



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

Evaluación de cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano y extractos naturales comerciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*, producción de aflatoxinas y atributos de calidad en frutos de jitomate.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTA:

L.N. MARIO ALBERTO SEGURA PALACIOS

DIRECTORAS

DRA:

DRA. MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCÍA

CODIRECTORA:

DRA. ZORMY NACARY CORREA PACHECO

FECHA: CUERNAVACA, JUNIO 2022

AGRADECIMIENTOS

Dra. Margarita, agradezco infinitamente el que me brindara la confianza para convertirme uno de sus alumnos, por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles, y tener unas palabras de aliento cuando mas dificultades me presento la vida. Gracias por instruirme en el laboratorio y su infinita paciencia conmigo.

Dra. Zormy agradezco el apoyo brindado en el laboratorio de postcosecha, el mostrarme las técnicas y el manejo de algunos equipos en el mismo. Al igual la paciencia de tenerme como uno de sus alumnos.

Mtra. María Luisa agradezco el transmitirme sus conocimientos en las técnicas de elaboración de cubiertas comestibles, así como las técnicas para evaluar crecimientos en hongos.

Dra. Rosa Isela, muchas gracias por querer mostrarme horizontes mas bastos en la investigación, por mostrarme que el trabajo duro siempre da buenos resultados.

A mis compañeros de la maestría en ciencias de la nutrición, que bien por las circunstancias no fue posible casi el contacto demostraron que no es necesario estar cerca para brindar apoyo y cariño.

A mi madre quien dio todo por brindarme una formación profesional, nunca presento duda alguna sobre lo que podría lograr, mil gracias por todo el amor que sirvió para formar a quien soy hoy en día.

A mis abuelos quienes partieron en esta etapa, les mando un abrazo tan cariñoso como el que me brindaron para seguir adelante.

Mi tía Irma merece una mención especial, pues fungió como madre en momentos que más lo necesite, quien a lo largo de mi trayectoria escolar motivaba con aliento y regaños para sobresalir de los demás.

RESUMEN

Aspergillus flavus, es un hongo toxicogénico que puede contaminar cereales, frutos secos y recientemente se ha reportado su presencia en frutos frescos (frutas y hortalizas). Este hongo produce aflatoxinas, las aflatoxinas B1 y B2 las cuales pueden causar graves daños a la salud en los seres humanos en caso de ser consumidas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de productos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre el desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas de manera *in vitro*, así como en frutos de tomate. Se realizaron pruebas *in vitro* e *in situ*. *In vitro* se evaluó, el halo de inhibición, la producción de esporas y se realizó el conteo de aflatoxinas *in situ*, el crecimiento micelial, la incidencia y la producción de aflatoxinas. Los tratamientos utilizados fueron quitosano 1%, cubierta de quitosano, cubierta nanoestructurada de quitosano, Citrocover 1% (extracto de semillas de cítricos), Resinadher 0,5% (extracto de resina de pino), Mancozeb 2% y agua. Se utilizó un Anova y método de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados *in vitro* mostraron que Citrocover y Resinadher redujeron la esporulación ($0,2$ y $0,9 \times 10^5$ esporas mL^{-1} , respectivamente), mientras que el quitosano inhibió la producción de aflatoxinas. *In situ*, Resinadher y Citrocover, mostraron la menor incidencia, crecimiento micelial y producción de aflatoxinas con valores correspondientes de 0 %, $0,0 \text{ cm}^2$ y $0,95 \text{ ppb}$, respectivamente, y 7 %, $0,2 \text{ cm}^2$ y $1,77 \text{ ppb}$, respectivamente. El uso de Citrocover y Resinadher podría ser una alternativa viable para disminuir el desarrollo de *A. flavus* en frutos de tomate.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Importancia de los frutos de jitomate.....	16
2.2 Descripción botánica.....	16
2.3 Características nutricionales del jitomate y beneficios a la salud	18
2.4 Variables que determinan la calidad de los frutos de jitomate.....	20
2.5 Vigilancia de la cadena alimentaria del jitomate	22
2.5.1 Daño por microorganismos en frutos de jitomate	23
2.5.1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	23
2.5.1.2 Aflatoxinas	24
2.6 Métodos de control de <i>A. flavus</i>	27
2.6.1 Control químico.....	27
2.6.2 Alternativas naturales.....	28
2.6.2.1 Quitosano.....	28
2.6.2.2 Nanotecnología aplicada a los alimentos	30
2.6.2.3 Extractos de especies vegetales	30
2.6.2.3.1 Extracto de cítricos	31
2.6.2.3.2 Extracto de Resina de Pino	31
2.6.2.3.3 Extractos vegetales Comerciales.....	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPOTESIS:.....	34

5. OBJETIVO GENERAL:	34
5.1 Objetivos específicos	34
5.1.1 Evaluar el efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre el desarrollo de <i>A. flavus</i> de manera <i>in vitro</i> mediante la técnica de pozos y su producción de aflatoxinas.	34
5.1.2 Evaluar el efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre la incidencia, severidad y producción de aflatoxinas por <i>A. flavus</i> . en frutos de jitomate Saladette.....	34
5.1.3 Evaluar el efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales, color, respiración y etileno.....	34
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
6.1 Obtención y preparación de materiales.	34
6.1.1 Obtención de frutos de jitomate	34
6.1.2 Obtención productos	35
<i>Figura 4. Productos naturales comerciales, Resinadher y Citrocover</i>	36
6.1.3 Obtención y activación de cepas de <i>A. flavus</i>	36
6.1.4 Preparación de la solución de esporas	37
6.1.5 Preparación del quitosano	37
6.1.6 Preparación de las nanopartículas de quitosano.	37
6.1.7 Preparación de soluciones comerciales	38
6.1.7.1 Citrocover.	38
6.1.7.2 Resinadher	38
6.1.7.3 Mancozeb 20%	38
6.2 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de <i>A. flavus</i> de manera <i>in vitro</i> mediante la técnica de pozos y su producción de aflatoxinas.	39
6.2.1. Técnica de pozos	39

6.2.2.Variables a evaluar.....	41
6.2.2.1 Halo de inhibición	41
6.2.2.2 Conteo de esporas.....	42
6.2.2.3 Conteo de aflatoxinas.....	42
6.3 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas, sobre la incidencia y la severidad de <i>A. flavus</i> y en frutos de jitomate	43
6.3.1 Aplicación de tratamientos en los frutos de jitomate.....	43
6.3.2 Variables a evaluar.....	44
6.3.2.1 Incidencia	44
6.3.2.2 Severidad de infección.....	44
6.4 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre la producción de aflatoxinas por parte de <i>A. flavus</i> presentes en frutos de jitomates a nivel de laboratorio.....	44
6.4.1 Evaluación de aflatoxinas	44
6.5 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, solidos solubles totales.....	45
6.5.1 Aplicación de los tratamientos.....	45
6.5.1.2 Variables a evaluar.....	45
6.5.1.2.1 Pérdida de peso.....	45
6.5.1.2.1.1 Fórmula para porcentaje de pérdida de peso.....	45
6.5.1.2.2 Firmeza.....	46
6.5.1.2.3 Solidos solubles totales (SST).....	46
6.5.1.2.4. Respiración y Etileno.....	47

6.5.1.2.4 Color	48
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de <i>A. flavus</i> de manera <i>In vitro</i> mediante la técnica de pozos y su producción de aflatoxinas.	49
7.2 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas, sobre la incidencia y la severidad de <i>A. flavus</i> y en frutos de jitomate.	52
7.3 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre la producción de aflatoxinas por parte de <i>A. flavus</i> presentes en frutos de jitomates a nivel de laboratorio	55_Toc128038216
7.4 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales.....	56
8. DISCUSIÓN	62
8.1 Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> en pruebas <i>in vitro</i>	62
8.2 Evaluación de productos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> en frutos de jitomate.....	63
8.3 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales.....	64

9. CONCLUSIÓN..... 66
10. REFERENCIAS 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la planta del jitomate.....	17
Figura 2. Partes estructurales del fruto de jitomate.....	18
Figura 3. Frutos de Jitomate obtenidos de productores del municipio de Yautepec.	35
Figura 4. Productos naturales comerciales, Resinadher y Citrocover..... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 5. Técnica de pozos. a) Caja Petri con medio Czapek en campana de flujo de laminar estéril, b) adición de solución de esporas, c) realización de orificio en la caja, d) caja Petri con orificio y e) Tratamientos que se adicionaron al orificio de la caja Petri.....	40
Figura 6. Halo de inhibición presentado en el quinto día por el fungicida Mancozeb.....	41
Figura 7. Conteo de esporas de <i>A. flavus</i> en cámara de Neubauer.....	42
Figura 8. Equipo Raptor procesando conteo de aflatoxinas.....	43
Figura 9. Grados Brix obtenidos de una muestra de jugo de jitomate en un refractómetro.	46
Figura 10. Evaluación de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre la incidencia de <i>A.</i> <i>flavus</i> en frutos de jitomate almacenados por 6 días a temperatura ambiente (28° a 30°C) en condiciones de laboratorio.	53
Figura 11. Evaluación de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre el porcentaje de pérdida de peso en frutos de jitomate almacenados por 10 días a temperatura ambiente (28° a 30°C) en condiciones de laboratorio.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido nutricional del jitomate (por cada 100g)	19
Tabla 2. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre el halo de inhibición de <i>A. flavus</i>..	50
Tabla 3. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la producción de esporas de <i>A. flavus</i> durante 7 días de almacenamiento.....	51
Tabla 4. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la producción de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> durante 7 días de almacenamiento.¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 5. Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre el crecimiento micelial de <i>A. flavus</i> durante 6 días de almacenamiento en frutos de jitomate.	54
Tabla 6. Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la severidad de <i>A. flavus</i> inoculado en frutos de jitomate.....	55
Tabla 7. Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la producción de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> en frutos de jitomate almacenados por 6 días.	56

Tabla 8. Evaluación de extractos naturales comerciales cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la firmeza de frutos de jitomate almacenados durante 10 días a temperatura ambiente (28° a 30 °C).....	58
Tabla 9. Efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la concentración de SST de frutos de jitomate almacenados durante 10 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).	59
Tabla 10. Efecto de productos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la producción de CO₂ en frutos de jitomate almacenados durante 7 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).	60
Tabla 11. Efecto de productos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la producción de etileno en frutos de jitomate almacenados durante 7 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).	61
Tabla 12. Efecto de productos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en el color en frutos de jitomate almacenados durante 6 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).	62

Lista de siglas símbolos y abreviaturas.

%.....	Porcentaje
°Brix.....	Grados Brix
°C.....	Grados centígrados
µg.....	Microgramo
µL.....	Microlitro
A.....	<i>Aspergillus</i>
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico.
AFB1.....	Aflatoxina B1
AFB2.....	Aflatoxina B2
AFS.....	Aflatoxinas
CIIC.....	Instituto Internacional para la Investigación del Cáncer
CO ₂	Dióxido de carbono
ECV.....	Eventos cardiovasculares
EPA.....	Agencia de Protección ambiental de Estados Unidos
FAO.....	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g.....	Gramo
kcal.....	Kilo calorías
kg.....	Kilogramos
L.....	Litro
mg.....	Miligramo
mL.....	Mililitro
N.....	Newtons
OMS.....	Organización Mundial de la Aalud
<i>Pf</i>	Peso final

Pi..... Peso inicial
PPM..... Partes por millón
Sp..... *Especies*
SST..... Sólidos solubles totales
USDA..... United States Department of Agriculture

1. INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes para la economía de México, ya que se producen más de 2 millones de toneladas anuales (1). Durante la vigilancia de la cadena alimentaria del jitomate, pueden identificarse riesgos que dañan los frutos, afectando su calidad y disminuyendo el rendimiento del cultivo. Durante el manejo postcosecha se han reportado pérdidas del producto hasta de 40% del total cosechado; y estas pérdidas están relacionadas directamente con la presencia de microorganismos patógenos, principalmente hongos fitopatógenos (2). Existe un gran número de hongos que atacan al jitomate en postcosecha, tales como, *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporium*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor sp*, *Penicillium sp* y *Aspergillus flavus*. Este último hongo es de importancia alimentaria, ya que produce micotoxinas conocidas como aflatoxinas. Las aflatoxinas una vez consumidas, son capaces de provocar problemas en el desarrollo fetal, provocar alteración en el genoma, así como, provocar o acelerar procesos tumorales o carcinogénicos (3).

En la actualidad se utilizan fungicidas químicos sintéticos para evitar o controlar el desarrollo de hongos fitopatógenos, incluido *A. flavus*, sin embargo, a pesar de su efectividad, se recomienda disminuir el uso, ya que se ha demostrado que pueden ser neurotóxicos, genotóxicos, teratógenos, mutagénicos, pueden llegar a afectar la fertilidad, además están clasificados como posibles carcinógenos por la EPA. Del mismo modo se ha reportado que el uso frecuente de fungicidas químicos ha causado resistencia en los hongos y ha afectado gravemente al medio ambiente y la salud animal (4). Ante esta problemática se han buscado alternativas al uso de fungicidas químicos que sean efectivas y no tengan efectos adversos al medio ambiente, a la salud animal o a la salud humana.

Los fungicidas derivados de productos naturales podrían ser una alternativa al uso de fungicidas químicos, ya que se ha demostrado su efectividad y los daños colaterales son casi nulos. El quitosano, así como los extractos vegetales (semilla de cítricos y resina de pino), han sido ampliamente estudiados y se ha demostrado su efectividad en una gran variedad de hongos tales como, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* y especies del género de *Aspergillus*, sin embargo, la información referente a su efecto contra la producción de aflatoxinas es reducida. La nanotecnología juega un papel importante en el control de hongos ya que, al ser utilizada junto con los productos naturales, puede potencializar el efecto de los mismos y lograr un mayor control en el desarrollo del hongo (5).

En la actualidad es de vital interés el uso de alternativas naturales al uso de fungicidas químicos, sin embargo, en ocasiones la elaboración de los extractos puede ser complicada y esto no permite que se llegue a implementar a corto plazo en las unidades de producción (6). Por tal motivo es de interés evaluar extractos vegetales comerciales para determinar su efecto en el control de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas en frutos de jitomate.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Importancia de los frutos de jitomate

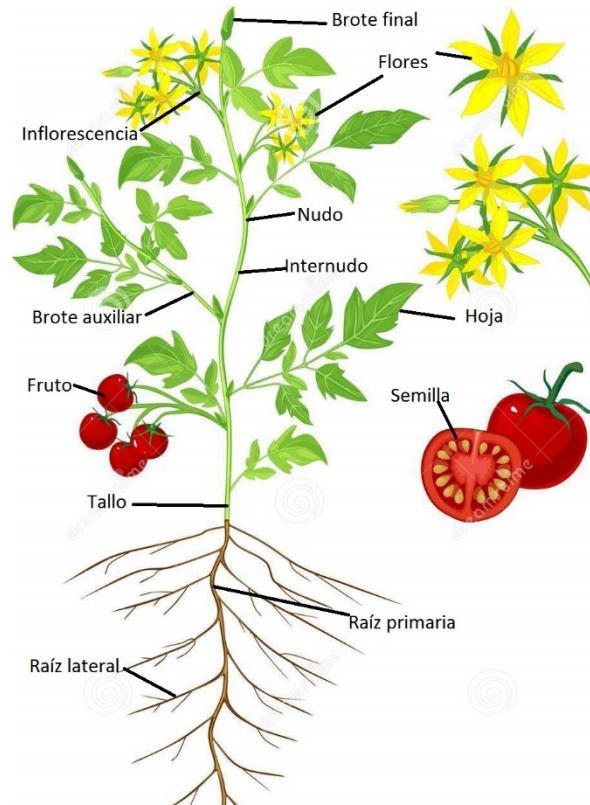
El jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) es una de las hortalizas más importantes para la economía nacional por las divisas que genera, ya que se producen alrededor de 2.2 millones de toneladas al año. Según el reporte del mercado de tomate rojo, en un panorama mundial, México es el principal exportador de jitomate, comercializando hasta 1.7 millones de jitomate por año, siendo Estados Unidos el principal comprador (7,8). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reporta que en México se produjeron un total de 4,559,375 toneladas de frutos de jitomate en el año 2018, este fruto juega un papel importante en la gastronomía mexicana por su versatilidad al momento de consumirlo, ya sea fresco o procesado (8).

En los últimos años se ha incrementado la demanda en el consumo de frutas y verduras frescas, con la finalidad de llevar una dieta correcta, equilibrada, variada y saludable. El consumo de jitomate se ha incrementado, debido a que es fuente de fibra, vitaminas y antioxidantes, además de que tiene bajo aporte calórico. El consumo de jitomate previene la malnutrición en los individuos, así como la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). A nivel mundial la FAO indica que se consumen alrededor de 20.2 kg de jitomate por persona al año (9,10).

2.2 Descripción botánica.

El jitomate pertenece a la familia de las solanáceas. Es una planta perenne y arbustiva que se cultiva durante todo el año. Está formado por la raíz principal, corta y débil, con numerosas raíces secundarias y adventicias. Su tallo principal mide entre 2 y 4 cm de

grosor en su base, de desarrollan tallos encontramos las disponen de forma (Figura1) (11).



la cual se secundarios donde hojas que se alterna sobre el tallo

Figura 1. Partes vegetativas de la planta del jitomate ⁽¹¹⁾.

El fruto de jitomate es considerado una baya (bilocular o plurilocular), de consistencia carnosa, además presenta variantes en tamaño, color y sabor. El fruto está constituido por un pericarpio, tejido placentario y la semillas (Figura 2)(12). El jitomate es originario de las costas de Perú, pero su cultivo comienza a desarrollarse en México donde es domesticado por el imperio azteca, así en el tiempo de la conquista es trasladado hacia Europa alrededor del año 1540.

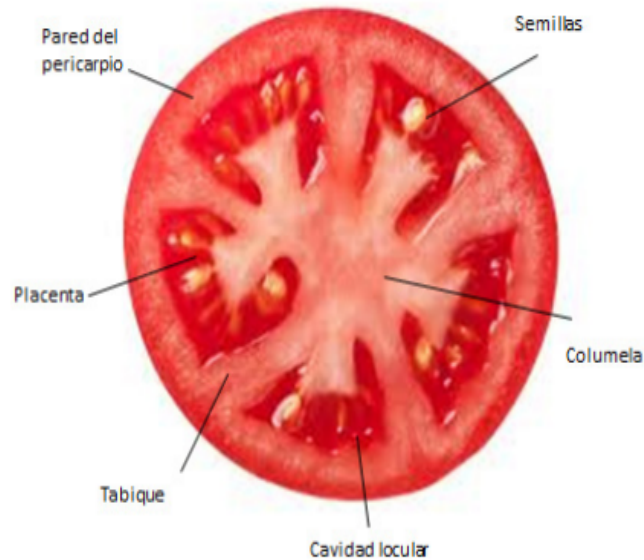


Figura 2. Partes estructurales del fruto de jitomate⁽¹³⁾

2.3 Características nutricionales del jitomate y beneficios a la salud

El fruto de jitomate está constituido por 95% agua, 3.89 gramos de hidratos de carbono, 1.2 gramos de fibra dietética, 0.8 gramos de proteína y 0.7 gramos de grasa. Cada 100gr de jitomate aportan 18 kcal (Tabla 1), además contiene una cantidad importante de vitamina A, B1, B2, B5 y C, así como betacarotenos (4.52mg), donde resalta el licopeno (2570 µg) (12).

Tabla 1. Contenido nutricional del jitomate (por cada 100g)

Nutrimento	Cantidad	Unidad
Energía	18	Kcal
Hidratos de carbono	3.89	G
Proteínas	0.8	Mg
Lípidos	0.75	G
Agua	95.5	%
Fibra dietética	1.2	G
Sodio	5	Mg
Potasio	237	G
Calcio	10	Mg
Hierro	0.27	Mg
Fósforo	24	G
Vitamina A	42	µg ER
Vitamina C	13.7	G
Licopeno	2570	µg

Datos obtenidos en USDA (12)

Varios estudios han demostrado los efectos benéficos del jitomate en el organismo humano (14,15). En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que el consumo de jitomate puede prevenir el desarrollo de eventos cardiovasculares (ECV);

como infarto agudo al miocardio y enfermedades cerebro vasculares, así como ciertos tipos de cáncer. Se han descrito los mecanismos protectores de ECV gracias a la actividad antiplaquetaria, protectora del endotelio, antioxidante y antiaterogénica, adjudicada al licopeno presente en el jitomate. Mientras que los mecanismos que pueden prevenir el cáncer son gracias a su actividad antioxidante, la activación de la apoptosis, disminución de la proliferación celular y disminución de la angiogénesis y metástasis. Varios estudios han demostrado la capacidad antioxidante del jitomate, así como su efecto quimioterapéutico. En estudios *in vitro* se reportó que promueve la apoptosis, mientras que, en estudios en animales, ayuda a prevenir la inflamación en el tejido adiposo y disminuye significativamente los niveles de colesterol en suero de conejos (16-18).

2.4 Variables que determinan la calidad de los frutos de jitomate.

La calidad significa atributo, propiedad o naturaleza, que en la actualidad significa poseer un grado de excelencia o superioridad, sin embargo, también hace referencia a grado de cumplimiento de un número de condiciones que determinan su aceptación por un consumidor (19). En la industria alimentaria es de suma importancia determinar atributos de calidad que permitan mantener los estándares de calidad de los frutos (20). Los atributos que se consideran esenciales para la determinación de calidad en frutos de jitomate son: a) peso, b) firmeza, c) sólidos solubles totales, d) color, e) respiración y f) producción de etileno (21).

a) Pérdida de peso:

Después de la cosecha, los frutos de jitomate pierden agua de forma natural, y esto se debe al intercambio gaseosos con el medio. Dentro de los estándares se menciona que los frutos que pierden más del 10% de agua son considerados indeseables, ya que puede afectar la firmeza de los frutos y acortar su vida de anaquel.

b) Firmeza:

La firmeza es la fuerza necesaria para conformar la superficie de un fruto, esta es el reflejo de la frescura del mismo. La firmeza se determina utilizando un penetrómetro, el cual mide la resistencia que produce la cascara antes de la ruptura, esta prueba es de amplio interés durante el almacenamiento. Los penetrómetros o texturómetros expresan sus resultados en kilos-fuerza o Newtons (N).

c) Sólidos solubles totales:

Los Sólidos Solubles Totales (SST) se determinan utilizando un refractómetro que indicará el índice refractométrico y lo expresará en grados Brix (°Brix). Entre mayor sea la cantidad de grados Brix, es mayor la cantidad de azúcar presente en el fruto de jitomate.

d) Color:

Los frutos de jitomate se consumen cuando el estado de madurez es óptimo, es decir cuando presenta el color rojo intenso característico, está relacionado con la textura, el sabor el aroma. El color rojo es el resultado de la degradación de la clorofila, así como de la síntesis de cromoplastos, este parámetro de calidad se determina con ayuda de colorímetros, los cuales se basan en la utilización de espacios cromáticos uniformes (CIELAB), que permiten visualizar y representar colores en tres dimensiones (L, a y b).

e) Respiración

La respiración es un proceso metabólico fundamental tanto para las plantas como para los frutos cortados, también se puede describir como una degradación oxidativa de los productos, que van de almidones y azúcares a los ácidos orgánicos, en este proceso el resultado es la producción de moléculas más simples como el dióxido de carbono y agua. El tiempo de vida de anaquel de un fruto se puede determinar con la velocidad que transcurre en la respiración del fruto.

f) Etileno.

El etileno es una hormona que puede alterar drásticamente las características organolépticas de los frutos de jitomate ya que acelera los cambios en la maduración. La producción de etileno puede verse alterada por medios externos, tales como, la quema de hidrocarburos, daños físicos en el fruto, daños por microorganismos, entre otros. Dicha hormona y la tasa de respiración son cuantificables mediante un cromatógrafo de gases.

2.5 Vigilancia de la cadena alimentaria del jitomate

El jitomate es un fruto perecedero y delicado que puede sufrir daños como magulladuras y perforaciones en su piel, causados por la inadecuada manipulación al momento de la recolección, lo que lo vuelve susceptible a la contaminación por microorganismos en las diversas etapas del proceso. Las etapas en las que se debe tener mayor cuidado y atención son: empaque, almacenamiento y transporte; debido a que en estas, se somete al jitomate al mayor estrés físico, lo que puede provocar daños severos. Durante estas etapas, se debe cuidar y mantener al jitomate libre de contaminantes alimentarios (biológicos, físicos y/o químicos), para poder lograr un alimento inocuo. Para asegurar esta inocuidad se requiere que todas las partes que participan en la cadena de producción sigan buenas prácticas agrícolas, vigilando que se cumplan las condiciones de ambiente en las que el jitomate debe encontrarse para mantenerse inocuo (22). Durante el almacenamiento, se pueden presentar condiciones de alta humedad en el ambiente, apilamiento de cajas, contacto con materiales contaminados lo cual puede provocar, pérdida de peso en exceso, de firmeza y modificar drásticamente sus SST (cantidad de azúcar presente en el fruto que se conoce como concentración de sólidos solubles totales), así como el color y afectar su respiración; estas alteraciones generan un ambiente óptimo para la proliferación y desarrollo de microorganismos.

2.5.1 Daño por microorganismos en frutos de jitomate

Cuando el fruto del jitomate sufre daños físicos, la protección natural del fruto (su cáscara) pierde efectividad protectora, lo que lo vuelve vulnerable a la contaminación por diversos microorganismos. Los frutos proveen un ambiente óptimo para el desarrollo de microorganismos, con la humedad y los nutrientes necesarios para su proliferación. Dentro de los principales microorganismos que causan daños en el jitomate, durante el almacenamiento, se encuentran los hongos *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Aspergillus flavus*. Este último es uno de los más abundantes en el ambiente donde se cultivan y almacenan diversos alimentos. Además de causar un daño físico al fruto, produce metabolitos secundarios tóxicos para el organismo humano denominados micotoxinas (23, 24).

2.5.1.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es un hongo que puede crecer en casi cualquier tipo de sustrato, especialmente en materia en descomposición. Resiste temperaturas entre los 12 y 57°C, sus esporas pueden resistir temperaturas mayores a 70°C. En América Latina se ha encontrado la presencia de *A. flavus* en alimentos agrícolas de primera necesidad. Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas son el maíz, cacahuates, pistaches, nueces de Brasil, semillas de algodón, coco seco rallado, semillas de girasol, soya, frutos secos, aceites vegetales sin refinar y recientemente se ha observado su presencia en frutas y hortalizas frescas tales como mango manila, higo y jitomate. *Aspergillus flavus* no solo genera daños en los frutos, se destaca también por su capacidad de generar metabolitos secundarios llamados micotoxinas. Las micotoxinas son compuestos tóxicos producidos en el metabolismo de ciertos hongos y mohos (25,26). Estas toxinas pueden estar presentes en cereales, frutas deshidratadas, frutos frescos y pueden aparecer en cualquier momento del proceso de cosecha,

almacenamiento o transporte de los alimentos. Las micotoxinas son sustancias químicamente estables, difíciles de eliminar y están presentes en ciertas cantidades aun después los procesos de desinfección y conservación. La FAO estima que el 25 % de los cultivos mundiales se pierden a causa del daño por microorganismos, principalmente hongos, los cuales a su vez son generadores de micotoxinas (27-29).

2.5.1.2 Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFs) son micotoxinas producidas por cepas toxigénicas de ciertos hongos en diversos cultivos; son producidas principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Toxicológicamente se consideran toxinas potentes relacionadas con el desarrollo del cáncer, mutaciones puntuales y múltiples alteraciones del desarrollo fetal. En la fase inicial del crecimiento y desarrollo del hongo se forman pocas AFs; con el paso del tiempo se reducen los nutrientes disponibles para el crecimiento primario del hongo, por lo que se induce al metabolismo secundario (30). La producción AFs se debe a una serie de reacciones químicas catalizadas a partir de acetato, mebolato, malonato y ciertos aminoácidos presentes en la materia orgánica y ante la presencia de importantes cantidades de agua, sirven como mecanismo de defensa ante otros microorganismos y pueden ser segregadas al momento de la descomposición de la materia en la que se está desarrollando el hongo. La producción de AFs es inevitable, ya que se está relacionada al proceso de esporulación del hongo y puede aparecer en las distintas etapas del desarrollo de los cultivos y/o durante el almacenamiento (31).

Hasta la fecha se han identificado alrededor de 20 tipos diferentes de AFs; siendo las AFs B1 (AFB1) y las AFs B2 (AFB2), las de mayor importancia en materia de contaminación de alimentos y ambas son producidas por *A. flavus*. La exposición prolongada a AFs puede tener graves consecuencias, ya que se ha demostrado que las AFs son mutagénicas y afectan el ADN y con ello causan defectos congénitos en los infantes (32). Logrando causar este efecto al dañar el gen p53, el cual juega un papel importante regulando el daño celular y funge como el responsable de la respuesta

antitumoral. Dicho daño facilita la aparición de tumores malignos debido a que se pierde el control en el ciclo celular (33, 34).

Buchanan et al. (35), realizó una investigación con higos contaminados por *A. flavus*, y reportó la presencia de AFs en todos los estados de maduración, siendo mayores las concentraciones cuando el fruto estaba completamente maduro. El investigador determinó que la cantidad de AFs eran equiparables a las presentes en el cacahuate, soya maíz y otros cereales. Del mismo modo, Baiyewu, reportó presencia de *A. flavus* y presencia de AFs en frutas de papaya, especialmente en las frutas dañadas (35). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, las aflatoxinas en productos agrícolas y subproductos no deben exceder 20 µg/kg (36). Por otro lado, desde 2008 el Codex Alimentarius de la FAO y OMS mantiene en 10 µg/kg el nivel máximo permitido de aflatoxinas en alimentos. La Comisión Europea discute la posibilidad de equiparar el nivel vigente actualmente en la UE, con 4 µg/kg, al Codex para todos los productos agrícolas y subproductos (37).

El estudio de la AFB1 ha confirmado que existen pruebas de laboratorio en ratas y ratones que demuestran actividad carcinogénica, tóxica y mutagénica; ya que en hembras embarazadas consumidoras de AFB1, se identificaron cambios degenerativos, retraso en el crecimiento del feto y disminución de los parámetros reproductivos (38). Del mismo modo, existen datos epidemiológicos que señalan a esta toxina como responsable de neoplasia gastrointestinal y hepática en diversas partes del mundo. La presencia de AFs aumenta la permeabilidad de las células intestinales de porcinos, permitiendo así la entrada de sustancias tóxicas para el organismo a la par que aumenta la IL-8 (39). El Instituto Internacional para la Investigación del Cáncer también conocido centro internacional de investigaciones sobre Cáncer (CIIC) de la Organización Mundial de las Naciones Unidas (Francia), indica que estas AFs son consideradas como carcinógeno de clase 1, es decir, uno de los agentes más peligrosos para el ser humano, ya que, para que se manifiestan secuelas en el organismo basta con una exposición continua a niveles menores a los establecidos en la normativa de la mayoría de los países (20µg/kg) (40).

La intoxicación causada por AFs es llamada “aflatoxicosis”, puede ser de índole aguda o crónica y afectar gravemente el sistema inmune. La infección aguda se manifiesta como una hepatitis aguda (ictericia, fiebre, depresión, anorexia y diarrea); mientras que la crónica se manifiesta como una hepatocarcinoma (vómito, dolor abdominal, hepatitis) pudiendo causar la muerte (41).

Para que la AFB1 tenga acción tóxica primero debe sufrir un cambio metabólico que ocurre al ingresar a las células hepáticas del ser que la consumió, debido al citocromo P450 presencia de oxígeno y enzimas dependientes de NADPH. Los humanos tenemos 5 citocromos P450 capaces de activar la AFB1; dando como resultado la molécula AFB1 Exo-8,9-epóxido, la cual es inestable y tiene alta afinidad con la guanina relacionándose covalentemente con esta en el ADN, es responsable del efecto carcinogénico y mutagénico (41). A partir de esta unión (AFB1-guanina) se forma una molécula más estable AFB1-formamidopirimidina que es la causante de las transcripciones con errores subsecuentes del ADN. Este compuesto puede estar presente en más de un ciclo de replicación del ADN y está ligada a la aparición de tumores; ya que induce a una mutación de G → T en la tercera base del codón 249 del gen p53 (42).

En el 2005 se detectaron 667,000 casos de cáncer hepático en el mundo lo que lo posicionó como el quinto más común en hombres y en la tercera edad, donde los factores de riesgos apuntan desde la exposición al virus de hepatitis B y C, el consumo de alcohol, tabaquismo y factores como anticonceptivos orales, y exposición a aflatoxinas (42). En Monterrey Nuevo León, México, se detectó la presencia de AFB1 en humanos, al examinar a 16 pacientes con hepatocarcinoma se encontró una mutación del gen p53 en 3 pacientes relacionado directamente con el consumo de aflatoxinas; así como en pacientes de Matamoros, Tamaulipas, México. En el año 2003, se encontraron en el suelo donde se almacenan cereales para consumo humano rastros de AFB1, que no disminuían de 125 µgr/kg durante 10 años, volviendo a las aflatoxinas un foco de alerta con relación a su consumo en la dieta del mexicano. La AFB1, es un potente mutagénico producido por hongos del género *Aspergillus*, principalmente por *A. flavus* (38). Debido a estos factores, es de vital importancia utilizar medidas que

controlen o inhiban el desarrollo de este hongo y así se evite la producción de aflatoxinas que contaminan los alimentos

2.6 Métodos de control de *A. flavus*

2.6.1 Control químico.

Los fungicidas químicos son los productos más utilizados para reducir el desarrollo de *A. flavus* en los productos hortofrutícolas incluyendo al jitomate y sus resultados han sido satisfactorios, sin embargo, el uso excesivo ha causado resistencia de los hongos, por lo tanto, se utilizan dosis mayores a las recomendadas. Algunos fungicidas químicos comerciales usados son neurotóxicos, genotóxicos, teratógenos, mutagénicos, pueden llegar a afectar la fertilidad y están clasificados como posibles carcinógenos por la EPA; como el benzimidazol, procloraz y clorotalonil (43). La aplicación de estos productos, así como los residuos que permanecen en los alimentos afectan gravemente la salud de las personas que los utilizan y los consumen (44). En Sonora, Mexico se estudió la intoxicación por uso prolongado de organofosforados por aproximadamente 26 años, observando un aumento de alteraciones del sistema digestivo, respiratorios y alteraciones en la respuesta neurológica (45), concluyeron que estos pesticidas producen alteraciones en la sensibilidad profunda. En un estudio de carácter genético se halló una inhibición significativa en la síntesis de la acetilcolinesterasa en trabajadores con exposición directa (aplicación en el campo) e indirectos (recolección del fruto); así como un aumento en los niveles de la peroxidación de lípidos en los directos y una reducción de catalasa y aumento de Índice de Daño Cometa e Índice de Daño Ensayo Reparación en ambos grupos (46).

Los efectos colaterales de los pesticidas han ocasionado la necesidad de evaluar nuevas alternativas naturales, biodegradables y seguras aplicadas a frutos de jitomate para consumo fresco y procesado, que puedan controlar satisfactoriamente el crecimiento del hongo y de esta manera evitar el desarrollo de AFs (46). En frutos de jitomate se han utilizado diversas medidas de control alternativo que van desde control

biológico, cubierta biodegradables usos de productos naturales, así como extractos de especies vegetales (47-49).

2.6.2 Alternativas naturales

Existe un gran número de alternativas naturales para el manejo de enfermedades postcosecha, desde hace años se ha promocionado la utilización de otras especies, ya sean hongos, levaduras o bien organismos antagonistas que ayuden al control de plagas, esta práctica se conoce como control biológico (1). La utilización de este control no siempre es favorable pues no siempre presenta una inhibición total y la aplicación de otro organismo no brinda total confianza a los productores, así como a algunos consumidores (2).

Otra alternativa natural utilizada en los últimos años es la aplicación de extractos de especies naturales, ya sean provenientes de las semillas, tallos, o restos de cáscaras. Las plantas y algunas especies naturales son capaces de generar compuestos naturales que funcionan como agentes protectores para los depredadores, dentro los que destacan, los extractos de tomillo, extractos de semillas de cítricos, etc (3)

Para los frutos frescos y hortalizas se ha experimentado con polímeros a base de carbohidratos que, unidos a otros compuestos como lípidos, o proteínas, pueden generar películas o cubiertas que brinden protección de microorganismos y a su vez puedan generar una atmosfera modificada que disminuye la oxidación del fruto, y conserva o incluso mejora algunos parámetros de calidad (4).

2.6.2.1 Quitosano

El quitosano es un polisacárido que se obtiene de quitina parcialmente desacetilada siendo junto con la celulosa uno de los polímeros más abundantes de la naturaleza, este se encuentra formado por unidades de glucosamina y n-acetil D-glucosamina unidos por enlaces β -1-4, según la IUPAC. La fuente de este polímero está en la

naturaleza en la pared celular de los hongos, exoesqueletos de los invertebrados, levaduras etc. Para fines comerciales la fuente de obtención es dada por los desechos de los crustáceos (50).

El quitosano ha comprobado su capacidad antimicrobiana sobre antracnosis ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* y daños ocasionados por especies del género *Aspergillus*. Los mecanismos de acción sugieren una efectividad por alteración en la permeabilidad de la membrana citoplasmática de los microorganismos, mediante la interacción de sus grupos NH^{3+} con ayuda sus componentes fosfolípidos con cargas negativas en la membrana, gracias a esto se logra alterar el intercambio del medio, además de la formación de quelatos con los metales de transición y con ello la inhibición de algunas enzimas. A nivel molecular afecta los ácidos nucleicos y alterando así sus funciones mediante cambios transcripciones específicos (50). A nivel *in vitro* Hernández-Lauzardo estudio la actividad antifúngica del quitosano sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp., donde se observó una disminución del crecimiento micelial, así como una inhibición de esporulación. Dentro de las propiedades del quitosano se encuentra la capacidad de formar películas o cubiertas, que combinadas con lípidos y otros compuestos son capaces de dar protección a la superficie de los productos aplicados (51). Este polisacárido por si solo, confiere un efecto protector y además puede funcionar como vehículo para llevar dentro de las cubiertas compuestos activos o productos antimicrobianos que aumenten la capacidad protectora y modifiquen la atmosfera de los frutos con estas cubiertas (52). Por otro lado, Alvarado investigó la actividad antifúngica del quitosano con aceites esenciales de canela, clavo y tomillo sobre *R. stolonifer* en productos de jitomate obteniendo como resultado una inhibición significativa del hongo de un 24%, en comparación con el control (53). Diversos estudios describen que el quitosano tuvo actividad antifúngica sobre la fase sexual del hongo, inhibiendo al 100% la germinación de los tubos germinativos de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensi* a nivel laboratorio, a nivel campo y postcosecha. La aplicación de quitosano en la plantación dio como resultado plantas más sanas, más altas, con mayor número de hojas y plátanos (postcosecha) con retardo en la maduración (54).

2.6.2.2 Nanotecnología aplicada a los alimentos

La nanociencia involucra la investigación y el descubrimiento de nuevas características y propiedades de materiales a nano escala, cuyo rango va de 1 a 100 nanómetros (nm). Por otro lado, la nanotecnología es la manera como estos materiales son utilizados y el estudio de las propiedades que estas características le confieren. Esta es conformada por distintas disciplinas como la química, la física, la biotecnología, etc. La nanotecnología puede ser aplicada en distintas etapas del ciclo de alimentos, desde el desarrollo en el campo, la protección de plagas hasta la preparación de alimentos en la cocina (55). Esta es aplicada en el campo con nanosensores para la vigilancia, lo que brinda un mejor desarrollo y crecimiento de los cultivos.

La aplicación de esta tecnología para el control de microorganismo ya ha sido llevada a cabo de manera exitosa en un ambiente con condiciones controladas(56). Aparicio et al. (57), han reportaron una notable inhibición en la germinación de esporas de *A. flavus* y una reducción en la producción de aflatoxinas, después de utilizar una cubierta elaborada con nanopartículas de quitosano y propóleo, y extracto de propóleo a una concentración del 40%; los autores concluyen que el uso de cubiertas a base quitosano y propóleo en higos ayuda a alargar la vida de anaquel de los frutos, a reducir el crecimiento de *A. flavus* y la inhibición de la producción de aflatoxinas. Por otra parte, Martínez-González (58), no solo logro identificar la capacidad antimicrobiana sino presentar una relación directa entre cubiertas nanoestructuradas a base de quitosano y propóleo con mejoras en algunos atributos de calidad en productos altamente perecederos y susceptibles a daño.

2.6.2.3 Extractos de especies vegetales

El uso de extractos naturales a partir de plantas, raíces, hojas; es una práctica para proteger a los cultivos del riesgo de contaminación por microorganismos patógenos, debido a que estos productos generan compuestos activos provenientes de metabolitos secundarios, los cuales pueden interferir severamente en el metabolismo de otros organismos. Los extractos están conformados por varios compuestos (terpenos, fenoles, retinoides, piretroides y alcaloides), los cuales les proporcionan sus actividades específicas (59, 60).

2.6.2.3.1 Extracto de cítricos

Los extractos de cítricos o de semillas de cítricos han sido usados en diversas áreas como productos antisépticos y antioxidantes; en la formulación cosmética se ha empleado como agente para controlar la caspa y como preservador de cremas, gracias a sus concentraciones de vitamina C. Posteriormente se comenzó a utilizar dentro del sector alimenticio y agropecuario; incluyéndose como aditivo-conservador en los alimentos y como producto agroquímico para evitar la contaminación de los cultivos por ciertas plagas. Todas estas aplicaciones son gracias a que las plantas del género *Citrus* producen metabolitos secundarios con capacidades antifúngicas, incluyendo alcaloides, terpenos, fenoles, flavonoides, taninos y saponinas. Los cítricos más comunes contienen de forma casi exclusiva flavonas metoxiladas que son más efectivas como sustancias antifúngicas que los demás flavonoides. Todo esto permite el uso de cítricos dentro de la industria agropecuaria en el desarrollo de biopesticidas (61, 62).

2.6.2.3.2 Extracto de Resina de Pino

Las resinas extraídas de árboles tienen como componentes primarios los terpenoides y compuestos fenólicos. La producción de resinas en México se encuentra entre 20 000 y 30 000 toneladas anuales (63). El uso de estas resinas puede contribuir a desarrollar procedimientos que resuelvan problemáticas relacionadas con la contaminación de alimentos por sus propiedades antifúngicas, sin afectar la salud de aquellos que los manipulan y los que aprovechan los resultados, sin residuos tóxicos que dañen los

ecosistemas y organismos (64). Lo que vuelve tan útil las resinas de los árboles cuando son usados como pesticidas naturales es el mecanismo de resistencia a enfermedades y plagas que ha desarrollado en su habitat natural. Uno de los compuestos carbonados más valorados es la oleorresina; esta es una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos (fracción volátil) y diterpenos o ácidos resiníferos (fracción no volátil); esta resina es producida como una barrera física ante el daño de los agentes agresores siendo tóxica para muchos insectos y hongos patógenos, reduciendo la proliferación del daño (65). Las alternativas a base de productos vegetales como control de plagas han ido en aumento en las últimas décadas, algunas plantas y extractos tienen la capacidad de generar metabolitos secundarios que funcionan como medida de respuesta ante el ataque de organismos externos o depredadores herbívoros. Los fungicidas a partir de extractos vegetales son una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos (66); estos compuestos presentes en los productos naturales aparte de generar protección contra microorganismo también ayudan a la conservación de características organolépticas tales como evitar una pérdida de peso en los productos o bien conservar atributos de frescura como color o firmeza.

2.6.2.3.3 Extractos vegetales Comerciales.

Los extractos comerciales brindan una alternativa de control, la cual puede estar con mayor facilidad al alcance del productor de frutas y hortalizas. En el mercado actual se comercializan productos naturales a base de extracto de semilla de cítricos y de resina de pino, los cuales han sido efectivos en el control de microorganismos en precosecha, sin embargo, son pocos los estudios que reportan sus efectos durante el almacenamiento de las frutas.

Citrocover es un producto comercial elaborado a base de extracto de semilla de cítricos al 7%. El extracto para la elaboración de este producto se obtiene por arrastre de vapor y se utilizan las especies de *C. limon* y *C. sinensis*.

Resinadher es un producto natural y comercial proveniente de la resina obtenida del árbol de *Pinus teocote* la cual se recolecta de manera manual, posteriormente se depura y limpia para ser mezclada con materiales inertes y diluyentes a concentración del 60%.

3. JUSTIFICACIÓN

El jitomate juega un papel importante en la gastronomía mundial, ya que se considera parte de la canasta básica de muchos países, incluyendo a México. Debido a su composición es susceptible a contaminarse durante varias etapas de su cadena productiva (producción, cosecha, almacenamiento y comercialización) por distintos tipos de hongos, dentro de los que destaca *A. flavus*. Este hongo produce AFs, las cuales pueden afectar gravemente la salud de las personas que las consumen, siendo causante de hepatocarcinoma y otras alteraciones del código genético. Las AFs no pueden eliminarse de los alimentos, por lo tanto, es de vital importancia prevenir su aparición en frutos de jitomate. En la actualidad los fungicidas químicos como el benzimidazol, procloraz y clorotalonil son los más utilizados para reducir el desarrollo de *A. flavus*, sin embargo, su residuo en la fruta puede causar intoxicación en las personas que los consumen. Por este motivo es de suma importancia encontrar alternativas que brinden seguridad al consumidor, que no generen daños a la salud, que proteja de microorganismos patógenos y que no altere las características organolépticas de los frutos. La utilización de productos naturales comerciales tales como, quitosano, resina de pino y extractos de cítricos, tienen un efecto protector contra microorganismos y evitan en cierta medida el daño causado por el medio, sin embargo, es necesario ampliar la investigación del alcance protector que tienen estos productos sobre el hongo *A. flavus*. Las cubiertas vegetales a base de quitosano y nanopartículas de quitosano, han demostrado tener un poder protector contra *A. flavus*. Sin embargo, aún falta evaluar el efecto sobre el desarrollo del hongo y producción de aflatoxinas en frutos de jitomate.

4. HIPOTESIS:

Los extractos naturales comerciales, las cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano inhibirán el desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas, además conservarán la calidad de frutos de jitomate.

5. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano, sobre el crecimiento de *A. flavus*, producción de aflatoxinas y su impacto sobre la calidad de frutos de jitomate.

5.1 Objetivos específicos.

5.1.1 Evaluar el efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre el desarrollo de *A. flavus* de manera *in vitro* mediante la técnica de pozos y conteo de aflatoxinas.

5.1.2 Evaluar el efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre la incidencia, severidad y producción de aflatoxinas por *A. flavus* en frutos de jitomate Saladette.

5.1.3 Evaluar el efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales, color, respiración y etileno.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Obtención y preparación de materiales.

6.1.1 Obtención de frutos de jitomate

Los frutos de jitomate fueron donados por productores locales del municipio de Yautepec, Morelos, México (localizado entre extremas 18°53' N de latitud y 99°04' O de longitud, a una altura aproximada de 1,210 m s. n. m.). Se seleccionaron los frutos que se encontraban sanos (Figura 3) y que cumplieran con las condiciones físicas deseadas para la venta al público (adecuado nivel de maduración, tamaño promedio, firmeza aceptable, color característico: rojo intenso), y se descartaron aquellos que no cumplieran las características de maduración o presentaron daños físicos o causados por microorganismos.



Figura 3. Frutos de Jitomate sanos obtenidos de productores del municipio de Yautepec.

6.1.2 Obtención productos

Los productos naturales comerciales, Citrocover (extracto de semilla de cítricos) y Resinadher (resina de pino comercial) (Figura 4) fueron donados por la empresa MS Agros. El quitosano utilizado en esta investigación fue de medio peso molecular (grado

de desacetilación 75–85%), de grado reactivo Sigma Aldrich. Las nanopartículas de quitosano fueron elaboradas en el Laboratorio de Tecnología de Postcosecha de Productos Agrícolas del Centro de Desarrollo Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional. El tratamiento químico Mancozeb fue en presentación de polvo humectable (Equivalente a 800g de i.ai/Kg).



Figura 4. Productos naturales comerciales, Resinadher y Citrocover.

6.1.3 Obtención y activación de cepas de *A. flavus*

La cepa de *A. flavus* utilizada en esta investigación fue donada por el Laboratorio de Tecnología de Postcosecha de Productos Agrícolas del Centro de Desarrollo Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Se preparó medio de cultivo Czapek en un matraz Erlenmeyer de 500ml. Se vertieron 6 gr. de medio de cultivo Czapek en 120 ml de agua desionizada, se mezcló por 15 minutos con ayuda de una parrilla de agitación (DAIHA LABTECH- INDONESIA) hasta llegar al punto de ebullición (100°C), posteriormente el medio de cultivo fue esterilizado

en una autoclave a una temperatura de 121°C y 15 lbs de presión durante de 15 minutos. 25 mL del medio elaborado fue vertido en cajas petri de plástico estériles. Una vez gelificado, se sellaron las cajas en una campana de flujo laminar (ECOSHIEL- MEXICO) y se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su utilización.

Para la activación de la cepa, se cortaron discos de 0.5mL de diámetro de las cajas petri de *A. flavus* y se colocaron en el centro de las cajas que contenían medio Czapek previamente elaborado. Las cajas fueron almacenadas a 27°C por siete días. Posteriormente se realizó una herida a frutos de jitomate y se colocó sobre la herida 10mL de solución de esporas del hongo *A. flavus* (1×10^5).

6.1.4 Preparación de la solución de esporas

En una caja Petri con la cepa reactivada se adicionaron 10 mL de agua desionizada posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica fue raspado el micelio, la solución de esporas se agregó a un matraz Erlenmeyer con 20 mL de agua desionizada. Con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio se contabilizaron las esporas, hasta obtener una concentración de esporas de 1×10^5 .

6.1.5 Preparación del quitosano

En un matraz se vertieron 1 ml de ácido acético glacial (Fremont) en un litro de agua desionizada, la solución se agitó durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 10 gramos de quitosano y se mantuvo en agitación constante durante 24h a una temperatura constante de 70°C, al finalizar se ajustó el pH con ayuda de hidróxido de sodio 1N(Hycl).

6.1.6 Preparación de las nanopartículas de quitosano.

La preparación de nanopartículas de quitosano se realizó de acuerdo a lo reportado por Correa-Pacheco et al. (67). Se prepararon soluciones de quitosano en concentraciones

de 0,05 y 1% (p/v) en ácido acético (1% v/v) y agua destilada; la solución de quitosano se agregó gota a gota 2,5 mL de la solución de quitosano a la fase orgánica (0,05%) posteriormente se añadieron 40 mL de etanol y 1% de Tween 20 con ayuda de una bomba peristáltica, esta solución se mantuvo en agitación durante 10 minutos, para evaporar el etanol se colocó en un rotavapor (Rotary Evaporator RE 300, BM 500 Water Bath, Yamato CF 300) a 40°C y 50 rpm se redujo a un volumen de 2 mL y se almacenó en refrigeración (4 °C) para para su uso posterior

6.1.7 Preparación de soluciones comerciales.

6.1.7.1 Citrocover.

Se realizó una solución de Citrocover al 1%. Se mezclaron 10mL de Citrocover concentrado en 900mL de agua desionizada y se mantuvo la solución en agitación constante por 1 min. Se siguieron las instrucciones de la ficha técnica indicadas por el fabricante (Anexo 1).

6.1.7.2 Resinadher.

Se realizó una solución de Resinadher al 0.5%. Se mezclaron 5mL de Resinadher concentrado en 955mL de agua desionizada y se mantuvo en agitación constante durante 1 min. Se siguieron las instrucciones de la ficha técnica indicadas por el fabricante (Anexo 2).

6.1.7.3 Mancozeb 20%.

Se realizó una solución de Mancozeb al 2%. Se pesaron 20g de Mancozeb y se adicionaron a 980 mL de agua desionizada. La solución se mantuvo en agitación por un minuto hasta disolver el producto.

6.2 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de *A. flavus* de manera *in vitro* mediante la técnica de pozos y su producción de aflatoxinas.

6.2.1. Técnica de pozos

Se siguió la técnica de pozos (Figura 5) para evaluar el halo de inhibición. En una campana de flujo laminar en condiciones estériles, se adicionó 0.5mL de solución de esporas (10^5) en cada caja Petri con agar Czapek. La solución de esporas se esparció en toda la caja con un asa bacteriológica estéril. Se dejó secar la solución de esporas y posteriormente con un horador de 5 mm de diámetro, se realizó un orificio en el centro de la caja Petri. En el orificio generado se adicionó 20 μ l de cada uno de los tratamientos. Las cajas se almacenaron a temperatura ambiente. Se realizaron 6 repeticiones de cada tratamiento.

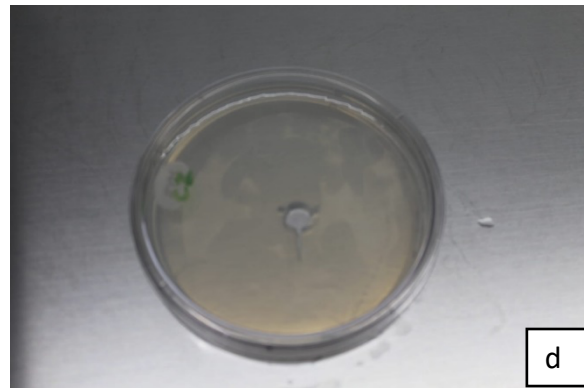
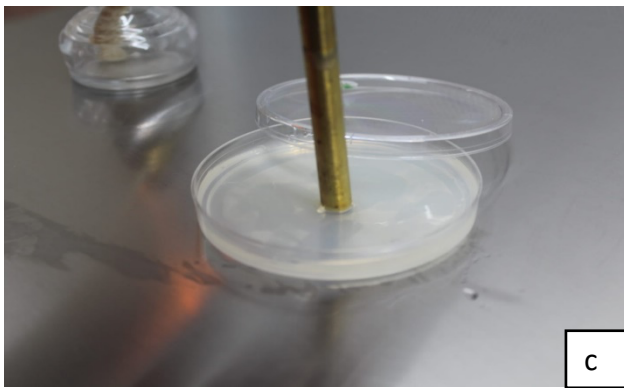
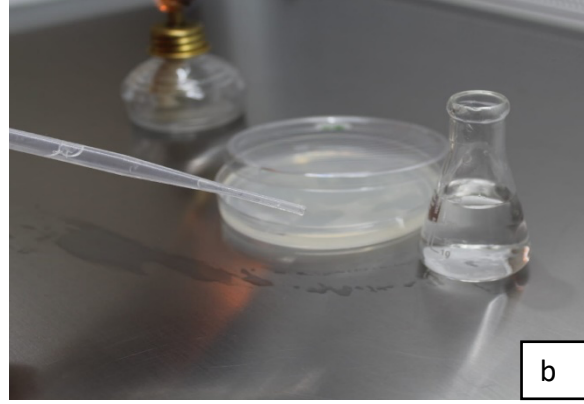
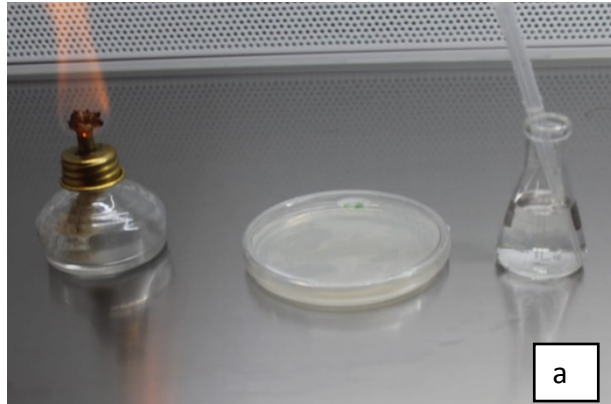


Figura 5: Técnica de pozos. a) Caja Petri con medio Czapek en campana de flujo de laminar estéril, b) adición de solución de esporas, c) realización de orificio en la caja, d) caja Petri con orificio y e) Tratamiento que se adicionaron al orificio de la caja Petri.

6.6.2. Variables a evaluar.

6.2.2.1 Halo de inhibición

Se midió el halo de inhibición (mm) (Figura 6) diariamente con la ayuda de un vernier digital. Se realizaron dos mediciones correspondientes a lo largo y ancho, en relación al crecimiento del hongo.

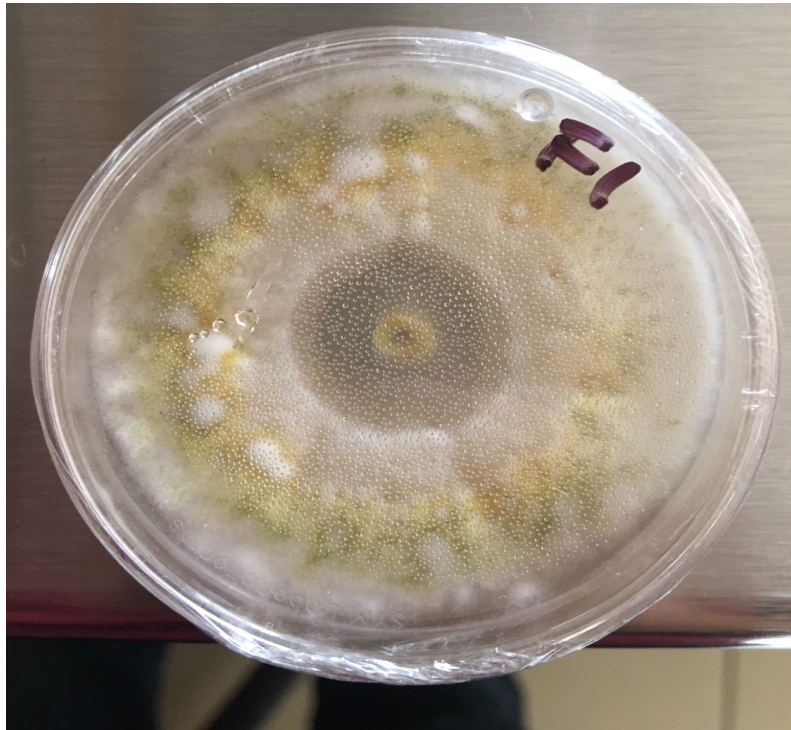


Figura 6: Halo de inhibición presentado en el quinto día por el fungicida Mancozeb.

6.2.2.2 Conteo de esporas.

Después de 7 días de almacenamiento, se tomaron las cajas petri y se adicionó 10 ml de agua destilada para generar una suspensión de esporas. Con ayuda de un gotero se colocaron 3 gotas de la suspensión en una cámara de Neubauer (Figura 7) para después cuantificar cinco celdas, el procedimiento se realizó por triplicado.

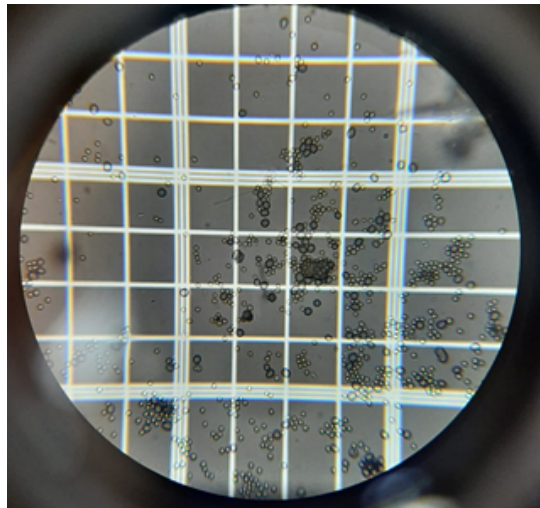


Figura 7: Conteo de esporas de *A. flavus* en cámara de Neubauer.

6.2.2.3 Conteo de aflatoxinas.

Se licuaron 10 g de muestra de cada tratamiento con 50 mL de solución de etanol absoluto al 65% durante 1 min y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente se colocaron 2ml de la mezcla anterior en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 12500 RPM durante un minuto. Posteriormente se realizó un inmunoensayo de flujo lateral de un solo paso con el kit *Reveal Q+ for Aflatoxin*. Se colocaron 100 μ L del sobrenadante y 500 μ L de líquido revelador (el líquido revelador se incluía en el kit) se mezcló 5 veces para su completa homogenización. Se colocó un cartucho con 3 tiras del kit *Reveal Q+ for Aflatoxin* en la plataforma de análisis integrado Raptor, (Figura 8) y se le agregaron 400

μL de la mezcla del sobrenadante y el revelador. Los datos se expresaron en partes por billón (PPB) de aflatoxinas totales.



Figura 8: Equipo Raptor procesando conteo de aflatoxinas.

6.3 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas, sobre la incidencia y la severidad de *A. flavus* y en frutos de jitomate

6.3.1 Aplicación de tratamientos en los frutos de jitomate.

Los frutos de jitomate se lavaron durante 10s con una solución de agua destilada y cloro al 1% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se sumergieron en las distintas formulaciones durante dos minutos. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente (28°C) para posteriormente ser almacenados a temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$).

6.3.2 Variables a evaluar.

6.3.2.1 Incidencia

La incidencia se determinó por el número de frutos que se infectaron en un periodo de cuatro días y se expresaron los resultados en porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

Fórmula para determinar el porcentaje de incidencia de infección

$$\% \text{ Incidencia de infección} = \left(\frac{\text{frutos infectados}}{\text{total de frutos}} \right) \times 100$$

6.3.2.2 Severidad de infección

El índice de severidad ocasionado por *A. flavus* se determinó mediante una escala Donde 1 = 0 %; 2 = 1-25 %; 3 = 26-50 %; 4 = 51-75 % y 5 = 76-100%.

6.4 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre la producción de aflatoxinas por parte de *A. flavus* presentes en frutos de jitomates a nivel de laboratorio

6.4.1 Evaluación de aflatoxinas

Se licuaron 10 g de frutos de jitomate de cada tratamiento con 50 mL de solución de etanol absoluto al 65% durante 1 min y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente se colocaron 2ml de la mezcla anterior en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 12500 RPM durante un minuto. Posteriormente se realizó un inmunoensayo de flujo lateral de un solo paso con el kit *Reveal Q+ for Aflatoxin*. Se colocaron 100 µL del sobrenadante y 500 µL de líquido revelador (el líquido revelador se incluía en el kit) se mezcló 5 veces para su completa homogenización. Se colocó un cartucho con 3 tiras del kit *Reveal Q+*

for *Aflatoxin* en la plataforma de análisis integrado Raptor (marca y país de fabricación), y se le agregaron 400 µL de la mezcla del sobrenadante y el revelador. Los datos se expresaron en partes por billón (PPB) de aflatoxinas totales.

6.5 Evaluación del efecto de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, solidos solubles totales

6.5.1 Aplicación de los tratamientos.

Los frutos fueron lavados con agua corriente para eliminar el exceso de tierra o basura y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se sumergieron en cada una de soluciones con tratamientos previamente descritas durante 10 segundos y se dejaron secar.

6.5.1.2 Variables a evaluar.

6.5.1.2.1 Pérdida de peso.

Los frutos fueron pesados diariamente por 10 días. La pérdida de peso se determinó con la ayuda de una balanza digital. Se determino la diferencia entre el peso inicial y el peso final de cada fruto de jitomate. El resultado se expresó en porcentaje de acuerdo con la siguiente ecuación.

6.5.1.2.1.1 Fórmula para porcentaje de pérdida de peso

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde P_i = peso inicial y P_f = peso final.

6.5.1.2.2 Firmeza.

La firmeza se determinó utilizando un penetrómetro análogo (KANDPI, Japón) al inicio y al final del experimento. Se utilizó una punta cilíndrica de 8mm de diámetro penetrando con este la zona media del jitomate, en tres caras del fruto. Se midieron 3 frutos diariamente de cada tratamiento durante 10 días. Los valores se reportaron como la fuerza requerida para atravesar la membrana del fruto en unidades de Newton (N).

6.5.1.2.3 Solidos solubles totales (SST).

Para determinar los SST, se utilizaron 30 frutos por cada tratamiento y se evaluaron diariamente. Se extrajo una gota de jugo de los frutos tratados y con la ayuda de un refractómetro (Atago, Japón) se obtuvieron los resultados los cuales se expresaron en grados "Brix" (Figura 9).

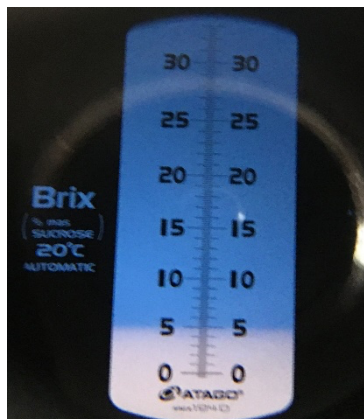


Figura 9: Grados Brix obtenidos de una muestra de jugo de jitomate en un refractómetro ATAGO.

6.5.1.2.4. Respiración y Etileno.

La producción de CO₂ y etileno se midió utilizando la técnica de “espacio-cabeza”. Se seleccionaron 3 frutos de jitomate por tratamiento y se obtuvo el volumen. Posteriormente, los frutos se colocaron dentro de frascos de plástico con capacidad de 1L, sellados herméticamente con una tapa equipada con un septum de caucho de silicona. Después de 2 h a 27 ± 2 °C, se extrajeron 6 mL de aire de los frascos con una jeringa de 10 mL y se inyectaron en tubos vacutainer. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su posterior evaluación.

Para medir la producción de CO₂ y etileno se inyectaron 0.5mL de la muestra en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 7890B) equipado con ionización de flama. Se utilizaron dos columnas (HP-PLOT/Q y CPMOSIEVE 5A), dos detectores (FID / TCD) y un inyector que se mantuvo en modo split con temperaturas de 300, 250 y 200 °C respectivamente. Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La respiración se expresó en ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹ y se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Respiración} = \frac{\Delta\%CO_2 \times 10 \times \text{volumen libre del contenedor (L)}}{\text{Peso de fruto (Kg)} \times \text{Tiempo de almacenamiento (h)}} \times \frac{556 \text{ mL } CO_2}{1000 \text{ mg}}$$

Para calcular la producción de etileno se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{PC_2H_4 = C_2H_4 \text{ final} - C_2H_4 \text{ Inicial}}{1000} \times (V_{\text{frasco}} - V_{\text{fruto}}) \times \frac{1000}{P_{\text{fruto}}} \times \frac{60}{T}$$

6.5.1.2.4 Color

Para determinar el color se realizó, una medición diaria durante seis días en ambas caras y en la zona media de los frutos utilizando un colorímetro (Konica Minolta, Baking Meter BC-10, Japón), obteniendo las coordenadas de color L^* , que es el indicador de la luminosidad, a^* (cromaticidad (-) verde a (+) rojo) y b^* (cromaticidad (-) azul a (+) amarillo), con las cuales se calcularon las diferencias de color ΔE , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Donde L, a y b representan las diferencias entre los parámetros de color de los frutos recubiertos y de los frutos control, tomados como referencia el día uno.

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se analizarán con el método Anova y método de comparación de medias de Tukey, utilizando el programa INFOSTAT.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de *A. flavus* de manera *In vitro* mediante la técnica de pozos y conteo de aflatoxinas.

En los resultados *In vitro* se observó que en el día cuatro, cinco y seis, las cajas Petri tratadas con Citrocover mostraron un mayor halo de inhibición (10.4, 4.2 y 3.5 cm²) siendo estadísticamente diferente al control. Del mismo modo, los tratamientos Resinadher y Mancozeb, mostraron un halo de inhibición sobre el hongo *A. flavus* durante los días cuatro, cinco y seis, sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes al control (Tabla 2). En el día siete no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. En el caso de las cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano, no se visualizó un halo de inhibición a partir de las 72 horas.

Con respecto a la producción de esporas se observó que los productos Citrocover, Resinadher y quitosano lograron reducir la producción de esporas (0.2, 0.9 y 4.7 X10⁵ esporas mL⁻¹, respectivamente), y fueron estadísticamente diferentes al control (Tabla 3). Los tratamientos cubierta nanoestructurada de quitosano y ácido acético mostraron el mayor número de esporas.

Tabla 2. Evaluación *In vitro* de los extractos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre el halo de inhibición de *A. flavus*.

Tratamiento	Halo de inhibición (cm ²)				
	Días de almacenamiento				
	3	4	5	6	7
Quitosano	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Cubierta de quitosano	.08 ± .17 ^{bA}	.06 ± .13 ^{aA}	0 ± 0 ^{aA}	0 ± 0 ^{aA}	0 ± 0 ^{aA}
Nanopartículas de quitosano	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Citrocover	3.4 ± 4.4 ^{ab}	10.4 ± 14.4 ^{bA}	4.2 ± 5.1 ^{bA}	3.5 ± 4.7 ^{bA}	3.0 ± 4.5 ^{aA}
Resinadher	5.7 ± 4.0 ^{bB}	5.4 ± 5.0 ^{abB}	2.6 ± 2.1 ^{abAB}	2.6 ± 2.4 ^{abAB}	2.6 ± 2.4 ^{Ab}
Ácido Acético	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Mancozeb	6.5 ± 2.6 ^{abC}	2.6 ± 1.3 ^{abB}	2.6 ± 1.5 ^{abB}	1.1 ± .11 ^{abAB}	.99 ± .15 ^{aAB}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey , $p < 0.05$).

Tabla 3: Evaluación *In vitro* de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la producción de esporas de *A. flavus* durante 7 días de almacenamiento.

Tratamiento	Promedio de esporas
Quitosano 1	4.7 ± 0.6 ^{ab}
Cubierta de quitosano	14.5 ± 4.8 ^{cd}
Nanopartículas de quitosano	19.7 ± 4.1 ^d
Citrocover	0.2 ± 0 ^a
Resinadher	0.9 ± 0.02 ^a
Ácido Acético	18.5 ± 1.3 ^d
Mancozeb	9.4 ± 3.1 ^{bc}
Agua	11.1 ± 1.14 ^{bc}

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey, $p < 0.05$). ± = desviación estándar.

Con respecto a la producción de aflatoxinas producidas por *A. flavus*, se observó que los tratamientos Mancozeb, quitosano y Citrocover fueron los que mostraron menor producción de aflatoxinas. Sin embargo, la cubierta de quitosano logró inhibir en su totalidad la producción de este metabolito secundario. No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados (Tabla 4).

Tabla 4: Evaluación *In vitro* de los extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus* durante siete días de almacenamiento.

Tratamiento	Aflatoxinas (PPB)
Quitosano	0.10 ± 0.08 ^a
Cubierta de quitosano	0.00 ± 0.00 ^a
Nanopartículas de quitosano	0.83 ± 2.20 ^a
Citrocover	0.13 ± 0.16 ^a
Resinadher	0.29 ± 0.25 ^a
Ácido Acético	0.19 ± 0.47 ^a
Mancozeb	0.09 ± 0.16 ^a
Agua	1.21 ± 1.50 ^a

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey, $p < 0.05$).

7.2 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas, sobre la incidencia y la severidad de *A. flavus* y en frutos de jitomate.

En los resultados sobre la incidencia del hongo *A. flavus* en frutos de jitomate se observó que los frutos tratados con Resinadher y Citrocover en el segundo día mostraron un porcentaje menor de incidencia (0 y 7%, respectivamente) siendo estadísticamente diferentes al control (Figura 10).

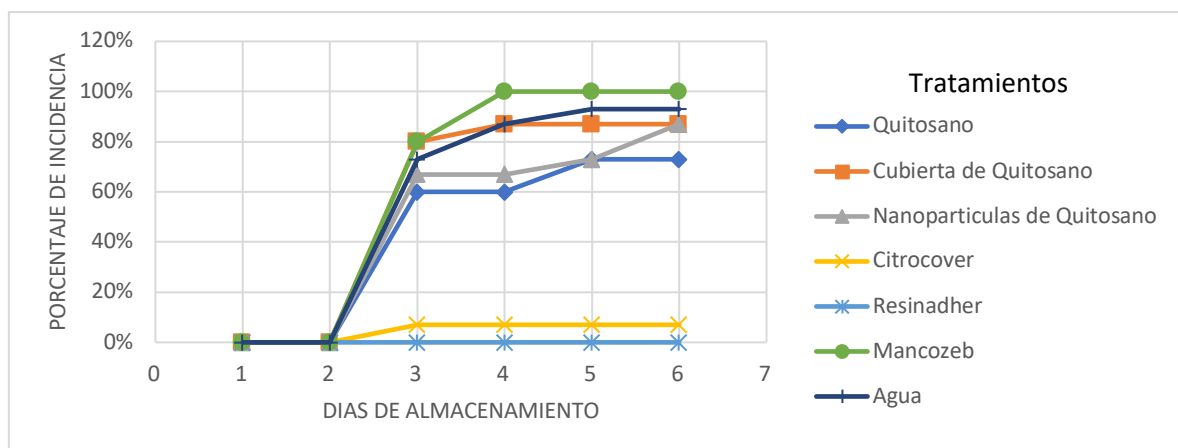


Figura 10. Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano sobre la incidencia de *A. flavus* en frutos de jitomate almacenados por 6 días a temperatura ambiente (28° a 30°C) en condiciones de laboratorio.

Con respecto al crecimiento micelial, Resinadher y Citrocover mostraron una menor área de crecimiento micelial (0.0 y 0.04 cm²) siendo estadísticamente diferentes al control (Tabla 5), cabe destacar que el poder protector continuo durante los siete días de almacenamiento. En el crecimiento micelial Mancozeb y las nanopartículas de quitosano resultaron menos efectivos para controlar el crecimiento micelial el hongo (1.3 y 1.5 cm).

En los resultados obtenidos de la escala de severidad de *A. flavus*, se observó que a partir del tercer día de almacenamiento Resinadher y Citrocover presentaron una menor severidad (1 y 1, respectivamente), mientras que los frutos tratados con Mancozeb presentaron una severidad mayor (2.0). A partir del cuarto día de almacenamiento (Tabla 6). El resto de los tratamientos como las cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano se mantuvieron en un rango mayor a 1 pero sin rebasar el 2, en escala de severidad.

Tabla 5: Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre el crecimiento micelial de *A. flavus* durante seis días de almacenamiento en frutos de jitomate.

Tratamiento	Crecimiento micelial (cm ²)				
	Días de almacenamiento				
	1-2	3	4	5	6
Quitosano	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2 ^{abc}	0.7 ± 1.0 ^{bc}	0.9 ± 1.2 ^{abc}	1.0 ± 1.3 ^{abc}
Cubierta de quitosano	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2 ^{bc}	0.3 ± 0.2 ^{abc}	0.4 ± 0.2 ^{ab}	1.2 ± 0.9 ^{abc}
Nanopartículas de quitosano	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3 ^{bc}	0.3 ± 0.3 ^{ab}	0.4 ± 0.4 ^a	1.5 ± 1.5 ^{bc}
Citrocover	0.0 ± 0.0	.04 ± 0.1 ^{ab}	.07 ± 0.2 ^a	0.1 ± 0.5 ^a	0.2 ± 0.8 ^{ab}
Resinadher	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
Mancozeb	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2 ^c	0.0 ± 0.5 ^c	1.3 ± 0.9 ^{bc}	1.3 ± 1.9 ^{bc}
Agua	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2 ^{abc}	0.6 ± 0.5 ^{bc}	1.8 ± 1.8 ^c	1.9 ± 1.8 ^c

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 6: Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la severidad de *A. flavus* inoculado en frutos de jitomate

Tratamiento	Severidad				
	Días de almacenamiento				
	1-2	3	4	5	6
Quitosano	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5 ^b	1.6 ± 0.5 ^b	1.7 ± 0.4 ^b	1.7 ± 0.4 ^b
Cubierta de quitosano	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.4 ^b	1.8 ± 0.3 ^{bc}	1.8 ± 0.3 ^b	1.8 ± 0.3 ^b
Nanopartículas de quitosano	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.4 ^b	1.6 ± 0.4 ^{bc}	1.7 ± 0.4 ^b	1.8 ± 0.3 ^b
Citrocover	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.2 ^a
Resinadher	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.0 ^a
Mancozeb	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4 ^b	2.0 ± 0.0 ^c	2.0 ± 0.0 ^b	2.0 ± 0.0 ^b
Agua	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.4 ^b	1.8 ± 0.3 ^{bc}	1.9 ± 0.4 ^b	1.9 ± 0.2 ^b

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey , $p < 0.05$).

7.3 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus*, presentes en frutos de jitomates a nivel de laboratorio

Los frutos de jitomate tratados con Resinadher y Citrocover mostraron una menor concentración de aflatoxinas (0.95 y 1.77 PPB), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, incluyendo las cubiertas comestibles y nanoestructuradas a base de quitosano. Todos los tratamientos se comportaron similares a excepción del agua (5 PPB) (Tabla 7).

Tabla 7: Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus* en frutos de jitomate almacenados por 6 días.

Tratamiento	Aflatoxinas (PPB)
Quitosano 1%	2.13 ± 0.90 ^a
Cubierta de quitosano	2.50 ± 1.32 ^a
Nanopartículas de quitosano	1.87 ± 0.45 ^a
Citrocover	1.77 ± 0.21 ^a
Resinadher	0.95 ± 0.68 ^a
Mancozeb	1.93 ± 0.65 ^a
Agua	5.0 ± 0.89 ^b

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey, $p < 0.05$). ± '= desviación estándar.

7.4 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales.

En la evaluación de porcentaje de pérdida de peso, los frutos de jitomate tratados con Citrocover y Resinadher presentaron un menor porcentaje de pérdida de peso (10.49 y 11.84%, respectivamente) al final del almacenamiento. A partir del día dos de almacenamiento y hasta el día 10, el tratamiento Citrocover, mostro diferencias estadísticas significativas (1.47 y 10.49%, respectivamente), comparado con el resto de los tratamientos ($p < 0,05$) (Figura 11).

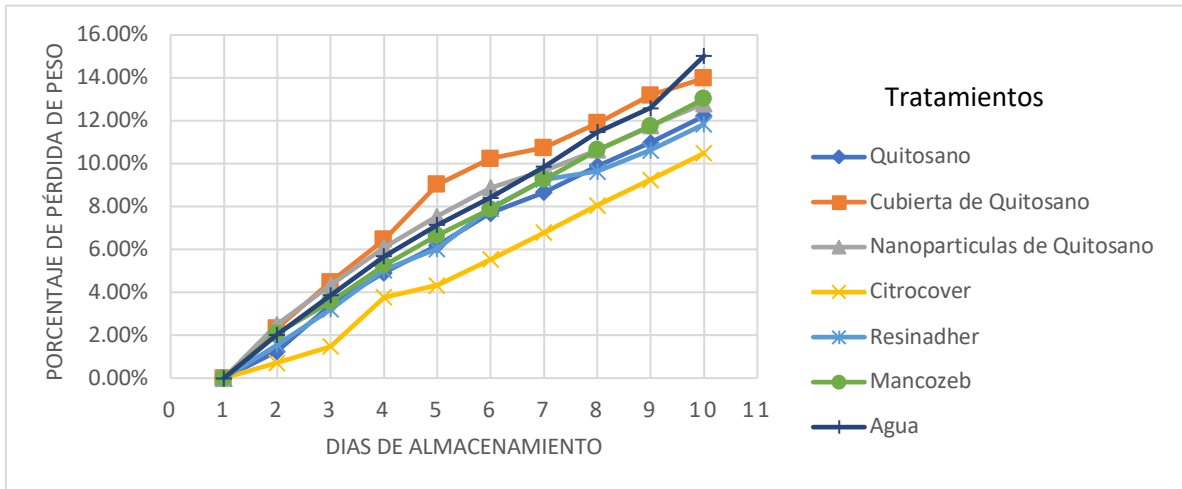


Figura 11. Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano sobre el porcentaje de pérdida de peso en frutos de jitomate almacenados por 10 días a temperatura ambiente (28° a 30°C) en condiciones de laboratorio.

Con respecto a la variable firmeza, se observó que a partir del día 2, la cubierta de quitosano, la cubierta nanoestructurada y Citrocover presentaron una mayor firmeza (2.7, 2.2 y 2.1N respectivamente), sin embargo, en el resto de los días de almacenamiento no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. Los frutos tratados con la cubierta de quitosano fueron los que mostraron una mayor firmeza al final del almacenamiento (Tabla 8).

Tabla 8: Evaluación de extractos naturales comerciales cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la firmeza de frutos de jitomate almacenados durante 10 días a temperatura ambiente (28° a 30 °C).

Tratamiento	FIRMEZA (N)				
	Días de almacenamiento				
	2	4	6	8	10
Quitosano 1%	1.8 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.1 ^{ab}	2.0 ± 0.1 ^{ab}	1.5 ± 0.9 ^a
Cubierta de quitosano	2.7 ± 0.2 ^b	1.9 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.3 ^{ab}	2.3 ± 0.5 ^{ab}	2.2 ± 0.2 ^{ab}
Nanopartículas de quitosano	2.2 ± 0.3 ^{ab}	2.1 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.4 ^b	2.7 ± 0.2 ^b	2.4 ± 0.3 ^b
Citrocover	2.1 ± 0.4 ^{ab}	1.7 ± 0.4 ^a	1.9 ± 0.2 ^{ab}	1.8 ± 0.2 ^{ab}	1.9 ± 0.2 ^{ab}
Resinadher	1.6 ± 0.3 ^a	1.8 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^{ab}	1.7 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.1 ^{ab}
Mancozeb	1.6 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.3 ^{ab}	2.0 ± 0.3 ^{ab}	1.8 ± 0.3 ^{ab}
Agua	2.0 ± 0.2 ^{ab}	1.6 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.2 ^a	2.6 ± 0.4 ^{ab}	2.1 ± 0.2 ^{ab}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey , $p < 0.05$).

Con respecto a los sólidos solubles totales no se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados los días 2,4,6. Sin embargo en el día 10, los frutos tratados con Resinadher, mostraron el valor más alto al final del almacenamiento (Tabla 9).

Tabla 9: Efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la concentración de SST de frutos de jitomate almacenados durante 10 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).

Tratamiento	SST (°Brix)				
	Días de almacenamiento				
	2	4	6	8	10
Quitosano 1%	3.0 ± 0.0 ^a	2.6 ± 3.8 ^a	2.6 ± 0.6 ^a	3.3 ± 0.0 ^a	3.0 ± 1.0 ^{ab}
Cubierta de quitosano	3.3 ± 0.5 ^a	3.3 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.5 ^{ab}
Nanopartículas de quitosano	3.3 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.6 ± 0.5 ^a	2.6 ± 0.5 ^{ab}
Citrocover	2.6 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.6 ± 0.5 ^a	2.3 ± 0.5 ^a
Resinadher	2.6 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.5 ± 1.5 ^a	4.0 ± 0.0 ^b
Mancozeb	3.0 ± 1.0 ^a	2.6 ± 0.5 ^a	3.6 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.5 ^{ab}
Agua	3.3 ± 1.7 ^a	3.0 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.5 ^a	3.6 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.0 ^{ab}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey, $p < 0.05$).

Con respecto a la producción de CO₂, etileno y la variable color, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos evaluados (Tabla 10, 11 y 12).

Tabla 10: Efecto de productos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la producción de CO₂ en frutos de jitomate almacenados durante 7 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).

Tratamiento	Producción de CO ₂ (ml CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)						
	Días de almacenamiento						
	1	2	3	4	5	6	7
Quitosano 1%	15.34±2.06	14.81 ± 1.39 ^a	17.08 ± 2.33 ^a	14.10 ± 2.08 ^a	18.26± 6.03 ^a	19.75 ±11.48 ^a	17.74 ± 1.87 ^a
Cubierta de quitosano	15.89 ± 3.39 ^a	14.77 ± 1.19 ^a	16.19 ± 3.85 ^a	17.87 ± 0.55 ^a	18.75 ± 3.98 ^a	17.36 ± 2.44 ^a	16.61 ± 2.0 ^a
Nanopartículas de quitosano	13.28 ± 5.70 ^a	17.30 ± 1.67 ^a	14.10 ± 4.88 ^a	12.38 ± 3.36 ^a	18.97 ± 6.84 ^a	14.97 ± 1.47 ^a	16.08 ± 1.71 ^a
Citrocover	14.64 ± 7.53 ^a	16.32 ± 5.99 ^a	17.67 ± 3.59 ^a	14.24 ± 2.39 ^a	18.62 ± 5.99 ^a	14.70 ± 1.36 ^a	13.46 ± 2.94 ^a
Resinadher	13.18 ± 4.46 ^a	14.47 ± 5.12 ^a	16.62 ± 2.96 ^a	14.72 ± 0.78 ^a	15.49 ± 2.73 ^a	12.86 ± 4.13 ^a	15.68 ± 3.64 ^a
Mancozeb	15.89 ± 6.86 ^a	18.35 ± 3.41 ^a	20.86 ± 4.59 ^a	16.04 ± 2.17 ^a	15.13 ± 4.10 ^a	12.03 ± 1.47 ^a	16.15 ± 6.21 ^a
Agua	16.49 ± 3.33 ^a	18.83 ± 2.78 ^a	15.43 ± 1.79 ^a	15.35 ± 3.43 ^a	17.85 ± 3.60 ^a	16.96 ± 3.31 ^a	18.85 ± 4.64 ^a

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey , $p < 0.05$).

Tabla 11: Efecto de productos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en la producción de etileno en frutos de jitomate almacenados durante 7 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).

Tratamiento	Producción de etileno (mL Kg ⁻¹ h ⁻¹)						
	Días de almacenamiento						
	1	2	3	4	5	6	7
Quitosano 1%	0.48 ± 0.44 ^a	0.54 ± 0.09 ^a	0.48 ± 0.29 ^a	0.50 ± 0.18 ^a	0.40 ± 0.35 ^a	0.32 ± 0.29 ^a	0.53 ± 0.21 ^a
Cubierta de quitosano	0.77 ± 0.26 ^a	0.45 ± 0.26 ^a	0.64 ± 0.40 ^a	0.69 ± 0.34 ^a	0.30 ± 0.21 ^a	0.44 ± 0.40 ^a	0.65 ± 0.11 ^a
Nanopartículas de quitosano	0.51 ± 0.42 ^a	0.77 ± 0.31 ^a	0.63 ± 0.33 ^a	0.59 ± 0.23 ^a	0.37 ± 0.13 ^a	0.32 ± 0.24 ^a	0.63 ± 0.22 ^a
Citrocover	0.74 ± 0.39 ^a	0.64 ± 0.40 ^a	0.51 ± 0.45 ^a	0.42 ± 0.46 ^a	0.54 ± 0.17 ^a	0.31 ± 0.17 ^a	0.24 ± 0.21 ^a
Resinadher	0.48 ± 0.27 ^a	0.49 ± 0.26 ^a	0.64 ± 0.40 ^a	0.78 ± 0.51 ^a	0.63 ± 0.06 ^a	0.31 ± 0.15 ^a	0.35 ± 0.13 ^a
Mancozeb	1.57 ± 0.82 ^a	0.74 ± 0.39 ^a	0.99 ± 1.13 ^a	0.67 ± 0.30 ^a	0.42 ± 0.23 ^a	0.53 ± 0.17 ^a	0.17 ± 0.12 ^a
Agua	0.73 ± 0.29 ^a	0.66 ± 0.27 ^a	0.29 ± 0.26 ^a	0.59 ± 0.34 ^a	0.32 ± 0.23 ^a	0.50 ± 0.14 ^a	0.39 ± 0.09 ^a

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey , $p < 0.05$).

Tabla 12: Efecto de productos naturales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas en el color en frutos de jitomate almacenados durante 6 días a temperatura ambiente (28° a 30° C).

Tratamiento	Color					
	Días de almacenamiento					
	1	2	3	4	5	6
Quitosano 1%	17.77 ± 6.17 ^a	22.09 ± 6.24 ^a	26.16 ± 5.23 ^a	31.20 ± 4.13 ^a	31.66 ± 4.98 ^a	33.08 ± 3.81 ^a
Cubierta de quitosano	16.42 ± 1.68 ^a	19.95 ± 2.47 ^a	24.07 ± 3.02 ^a	28.51 ± 2.97 ^a	30.08 ± 2.38 ^a	29.71 ± 2.77 ^a
Nanopartículas de quitosano	20.05 ± 5.18 ^a	24.30 ± 4.63 ^a	25.47 ± 2.48 ^a	31.64 ± 3.13 ^a	32.56 ± 2.34 ^a	31.55 ± 4.98 ^a
Citrocover	17.43 ± 3.42 ^a	22.00 ± 3.47 ^a	27.01 ± 5.02 ^a	31.80 ± 5.63 ^a	32.42 ± 5.15 ^a	36.45 ± 10.30 ^a
Resinadher	16.83 ± 5.32 ^a	20.35 ± 5.74 ^a	21.96 ± 4.34 ^a	26.58 ± 1.65 ^a	27.15 ± 2.65 ^a	28.27 ± 2.21 ^a
Mancozeb	15.87 ± 1.45 ^a	19.13 ± 1.83 ^a	22.90 ± 3.30 ^a	27.13 ± 3.91 ^a	28.50 ± 3.39 ^a	29.03 ± 4.21 ^a
Agua	16.25 ± 5.65 ^a	21.76 ± 5.14 ^a	25.54 ± 3.72 ^a	29.75 ± 4.87 ^a	31.20 ± 4.07 ^a	32.79 ± 3.77 ^a

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Prueba Anova y método de comparación de medias de Tukey, $p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* en pruebas *In vitro*.

Las cajas tratadas con Citrocover, mostraron el mayor control sobre *A. flavus* durante la incubación *In vitro*, estos datos son similares a los presentados por Iglesias (68) quien realizó evaluaciones *In vitro* de extracto de *Citrus aurantium*, *C. latifolia* y *C. reticulata* sobre *Alternaria solani* y *Passalora fulva*, y logro identificar que en general, todos los extractos logran inhibir el crecimiento y desarrollo de hongos incluso superior a un 50% en comparación al control (69). Los extractos de cítricos destacan por la producción de

compuestos bioactivos como, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, flavonoides, pectinas, alcaloides, saponinas, glicosilasas, taninos entre otros. Dentro de los compuestos que brindan una protección contra microorganismos, destacan los flavonoides y fenoles, ya que debido a sus estructuras aromáticas y su grupo hidroxilo alteran y desestabilizan las actividades enzimáticas de la quitina, quitina sintasa y β -glucanasa, dando como resultado la ruptura de la membrana citoplasmática de hongos (70).

En las cajas petri tratadas con recubrimiento de quitosano, destaca la nula producción de aflatoxinas (0.0) producidas por *A. flavus*, estos datos concuerdan con los presentados por Cortes-Higareda et al. (71), quienes evaluaron cubiertas de quitosano al 1% de manera *In vitro* y obtuvieron una inhibición total de la producción de aflatoxinas. Esto puede ser ocasionado por la interacción de las cargas positivas del grupo amino presente en el quitosano interactuando con los átomos de oxígeno presentes en las aflatoxinas (72). Otro método de acción presentado por Brakai-Golan (73), propone que el ambiente rico en zinc estimula la producción de estos metabolitos secundarios producidos por *A. flavus* y *A. parasiticus*, y en respuesta a la acción quelante del quitosano sobre el zinc, puede provocar una inhibición del en la producción de aflatoxinas por estos hongos.

8.2 Evaluación de productos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* en frutos de jitomate.

En la evaluación de los productos naturales sobre los frutos de jitomate, el Citrocover y Resinaher inhibieron el crecimiento micelial, así como la incidencia de *A. flavus* en jitomate. Estos datos son similares a los presentados por Gaviria-Hernández (74), quien evaluó los extractos comerciales de *C. sinensis* y *C. grandis* (0.05%) sobre el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* en frutos, y encontró una inhibición del 100% en el crecimiento micelial, así como en la biomasa fúngica. Así mismo Silva (75), evaluó extractos de cítricos al 1% para el control del hongo *Penicillium* spp. en frutos de manzano y reportó un control del 99.5%. La capacidad de los extractos de cítricos para

controlar los hongos se debe a las grandes cantidades de concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides, estos compuestos son capaces de inhibir enzimas que afectan la respiración de los hongos de la misma manera que tienen la capacidad de formar tanto alcoholes como esterés y con ello evitan el crecimiento de hifas y también previenen la germinación de esporas.

El fabricante menciona que Citrocover está compuesto de ácido ascórbico, ácido palmítico, manitosa, glucosa, glicéridos, ácidos grasos, aminoácidos, bioflavonoides cítricos mezclados con grupos de aminas, tocoferoles y terpenos de naranja. Los terpenos han sido ampliamente estudiados pues estos destacan por su actividad fungicida, tal como lo describe Quintana-Obregón et al. (76), quien reportó una inhibición del 100% del crecimiento micelial de *A. tenuissima* y cuando se añade 1% extra de terpeno de naranja se obtiene 20% menos de germinación de esporas. Los compuestos como terpenos son compuestos que logran reducir la división celular e inhibir el consumo de oxígeno. La respiración mitocondrial la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN. El D-limoneno aumenta específicamente la fluidez de las membranas fúngicas, lo que conduce a una alta permeabilidad inespecífica de la membrana y pérdida de integridad, mientras que la actividad antifúngica del citronelol se atribuye a la inhibición de la síntesis de ergosterol en la membrana fúngica, lo que da como resultado inestabilidad osmótica y metabólica (77-79).

8.3 Evaluación del efecto de extractos naturales comerciales, cubiertas comestibles y nanoestructuradas sobre los parámetros de calidad en frutos de jitomate, utilizando las variables de firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales.

La calidad de los frutos de jitomate se mantuvo durante todos los días de almacenamiento de manera significativa entre aquellos frutos a los que se les aplicó tratamiento y el grupo control. Las características organolépticas del jitomate se mantuvieron, conservando su buena calidad.

Con respecto a las variables de calidad, observamos que la firmeza fue significativamente mayor en los frutos tratados con nanopartículas de quitosano. Estos datos concuerdan con lo reportado por Martínez-González, (2019) (78), donde indica que frutos de fresa tratadas con nanopartículas de quitosano (10, 20 y 30%), mostraron una firmeza mayor (4.8) al final del almacenamiento, al compararlo con el control. Al igual que en nuestra investigación, Ruiz-Lopez et al. (80), reportaron que la aplicación del extracto de semillas de toronja no afectó el contenido de SST en melón durante almacenamiento bajo condiciones de mercado (20°C). Los SST no solo refleja el estado de madurez de madurez del fruto, sino también el grado de calidad.

La pérdida de peso se vió disminuida al utilizar el Citrocover en frutos de jitomate, del mismo modo, Silva et al. (75), reportaron que al utilizar un extracto de cítricos comercial al 1%, disminuyó el porcentaje de pérdida de peso (1.8%) de frutos de manzana comparado con otros extractos vegetales incluyendo al grupo control. La reducción de peso y de tamaño son causadas por procesos fisiológicos naturales, como respiración y transpiración, sin embargo, varios reportes indican que la utilización de los extractos de cítricos reduce está pérdida. Esto puede estar relacionado con los componentes hidrofóbicos de su fórmula, lo que le permite disminuir la pérdida de agua en el fruto (80).

No se observaron diferencias estadísticas con respecto al color, respiración y producción de etileno, lo que indica que los extractos de cítricos no modifican la calidad de los productos hortofrutícolas.

9. CONCLUSIÓN

Los extractos de semillas de cítricos comerciales, así como la resina de pino comercial, evitan el crecimiento micelial causado por *A. flavus*, así mismos disminuyen la producción aflatoxinas. Por otro lado, de manera *in vitro* las cubiertas de quitosano evitaron el desarrollo de aflatoxinas en su totalidad. La resina de pino comercial y el extracto de semilla de cítricos demuestran ser una opción viable para el control del hongo fitopatógeno *A. flavus*, a su vez los tratamientos a bases de semillas de cítricos lograron disminuir la pérdida de peso de los frutos obteniendo una ventana de oportunidad para evitar pérdida temprana del producto almacenado.

10. REFERENCIAS

1. FAO (Internet). Fao.org. (2022) [citado Junio de 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/plant-health-day/es>.
2. FAO (internet). Fao.org. (2022) [citado Junio de 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/hunger/es/#:~:text=Una%20persona%20padece%20inseguridad%20alimentaria,falta%20de%20recursos%20para%20obtenerlos>.
3. Bogantes, L. P., Bogantes, L. D., Bogantes, L. S. (2004). Aflatoxinas. Revista Acta Medica Costarricense, pp. 46(4).
4. Salesa Landete, B. (2021). Evaluación de los efectos producidos en diferentes niveles de organización biológica en daphnia magna tras la exposición al fungicida procloraz y al insecticida piriproxifen. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, España.
5. Quintana, O. E., Plasencia, J. M., Cortez, R. M. (2013). Impacto del uso de los azoles: implicaciones agrícolas y daños a la salud. En *Avances en Ciencias y Tecnología Alimentaria en México*; Ramírez de León, J. A., Uresti Marín, R., Aldana Madrid, M. L., Loarca Piña, M. L. F., Eds.; Plaza y Valdés Editores: Madrid, España, 2013; pp. 523-536.
6. Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: A versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest-A review. Revista Chapingo Serie Horticultura, 23(2), pp. 103-121.
7. Pérez, G. (2007). Comportamiento fenológico y agronómico de la variedad de tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) Sahel bajo condiciones en campo abierto y casa sombra. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
8. FAOSTAT [Internet]. Fao.org. (2020) [citado Mayo 26 de 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
9. Rodriguez, S., Nereyda, S. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai, 7(1), pp. 153-170.
10. Navarro-González, I., Periago, M. J. (2016). El tomate, ¿alimento saludable y/o funcional? Revista Española de Nutrición Humana y Dietética, 20(4), pp. 323-335.

11. El cultivo del tomate (Parte I). [internet] Infoagro.com. 2021.[citado noviembre 26 de 2021]. Disponible en: https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate__parte_i_.asp.
12. Noale, N (2016). Tomate para industria: revisión bibliográfica y selección de variedades en el Valle Medio de Río Negro (Tesis licenciatura). Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
13. Info agrónomo [Internet]. Artículos sobre Agronomía y Agricultura [citado 17 septiembre 2022]. Disponible en: <https://infoagronomo.net/?fbclid=IwAR39m6nyWrOv3kmeubSNkrCmXaEZimXXhzqYTAgzRbZWR042fTSk8xUcnI8>
14. U.S. Departamento de Agricultura [internet] FoodData Central Search Results. Com (2021). [citado en noviembre de 2021]. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170457/nutrients>.
15. Li, X., Xu, J. (2013). Lycopene Supplement and Blood Pressure: An Updated Meta-Analysis of Intervention Trials. *Nutrientes*, 5(9), pp. 3696-3712.
16. Waliszewski, K., Blasco, G. (2019). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud pública de Mexico*, 52(3), pp. 254-265.
17. Palomo, I., Moore-Carrasco, R., Carrasco, G., Villalobos, P., Guzmán, L. (2010). El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Idesia (Arica)*, 28(3), pp. 121-129.
18. Cruz-Bojórquez, R., González, J., Sánchez-Collado, P. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalario*, 28 (1), pp. 6-15.
19. Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., Pennock. D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta, FAO.
20. La calidad en frutas y hortalizas; capítulo 5 [internet]. Fao.org. 2021 [citado noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y4893s/y4893s08.htm>.
21. Casierra-Posada, F., Aguilar-Avenidaño, Ó. E. (2008). Calidad en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agronomía Colombiana*, 26(2), pp. 300-307.

22. Juárez-López, P., Castro-Brindis, R., Colinas-León, T., Ramírez-Vallejo, P., Sandoval-Villa, M., Reed, D. W., Cisneros-Zevallos, L., King, S. (2009). Evaluación de calidad de frutos de siete genotipos nativos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme). Revista Chapingo. Serie Horticultura, 15(spe), pp. 5-9.
23. Vivas, J. (2015). Estudio de la cadena alimentaria del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) para el desarrollo de una propuesta de mejoramiento productivo en la etapa de comercialización en el mercado de Iñaquito. (Tesis de licenciatura) Universidad Tecnológica General Mariano Escobedo, México.
24. Arrúa, A., Moura, J., Fernández, D., Casal, C. (2013) *Aspergillus* y Micotoxinas. Revista Médica, 2013(2), pp. 141- 164.
25. Bernal, R. (2010). Enfermedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) En invernadero en las zonas de salto y bella unión. Montevideo-Uruguay: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA.
26. OMS. [Internet] 2018. Aflatoxinas (pp. 1-6). FAO [citado 26 de mayo de 2021]. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_SP.pdf.
27. Martínez, M. M., Vargas del Río, L. M., Gómez Quintero, V. M. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. Biosalud, 12(2), pp. 89-109.
28. Micotoxinas. (2021). [citado 17 abril 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
29. Mendoza-Carrillo, J. (2020). Evaluación de la posible presencia de micotoxinas en mango fresco y procesado. Investigación Y Desarrollo En Ciencia Y Tecnología De Alimentos, 5, pp. 244-249.
30. Kyanko, M. V., Russo, M. L., Fernández, M., Pose, G. (2010). Efectividad del Acido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas. Información Tecnológica, 21(4), pp. 125-130.
31. Peña, D. (2007). La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. Salud Pública de México, 49(3), pp. 227-235.
32. Urrego Novoa, J., Díaz, G. (2006). Aflatoxinas: mecanismo de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Revista Facultad de Medicina. 54(2), pp. 108-116.

33. Cabrera, P., Fernández, A., Díaz, T., Bastidas, P., Molina, M., Bethencourt, A., Ascanio, E. (2006). Efecto teratógeno de la aflatoxina b1 sobre embriones murinos. *Agronomía Tropical*, 56(4), pp. 485-488.
34. Del Río, J., Moreno, C., Pinton, P., Mendoza, P., Oswald, I. (2007). Evaluación de la citotoxicidad de la aflatoxina y la fumonisina en células intestinales de porcino. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24, pp. 136-141.
35. Buchanan, J., Sommer, N., Fortlage, R. (1975) *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Production in Fig Fruits. *Applied Microbiology*, 30(2), pp 238-241.
36. Baiyewu, R., Amusa, N., Ayoola, O., Babalola, O. (2007). Encuesta de enfermedades postcosecha y contaminación por aflatoxinas de la fruta de papaya (*Carica papaya* L) comercializada en el suroeste de Nigeria. department of Microbiology, Olabisi Onabanjo University, P.M.B. 2002, Ago Iwoye. Ogun State Nigeria, pp. 178-181.
37. NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. México. 2002
38. FAO. (1995). CODEX STAN 193-1995 (Anexo 1). https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXS_193s.pdf
39. Guzmán, P. D., (2020). La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Revista de Salud Pública México*, 49(3), pp. 227-235.
40. Consejo Ejecutivo, 39. (1967). Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer: Informe sobre el Acuerdo de Residencia entre el Gobierno de Francia y la OMS. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/109473>.
41. Londoño, E. M., Martínez, M. M. (2017). Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Revista Biosalud*, 16(1), pp. 53-66.
42. Igbal, S. Z., Asi, M. R., Ariño, A. (2013). Aflatoxins. Stanley Maloy and Kelly Hughes, Eds. *Brenner's Encyclopedia of Genetics 2° Edition*, Vol 1. San Diego: Academic Press, pp. 43-47.
43. Carreño Venegas, A., Hurtado Guerra, J., Navas María, C. Exposición a aflatoxina: un problema de salud pública. *Exposition to aflatoxin: A public health problem. Iatreia*, 27(1), pp. 42-52.

44. Ortega, E., Carrera, M., Delgadil, D., Intriago, M., Lares, E., Quintanar, M. (2016) Asociación de la exposición ocupacional a plaguicidas organofosforados con el daño oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa. *Revista de Toxicidad*,33(1), pp. 39-43.
45. Badii, M. H., Landeros, J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *Revista CULCyT*, 4(19), pp. 21-34.
46. Ibarra, A. J., Valencia L. C., Castillo M. M., Manuel R. L., Borboa S. J., Mexia A. M., Ruiz S. N., (2019). Agroquímicos organofosforados y su potencial daño en la salud de trabajadores agrícolas del campo sonoreño. *Revista Ciencia ergo-sum*, 26(1), pp. 1-11.
47. Manual de Plaguicidas [Internet]. Plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr. 2020 [citado 27 May 2020]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/152-clorotalonil>.
48. Jozivan, F., Teixeira, E., Xavier, L., Martins, A., Fladiner, T. (2008). Extractos Vegetales en el control de plagas. *Revista Veracruzana*, 3(3), pp. 1-5.
49. Mesa, V., Marin, P., Ocampo, O., Calle, J., Monsalve, Z. (2019) Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de los hongos fitopatógenos *Revista de Investigación Agropecuaria*, 45(1), pp. 23-30.
50. Larez, V. C., (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Revista Avances en Química*,1(2), pp. 25-21.
51. Bautista-Baños, S., González-Soto, R., Ramos-García, M. (2018). Propiedades físicas de películas de quitosano adicionadas con aceite esencial de limón y su impacto en la vida de anaquel del jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 17(1), pp. 1-11.
52. Hernández-Lauzardo, A. N., Hernández-Martínez, M., Velázquez-del Valle, M. G. (2007). Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25 (2), pp. 109-113.
53. Alvarado, H. A., Barrera, N. L., Hernández, L. A., Vázquez, del V. M. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), pp. 127-134.

54. Ayala, A., Colina, M., Molina, J., Vargas, J., Rincón, D., Medina, J., Rosales, L., Cárdenas, H. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6), pp. 312-338.
55. Mendoza, G., Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*, 29, 161-186.
56. Moreno, N. (2017). Agrohomeopatía como alternativa a los agroquímicos. *Revista Médica de Homeopatía*, 10(1), pp. 9-13.
57. Aparicio-García, P. (2020). Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado. (Tesis de posgrado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
58. Martínez-González, M. (2019). Efectos de cubierta comestible con nanopartículas de quitosano y/o propóleo sobre la calidad y capacidad antioxidante de fresas (*fragaria x ananassa*). (Tesis de posgrado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
59. Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., Cuca, L.E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombia*, 26(1), pp. 97-106.
60. Kumar, A., P, N., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., Elobeid, T., S. K., Oz, F. (2023). Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. *Molecules*, 28, 887.
61. Okwu, D. E., A. Awurum y J. Okoronkwo (2007): Phytoquimical composition and in vitro antifungal activity screening of extract from citrus plant against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). *African Crop Science Conference Proceedings*, 8, pp. 1755-1758.
62. Dongmo, P. M., L. Tatsadjieu, E. Tchinda, J. Kuate y P. Amvam y C. Menut (2009). Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Agricultural Research*, 4, pp. 354-358.
63. Quiroz, C. J., Magaña, A. M. (2015). Resinas naturales de especies vegetales mexicanas: usos actuales y potenciales. *Revista Madera y Bosques*, 21(3), pp. 171-183.

64. Reyes, R. A., Cruz, L. J., Martínez, P. A., Marc, L. P., Ambriz, P. E., Sanchez, V. N (2019). Caracteres ecológicos y dendrométricos que influyen en la producción de resina en *Pinus oocarpa* de Michoacán, México. *Revista Madera y Bosques*, 25(1), pp. 1-13.
65. Arteaga, C. Y., Carballo, A. L., Tiomno, T. O., Casal, V. A., Tacoronte, M. J., Cruz, S. R. (2007). Resina de pino: química verde y potencialidades biológicas. *Revista Cubana de Química*, 19(1), pp. 90-93.
66. Pastor, C., Sanchez-Gonzalez, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Chafer, M., Gonzalez-Martinez, C. H. (2010). Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropyl-methylcellulose edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), pp. 64-70.
67. Correa-Pacheco, Z., Bautista-Baños, S., Valle-Marquina, M. A., Hernández-Lopez, M. (2016). The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth *in vitro* and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. *Journal Phytopathology*, 165, pp. 297-305.
68. Iglesias, D. (2012). Actividad Antifúngica *In Vitro* de Extractos Hidroalcohólicos de Hojas de *Citrus* spp. Frente a Hongos Fitopatógenos de *Lycopersicon esculentum* Mill. (Tesis de licenciatura) Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas Cuba.
69. Ramírez, Y. (2013). Actividad Antifúngica *In Vivo* de Extractos de *Citrus reticulata* Blanco y *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle Frente a *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous. (Tesis de licenciatura) Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas Cuba.
70. Amini, M. N., Safaie, M. J. (2012). Actividad antifúngica de tres aceites esenciales de plantas medicinales contra algunos hongos fitopatógenos. *Trakia Journal of Sciences*, 10, pp. 1-8.
71. Cortes-Higareda, M., Ramos-García, M. L., Correa-Pacheco, Z., Del Rio, J. C., Bautista-Baños, S. (2019). Formulaciones nanoestructuradas de quitosano/propóleo: Caracterización y efecto sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y producción de aflatoxinas. *Heliyon*, 5, e01776.
72. Juárez-Morales, L., A., Hernandez-Cocoletzi, H., Chigo-Anona, E., Aguila-Almanza, E., Tenorio-Arvide, G. (2017). Interacción quitosano-aflatoxinas B1, M1: un enfoque computacional. *Current Organic Chemistry*, 21, pp. 2877-2883.

73. Barkai-Golan, R. (2008). *Aspergillus* Micotoxinas. En *Micotoxinas en Frutas y Verduras*. Barkai-Golan, R., Paster, N., Eds.; Prensa académica: Cambridge, MA, EE. UU.; Elsevier: Ámsterdam, Países Bajos, pp. 115-151.
74. Gaviria-Hernández, V., Patiño-Hoyos, L. F., Saldarriaga-Cardona, A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de Castilla. *Ciencia y Tecnología. Agropecuaria*, 14, pp. 67-75.
75. Silva, M E., Schwan-Estrada, K. R. F., Balbi-Peña, M. I., Terumi, A., Clemente, E., Stangarlin, J. R. (2015). Control del moho azul en poscosecha de manzana con productos naturales. *Idesia*, 33, pp. 57-63.
76. Quintana-Obregón, E. A., Sánchez-Mariñez, R. I., Cortez-Rocha, M. O., González-Aguilar, G.A. (2017). Actividad antifúngica *in vitro* de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*. *Revista Mexicana de Microbiología*, 45, pp. 7-12.
77. Barroso, A. K., Ochoa, F.Y., Cerna, E., Toruch, M., Olalde, P.V., Robles, Y.L. (2021). Manejo *in vitro* de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8 (2), e3038.
78. Solano-Doblado, L.G., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Revista Española de Ciencias Químico-Biológicas*, 21 (2), pp. 30-42.
79. Corella M., Gálvez-Iriqui, A., Carvajal S., Castillón L., Cánez G., Oduño O. (2016). Evaluación antifúngica *in vitro* de *Gutierrezia sarothrae* (hierba del pasmo) contra *Aspergillus flavus* y determinación del contenido de fenoles totales. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), pp. 220-225.
80. Ruiz-López, L., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., Aguilar, V. F. A., Guerrero, R. C., Garza, O. S. (2005). Tratamiento postcosecha contra *Fusarium roseum* en melón reticulado (*Cucumis melo* L.) *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 6(2), pp. 110-116.

ANEXOS



SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA A.C.

El Comité Organizador del

**XIII CONGRESO INTERNACIONAL Y
LVIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD
MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA A.C.**



Otorga la presente

Constancia a:

**MARIO SEGURA-PALACIOS, MARGARITA RAMOS-GARCÍA, ZORMY
CORREA-PACHECO, SILVIA BAUTISTA-BOLAÑOS, MARÍA
RANGEL-CORONA**

Por su participación en la presentación del e-Póster titulado:

**Evaluación de productos naturales comerciales, cubiertas comestibles y
nanoestructuradas de quitosano sobre el desarrollo *Aspergillus flavus* y producción de
aflatoxinas *in vitro* y en jitomate**



Dra. Patricia Rivas Valencia

Presidencia

Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.
2020-2022

10 al 12 NOVIEMBRE 2021

"La fitopatología contribuyendo con la salud y seguridad alimentaria del campo mexicano"





El Comité Organizador del

**XIII CONGRESO INTERNACIONAL Y
LVIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD
MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA A.C.**

Otorga el presente

Reconocimiento

A: Mario Alberto Segura-Palacios, Margarita de Lorena Ramos García, Zormy Nacary Correa-Pacheco, Silvia Bautista Baños y María Luisa Rangel Corona

Por obtener el **2do. Lugar** en la categoría de Maestría con el trabajo titulado:

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES COMERCIALES, CUBIERTAS COMESTIBLES Y NANOESTRUCTURADAS DE QUITOSANO SOBRE EL DESARROLLO *Aspergillus flavus* Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS *IN VITRO* Y EN JITOMATE. [Evaluation of commercial natural products, edible chitosan and nanostructured chitosan coatings on the development of *Aspergillus flavus* and production *in vitro*, and in tomato, of aflatoxin].



Dra. Patricia Rivas Valencia
Presidencia
Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.
2020-2022

10 al 12 NOVIEMBRE 2021

"La fitopatología contribuyendo con la salud y seguridad alimentaria del campo mexicano"



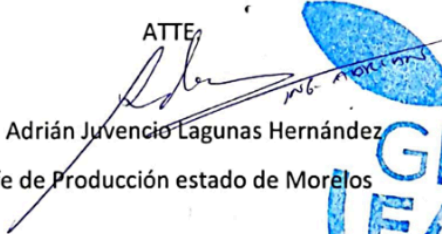
Miacatlán, Morelos a 22 de noviembre del 2021

A quien corresponda:

Se extiende la presente constancia a la Dra. Margarita de Lorena Ramos García, Dra. Silvia Bautista Baños, Dra. Patricia Rivas Valencia y LN. Mario Alberto Segura Palacios, por su participación en la impartición del taller de capacitación: **“Uso de extracto de cítricos y aceites esenciales en el manejo postcosecha de frutos de jitomate Saladette, efecto en el control de microorganismos patógenos y recomendaciones de uso”**. El taller se realizó el día 22 de noviembre del año en curso, en las instalaciones de empaque de la empresa productora de hortalizas Agrícola Green Earth, Miacatlán, Morelos.

Saludos cordiales.

ATE




Ing. Adrián Juvencio Lagunas Hernández
Jefe de Producción estado de Morelos



Escaneado con CamScanner

Article

Use of Natural Products on the Control of *Aspergillus flavus* and Production of Aflatoxins In Vitro and on Tomato Fruit

Mario Alberto Segura-Palacios ¹, Zormy Nacary Correa-Pacheco ² , Maria Luisa Corona-Rangel ²,
Ollin Celeste Martinez-Ramirez ¹, Dolores Azucena Salazar-Piña ¹ , Margarita de Lorena Ramos-García ^{1,*}
and Silvia Bautista-Baños ^{2,*}

¹ Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Calle Iztaccihuatl S/N, Col. Los Volcanes, Cuernavaca C.P. 62350, Mexico; mario.ln9424@gmail.com (M.A.S.-P.); ollin.martinez@uaem.edu.mx (O.C.M.-R.); azucena.salazar@uaem.mx (D.A.S.-P)

² Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yauatepec-Jojutla, km. 6.8, San Isidro, CEPROBI 8, Yauatepec C.P. 62731, Mexico; zcorreap@ipn.mx (Z.N.C.-P.); mlcr7@hotmail.com (M.L.C.-R.)

* Correspondence: margarita.ramosg@uaem.edu.mx (M.d.L.R.-G.); sbautis@ipn.mx (S.B.-B.)



Citation: Segura-Palacios, M.A.; Correa-Pacheco, Z.N.; Corona-Rangel, M.L.; Martinez-Ramirez, O.C.; Salazar-Piña, D.A.; Ramos-García, M.d.L.; Bautista-Baños, S. Use of Natural Products on the Control of *Aspergillus flavus* and Production of Aflatoxins In Vitro and on Tomato Fruit. *Plants* **2021**, *10*, 2553. <https://doi.org/10.3390/plants10122553>

Academic Editors: Jesús Martín-Gil, Vicente Gonzalez Garcia and Pablo Martín-Ramos

Received: 19 October 2021

Accepted: 18 November 2021

Published: 23 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Aspergillus flavus* affects fresh and dry fruit and vegetable products, and its toxic metabolites, namely aflatoxins, cause serious damage in humans. The objective of this research study was to evaluate the effect of commercial natural products as well as edible and nanostructured chitosan coatings on the development of *A. flavus* and on the production of aflatoxins in vitro and in tomato. Treatments were as follows: chitosan 1%, chitosan coating, chitosan nanostructured coating, Citrocover 1% (citrus seed extract), Resinadher 0.5% (pine resin extract), mancozeb 2%, and water. The variables were as follows: halo inhibition, spore production, and aflatoxins content. In fruit, the following were evaluated: disease incidence, mycelial growth, and aflatoxin production. An ANOVA (Tukey: $p < 0.05$) was used. In vitro results showed that Citrocover and Resinadher reduced sporulation (0.2 and 0.9×10^5 spores mL^{-1} , respectively), while chitosan inhibited the production of aflatoxins. With Resinadher and Citrocover, tomato fruit had the lowest incidence, mycelial growth, and aflatoxin production with corresponding values of 0%, 0.0 cm^2 , and 0.95 ppb, respectively, and 7%, 0.2 cm^2 , and 1.77 ppb, respectively. The use of Citrocover and Resinadher could be a viable alternative to decrease the development of *A. flavus* in tomato fruit.

Keywords: mycotoxins; coatings; nanoparticles; chitosan; citrus seed extract; pine resin extract

1. Introduction

Tomato is a perishable fruit and can be contaminated by microorganisms mainly during storage. This is due to the high storage temperatures, increase in relative humidity, and increase in contact with fruit contaminated with microorganisms. The fungi *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Aspergillus flavus* can contaminate tomatoes during storage, causing physical damage to the fruit. *Aspergillus flavus*, in addition to causing physical damage to the fruit, also produces toxic secondary metabolites for the human body called aflatoxins [1]. The consumption of aflatoxins has been confirmed to have carcinogenic, toxic, and mutagenic activity in humans and animals [2,3].

Many papers have reported the contamination of *A. flavus* with products such as corn, peanuts, pistachios, Brazil nuts, cotton seeds, grated dried coconut, sunflower seeds, soybeans, and nuts [4]. However, its presence in fresh fruit and vegetables has recently been reported. Buchanan et al. [5] carried out an investigation in figs contaminated by *A. flavus* and reported the presence of aflatoxins in all the ripening stages of the fruit, in which the concentrations were higher when the fruit was fully ripe (28 $\mu\text{g/g}$ of fruit). Additionally, Baiyewu et al. [6] reported the presence of *A. flavus* and aflatoxins in papaya fruit, especially in those showing symptoms of microorganisms' infection, while Maroutti [7] reported the



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

24/03/2023

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el C. Mario Albero Segura Palacios, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10036911, y que lleva por título “Evaluación de cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano y extractos naturales comerciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*, producción de aflatoxinas y atributos de calidad en frutos de jitomate.” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez
Sinodal



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2023-03-24 11:26:00 | Firmante

nTkABvCV/+CTKLO2nbNgnpP44QmFnOnjaXQKa5hqtZ+yBHnCGmWBGh14fUS530vEYcDqqOSk+mnpvE/g9VjogNvIA09w7wWHKHMKEAJ7TopPTOLKmnyJpDoQuw/GCVN6i
TtQ4HWJ70eKNnNLaWUB5CUGkN1Lnyi0oaMzvPqObVSq83ssBz4OjE+HpfXkdwDTwAo99yMCDA1Yx0bWl1bjSKZ4BDhM6HYD5GAvJzCb48O8uwMnlVBcrmxk6D/YeKpCCIP
RL82IzZTZUzyFpTa1WYIQXK6oUKdnW3TQjzPkH6Pp84N42TivsyLZRK8YAPv3wTIRwWtb+RcBOVRK4Z5iA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[0kvqtRZXJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4rTeOe0EAythN01cvX4kk7Jpp0QwnZpU>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Mario Albero Segura Palacios, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10036911, y que lleva por título “Evaluación de cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano y extractos naturales comerciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*, producción de aflatoxinas y atributos de calidad en frutos de jitomate.” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de marzo de 2023.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2023-03-27 15:19:24 | Firmante

u1YoA3svEmrtvutNqTKsR1Qsdi+GKtb8wu4RgaPtlIIITaOysYpXlzn3Oo3RagNRHNbMCRaBe00Ur8uF1+BvNpq5VjEqXszd5ObmeSS8hEgxYiBRoZbL4Pa1JXxSiSKfF7rBjl8aTmbdQSxLNNyO+sl9gGcHNlwUC2JvqRmWYILv/Bw7L+Lsk3gMIFCkOLOXPdG55XsF60CO32LvhIMvFqool+4elH4Oumey19InT2roEsOFUnTnex8MCckLKPQ5ufCHpfrILGBa1rRSX3EapQxn5TCOfy4X8O2bBiiTEsF5fM+/GountWjjPJGSt8MP95yWXUkRhF9T5YArY/Wvsg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



CeNFI6H51

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FoHg10scVJvnPvBnijXoUehlUTOA6cH3>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Mario Albero Segura Palacios, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10036911, y que lleva por título “Evaluación de cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano y extractos naturales comerciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*, producción de aflatoxinas y atributos de calidad en frutos de jitomate.” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. América Ivette Barrera Molina
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de marzo de 2023 .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA | Fecha:2023-03-23 10:51:22 | Firmante

tcu9rRMuA28ZGJDx3eYFmLWBUz19ElrkXwLGi5dmSCQctZhJog5SuZ7Ge6W8G7KEHth5XiYXrCqipSpVwSB0Zif8VDvKLwZLZAZm5gaBwJK5MGxZTwh5rVneeHn4rJ2rdUC9N
FUagASoglgLvRKSUxkkZiJe+zFQ7VrBfuRxVM5udQ9Rxxpff2fR19fEKMVeKHtOU7IIRm1vfvZocsVGDuD+qzTartGWld+z03Bh/ZiVa9c554v3JQXX+EG9sywnvdtuukT47wy3KqW
xjhn9Ec57B7VSY+QTDpi54/sxCxOnXKVuEj7mkyC4UY+xJfLI849Tx50QvK76U+mV3UrVQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[eHzOfYAvb](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5GKBfpigqGqBZzz8zh27Qs8EtYZM5KJn>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

1. Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Mario Albero Segura Palacios, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10036911 , y que lleva por título “Evaluación de cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano y extractos naturales comerciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*, producción de aflatoxinas y atributos de calidad en frutos de jitomate.” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:
 - I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.
2. Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente
Por una universidad Culta
Una Universidad de Excelencia

Dr. Héctor Sotelo Nava
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de marzo de 2023 .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HECTOR SOTELO NAVA | Fecha:2023-03-28 15:59:07 | Firmante

bON5ALW8aND8eLKiuJCZMBgyAvR9daDyUY65qllFSah63uJqelyAKcSDqTay2iF1/XYdxi69g+/sqIM62CO1Lbwro3UWeIr1RetM3Wfw0qKFUPqxcGO5cPHT8f5IlgAVDS7OpW77R
GmjqpYNM4yfPDkqEm16usrOFhZomav5AepA3bhN5KJdMEfUryTDNbSybhnc2/umUAI1aMfq5P0hNx9B/o106La1JqGPEINR2SU4fbm2+QYGvb7Fhcwu9jHQBJ9oW5GlqNRzBAf
TnGap58JohEzDEydDpu33+jCIHvz/QsDa8Ys+z0oNVOOnzFI+dEO1OjFC/ZiHoykdKgMqSg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[dOI3bXs4r](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1pVRlemMnN7Y3lxbxNyGCP6nlZJFHhLDK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Mario Albero Segura Palacios, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10036911, y que lleva por título “Evaluación de cubiertas comestibles y nanoestructuradas de quitosano y extractos naturales comerciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*, producción de aflatoxinas y atributos de calidad en frutos de jitomate.” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de marzo de 2023.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2023-03-27 15:19:24 | Firmante

u1YoA3svEmrtvutNqTKsR1Qsdi+GKtb8wu4RgaPtlIIITaOysYpXlzn3Oo3RagNRHNbMCRaBe00Ur8uF1+BvNpq5VjEqXszd5ObmeSS8hEgxYiBRoZbL4Pa1JXxSiSKfF7rBjl8aTmbdQSxLNNyO+sl9gGcHNlwUC2JvqRmWYlLv/Bw7L+Lsk3gMIFCkOLOXPdG55XsF60CO32LvhIMvFqool+4elH4Oumey19InT2roEsOFUnTnex8MCckLKPQ5ufCHpfrILGBa1rRSX3EapQxn5TCOfy4X8O2bBiiTEsF5fM+/GountWjjJGSt8MP95yWXUkRhF9T5YArY/Wvsg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



CeNFI6H51

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FoHg10scVjvnPvBnijXoUehlUTOA6cH3>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CORREA PACHECO ZORMY NACARY | Fecha:2023-03-29 21:05:44 | Firmante

nC0im9IVClt3F/hzqP0eTh3WvsGgXly9YJF7f0DmS3f4FpG+udqZ3OYUZRDz1a9q2vuFjYC94szEyJsTk+FqPNsHJTPcnwg/DGHeAIMNGpgejcVzVCIxnfkUEhY9DjD8zAxdGI7CaG
EPbHMeyrjXvdG9HZ9rPhRC6czJc4pTWRMxkNJ2mlajlXdArnt+59WMWfcrUggOfiYQ1xbzFSxV1QmZWSjtsYZ9nk2JQ5DI665KI3RNaccUrDFplcwm2JWqZpUtEg6lUiQi7nWuuL8
/g8o7sAq9Jbg6ywa0BGNb9ZgYSE/h2Br8xyi2QYZj|xtcwuRVhA4TfeydkJyQbQS3w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[yPgze1Uk](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BlvOV8EiVu8hS45HUV9NPxuN5XoSTmKa>

