en etapa de madurez de consumo.

Preparación de las soluciones de quitosano

El quitosano se disolvió en ácido acético glacial (1 mL/100 mL) en 100 mL de agua destilada, dejándose agitar por 24 h a 15 rpm. El pH se ajustó a 5.6 con NaOH a 0.275N y se aforó a 200 mL con agua destilada (método adaptado de Bautista-Baños y Bravo Luna, 2004; y de Arceo-Martínez, 2015).

Prueba de viscosidad

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH. A cada una de las soluciones de quitosano se les determinó la viscosidad empleando un viscosímetro modelo 3T Brookfield Engineering Labs. Inc., usando el UL ADAPTER por un lapso de 3 min y una precisión de 50.00 cP. Los resultados se analizaron con el software Rheocalc T 1.2.19 de Brookfield Engineering Labs. Inc.

Pruebas de textura

También fueron realizadas en el LIDA, utilizando el texturómetro Texture Analyzer CT3 Brookfield Engineering Labs. Inc. y los datos se analizaron con el software TexturePro CT V1.7 Build 28 de Brookfield Engineering Labs. Inc. con las siguientes especificaciones:

Biopelículas.- Test de compresión con una carga de activación de 0.30N, una velocidad de prueba de 0.10 mm/s y un tiempo de espera de 1s.

Frutos.- Test de compresión con una carga de activación de 0.50N, una velocidad de prueba de 2.00mm/s y un tiempo de espera de 1s, a los 1 y 7 días de almacenamiento a las dos temperaturas de almacén 4° C y 25° C.

Asepsia y recubrimiento de frutos

Los frutos de zarzamora en estado de madurez de consumo, fueron sometidos a un proceso de asepsia superficial que consistió en un enjuague con agua estéril por 5 min, sin aplicarles agentes desinfectantes y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los frutos se recubrieron por inmersión en las soluciones de quitosano por 1 min, se colocaron individualmente en charolas con divisiones para evitar el contacto entre ellos y se dejaron secar 24 h a temperatura ambiente (25 °C).

Ensayo de textura con frutos recubiertos con quitosano

Una vez sometidos los frutos al proceso de asepsia mencionado anteriormente, los frutos se recubrieron por inmersión en la solución correspondiente por 1 min en diversos tratamientos: 1) Control; 2) Quitosano 0.5%; 3) Quitosano 1%; y 4) Quitosano 1.5%; posteriormente se colocaron individualmente en charolas con divisiones para evitar el contacto entre ellos y se dejaron secar 24 h a temperatura ambiente. Es importante recalcar que los frutos no fueron inoculados. Se probaron dos temperaturas de almacén 4° C y 25° C. A dichos frutos se les realizó la prueba de textura a los 1 y 7 días siguiendo las especificaciones del test mencionado anteriormente (adaptado de El Ghouth *et al.*, 1992).

Ensayo de textura con frutos recubiertos con quitosano y aceite esencial

Se emplearon frutos previamente sometidos al proceso de asepsia, los cuales se recubrieron por inmersión en la solución correspondiente por 1 min en diversos tratamientos: 1) Control; 2) 0.25 µg/mL (aceite esencial de Santa María); 3) 0.75 µg/mL (aceite esencial de Santa María); 4) CMI 100% (0.05 µg/mL); 4) Quitosano 1.5% + CMI 100%; y 5) Quitosano 1.5%; posteriormente se colocaron individualmente en charolas con divisiones para evitar el contacto entre ellos y se dejaron secar 24 h a temperatura ambiente. Es importante recalcar que los frutos

no fueron inoculados. Se probaron dos temperaturas de almacén 4 °C y 25 °C. Realizando prueba de textura a los 1 y 7 días a cada fruto, siguiendo las especificaciones del test de compresión que se describe anteriormente (Perdones *et al.*, 2012; Timóteo dos Santos *et al.*, 2012).

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de diferenciación de medias de Tukey ($p < 0.05$) (Minitab 16).

Resultados y discusión

Se analizó la viscosidad de las tres concentraciones de quitosano, observándose que a mayor concentración de quitosano hubo una mayor viscosidad, teniendo valores de 952.6 cP para concentraciones de 15 mg/mL (1.5%), detectándose diferencias significativas de viscosidad entre las tres concentraciones (Cuadro 9)

Una vez determinada la viscosidad de las soluciones de quitosano, se procedió a formar la biopelícula, la que fue caracterizada por medición de los parámetros de dureza y deformación según la dureza. Los resultados mostraron que las biopelículas de 0.5% de quitosano son menos duras que las de 1 y 1.5% de quitosano, ya que presentaron un valor de 22 N en comparación con las de 1% y 1.5%, con valores de 28.1 N y 28.4 N, respectivamente. Se observó diferencia significativa entre el valor de la concentración más baja con las de los otros dos tratamientos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en estos últimos valores. La dureza dependió de la concentración de quitosano (Figura 9).

Cuadro 9. Valores de viscosidad en tres concentraciones de quitosano. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Concentración de quitosano	Viscosidad
	cP
5mg/mL (0.5%)	17.92 ^a
10mg/mL (1%)	167.26 ^b
15 mg/mL (1.5%)	952.6 ^c

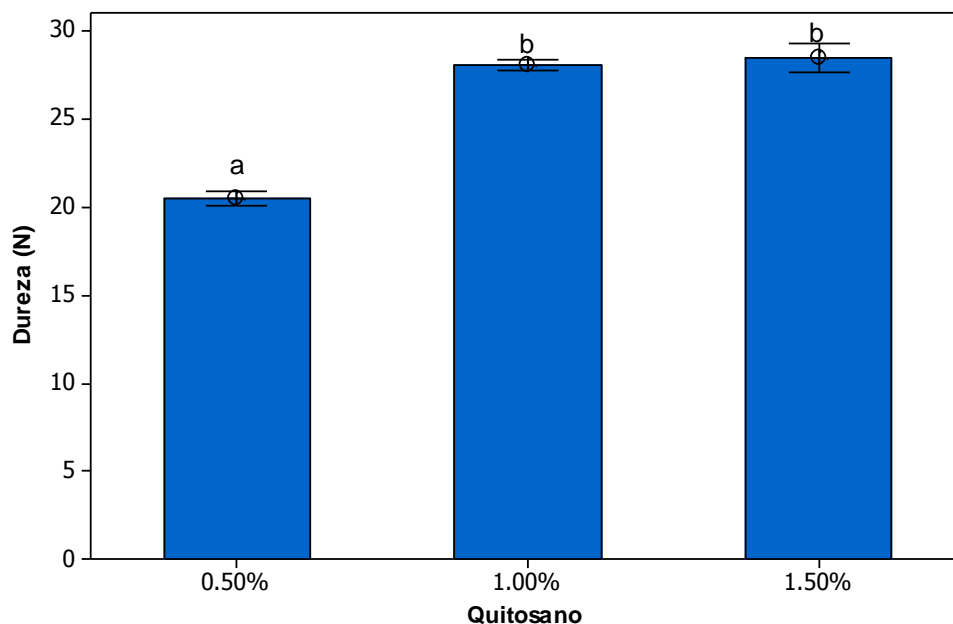


Figura 9. Dureza de biopelículas en tres concentraciones de quitosano: 0.5%, 1% y 1.5% (n=6 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Asimismo, se obtuvo que la deformación según dureza presenta una tendencia a disminuir según la concentración de quitosano, pues las biopelículas de 1.5% de quitosano tuvieron una deformación menor (0.07mm) que las de 0.5 % (0.10mm), aunque no hay diferencias significativas en los tres tratamientos (Figura 10).

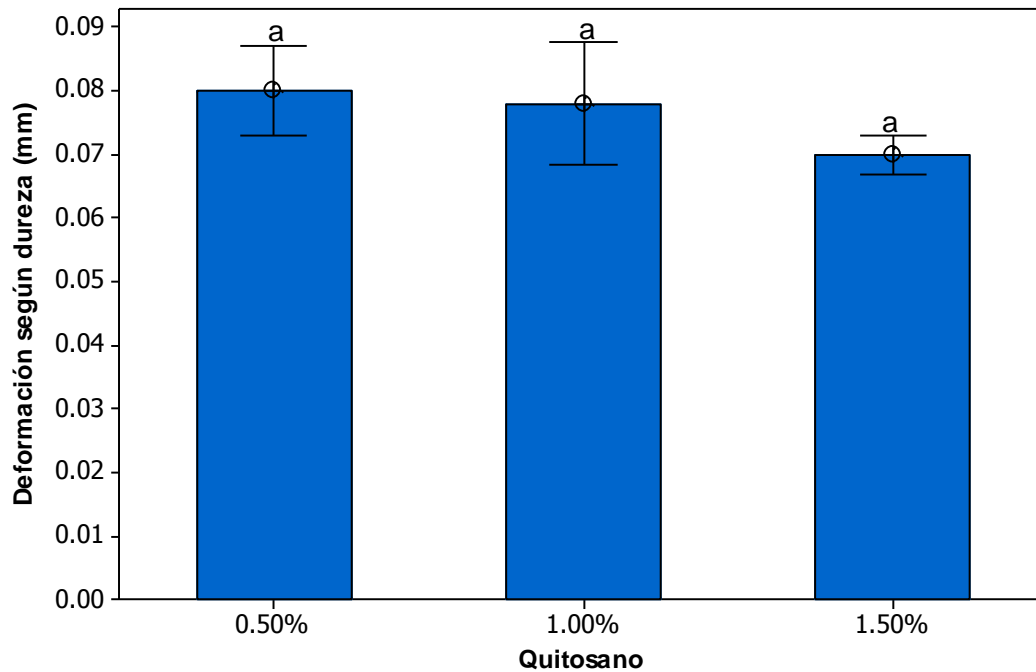


Figura 10. Deformación según dureza de biopelículas en tres concentraciones de quitosano: 0.5%, 1% y 1.5% (n=6 p<0.05 Tukey).

Posteriormente se evaluaron los parámetros de dureza y deformación según dureza, en frutos de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) no recubiertos (tratamiento control) y recubiertos con las tres concentraciones de quitosano (0.5, 1 y 1.5%), en dos temperaturas de almacén: ambiente (25 °C) y refrigeración (4 °C), a los 1 y 7 días de almacenamiento.

A temperatura ambiente, al día 1 se observó que no hay diferencias significativas tanto en dureza como en el porcentaje de deformación según dureza, entre los frutos recubiertos con las distintas concentraciones de quitosano y los frutos no recubiertos (Figura 11A y 11B).

En el día 7, no se tuvieron mediciones de los frutos control debido a su alta tasa de decaimiento; sin embargo, en los frutos recubiertos con quitosano a este tiempo los frutos aun presentaban óptima calidad y de igual manera no se

detectaron diferencias significativas en la dureza pero sí en el porcentaje según la dureza, ya que los frutos de 1.5% de quitosano mantuvieron la dureza y tuvieron el menor porcentaje de deformación con un 6%, en tanto que los recubiertos con 0.5% fueron los que obtuvieron el mayor porcentaje de deformación con un 9% (figura 11B).

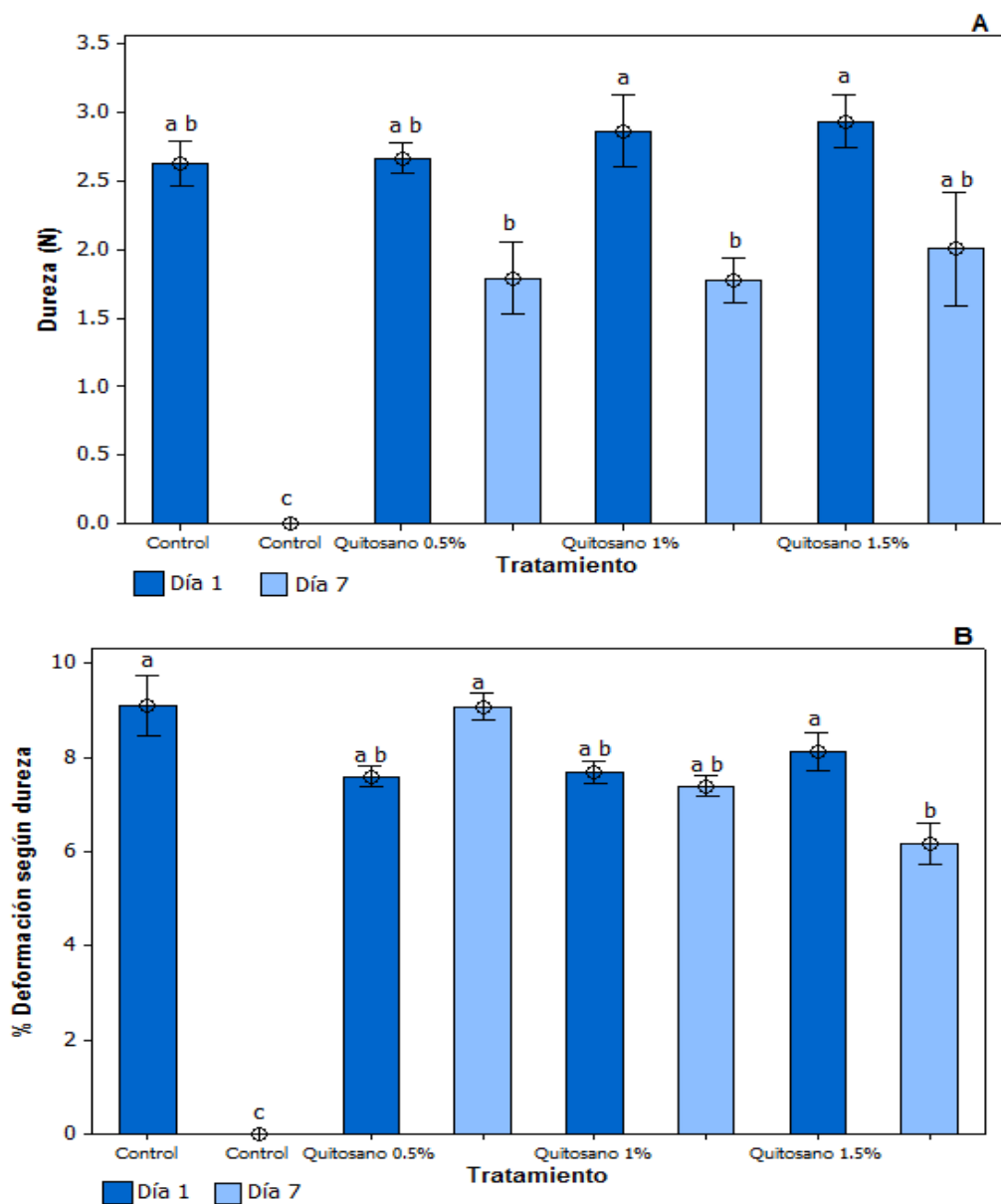


Figura 11. Datos de dureza (A) y porcentaje de deformación según dureza (B) de frutos recubiertos con las tres concentraciones de quitosano y control a los 1 y 7 días a 25 °C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.

En las condiciones de temperatura de refrigeración, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos tanto en dureza como en porcentaje de deformación según dureza (Figura 12A y 12B). Al séptimo día, los frutos control no fueron medidos debido a que tuvieron altas tasas de decaimiento. Mientras que los frutos recubiertos no son significativamente diferentes en los valores de dureza y en los de porcentaje de deformación (figura 12A y 12B), lo cual nos indica que los recubrimientos de quitosano retrasan la pérdida de dureza de los frutos en ambas temperaturas

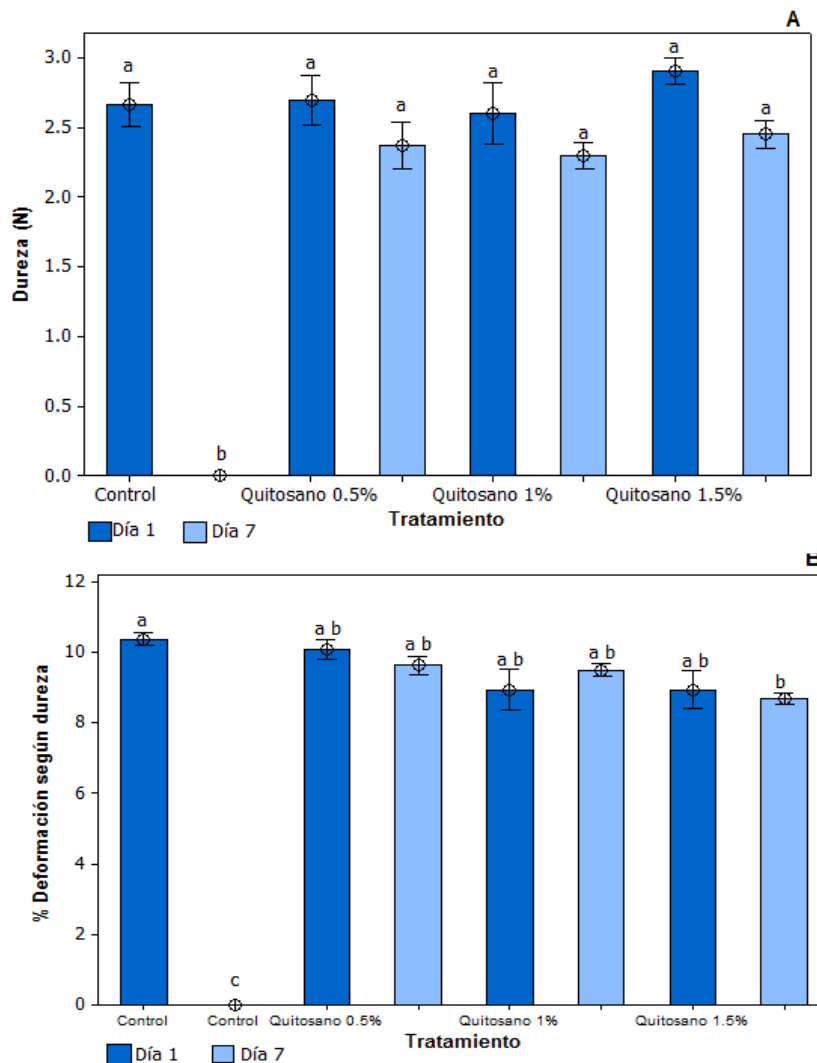


Figura 12. Datos de dureza y porcentaje de deformación según dureza de frutos recubiertos con las tres concentraciones de quitosano y control a los 1 y 7 días a 4°C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.

La pérdida de dureza en los frutos control en ambas temperaturas de almacén concuerda con lo reportado por Zhao (2007), quien menciona que el 60% de los frutos disminuyen su textura después de comenzar su almacenamiento; así mismo, se ha observado que en uvas de mesa durante el almacenamiento, el proceso de ablandamiento causa una pérdida de dureza mucho mayor y un rápido deterioro en los frutos control que en los tratados (Valverde *et al.* (2005). El ligero aumento de la dureza en frutos recubiertos con quitosano en comparación con los control concuerda con lo observado en cítricos recubiertos con quitosano + carboximetil celulosa (Arnon *et al.*, 2014) y en fresas con quitosano + gluconato de calcio, en los que se muestra un aumento de dureza durante el segundo y tercer día de almacenamiento (Hernández-Muñoz *et al.*, 2006).

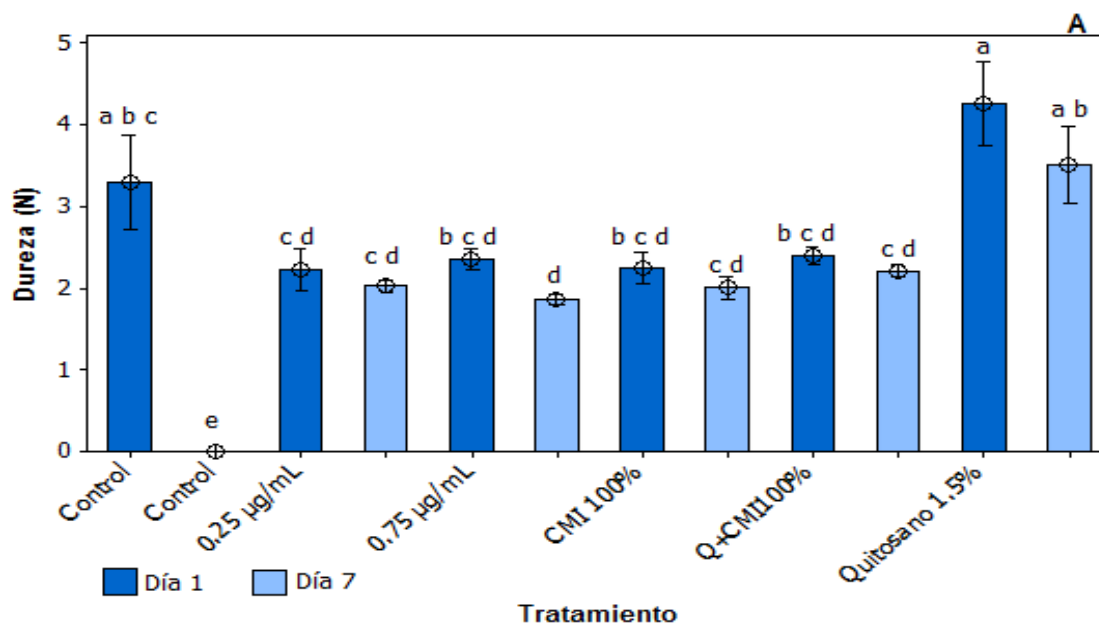
La textura de los frutos de zarzamora depende de diversos factores, tales como el estado de maduración, el cultivar, la dureza de la piel y el tamaño del fruto, pues las zarzamosas con pequeñas drupas tienen mayor firmeza. Sin embargo, los cambios de textura en las frutillas en general, son resultado de la degradación de los componentes de la pared celular incluyendo pectinas, celulosas, hemicelulosas, glicoproteínas y polifenoles esterificados, los cuales son componentes importantes que inciden en la calidad de los frutos y se encuentran relacionados con la maduración y la vida de anaquel (Hancock, 2008).

Sin embargo, los recubrimientos con quitosano aplicados a frutos tales como pimientos (Poverenov *et al.*, 2014) disminuyen el decaimiento del fruto y mejoran la textura del mismo; en frambuesas, el quitosano es responsable de mantener la dureza y la calidad del fruto (Tezotto-Uliana *et al.*, 2014); no obstante, en frutos de fresa y frambuesa roja, que fueron congelados y después descongelados, la dureza disminuyó durante el almacenamiento debido a que el recubrimiento no controló la pérdida de firmeza (Han *et al.*, 2004). En la presente investigación, al evaluar los parámetros de viscosidad de la solución formadora de la películas, así como la dureza y deformación según dureza en las biopelículas y en los frutos de zarzamora Cv. Tupi recubiertos, se determinó que la concentración óptima para el

recubrimiento de los frutos de zarzamora con quitosano, es la de 1.5% (15 mg/mL).

Posteriormente, se evaluó la dureza (N) y el porcentaje de deformación según dureza, de frutos recubiertos con la concentración óptima de quitosano adicionando la CMI 100% (0.05 µg/mL) del aceite esencial de Santa María.

A un día de almacenamiento en temperatura ambiente, los frutos recubiertos sólo con quitosano fueron significativamente diferentes al resto de los demás tratamientos, teniendo valores de dureza de 5N, mientras que los frutos con el recubrimiento de quitosano + CMI100% presentaron una dureza de 3N (Figura 13A) y un porcentaje de deformación de 9% (Figura 13B). A los 7 días, se observó que los frutos recubiertos con quitosano a los cuales se le añadió la CMI 100%, no presentaron diferencia significativa en la dureza con los tratados, sólo con la CMI 100% del aceite esencial y las dos concentraciones del aceite. En tanto, los frutos recubiertos sólo con quitosano presentaron mayor dureza en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 13A). Sin embargo, los frutos con CMI 100% fueron los que tuvieron mayor deformación con un 12% y los tratados con quitosano +CMI100% se deformaron un 10% (figura 13B).



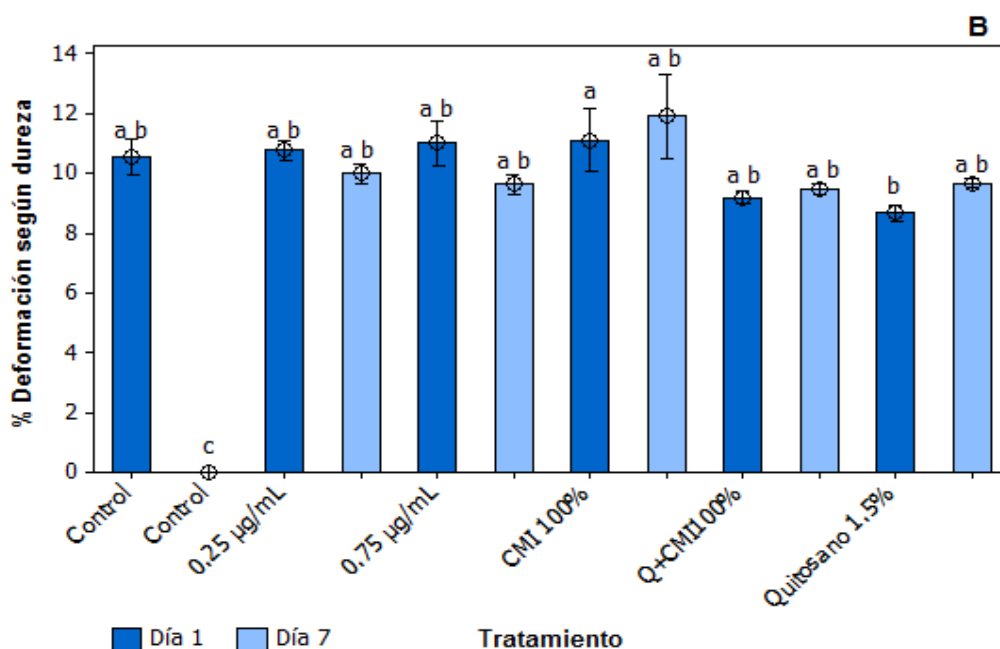
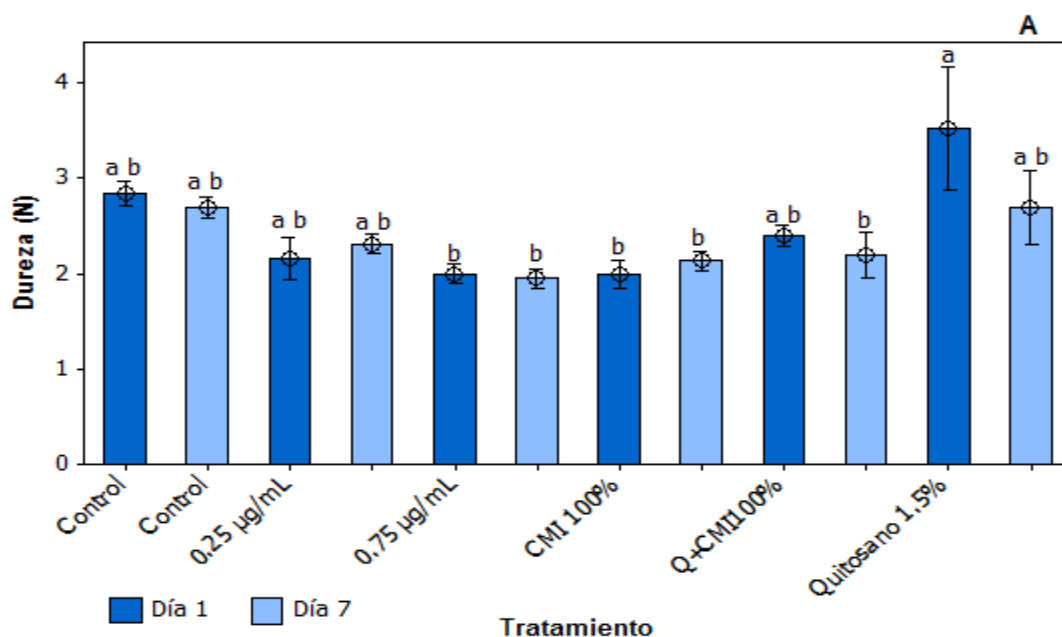


Figura 13. Datos de dureza (A) y porcentaje de deformación según dureza (B) de frutos recubiertos con aceite esencial de *T. lucida* y con quitosano (1.5%) adicionado con la CMI 100% del aceite esencial (0.05 µg/mL), a los 1 y 7 días a 25 °C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.

En refrigeración, al igual que en temperatura ambiente, al día 1 se observó una diferencia significativa de los frutos con quitosano al 1.5% con una dureza de 4N, mientras que los frutos recubiertos con quitosano+CMI100%, CMI100% y las dos concentraciones de aceite presentaron una dureza de 3N (Figura 14A); sin embargo, no tuvieron diferencias significativas respecto al porcentaje de deformación del fruto. Pero a los 7 días de almacenamiento, no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos ni en dureza o en porcentaje de deformación (figura 14A y 14B). No obstante, los frutos recubiertos con quitosano + CMI 100% mantuvieron la dureza al comparar los valores con el día 1, en tanto que los frutos recubiertos sólo con quitosano disminuyeron su dureza a los 7 días de 4N a 2.50N (Figura 6A).

Los altos valores de dureza de frutos recubiertos sólo con quitosano, la disminución de la misma en frutos tanto con quitosano a los que se les añadió la CMI 100% del aceite esencial de Santa María como los recubiertos sólo con el aceite esencial, no significa que los frutos sean más blandos que el resto de los tratamientos, sino que son más deformes a ambas temperaturas. Esto concuerda con lo reportado para pimientos recubiertos con quitosano al 1% y aceite de limón, en los que se obtuvo una alta firmeza, seguida por la combinación de quitosano y aceite esencial; en tanto, los que estaban tratados sólo con el aceite esencial no mantuvieron la firmeza en comparación con los no tratados (Ali *et al.*, 2015).

También este resultado se ha reportado para frutos de aguacates, ya que los recubiertos con quitosano y aceite de tomillo, fueron más firmes que los tratados solo con aceite esencial de sábila (*Aloe vera*) y de tomillo. Los frutos no tratados son los que mostraron valores de firmeza más bajos, como resultado del rápido ablandamiento o deterioro de éstos (Bill *et al.*, 2014). En cuanto al efecto de la temperatura, el ablandamiento se ha observado mayormente a temperatura ambiente que en refrigeración, aún recubiertos con quitosano adicionado con aceite esencial (Dantas-Guerra *et al.*, 2016). En frutos de tomate cherry cubiertos con quitosano y aceite esencial de menta, la dureza disminuyó considerablemente al aumentar el tiempo de almacenamiento, mismo efecto que se observó en los frutos no tratados (Dantas Guerra *et al.*, 2015).



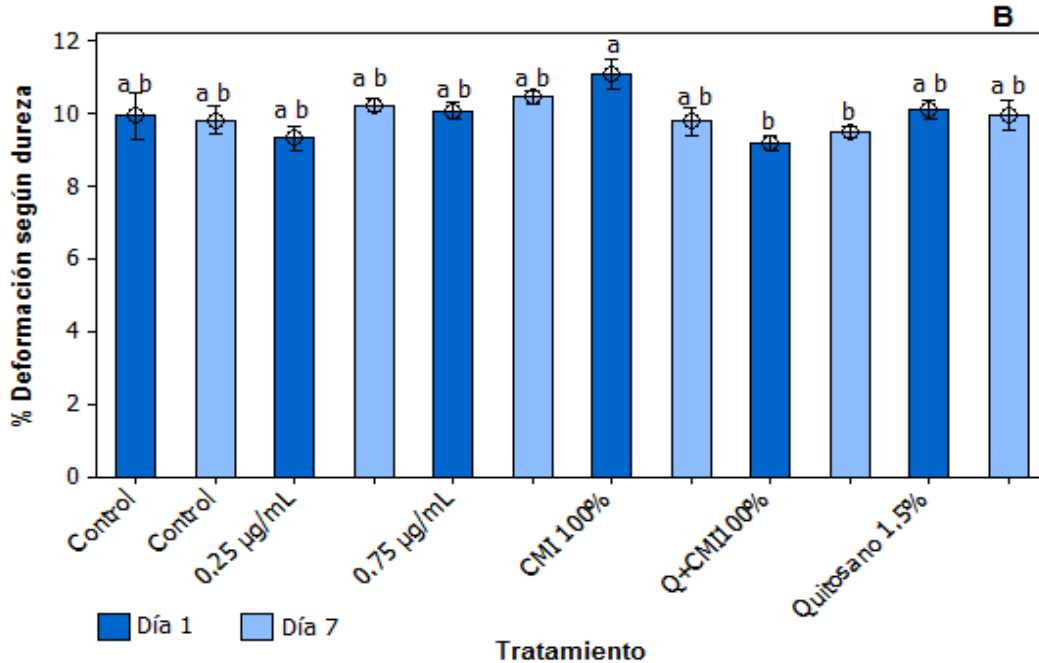


Figura 14. Datos de dureza (A) y % de deformación según dureza (B) de frutos recubiertos con aceite esencial de *T. lucida* y con quitosano (1.5%) adicionado con la CMI 100% del aceite esencial (0.05 µg/mL), a los 1 y 7 días a 4 °C (n=9 p<0.05 Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas.

En particular, para los frutos de zarzamora Cv. Tupi, la incorporación del aceite esencial a la biopelícula de quitosano tuvo efectos sobre la dureza de los frutos, dando como resultado una acción de los mismos sobre el tejido celular del fruto afectando directamente la firmeza del fruto. Lo anterior se ha observado en rebanadas de melón recubiertas con alginato y aceites esenciales de canela, palmarosa y hierba de limón, en los cuales, se observó una disminución de la firmeza durante el tiempo de almacén (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2008)

Conclusiones

Debido a las propiedades de mayor viscosidad, recubrimientos más duros pero menos deformes, la concentración de 15 mg/mL (1.5%) de quitosano fue la óptima para el recubrimiento de frutos de zarzamora Cv. Tupi, aportando una menor pérdida de dureza y deformidad a los frutos recubiertos almacenados a temperatura ambiente y refrigeración. En tanto que, al añadir al recubrimiento de quitosano la CMI 100% del aceite esencial de Santa María, hubo una disminución de la dureza pero se mantuvieron valores bajos de deformidad en ambas temperaturas de almacén.

El recubrimiento de los frutos de zarzamora Cv. Tupi con la biopelícula de quitosano adicionado con el aceite esencial de *T. lucida*, alarga la vida de anaquel y conserva la firmeza de los frutos hasta por siete días.

Referencias

- Ali, A., Noh N.M. y Mustafa M.A. 2015.** Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and Shelf Life*, 3:56-61.
- Arceo-Martínez, M.A. 2015.** Efecto antagónico *in vitro* e *in vivo* de recubrimientos de quitosano sobre fitopatógenos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en genómica alimentaria. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. Sahuayo, Michoacán, México. 65 pp.
- Arnon, H., Zaitsev Y., Porat R. y Poverenov E. 2014.** Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 87:21–26.
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P. y Mohd Adzahan, N. 2014.** Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88:1–7.
- Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna L. 2004.** Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana*, 6:63–67.

- Bill, M., Sivakumar D., Korsten L. y Thompson A.K. 2014.** The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64:159–167.
- Choi, W. S., Singh, S. y Lee, Y. S. 2016.** Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of “Formosa” plum (*Prunus salicina* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 70:213–222.
- Dantas-Guerra, I.C., Lima de Oliveira P.D., Fernandes Santos M.M., Carneiro Lúcio A.S.S., Fachine Tavares J., Barbosa-Filho J.M., Madruga M.S. y Leite de Souza E. 2016.** The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34:112–121.
- Dantas-Guerra, I.C., Lima de Oliveira P.D., Lima de Souza Pontes A., Carneiro Lúcio A.S.S., Fachine Tavares J., Barbosa-Filho J.M., Madruga M.S. y Leite de Souza E. 2015.** Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214:168–178.
- Dhanapal, A., Rajamani L. y Banu M. 2012.** Edible films from Polysaccharides. *Food Science and Quality Management*, 3(1):9-18.
- El Ghaouth, A., Arul J., Grenier J. y Asselin A. 1992.** Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82(4):398-402.
- Elsabee, M.Z. y Abdou E.S. 2013.** Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4):1819-1841.
- Embuscado, M.E. y Huber K.C. 2009.** *Edible Films and Coatings for Food Applications*. EUA: Springer. 411 pp.
- Guerreiro, A.C., Gago C.M.L., Faleiro M.L., Miguel M.G.C. y Antunes M.D.C. 2015.** The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100:226–233.
- Giongo, L., Poncetta P., Loretto P. y Costa F. 2013.** Textura de perfiles de arándanos durante el desarrollo del fruto, maduración y almacenamiento. *Poscosecha Biología y Tecnología*, 76(6):34-39.

- Han, C., Zhao Y., Leonard S.W. y Traber M.G. 2004.** Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33(1):67–78.
- Hancock, J.F. 2008.** Temperate Fruit Crop Breeding. Germplasm to Genomics. Springer Science + Business Media B.V. EUA. 459 pp.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar E., Ocio M.J. y Gavara R. 2006.** Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, 39(3):247–253.
- Krochta, J. M. y De Mulder-Johnston C. 1997.** Edible and Biodegradable Polymer Films : Challenges and Opportunities. *Food Technology*, 51(2): 61-74.
- Malik, A., Erginkaya Z., Ahmad S. y Erten H. 2014.** Food Processing: Strategies for Quality Assessment. Nueva York, EUA. Springer Science + Business. 510 pp.
- Nussinovitch, A. 2013.** Biopolymer Films and Composite Coatings. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Elsevier. p 295-327.
- Perdones, A., Sánchez-González L., Chiralt A. y Vargas M. 2012.** Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70:32–41.
- Poverenov, E., Zaitsev Y., Arnon H., Granit R., Alkalali-Tuvia S., Perzelan Y. y Weinberg T. 2014.** Effects of a composite chitosan-gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. *Postharvest Biology and Technology*, 96:106-109.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar J. y Martín-Belloso O. 2008.** Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3):313–327.
- Redgwell, R.J. y Fischer M. 2008.** Textura de la fruta, metabolismo de la pared celular y percepciones del consumidor. En: *Bases biológicas de la calidad de la fruta* (Knee M. Ed.). Acribia. Zaragoza, España. pp. 47-90.
- Tezotto-Uliana, J.V., Fargoni G.P., Geerdink G.M. y Kluge R.A. 2014.** Chitosan applications pre- or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. *Postharvest Biology and Technology*, 91:72-77.

- Timóteo dos Santos, N.S., Athayde-Aguiar A.J.A., Vasconcelos de Oliveira C. E., Veríssimo de Sales C., de Melo e Silva S., Sousa da Silva R., Montenegro-Stamford T.C. y Leite de Souza E. 2012.** Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32(2):345–353.
- Valverde, J.M., Valero D., Martínez-Romero D., Guillén F., Castillo S. y Serrano M. 2005.** Novel edible coating based on *Aloe vera* gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20):7807–7813.
- Vargas, M., Sánchez-González L., Cháfer M., Chiralt A. y González-Martínez C. 2012.** Edible chitosan coatings for fresh and minimally processed foods. En: *Emerging Food Packaging Technologies* (Yam D.S. y Lee K.L., Eds.), Woodhead Publishing Limited. pp. 66–95.
- Zhao, Y. 2007.** Berry fruit: Value-added products for health promotion. EUA: CRC Press Taylor and Francis Group. 444 pp.

7.3. Efecto antifúngico de una película de quitosano adicionada con aceite esencial de *T. lucida* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) inoculados con *B. cinerea* almacenados a diferentes temperaturas.

Resumen

El efecto antifúngico *in vivo* de una película de quitosano con la concentración óptima (1.5%) adicionada con la CMI 100% (0.05 µg/mL) del aceite esencial de *Tagetes lucida* (Santa María), se determinó en frutos de zarzamora Cv. Tupi, colectados en la etapa de madurez de consumo y previamente inoculados con esporas de *B. cinerea* (1×10^6 esporas/mL), almacenados en dos temperaturas, a 4 °C (refrigeración) y 25 °C (ambiente). El efecto se determinó con la medición por índice de severidad. Los frutos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: 1) Control (sin inóculo); 2) Control negativo (Etanol), 3) Control positivo (Tecto₆₀), 4) Quitosano 1.5%, 5) CMI 100% (0.05 µg/mL) y 6) Quitosano 1.5% + CMI 100%. A los 7 días de almacén, los frutos tratados sólo con etanol presentaron índices de severidad de 5 con un 100% de inhibición del crecimiento de micelio al igual que los frutos control a 25 °C e índices de 2 y 4 respectivamente a 4 °C. Los tratados con el fungicida comercial mostraron índices de 3 a 25 °C y de 2 a 4°C, y los tratados sólo con la CMI 100% del aceite esencial y el quitosano al 1.5% adicionado con la CMI 100% del aceite esencial de Santa María, no presentaron crecimiento de micelio a ambas temperaturas (índice de severidad de 1). Con estos resultados, se demostró el efecto inhibitorio *in vivo* de la biopelícula de quitosano (1.5%) adicionado con la CMI 100% (0.05 µg/mL) del aceite esencial de Santa María, en frutos de zarzamora Cv. Tupi, inoculados con esporas de *B. cinerea*.

Palabras clave: Biopelículas, ensayos *in vivo*, Índice de severidad, Inhibición, Santa María.

Abstract

The *in vivo* antifungal effect of a film of chitosan with optimal concentration (1.5%) added with the MIC 100% (0.05 µg/mL) of the essential oil of *Tagetes lucida* (Santa Maria), was determined in fruits of blackberry Cv. Tupi, collected in consumption maturity stage and previously inoculated with spores of *B. cinerea* (1×10^6 spores/mL), stored at two temperatures, at 4 ° C (cooling) and 25 ° C (room temperature). The effect was determined with the measurement for severity index. The fruits were subjected to the following treatments: 1) Control (without inoculum); 2) Negative control (ethanol), 3) Positive control (Tecto₆₀), 4) Chitosan 1.5%, 5) MIC 100% (0.05 µg/mL) and 6) 1.5% Chitosan + MIC 100%. At seven days of storage, the fruits treated only with ethanol showed a severity index of 5 with 100%

inhibition of mycelia growth as control at 25 ° C fruit and indices of 2 and 4 at 4 ° C, respectively. The fruits treated with the commercial fungicide showed severity index of 3 to 25 ° C and 2 to 4° C, y these treated only with the MIC 100% of the essential oil and with chitosan 1.5% added with the MIC 100%, did not show growth of mycelia at both temperatures (severity index of 1). These results showed the inhibitory effect *in vivo* of the biofilm of chitosan (1.5%) added with the MIC 100% (0.05 µg/mL) of the essential oil of Santa María, in fruits of blackberry Cv. Tupi, inoculated with spores of *B. cinerea*.

Keywords: Biofilms, *in vivo* tests, severity index, inhibition, Santa María.

Introducción

La mayor cantidad de pérdidas de calidad y cantidad de frutas frescas ocurren entre el período poscosecha y su consumo. Durante la vida de anaquel, además de controlar el proceso de maduración bajo condiciones de refrigeración o atmósferas controladas, es necesario regular la aparición de daño por microorganismos, principalmente el causado por hongos, ya que las pérdidas por éstos son muy altas, generalmente hasta un 100% dependiendo del fruto y hongo contaminante (Tripathy *et al.*, 2008; Gatto *et al.*, 2011).

Esta problemática la presentan los diversos tipos de frutillas o “berries” como fresa, arándano, frambuesa y zarzamora, las que tienen un tiempo de vida de anaquel muy corto y muestran una alta sensibilidad al ataque de hongos, principalmente por *Botrytis cinerea*. En los frutos de zarzamora (*Rubus* spp), este hongo causa una pudrición húmeda, que los descompone totalmente, ocasionando mal aspecto, ablandamiento, pudrición y cambio en sus propiedades organolépticas (ICA, 2011).

El control de la infección por hongos en frutos poscosecha se realiza con la aplicación de fungicidas sintéticos. El uso continuo de éstos representa un problema para el consumo humano, ya que los residuos de éstos pueden presentar toxicidad directa o indirectamente aumentar la resistencia de las poblaciones de hongos a los propios fungicidas (Tripathi y Dubey, 2004). La

seguridad alimentaria es uno de los principales temas en la industria y comercialización de frutas y verduras (Antunes y Cavaco, 2010).

Una alternativa para disminuir la aplicación de compuestos químicos sintéticos y aumentar la vida de anaquel, es el uso de las biopelículas o recubrimientos comestibles, siendo los polisacáridos los más empleados debido a que forman recubrimientos homogéneos y transparentes, de los cuales el más utilizado es el quitosano. A esta molécula se le han atribuido cualidades antifúngicas, además de ser biodegradables, biocompatibles, con óptimas propiedades mecánicas, que provee una selectiva permeabilidad a los gases (CO₂ y O₂), mantiene el aroma, controla la humedad, prolonga la vida de anaquel y conserva la calidad de los alimentos (Goy *et al.*, 2009; Elsabee y Abdou, 2013).

En concentraciones mayores a 0.1% de quitosano, se ha demostrado la inhibición del crecimiento de micelio de *Rhizopus stolonifer* (Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004), *Aspergillus niger* (Sebti *et al.*, 2005) y *Colletotrichum musae* (Jinasena *et al.*, 2011), sin embargo la actividad contra *B. cinerea* es considerada muy baja o bien que solamente retrasa la infección (El Ghaouth *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2007; Lárez Velázquez, 2008).

Con el propósito de aumentar la efectividad antifúngica de las biopelículas de quitosano, sobre todo con el fin de inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, éstas pueden ser adicionadas con compuestos antifúngicos naturales y los aceites esenciales de plantas son una buena opción, debido a que contienen compuestos terpénicos como el timol, eugenol, metil-eugenol y estragol, reportados con una alta efectividad contra hongos, entre ellos *B. cinerea* (Fontenelle *et al.*, 2008; Obolskiy *et al.*, 2011; Melgarejo-Flores *et al.*, 2013; Aguilar-González *et al.*, 2015; El-Soud *et al.*, 2015).

El aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. (Santa María) ha mostrado ser un efectivo antifúngico, con una inhibición del 100% tanto de micelio como de esporas

de *B. cinerea* en ensayos *in vitro* y en frutos de zarzamora, a una concentración mínima inhibitoria del 100% de 0.05 µg/mL (Sección 7.1). Por estas propiedades, en la presente investigación se propone al aceite esencial de *T. lucida* como un aditivo de la biopelícula de quitosano con el propósito de inhibir el crecimiento de *B. cinerea* y aumentar la vida de anaquel. Para cumplir con este objetivo, se determinó el efecto antifúngico de las biopelículas de quitosano con la concentración óptima (1.5%) adicionada con la CMI 100% (0.05 µg/mL) del aceite esencial de *T. lucida* en frutos de zarzamora Cv. Tupi, a dos temperaturas de incubación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceite esencial de *T. lucida*

Del aceite esencial de *T. lucida* obtenido por hidrodestilación, se preparó la concentración correspondiente a la CMI 100%, ésta utilizando una alícuota del aceite esencial de Santa María concentrado en etanol absoluto para obtener la concentración de 0.05 µg/mL. Es por ello que este disolvente es utilizado como control negativo.

Frutos de zarzamora Cv. Tupi

Se utilizaron frutos en madurez de consumo colectados en un huerto en la localidad de Ziracuaretiro, Michoacán. Éstos fueron utilizados recién colectados y seleccionados para tener homogeneidad en tamaño, forma, color y madurez.

Botrytis cinerea

La cepa utilizada para el presente trabajo pertenece al cepario del laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo, donada por el Dr. Eduardo Valencia Cantero. La cepa se mantuvo en un medio de cultivo PDA (papa

dextrosa-agar) en cámara de crecimiento (24 °C, fotoperiodo de 16 h de luz, 200 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ y 60% de humedad). Las transferencias a medio fresco se realizaron cada 21 días por porción de micelio.

Preparación de la solución madre de quitosano

Se utilizó la solución en la concentración óptima de quitosano (1.5%) que fue seleccionada por los resultados mostrados en la Sección 7.2, en donde también se describe el método de preparación.

Método de asepsia y recubrimiento de frutos

Los frutos de zarzamora fueron sometidos a un proceso de asepsia superficial que consistió solamente en un enjuague con agua estéril por 5 min, sin aplicarles agentes desinfectantes, dejándose secar a temperatura ambiente. Los frutos se recubrieron por inmersión en la solución de quitosano (1.5%) por 1 min, se colocaron individualmente en charolas con divisiones para evitar el contacto entre ellos y se dejaron secar 24h a temperatura ambiente.

Ensayos en frutos recubiertos con quitosano adicionando la CMI 100% inoculados con *B. cinerea*

La inoculación con esporas de *B. cinerea* (1×10^6 esporas/mL) en frutos de zarzamora Cv. Tupi se describen en la Sección 7.1. Una vez inoculados, los frutos fueron sometidos por inmersión en los distintos tratamientos (método adaptado de Xu *et al.*, 2007; y de Lima de Sousa *et al.*, 2013).

- 1) Control. Frutos no inoculados sin recubrimiento.
- 2) Control negativo. Frutos inoculados, aplicando etanol absoluto.
- 3) Control positivo. Frutos inoculados, aplicando 5 mg/mL de Tecto₆₀.
- 4) Quitosano 1.5%. Frutos inoculados y recubiertos con quitosano.

- 5) CMI 100%. Frutos inoculados, aplicando 0.05 µg/mL del aceite esencial.
- 6) Quitosano 1.5% + CMI 100% (0.05 µg/mL). Frutos inoculados, recubiertos con quitosano y aplicando el aceite esencial.

Los dos últimos tratamientos también se aplicaron a frutos sin ser inoculados con *B. cinerea*. Se probaron dos temperaturas de almacén: 4 °C y 25 °C.

Índice de severidad en frutos recubiertos e inoculados

Para estimar el grado de infección de los frutos de zarzamora, debido a la inoculación con esporas de *B. cinerea*, se utilizó un índice de severidad adaptado de Romanazzi *et al.*, 2013, basado en el crecimiento de micelio sobre todo el fruto como se indica en el cuadro 5 de la Sección 7.1.

Resultados y discusión

El índice de severidad en frutos inoculados con *B. cinerea* y recubiertos con quitosano se determinó en dos temperaturas de almacén, 4 °C y 25 °C. Los frutos inoculados tratados solo con etanol presentaron un índice de severidad de 5 con un crecimiento de micelio en el 100% del fruto a 25 °C (Cuadro 10), al igual que los frutos control (Figura 15A y 15B) y un índice de severidad de 3 medido a 4 °C (Figura 15I). Al aplicar el fungicida Tecto₆₀ se obtuvo un índice de severidad de 3 a 25 °C (Figura 15C) y de 2 a 4 °C (Figura 15J) (Cuadro 10).

Después de 7 días de incubación, los frutos recubiertos con quitosano (1.5%) y almacenados en ambas condiciones de temperatura, presentaron crecimiento de micelio en un 25% del fruto (Figuras 15D, 15K). En frutos recubiertos a los que se les adicionó el aceite esencial de Santa María (Quitosano 1.5% + CMI 100% con y sin esporas), no se observaron síntomas de la infección por *B. cinerea* (Figuras

15F, 15M, 15G, 15N). Este mismo resultado se obtuvo con la CMI 100% del aceite esencial de *T. lucida* (Cuadro 10) (Figuras 15E, 15L).

Cuadro 10. Índice de severidad en frutos de zarzamora recubiertos con 1.5 mg/mL de quitosano, inoculados con esporas de *B. cinerea* a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (4 °C) a los 1, 3 y 7 días.

Tratamiento	Índice de severidad					
	25°C			4°C		
	1d	3d	7d	1d	3d	7d
Control	1	3	5	1	3	4
Etanol Abs.	1	3	5	1	1	2
Tecto₆₀ (5 mg/mL)	1	2	3	1	1	2
Quitosano 1.5% (1.5 mg/mL)	1	1	2	1	1	2
CMI 100% (0.05 µg/mL)	1	1	1	1	1	1
Quitosano 1.5% + CMI 100%	1	1	1	1	1	1
Quitosano 1.5% + CMI 100% (sin esporas)	1	1	1	1	1	1

Los resultados obtenidos de los frutos recubiertos con quitosano a los cuales se les adicionó la CMI 100% del aceite de Santa María y almacenados en ambas temperaturas, concuerdan con lo reportado para frutos de fresa inoculados con *B. cinerea* y recubiertos con quitosano, así como con la CMI de aceite esencial de clavo (92.56 µL/L_{aire}) y mostaza (15.42 µL/L_{aire}) en fase de vapor y con la combinación de ambos aceites (Aguilar-González *et al.*, 2015).

En otras investigaciones, también se ha reportado el efecto potenciado de aceites esenciales en frutos recubiertos con biopelículas. En rebanadas de piña recubiertas con alginato y aceite de limón, se mantuvo la calidad de las mismas y se logró extender la vida de anaquel (Azarakhsh *et al.*, 2014); en tanto que en arándanos recubiertos con quitosano (2%) adicionado con 8 o 12% de extracto de hojas de la misma planta, se observó un efecto inhibitorio contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, además se disminuyó la tasa de decaimiento de los frutos (Yang *et al.*, 2014); y en pimientos recubiertos con quitosano adicionados con aceite de canela, almacenados a 8°C, el recubrimiento retardó la desintegración superficial de los frutos en comparación con los no recubiertos, que mostraron altas tasas de decaimiento (Xing *et al.*, 2011).

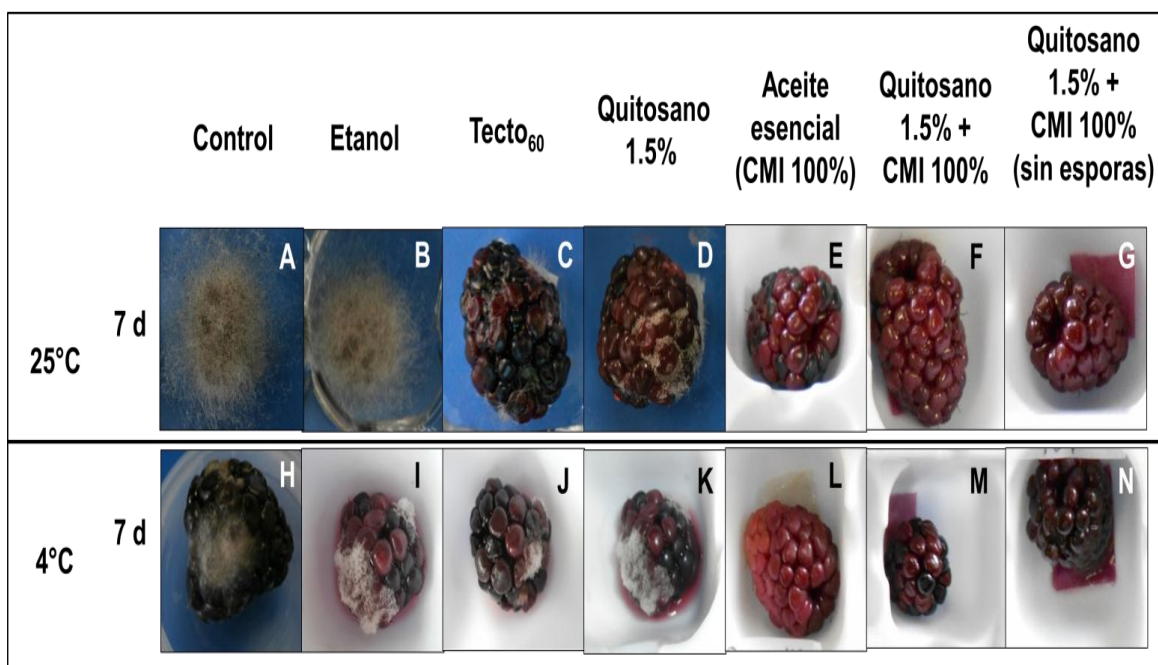


Figura 15. Resultados del crecimiento de micelio en frutos de zarzamora inoculados con esporas (1×10^6 esporas/mL) de *B. cinerea* a los 7 días de incubación a temperatura ambiente (25 °C) y refrigeración (4 °C), tratados con Etanol absoluto (B, I), Tecto₆₀ (5 mg/mL) (C, J), Quitosano 1.5% (1.5 mg/mL) (D, K), CMI 100% del aceite esencial de *T. lucida* (0.05 µg/mL) (E, L), Quitosano 1.5% + CMI 100% (F, M), Quitosano 1.5% + CMI 100% (sin esporas) (G, N) y un Control (A,H).

El recubrimiento de frutos solo con quitosano no fue efectivo, ya que se obtuvo un 25% de crecimiento del hongo, lo que demuestra que el quitosano (1.5%) no presentó un efecto antifúngico contra la cepa de *B. cinerea*. Lo anterior concuerda con la ya reportado, considerando que el quitosano no inhibe la germinación de esporas y el crecimiento de micelio de *B. cinerea* en frutos, solamente retrasa el proceso de infección (El Ghaouth *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2007; Lárez Velázquez, 2008). Esto confirma la resistencia de *B. cinerea* a la actividad antifúngica del quitosano (Sansguwan *et al.*, 2016).

Los frutos de zarzamora Cv. Tupi recubiertos con quitosano y aceite esencial de Santa María, además de no presentar síntomas de la infección y crecimiento de *B. cinerea*, mostraron una vida de anaquel de 7 días a 25 °C y de 10 días a 4 °C, un tiempo mayor a lo reportado para frutos poscosecha sin recubrimientos (FAO, 1995).

Cuando los frutos de zarzamora Cv. Tupi fueron recubiertos solo con la CMI 100% del aceite esencial de Santa María, no se presentó el crecimiento de micelio de *B. cinerea*, resultando con una alta efectividad en la inhibición del hongo. Esto no se ha observado al aplicar aceites esenciales de plantas aromáticas en la concentración similar al de *T. lucida*, ya que *in vivo*, el hongo germina y presenta crecimiento de micelio (Delić *et al.*, 2013; Zabka *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante resaltar que aunque el aceite esencial presenta propiedades antifúngicas contra *B. cinerea*, los frutos muestran un decaimiento en un tiempo menor al que se observó cuando los frutos de recubren con quitosano.

Este efecto inhibitorio tan efectivo del aceite esencial de *T. lucida*, puede ser debido a un sinergismo de los componentes terpénicos del mismo, lo cual ha sido demostrado para otros aceites esenciales (Aguilar-González *et al.*, 2015). En particular, debido a que los compuestos estragol y metil eugenol, son los mayoritarios de este aceite esencial, y han sido reportados con alta actividad antimicrobiana, se sugiere que éstos son los responsables de inhibir el crecimiento

de *B. cinerea* (Fontenelle *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2011; Obolskiy *et al.*, 2011; El-Soud *et al.*, 2015). Los resultados *in vivo*, concuerdan con lo observado en los ensayos *in vitro* (Sección 7.1).

Conclusión

Con la adición del aceite esencial de *T. lucida* en una concentración de 0.05 µg/mL (CMI 100%) en frutos de zarzamora Cv. Tupi, recubiertos con la biopelícula de quitosano (1.5%), se obtuvo un 100% de inhibición sobre el crecimiento de micelio de *Botrytis cinerea*. Además, con este tratamiento se preservó la calidad de los frutos hasta 10 días a 4 °C y 7 días a temperatura ambiente (25 °C), alargando la vida de anaquel de éstos

Referencias

- Aguilar-González, A.E., Palou E. y López-Malo A. 2015.** Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and / or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 32:181-185.
- Ali, A., Noh N.M. y Mustafa M.A. 2015.** Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and Shelf Life*, 3: 56–61.
- Antunes, M.D.C. y Cavaco A.M. 2010.** The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25:351-366.
- Azarakhsh, N., Osman A., Ghazali H.M., Tan C.P. y Mohd Adzahan N. 2014.** Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88:1–7.
- Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D. e Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.
- Bassolé, I.H.N. y Juliani H.R. 2012.** Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17(12):3989–4006.

- Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna L. 2004.** Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 6(001):63-67.
- Delić, D.A., Skrobonja J.R., Karamn M.A., Matavul M.N. y Bogavac M.A. 2013.** Antifungal activity of essential oils of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against three *Candida albicans* strains. *Journal of Natural Sciences*, 124:203-211.
- El Ghaouth, A., Arul J., Asselin A. y Benhamou N. 1992.** Antifungal activity of chitosan on postharvest pathogens. Induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*, 96:769-779.
- Elsabee, M.Z. y Abdou E.S. 2013.** Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering*, 33:189-1841.
- El-Soud, N.H.A., Deabes M., El-Kassem L.A. y Khalil M. 2015.** Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. *Macedonian Journal of Medical Science*, 3(3):374-379.
- Fontenelle, R.O., Morais S.M., Brito E.H., Brilhante R.S., Cordeiro R.A., Nascimento N.R., Kerntopf M.R., Sidrim J.J. y Rocha M.F. 2008.** Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5):1383-1390.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1995.** Chapter 5: General procedures for fruit and vegetable preservation. 5.1 Fresh storage. *In: Fruit and vegetable processing.* Roma. <http://www.fao.org/docrep/V5030e/V5030E0a.htm#5.1%20Fresh%20storage> (Accesada el 15 de noviembre de 2016)
- Gatto, M.A., Ippolito A., Linsalata V., Cascarano N.A., Nigro F., Vanadia S. y Di Venere D. 2011.** Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest BiologyTechnology*, 61:72-82.
- Goy, R.C., Britto, D. De, y Assis O.B.G. 2009.** A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência E Tecnologia*, 19(3):241–247.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2011.** Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus glaucus benth*) Medidas para la temporada invernal. Produmedio. Bogotá Colombia. 32 pp.

- Khan, A., Ahmad A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A. y Manzoor N. 2011.** Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Research*, 11(1):114-22.
- Jinasena, D., Pathirathna P., Wickramarechchi S. y Marasinghe E. 2011.** Use of chitosan to control anthracnose on “Embul” banana. *International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBEE*, 13:56-60.
- Lárez-Velásquez, C. 2008.** Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8(1): 1-22.
- Lima de Sousa, L., Albuquerque de Andrade S.C., Aguiar-Athayde A.J.A., Vasconcelos de Oliveira C.E., Veríssimo de Sales C., Madruga M.S. y Leite de Souza E. 2013.** Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165(3): 312–318.
- Melgarejo-Flores, B.G., Ortega-Ramírez I.A., Silva-Espinosa B.A., González-Aguilar G.A., Miranda M.R.A. y Ayala-Zavala J.F. 2013.** Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil. *Postharvest Biology and Technology*, 86:321-328.
- Romanazzi G, Feliziani E, Satini M. y Landi L. 2013.** Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and others resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75:24-27.
- Obolskiy, D., Pischel I., Feistel B., Glotov N. y Heinrich M. 2011.** *Artemisia dracuncululus* L. (*Tarragon*): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology and safety. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 31:17-45.
- Sangsuwan, J., Pongsapakworawat T., Bangmo P. y Sutthasupa S. 2016.** Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting *Botrytis cinerea* and their application in strawberry packaging system. *LWT - Food Science and Technology*, 74: 14–20.
- Sebti, I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S. y Coma V. 2005.** Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination. *Journal of Food Science*, 70(2):100-104.

- Tripathi, P. y Dubey N.K. 2004.** Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology Technology*, 32:235-245.
- Tripathi, P., Dubey N.K. y Shukla A.K. 2008.** Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:39-46.
- Xing, Y., Li X., Xu Q., Yun J., Lu Y. y Tang Y. 2011.** Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 124(4):1443-1450.
- Xu, W-T., Huang K-L., Guo F., Qu W., Yang J-J., Liang Z-H. y Luo Y-Bo. 2007.** Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46:86-94.
- Yang, G., Yue J., Gong X., Qian B., Wang H., Deng Y. y Zhao Y. 2014.** Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, 92:46–53.
- Zabka, M., Pavela R. y Prokinova E. 2014.** Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. *Chemosphere*, 112:443-448.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Los ejemplares del género *Tagetes* contienen aceites esenciales en sus flores y hojas, cuyos compuestos comprenden carotenoides, flavonoides, alcaloides, fenil propanoides, derivados fenólicos, terpenos, entre otros, los cuales varían en su composición y proporciones de sus componentes, siendo distintos entre especies, localización geográfica y método de extracción (Vasudevan *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2012).

Para *T. lucida* (Santa María), el aceite esencial obtenido por medio de hidrodestilación estuvo compuesto en un 75% por los terpenos estragol y metil-eugenol, con un contenido de 521.8 µg/mL y 464 µg/mL, con un 30 y 35% de abundancia, respectivamente. Estos valores son más del doble que lo reportado por Fulgencio-Negrete (2013), quien obtuvo en un extracto hexánico las concentraciones de 175.55 µg/mL y 208.621 µg/mL para estragol y metil-eugenol, respectivamente. Además, éstos son reportados como los compuestos con actividad antifúngica probada con *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*. En un extracto metanólico, además de los compuestos terpénicos se reportó la presencia de cumarinas, también aisladas de la parte aérea, las cuales poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos (Céspedes *et al.*, 2006).

Dada la actividad antimicrobiana reportada anteriormente por el aceite esencial de Santa María, se decidió realizar ensayos *in vitro* contra *B. cinerea*, un patógeno difícil de controlar debido a que es un agente necrotrófico, obteniendo un 100% de inhibición sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea* a muy bajas concentraciones del aceite esencial (0.05 - 0.1 µg/mL), estableciendo la concentración de 0.05 µg/mL como la concentración mínima inhibitoria (CMI) que ejerció el 100% de inhibición sobre *B. cinerea*, resultado el efecto similar al ejercido con una alta concentración del fungicida Tecto₆₀ (5mg/mL).

La CMI 100% reportada en este estudio es una concentración considerablemente baja contra un microorganismo, ya que para el extracto hexánico de Santa María, la CMI 100% fue de 0.05 mg/mL sobre *B. cinerea* y *C. acutatum* (Fulgencio-Negrete, 2013). Otros aceites esenciales han mostrado este efecto antifúngico con una CMI 100% mayores a los del aceite esencial de Santa María, obtenido por hidrodestilación; la CMI 100% del aceite esencial de *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana* (toronjil) fue de 0.92 µg/mL contra *Aspergillus flavus* y de 0.3 µg/mL *Porophyllum linaria* (Juárez *et al.*, 2015); y la CMI 100% del aceite esencial de orégano contra *Staphylococcus aureus* fue de 1.575 mg/mL y de 1.648 mg/L contra *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001).

El efecto antifúngico observado con el aceite esencial de *T. lucida* obtenido por hidrodestilación, además fue confirmado sobre la germinación de esporas de *B. cinerea* a los 7 días de incubación, ya que se observó un 100% de mortalidad, efecto no observado al utilizar el fungicida comercial, con el que se consiguió solamente un 92% de mortalidad de las esporas y se presentó el desarrollo de hifas. Con el aceite esencial no se observó el desarrollo de hifas (Cuadro 7, Sección 7.1). Dichos resultados se han observado con concentraciones más altas de otros aceites esenciales, como el de hierba limón (*Cymbopogon citratus*) del que se requirieron 500 ppm para tener un 0% de germinación contra *B. cinerea* (Tzortzakakis y Economakis, 2007); o bien, 250 µL/L de aceites de diferentes especies de tomillo (*Thymus* spp) para evitar la germinación de esporas de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Geotrichum citri-aurantii* (Boubaker *et al.*, 2016); con el aceite esencial de tomillo (*Thymus* sp) no se logró inhibir completamente la germinación de esporas, ya que con 0.05 µL/mL se obtuvo un 60% de germinación de esporas de *P. italicum*, mientras que con 0.002 µL/mL se tuvo un 80% de germinación de esporas de *B. cinerea* (Vitoratos *et al.*, 2013).

Cabe recalcar, que la CMI 100% reportada del aceite esencial de Santa María en este estudio, es relevante debido a que el efecto antifúngico lo ejerce en bajas concentraciones, y que además por ser considerado un producto GRAS y a que su

obtención se realizó sin el uso de disolventes, lo presenta con un alto potencial de uso como aditivo para frutos como zarzamora, los cuales por sus características de maduración y fisiología del fruto, presentan una vida de anaquel corta y son muy susceptibles al daño mecánico y al ataque del hongo *B. cinerea*, en poscosecha. Es por ello, que en esta investigación se realizaron ensayos *in vivo*, evaluando el efecto antifúngico del aceite esencial de Santa María en frutos de zarzamora Cv. Tupi, aplicando la CMI 100%.

A los 7 días de incubación, los frutos recubiertos con la CMI 100% de Santa María tanto a 25 °C como a 4 °C, no presentaron crecimiento de micelio de *B. cinerea* (Figura 8, Sección 7.1.). Este resultado concuerda con lo reportado para fresas inoculadas con *B. cinerea* y expuestas a la combinación de los aceites esenciales en fase gaseosa de mostaza y clavo, los cuales no permitieron el crecimiento del hongo (Aguilar-González *et al.*, 2015). El efecto antifúngico del aceite esencial de *T. lucida* se debe principalmente a su hidrofobicidad, lo que permite que éste penetre en las capas lipídicas de las membranas celulares de hongos, resultando en la disrupción en las estructuras de la membrana y la integridad de la misma (Reddy *et al.*, 2008).

En otras investigaciones, se ha propuesto el uso de los componentes del aceite esencial de diferentes especies de *Tagetes*, para ser implementados como suplementos (Khali *et al.*, 2012).

Por lo anterior y las características presentadas por el aceite esencial de *T. lucida* obtenido por hidrodestilación, se decidió incorporarlo a un recubrimiento comestible para frutos de zarzamora, en particular formulado con quitosano, ya que es una alternativa para reducir las altas tasas de decaimiento que sufren estos frutos poscosecha. Dentro de la calidad de cualquier fruto poscosecha, la de la apariencia es fundamental, es por ello que se utilizan recubrimientos elaborados de quitosano, debido a sus reportes de actividad antimicrobiana, la cual se

potencializa si se le añaden otros agentes, como los aceites esenciales (Zivanovic *et al.*, 2011).

Debido a que algunos parámetros fisicoquímicos y de textura cambian en frutos recubiertos con biopelículas adicionados con aceites esenciales, fue importante determinar la dureza y la deformación según la dureza en frutos recubiertos con quitosano solo, con el aceite esencial solo y como con quitosano incorporado con el aceite esencial.

Con una concentración de 15 mg/mL (1.5%) de quitosano se obtuvieron los mejores valores de dureza a ambas temperaturas, a los 7 días de almacenamiento, con valores de 2.5N (dureza) y 6% (deformación según dureza) a 25 °C y 2.5N (dureza) y 8% (deformación según dureza) a 4 °C. Esto concuerda con reportes de recubrimientos elaborados a partir de diversas sustancias, como para rebanadas de sandía recubiertas con alginato, que mantuvieron la dureza a los 7 días de almacenamiento (Sipahi *et al.*, 2013); y uvas recubiertas con *Aloe vera*, cuyo recubrimiento no permitió que la dureza se perdiera (Valverde *et al.*, 2005).

Después, se evaluó la dureza y deformación según dureza de los frutos recubiertos con quitosano al que se le adicionó la CMI 100% del aceite esencial de Santa María, obteniéndose a los 7 días de almacenamiento valores de dureza de 2N y 10% de deformación a 25 °C y 2.5 N de dureza y 10% de deformación a 4°C. Tales resultados, concuerdan con lo reportado para fresas recubiertas con quitosano + aceite de tomillo rojo (Sangsuwan *et al.*, 2016) y zarzamoras recubiertas con quitosano + extracto de hojas de zarzamora, lo cual fue dependiente de la concentración y de la composición de los extractos. Éstos tienden a disminuir las tasas de decaimiento de los frutos, además de que la pérdida de firmeza se encuentra relacionada con la hidrólisis enzimática de las sustancias de la pared celular y el ablandamiento, factores comúnmente

relacionados con la pérdida de agua, la cual es la responsable de la pérdida de turgencia y frescura de los frutos (Yang *et al.*, 2014)

Posteriormente se evaluó el índice de severidad de frutos inoculados con las esporas de *B. cinerea* y recubiertos con quitosano más la CMI 100% del aceite esencial de Santa María, encontrando que en frutos inoculados y no inoculados, recubiertos sólo con quitosano, se observó el desarrollo de micelio con un índice de severidad de 2 correspondiente al 25% del crecimiento del micelio, a los 7 días en ambas temperaturas. A los que se les añadió la CMI 100% del aceite esencial, no presentaron desarrollo de micelio en ambas temperaturas (Figura 15, Sección 7.3), presentándose índices de severidad de 1 (0% de crecimiento de micelio).

Dichos efectos son similares a los reportados para la goma de algarrobo (*Ceratonia siliqua*), recubiertos con quitosano al que se le incorporó el aceite de bergamota o naranja contra *Aspergillus flavus*, reduciendo las tasas de decaimiento al 52-62% a los 12 días (Aloui *et al.*, 2014); y en pimiento recubiertos con quitosano más el aceite esencial de hierba de limón contra *Colletotrichum capsici*, los cuales controlaron la incidencia de la enfermedad en un 33% (Ali *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la actividad antifúngica del aceite esencial de Santa María sobre el micelio y germinación de esporas de *B. cinerea*, así como su potencial para la incorporación a un recubrimiento de quitosano y aplicarlo a frutos de zarzamora, ya que con los resultados se demostró que su adición disminuye la dureza, mantienen bajos los valores de deformidad y potencia el efecto antifúngico, ya que se inhibió completamente el desarrollo de *B. cinerea*, uno de los principales patógenos que afectan la calidad de estos frutos.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se estableció la concentración de 0.05 µg/mL del aceite esencial de *Tagetes lucida* (Santa María) como la CMI para inhibir en un 100% el crecimiento de micelio y germinación de las esporas de *Botrytis cinerea* tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, en frutos de zarzamora Cv. Tupi.

La incorporación de esta concentración del aceite esencial al recubrimiento de quitosano (1.5%) en frutos de zarzamora Cv. Tupi, permitió una disminución de la dureza pero con un mínimo de cambios en la deformidad, tanto a 25 °C como a 4 °C durante 7 días de almacén.

El recubrimiento de los frutos de zarzamora Cv. Tupi con la biopelícula de quitosano adicionado con el aceite esencial de *T. lucida*, alarga la vida de anaquel, inhibe el desarrollo de micelio de *B. cinerea* y conserva la firmeza de los frutos hasta por siete días.

10. PERSPECTIVAS

Realizar las pruebas organolépticas para determinar los niveles de aceptación de los frutos de zarzamora Cv. Tupi recubiertos con quitosano y diferentes concentraciones del aceite esencial de *T. lucida*.

11. LITERATURA GENERAL CITADA

- Acosta de la Luz, L., Hechevarría Sosa I. y Rodríguez Ferrada C. 2010.** Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 15(1):38–45.
- Acosta de la Luz, L., Hechevarría Sosa I., Rodríguez Ferrada C. y Milanés Figueredo M. 2011.** Momento óptimo de plantación y de cosecha en *Tagetes lucida* Cav. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16(2):201–208.
- Aguilar-González, A.E., Palou E. y López-Malo A. 2015.** Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 32:181–185.
- Ali, A., Noh N.M. y Mustafa M.A. 2015.** Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. Food Packaging and Shelf Life, 3:56–61.
- Aloui, H., Khwaldia K., Licciardello F., Mazzaglia A., Muratore G., Hamdi M. y Restuccia C. 2014.** Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. International Journal of Food Microbiology, 170:21–28.
- Aquino, R., Cáceres A., Morelli S. y Rastrelli L. 2002.** An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. Journal of Natural Products, 65(12):1773–1776.
- Assis, O.B.G. y Pessoa J.D.C. 2004.** Preparation of thin films of chitosan for use as edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits. Brazilian Journal of Food Technology, 7:17-22.
- Atarés, L., y Chiralt A. 2015.** Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. Trends in Food Science and Technology, 48:51–62.

- Bakkali, F., Averbek S., Averbek D. e Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.
- Başer, K.H.C. y Demirci F. 2007.** Chemistry of essential oils. *In: Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (Berger, Günter, R. Eds.) USA: CRC Press, Boca Raton. pp. 43–86.
- Bassolé, I.H.N. y Juliani H.R. 2012.** Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17(12):3989–4006.
- Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna L. 2004.** Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana*, 6:63–67.
- Brad, W.S. 2010.** Industrial Uses of Essential Oils. Chapter 16. *In: Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications* (Başer C. y Buch B. Eds.) CRC Press. EUA. 843-854 pp.
- Beverly, R.I., Janes M.E.W., Prinyawiwatkul No H.K. 2008.** Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25(3):534–537.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009.** Pericón. UNAM. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=peric%C3%B3n&id=8002> (Accesada el 5 de junio de 2016).
- Bill, M., Sivakumar D., Korsten L. y Thompson A.K. 2014.** The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159–167.
- Boubaker, H., Karim H., El Hamdaoui A., Msanda F., Leach D., Bombarda I. y Ait Ben-Aoumar A. 2016.** Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 86:95–101.
- Bouchra, C., Achouri M., Hassani L.M.I. y Hmamouchi M. 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1):165–169.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223–53.

Catalogue of Life. 2015. Detalles de la especie *Botrytis cinerea* Pers., 1794.

http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/934743534707b5492847be247541d26c_ (Accesada el 30 de mayo de 2015).

Catalogue of Life. 2016. Detalles de la especie *Tagetes lucida* Cav.

<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/6036a8e086951745d3ca152ea15d042e> (Accesada el 5 de junio de 2016).

Castillo-Juárez, I., González V., Jaime-Aguilar H., Martínez G., Linares E., Bye, R. y Romero I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2):402–405.

Céspedes, C.L., Ávila J.G., Martínez A., Serrato B., Calderón-Mugica J.C. y Salgado-Garciglia R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:3521–3527.

Cheah, L.H., Page B.B.C. y Shepherd R. 1997. Chitosan coating for inhibition of *Sclerotinia* rot of carrots. *New Zealand Journal of Crop and Agricultural Science*, 25:89-92.

Ciolacu, L., Dunarea de Jos A.I.N. y Hoorfar J. 2014. Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *In: Global Safety of Fresh Produce: A Handbook of Best Practice, Innovative Commercial Solutions and Case Studies* (Hoorfar, J. Ed.). Woodhead Publishing Limited. pp 233-244.

Cordeiro de Azeredo, H.M. 2012. Edible Coatings. Chapter 14. *In: Advances in Fruit Processing Technologies* (Rodrigues S. y Fernandes F.A. Eds.). CRC Press Taylor & Francis Group. EUA. 472 pp.

Dantas-Guerra, I.C., Lima de Oliveira P.D., Fernandes-Santos M.M., Carneiro-Lúcio A.S.S., Fachine-Tavares J., Barbosa-Filho J.M., Madruga M. S. y Leite de Souza E. 2016. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv.

Isabella. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34: 112–121.

Dantas-Guerra, I.C., Lima de Oliveira P.D., Lima de Souza-Pontes A., Carneiro-Lúcio A.S.S., Fachine-Tavares J., Barbosa-Filho J.M., Madruga M.S. y Leite de Souza E. 2015. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214:168–178.

Devlieghere, F., Vermeulen A. y Debevere J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6): 703-714.

Elad, Y., Williamson B., Tudzynski P. y Delen N. 2007. *Botrytis*: Biology, pathology and control. Springer. 412 pp.

El Ghaouth, A., Arul J., Grenier J. y Asselin A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82(4):398-402.

Elsabee, M. Z. y Abdou E.S. 2013. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4):1819–1841.

Fernández-Pan, I. y Caballero J.I.M. 2011. Biopolymers for edible films and coatings in food applications. *In: Biopolymers – New Materials for Sustainable Films and Coatings* (Plackett D. Ed.). John Wiley and Sons, Ltd. pp. 233–254.

Fernández-Saiz, P., Lagarón J.M. y Ocio M.J. 2009. Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 57(8): 3298–3307.

Food and Agriculture Organization (FAO). 1995. General procedures for fruit and vegetable preservation. Chapter 5: 5.1 Fresh storage. *In: Fruit and vegetable processing*. Roma.

<http://www.fao.org/docrep/V5030e/V5030E0a.htm#5.1%20Fresh%20storage> (Accesada el 1 de junio de 2015)

Fulgencio-Negrete, R. 2013. Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (Nurite, Santa María y Toronjil) sobre hongos

patógenos de fresa. Tesis de Maestría. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 96 pp.

Goy, R.C., Britto D. De y Assis O.B.G. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência E Tecnologia*, 19(3): 241–247.

Hancock, J.F. 2008. Temperate Fruit Crop Breeding. Germplasm to Genomics. EUA: Springer Science + Business Media B.V. 459 pp.

Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños S., Velázquez-del Valle M.G., Rodríguez-Ambriz S.L., Corona-Rangel M.L., Solano-Navarro A. y Bosquez-Molina E. 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23:198–205.

Hernández-Muñoz, P., Almenar E., Valle V. Del, Velez D. y Gavara R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2):428–435.

Hosseini, M.H., Razavi S.H., Mousavi S.M.A., Yasaghi S.A.S. y Hasansaraei A. G. 2008. Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences*, (16):2895-2900.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2011. Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus glaucus* benth) -Medidas para la temporada invernal. Bogotá, Colombia: Produmedio. 32 p.

Jinasena, D., Pathirathna P., Wickramarachchi S. y Marasinghe E. 2011. Use of chitosan to control anthracnose on “Embul” banana. International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBEE, IACSIT Press, Singapore, 13:56–60.

Juárez, Z.N., Hernández L.R., Bach H., Sánchez-Arreola E. y Bach H. 2015. Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Industrial Crops and Products*, 74:178–182.

Khalil, M., Raila J., Ali M., Islam K.M.S., Schenk R., Krause J.P. y Rawel H. 2012. Stability and bioavailability of lutein ester supplements from

Tagetes flower prepared under food processing conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(3):602–610.

Kong, M., Chen X.G., Xing K. y Park H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1):51–63.

Krochta, J.M. y De Mulder-Johnston C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2):61-74.

Lambert, R.J.W., Skandamis P.N, Coote P.J. y Nychas G.-J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91:453-462.

Lárez Velásquez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista Científica UDO Agrícola*, 8(1):1–22.

Lima de Sousa, L., Albuquerque de Andrade S.C., Aguiar-Athayde A.J.A., Vasconcelos de Oliveira C.E., Veríssimo de Sales C., Madruga M.S. y Leite de Souza E. 2013. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165(3):312–318.

Lin, D. y Zhao Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruit and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6:60-75.

Liu, J., Tian S., Meng X. y Xu Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3):300–306.

López-Mata, M.A., Ruiz-Cruz S., Navarro-Preciado C., Ornelas-Paz J.J., Estrada-Alvarado M.I., Gassos-Ortega L.E. y Rodrigo-García J. 2012. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. *BIOTecnia*, XIV(1):33-43.

- Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha M.O., Ezquerra-Brauer J.M., Graciano-Verdugo A.Z., Rodríguez-Félix F., Castillo-Ortega M.M. y Plascencia-Jatomea M. 2010.** Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 305–315.
- Mathew S. y Abraham T.E. 2008.** Characterization of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films, *Food Hydrocolloids*, 22(5):826–83.
- Meng, X., Liu J. y Tian S. 2008.** Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106:501-508.
- Muratalla, L.A., Livera M.M., Chávez F.S., Rodríguez A.J., López J.A., Salazar G.A., López M.A.J., Nateras U.R. y Arévalo G.L. 1994.** El cultivo de la zarzamora. Memorias de la 1a. Reunión Internacional y 2ª. Reunión Nacional de Frutales Nativos e Introducidos. Montecillo, México. pp. 179-185
- Pérez-Barraza, M.H. y Vázquez-Valdivia V. 2004.** Zarzamora (*Rubus spp.*) su cultivo y producción en el trópico mexicano. Nayarit, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 37 p.
- Perez-Ortega, G., Gonzalez-Trujano M.E., Angeles-Lopez G.E., Brindis F., Vibrans H. y Reyes-Chilpa R. 2016.** *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 181:221–228.
- Phillips, D.J., Margosan D.A. y Mackey B.E. 1987.** Size, nuclear number, and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. *Phytopathology*, 77:1606-1608.
- Preedy, V.R. 2016.** Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press. Londres, Inglaterra. pp. 31-37.
- Ponce de León-Bolfeta S.L. 2007.** Estudio sobre el desarrollo del cultivo de zarzamora en el municipio de Uruapan, Michoacán. Tesina. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". UMNSH. Uruapan, Michoacán. 64 pp.

- Quezada-Gallo, J.A. 2009.** Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings. Chapter 11. *In: Edible Films and Coatings for Food Applications* (Embuscado K.C. y Huber M.E, Eds.). Springer Science + Business Media. pp. 315–333.
- Quintero, C.J., Falguera M., Quintero C., Juan I., Falguera V. y Muñoz H.A. 2010.** Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 5:93–118.
- Raafat, D., von Barga K., Hass A. y Hans-Georg S. 2008.** Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied Environmental Microbiology*, 74(12):3764-3773.
- Rebollar-Alviter, A. 2011.** Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. De México. 35 pp.
- Reddy, M.V.B., Angers P., Gosselin A., Arul J., Burt S., Calo J.R. y Real-Costo S. 2008.** Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2):446–475.
- Regnier, T., du Plooy W., Combrinck S. y Botha B. 2008.** Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 48(2):254-258.
- Rzedowski, G.C. y Rzedowski J. 2001.** Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), pp. 925-927.
- Rodríguez, S., Albertengo L., Debbaudt A. y Argullo E. 2005.** Uso de quitosano en alimentos en Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados (González-Aguilar G., Gardea A., Cuamea-Navarro F., Eds). Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México p. 558.
- Sacchetti, G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. y Bruni R. 2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91:621–632.

- Sangsuwan, J., Pongsapakworawat T., Bangmo P. y Sutthasupa S. 2016.** Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting *Botrytis cinerea* and their application in strawberry packaging system. *LWT - Food Science and Technology*, 74:14–20.
- Santos, J. D., Costa M.A y Fernandes M.H. 2009.** Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration. *Acta Biomaterialia*, 5(1):346-355.
- Sebti, I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S. y Coma V. 2005.** Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination. *Food Microbiology and Safety*, 70(2):100–104.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016.** Atlas Agroalimentario 2016. SAGARPA. México. 236 pp.
- Sipahi, R.E., Castell-Perez M.E., Moreira R.G., Gomes C. y Castillo A. 2013.** Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). *LWT - Food Science and Technology*, 51(1):9–15.
- Srinivasa P.C., Baskaran R., Ramesh M.N., Prashanth K.V.H. y Tharanathan R.N. 2002.** Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *European Food Research and Technology*, 215:504-508.
- Sistema-Producto Zarzamora, 2013.** Plan Rector Estatal. http://www.oeidrus-portal.gob.mx/oeidrus_mic/docs/Plan_Rector_Zarzamora_2013.pdf. (Accesada el 5 de noviembre de 2014)
- Strik, B.C., Finn C.E., Clark J.R. y Bañados M.P. 2006.** Worldwide production of blackberries. *Acta Horticulturae*, 777:209–217.
- Timóteo dos Santos, N.S., Athayde-Aguiar A.J.A., Vasconcelos de Oliveira C. E., Veríssimo de Sales C., de Melo e Silva S., Sousa da Silva R., Montenegro-Stamford T.C. y Leite de Souza E. 2012.** Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32(2):345–353.

- Tripathi, P. y Dubey N.K. 2004.** Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(3):235-245.
- Tongnuanchan, P. y Benjakul S. 2014.** Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7):1231–1249.
- Tzortzakis, N.G. y Economakis C.D. 2007.** Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(2): 253–258.
- Universidad de California: División de Agricultura y Recursos Naturales Tecnología Postcosecha. (UCDAVIS). 2015.** Bushberries: Blackberry, Blueberry, Cranberry, Raspberry: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. <http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/Bushberries/> (Accesada el 18 de Junio de 2015).
- Valverde, J.M., Valero D., Martínez-Romero D., Guillén F., Castillo S. y Serrano M. 2005.** Novel edible coating based on *Aloe vera* gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20):7807–7813.
- Vasudevan, P., Kashyap S. y Sharma S. 1997.** *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioresource Technology*, 62(1–2):29–35.
- Vázquez-Briones, M.C. y Guerrero-Beltrán J.A. 2013.** Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(7):5–14.
- Vera, S.S., Zambrano D.F., Méndez-Sánchez S.C., Rodríguez-Sanabria F., Stashenko E.E. y Duque-Luna J.E. 2014.** Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(7):2647–2654.
- Vitoratos, A., Bilalis D., Karkanis A. y Efthimiadou A. 2013.** Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horticulturae Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1):86-92.

- Williamson, B., Tudzynski B., Tudzynski P. y Van Kan J.A. 2007.** *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5):561-580.
- Xing, Y., Li X., Xu Q., Yun J., Lu Y. y Tang Y. 2011.** Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 124(4):1443–1450.
- Xu, L-W., Chen J., QI H.-Y. y Shi Y. 2012.** Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, 4(2):103–117.
- Xu, W.-T., Huang K.-L., Guo F., Qu W., Yang J.-J., Liang Z.-H. y Luo Y.-B. 2007.** Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1):86–94.
- Yang, G., Yue J., Gong X., Qian B., Wang H., Deng Y. y Zhao Y. 2014.** Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, 92:46–53.
- Zhao, Y. 2007.** Berry fruit: Value-added products for health promotion. *EUA: CRC Press Taylor & Francis Group*. 444 pp.
- Zivanovic, S., Davis R.H. y Golden D.A. 2015.** Chitosan as an antimicrobial in food products. *In: Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (Taylor M., Ed.). Elsevier Ltd. pp. 153–181.