# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**


## Aplicación de un recubrimiento de quitosano combinado con aceite esencial para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya

# TESIS

**Que presenta**


**IBQ.YESENIA GUADALUPE URIARTE GASTELUM**


**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIA**

**Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Director**

**DR. MISAEL ODÍN VEGA GARCÍA**


**Culiacán, Sinaloa, México** **Octubre de 2018**

El presente trabajo titulado “Aplicación de un recubrimiento de quitosano combinado con aceite esencial para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya” se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha del programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en el Laboratorio de Microscopía e Imagenología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Misael Vega García y contó con la asesoría del Dr. Armando Carrillo López y la Dra. Lidia Elena Ayón Reyna, así como la colaboración de la Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz y el MC. Daniel Tapia Maruri.

# *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA*

## *CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 26 del mes Septiembre del año 2018, el (la) que suscribe Yesenia Guadalupe Uriarte Gastelum alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0529148-8, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Misael Odín Vega García y cede los derechos del trabajo titulado "Aplicación de un recubrimiento de quitosano combinado con aceite esencial para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Yesenia Guadalupe Uriarte Gastelum

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Misael Odín por permitirme realizar el proyecto en su laboratorio y ser una más en su equipo de trabajo. Gracias por siempre apoyarme y aconsejarme en cada decisión que quería tomar tanto en lo laboral como en lo personal. También le agradezco por los regaños que me ayudaron a aclarar ideas y siempre depositar su confianza en mi pasar sacar adelante este proyecto, aun cuando pensaba que no podría. Gracias.

A mi fabulosa asesora, la Dra. Lidia Elena, quien gracias a ella se dio forma a este gran proyecto. Gracias por compartir tu conocimiento conmigo y siempre estar en entera disponibilidad para despejar cada duda que surgía. También por ayudarme a crecer día con día durante estos dos años con cada consejo, felicitación y sonrisa que me ofrecías.

También quiero agradecer a la Dra. Martha Edith por estar siempre al pendiente de mí y mi proyecto, por su disponibilidad, por escucharme y aconsejarme cuando más lo necesitaba. Gracias por siempre darme ánimos en los momentos más frustrantes y tristes que pase. También agradezco al Dr. Armando Carrillo por todo el apoyo y las facilidades que me otorgo para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Jordi, Denisse, Blanca, Andrés, Wendy, Karla, gracias por ayudarme a sacar adelante este proyecto y tomarse el tiempo de ayudarme. Gracias por compartir conmigo tantas anécdotas, experiencias, risas y un poco de bullying. Los quiero.

A mis compañeros de generación, Carolina, Jordi, Cinthia, Jazmín, Fernanda, Martín, Demis, Aliette, Judith, Maribel, Carlos, Julio, Santos y Samuel, gracias por tantos momentos felices que pasamos juntos, por permanecer unidos estos dos años y compartir tantas anécdotas. Doy gracias al destino por haberlos conocido y puesto en mi camino, saben que siempre tendrán una amiga en mí. Los quiero mucho.

Agradezco a mis inseparables amigas y amigo, Karely, Karla, Ale, Isma, por siempre apoyarme y estar a mi lado cuando más lo necesitaba, gracias por aconsejarme y siempre subirme el ánimo. Saben que son parte importante en mi vida, los amo.

También agradezco a una persona muy especial que se volvió a cruzar en mi camino para darme su apoyo incondicional, su amor y mucha felicidad, Benjamín. Gracias por acompañarme siempre durante este reto. Te amo.

Y agradezco infinitamente a las personas más importantes en mi vida, MI FAMILIA, sin ellos nada de esto sería posible, siempre están conmigo en las buenas y en las malas, dándolo todo por mí. LOS AMO.

## Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis inigualables padres, quienes siempre me apoyan y me quieren por sobre todas las cosas. Espero que se sientan orgullosos de mí, así como yo lo estoy de ustedes.

LOS AMO

## ÍNIDICE GENERAL


I. RESUMEN ..... 1
ABSTRACT ..... 3
II. INTRODUCCIÓN ..... 4
III. REVISIÓN DE LA LITERATURA ..... 7
A. PAPAYA ..... 7
1. Clasificación taxonómica ..... 7
2. Origen y distribución ..... 7
3. Aspectos Botánicos ..... 9
4. Composición química y nutrimental ..... 10
5. Producción e importancia económica ..... 13
6. Manejo poscosecha de papaya ..... 15
7. Pérdidas poscosecha de papaya ..... 18
B. ENFERMEDADES POSCOSECHA ..... 19
1. Antracnosis ..... 20
C. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN ..... 23
1. Recubrimientos comestibles ..... 24
a. Quitosano ..... 26
b. Aceites esenciales ..... 33
IV. JUSTIFICACIÒN ..... 38
V. HIPÓTESIS ..... 40
VI. OBJETIVOS ..... 41
A. OBJETIVO GENERAL ..... 41
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 41
VII. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 43
A. ETAPA 1 ..... 43
1. Materiales ..... 43
a. Aislamiento e identificación del hongo ..... 43
b. Aceites esenciales y quitosano ..... 43
2. Métodos ..... 44
a. Preparación del inóculo ..... 44

b. Ensayos preliminares *in vitro* e *in vivo* para la detección del aceite esencial y la concentración con mayor actividad antifúngica ..... 44
1) Crecimiento micelial del hongo ..... 44
2) Obtención y preparación de los frutos ..... 46
3) Severidad ..... 47
B. ETAPA 2 ..... 47
1. Materiales ..... 47
a. Obtención de los frutos ..... 47
2. Métodos ..... 47
a. Preparación de las dispersiones formadoras de los recubrimientos ..... 47
b. Aplicación de los tratamientos ..... 48
c. Actividad antifúngica *in vitro* de los tratamientos ..... 49
1) Germinación de conidios ..... 49
2) Efecto fungistático / fungicida ..... 50
d. Actividad antifúngica *in vivo* de los tratamientos ..... 50
1) Incidencia ..... 50
2) Severidad ..... 51
e. Análisis de calidad ..... 51
1) Pérdida de peso ..... 51
2) Firmeza ..... 51
3) Color externo ..... 52
4) Sólidos solubles totales ..... 52
f. Capacidad antioxidante ..... 52
1) Ensayo ABTS ..... 52
2) Ensayo DPPH ..... 53
g. Análisis nutricional y compuestos bioactivos ..... 54
1) Vitamina C ..... 54
2) Fenólicos totales ..... 55
h. Desarrollo de la enfermedad ..... 55
1) Microscopía electrónica de barrido (MEB) ..... 55
i. Análisis estadístico ..... 56
VIII. RESULTADOS ..... 57
A. ETAPA 1 ..... 57

1. **Identificación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*** ..... 57
2. **Selección del mejor aceite esencial y su concentración mínima inhibitoria (CMI)** 60
a. **Crecimiento micelial** ..... 60
b. **Severidad** ..... 63
B. **ETAPA 2** ..... 66
1. **Actividad antifúngica *in vitro* de los tratamientos** ..... 66
a. **Crecimiento micelial** ..... 66
b. **Germinación de conidios** ..... 71
c. **Efecto fungistático / fungicida** ..... 74
2. **Actividad antifúngica *in vivo* de los tratamientos** ..... 77
a. **Incidencia de antracnosis** ..... 77
a. **Severidad** ..... 80
3. **Análisis de calidad** ..... 84
a. **Pérdida de peso** ..... 84
b. **Firmeza** ..... 87
c. **Luminosidad externa (L*)** ..... 90
d. **Ángulo de matiz (H°)** ..... 93
e. **Sólidos solubles totales** ..... 94
4. **Análisis nutricional y compuestos bioactivos** ..... 97
a. **Ácido ascórbico** ..... 97
b. **Fenólicos totales** ..... 100
5. **Actividad antioxidante** ..... 102
a. **ABTS** ..... 102
b. **DPPH** ..... 105
6. **Análisis microestructural del área infectada** ..... 107
a. **Microscopía electrónica de barrido** ..... 107
IX. **CONCLUSIONES** ..... 114
X. **BIBLIOGRAFÍA** ..... 116
**ABREVIATURAS** ..... 145
**ANEXOS** ..... 147

## ÍNDICE DE FIGURAS


| Fig | Descripción | Pág. |
|---|---|---|
| 1 | Planta y frutos de papaya. | 9 |
| 2 | Índices de madurez de la papaya (cv. Maradol). | 14 |
| 3 | Síntomas de la enfermedad de antracnosis en papaya. | 20 |
| 4 | Propiedades de los recubrimientos comestibles. | 25 |
| 5 | Mecanismo de desacetilación de la quitina para obtener quitosano. | 27 |
| 6 | Diagrama del procesamiento de imágenes en el software ImageJ. | 47 |
| 7 | Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de papayas infectadas con antracnosis, teñidas con azul de lactofenol. | 58 |
| 8 | Secuencia de bases de *Colletotrichum gloeosporioides* según la base de datos NCBI Handbook. | 60 |
| 9 | Inhibición del crecimiento radial micelial de los 5 aceites esenciales contra *Colletotrichum gloeosporioides*. | 62 |
| 10 | Severidad de antracnosis en papaya tratada con aceites esenciales durante un periodo de almacenamiento de 20 días a 12 °C | 66 |
| 11 | Sintomatología de antracnosis en papayas inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratadas con aceites esenciales durante su almacenamiento a 12°C por 20 días. | 68 |
| 12 | Inhibición del crecimiento micelial de los tratamientos control, Q, AEM y Q+AEM contra *Colletotrichum gloeosporioides* durante un | 70 |

periodo de incubación de 7 días a 25 °C.

13 Inhibición de la germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* de los tratamientos control, Q, AEM, Q+AEM durante un periodo de incubación de 6 horas a 25 °C. 74

14 Incidencia de la enfermedad de antracnosis en frutos de papaya tratados con Q, AEM y Q+AEM durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. 79

15 Severidad de antracnosis en frutos de papaya tratados con Q, AEM y Q+AEM durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. 82

16 Visualización de la severidad de antracnosis en frutos de papaya a lo largo del periodo de almacenamiento a 12 °C utilizando los diferentes tratamientos. 84

17 Efecto de la aplicación de un recubrimiento de Q, AEM y Q+AEM sobre el porcentaje de pérdida de peso en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. 87

18 Efecto de la aplicación de un recubrimiento de aceite Q, AEM y Q+AEM sobre la firmeza en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. 90

19 Efecto de la aplicación de un recubrimiento de aceite Q, AEM y Q+AEM sobre los valores de luminosidad y ángulo de matiz en 93

frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C.

20 Efecto de la aplicación de un recubrimiento de aceite Q, AEM y Q+AEM sobre los valores de sólidos solubles totales en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. 97

21 Efecto de la aplicación de un recubrimiento de aceite Q, AEM y Q+AEM sobre el contenido de compuestos fenólicos totales y vitamina C de frutos de papaya cv. Maradol inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C 100

22 Efecto de la aplicación de un recubrimiento de aceite Q, AEM y Q+AEM sobre la capacidad antioxidante obtenida por el método de ABTS y DPPH en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. 106

23 Imágenes de MEB de papayas no recubiertas y recubiertas a los 0 y 1 días de almacenamiento. 111

24 Imágenes de MEB de esporas e hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya Maradol. 113

## ÍNDICE DE CUADROS


| Cuadro | Descripción | Pág. |
|---|---|---|
| 1 | Clasificación taxonómica de la papaya (*Carica papaya* L.) | 6 |
| 2 | Composición química y nutrimental de la papaya (contenido en 100 g de porción comestible) | 10 |
| 3 | Principales países productores de papaya en 2017 | 12 |
| 4 | Efecto fungistático o fungicida de los tratamientos control, Q, AEM y Q+AEM contra *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, durante un periodo de incubación de 7 días a 25 °C. | 72 |

# I. RESUMEN

La papaya (*Carica papaya* L.*)* es un fruto de amplio consumo en México y en el mundo debido a su sabor placentero y a sus propiedades nutrimentales. Su cultivo se realiza durante todo el año, por ello resulta beneficioso para la mayoría de los productores. Este fruto debe manipularse con mucho cuidado al momento de la cosecha ya que es muy sensible y perecedero y puede sufrir daños mecánicos que provocarían una disminución de su calidad, pérdidas poscosecha y el desarrollo de enfermedades producidas por hongos y bacterias.

La antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides,* es considerada la enfermedad fúngica más importante en frutos de papaya ya que genera grandes volúmenes de pérdidas poscosecha. Una alternativa utilizada para su control es la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, su uso constante genera resistencia en el patógeno y además produce daños al medio ambiente y a la salud humana. El uso de productos naturales con propiedades antimicrobianas, como el quitosano y los aceites esenciales, ha mostrado ser eficiente para reducir el desarrollo de antracnosis. Los aceites esenciales tienen estas propiedades dado que su hidrofobicidad, les permite dividirse en los lípidos de la membrana celular bacteriana y las mitocondrias, alterando las estructuras y haciéndolas más permeables. Por su parte, las propiedades antimicrobianas del quitosano se deben a que induce la producción de enzimas de defensa y fitoalexinas. Dadas estas consideraciones, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un recubrimiento elaborado con quitosano en combinación con aceite esencial

para inhibir el desarrollo de antracnosis y mantener la calidad poscosecha en frutos de papaya durante su almacenamiento comercial.

## ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit widely consumed in México and the world because of its pleasant taste and its nutritional properties. Its cultivation takes place throughout the year, which is why it is beneficial for many producers. This fruit must be handled with great care at the time of harvest as it is very sensitive and perishable and may suffer mechanical damage that would cause a decrease in quality, post-harvest losses and the development of diseases caused by fungi and bacteria.

Anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, is considered the most important fungal disease in papaya fruits since it generates large volumes of post-harvest losses. An alternative used for its control is the application of synthetic fungicides; However, its constant use generates resistance in the pathogen and also damages the environment and human health. The use of natural products with antimicrobial properties, such as chitosan and essential oils, has been shown to be efficient in reducing the development of anthracnose. Essential oils have these properties since their hydrophobicity allows them to divide into the lipids of the bacterial cell membrane and mitochondria, altering the structures and making them more permeable. On the other hand, the antimicrobial properties of chitosan are due to the fact that it induces the production of defense enzymes and phytoalexins. Given these considerations, the objective of this work was to evaluate the effect of the application of a coating made with chitosan in combination with essential oíl to inhibit the development of anthracnose and maintain post-harvest quality in papaya fruits during commercial storage.

# II. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto climatérico de sabor agradable que se cultiva durante todo el año en regiones tropicales y subtropicales, por lo cual, es una opción excelente desde una perspectiva socioeconómica para los países que la producen (Oliveira y Vitória 2011). A nivel mundial, México ocupa el quinto lugar en producción y es el principal exportador (SAGARPA 2017). Su principal forma de consumo es en fresco, aunque también puede utilizarse para la elaboración de jugos y mermeladas (Pino 2015). Este fruto ha ganado interés en el mercado por ser una buena fuente de compuestos bioactivos con alta capacidad antioxidante, dentro de los que se incluyen los carotenoides y algunas vitaminas como B1, B2, B3, B6, C y K. Durante su almacenamiento los frutos pueden sufrir deterioro en su calidad ya que la papaya es altamente susceptible a daños mecánicos, fisiológicos y microbianos (Ayón-Reyna y col 2015), lo que resulta en pérdidas poscosecha y económicas. Estos problemas generalmente son causados por diversos factores como una manipulación inadecuada, un proceso acelerado de maduración, condiciones ambientales, infecciones microbianas y presencia de plagas (Kasso y Bekele 2016).

La susceptibilidad de los frutos de papaya a enfermedades es la principal causa de las pérdidas poscosecha durante su manipulación y almacenamiento (Al Eryani-Raqeeb y col 2009). La enfermedad poscosecha más común es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y se conoce con el nombre de antracnosis. Con el fin de reducir la presencia de este hongo se han aplicado fungicidas químicos sintéticos; sin embargo, su uso conlleva a la resistencia del hongo si se utilizan por periodos prolongados (Ali y col 2015); además, representan un riesgo para la salud

de los consumidores ya que pueden permanecer residuos en la fruta (Ayón-Reyna y col 2017). Por esta razón, es necesario buscar algunas alternativas a los químicos sintéticos que reduzcan la deterioración por patógenos y prolonguen la vida de anaquel de los frutos durante su mercadeo (Ayón-Reyna y col 2015).

Recientemente se ha implementado el uso de productos naturales no tóxicos y amigables con el medio ambiente, como el quitosano, que ha demostrado tener propiedades antifúngicas, antibacterianas y ser un buen formador de recubrimientos (Rico y col 2012). Otros productos naturales con capacidad de controlar el crecimiento fúngico son los aceites esenciales (Ali y col 2015). Algunos estudios han demostrado un efecto sinérgico de los aceites esenciales y el quitosano para impedir el desarrollo microbiano, como el reportado por López-Mata y col (2012) quienes evaluaron un recubrimiento elaborado a base de quitosano al 1% y aceite esencial de canela al 0.1% para prolongar la vida de anaquel de fresas, observando una disminución en el desarrollo microbiano en los frutos tratados en comparación con los no tratados. También, Xing y col (2011a) aplicaron un recubrimiento elaborado a base de quitosano y aceite esencial de canela para inhibir la enfermedad del moho azul causado por *Penicillium citrinum* en frutos de jujube. Ellos encontraron que el recubrimiento elaborado a base de quitosano al 1% y aceite esencial de canela al 0.75% fue el más efectivo para inhibir el desarrollo del hongo durante su almacenamiento a 25°C por 3 días y 4 °C por 20 días.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un recubrimiento elaborado a base de quitosano solo y en combinacion con un aceite esencial, seleccionado de 5 diferentes (albahaca, canela, clavo, menta y té de

limón) para inhibir el desarrollo de la antracnosis en frutos de papaya y mantener la calidad poscosecha durante su almacenamiento comercial.

# III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

## A. PAPAYA

La papaya es una fruta nativa de América, pero actualmente se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales. A pesar de ser altamente perecedera (Maqbool y col 2011), es muy popular entre los consumidores por su alto contenido en azúcares, vitamina C y antioxidantes como los carotenoides, los cuales pueden ayudar a disminuir enfermedades degenerativas, como el cáncer, enfermedades del corazón y arterioesclerosis (Ali y col 2015; Pino 2015). Además del consumo en fresco, otro de sus usos es en la industria de los alimentos como ablandador de carnes y clarificador de cerveza, también se utiliza en la industria farmacéutica, cosmética, textil, manufacturera de papel, adhesivos, entre otros (SAGARPA 2010).

### 1. Clasificación taxonómica

La papaya pertenece a la familia Caricaceae, al género Carica y a la especie *papaya* L, como se muestra en el **Cuadro 1** (CONABIO 2017). La principal variedad producida a nivel mundial es Solo, también conocida como papaya Hawaiana (IFAS, 2015). Entre las variedades más conocidas están la Maradol, Amarilla, Roja y la Amameyada (CONABIO 2017).

### 2. Origen y distribución

Se cree que la papaya es nativa del sur de México y América Central. Actualmente se cultiva en una gran cantidad de países, como India, Brasil, Nigeria,

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de la papaya (*Carica papaya* L.)

| | |
|---|---|
| **Reino** | **Plantae** |
| **División** | Magnoliophyta |
| **Clase** | Magnoliopsida |
| **Orden** | Violales |
| **Familia** | Caricaceae |
| **Genero** | *Carica* |
| **Especie** | *Papaya* |

Fuente: CONABIO (2017)

Indonesia, Venezuela y México, siendo éstos los principales productores (FAOSTAT 2018). La papaya fue descubierta por primera vez en 1526 en las costas panameñas y colombianas por el cronista francés Oviedo. Debido a sus abundantes semillas y a su viabilidad, el fruto se propagó rápidamente en los trópicos (FAO 2003).

Los conquistadores españoles iniciaron la expansión en los años 1500 y 1600, la fruta ya se producía en regiones cálidas como en América Central, Florida, Bahamas, entre otros. En 1978 se introdujeron a México las primeras semillas de la variedad Maradol a través de CONAFRUT (Comisión Nacional de Fruticultura) en el estado de Xalapa, Veracruz (FAO 2003).

## 3. Aspectos Botánicos

El fruto de papaya es del tipo baya alargada de varios tamaños, con una cáscara delgada y lisa de color verde-amarillo. Tiene una pulpa gruesa con colores que van desde el amarillo al rojo, con un agradable sabor dulce (Oliveira y Vitória 2011). El árbol de papaya y las frutas verdes producen látex, el cual permanece aislado en las células lactíferas. Cuando estas células se rompen, ocurre la coagulación y esto representa un importante mecanismo de defensa de la planta contra patógenos y otros ataques dañinos (Oliveira y Vitória 2011).

El fruto puede llegar a medir de 10 a 30 cm de largo y 15 cm de ancho (CONABIO 2017), y su peso se encuentra entre 400 g y 6 kg, estos valores dependen de la variedad y de la posición en la planta (SAGARPA 2010). Este fruto tiene una ranura

en la parte superior, su color varía del verde amarillento al anaranjado cuando alcanza su madurez. Sus semillas son de color negro y están rodeadas por un anillo transparente de consistencia gelatinosa (**Figura 1**) (CONABIO 2017).

En el caso de la papaya Maradol, este cultivar es de tipo ginodióico (compuesto por plantas hermafroditas y femeninas) y sus frutos son alargados, cilíndricos, de gran tamaño y pueden pesar entre 1 y 3 kg. Su cáscara es delgada y lisa, la pulpa es de color roja o amarilla y su sabor no es tan dulce como el de otras variedades (SAGARPA 2010).

## 4. Composición química y nutrimental

Los frutos de papaya contienen alrededor de 85% de agua, de 10 a 13% de azúcares y 0.6% de proteínas (**Cuadro 2**) (FAO 2017). Son una buena fuente de calcio y de vitaminas A, $B_1$, $B_2$ y C. En el caso de la vitamina C, su contenido es de 35.4 a 187 mg/100 g dependiendo del cultivar, estado de madurez y fecha de cosecha. Otras sustancias importantes presentes son los compuestos fenólicos y carotenoides. Los compuestos fenólicos más abundantes son el ácido ferúlico, cafeico y rutina y para el caso de los carotenoides, los más abundantes son licopeno, β-criptoxantina y β-caroteno, y su contenido está asociado al estado de madurez y temperatura de almacenamiento (Oliveira y Vitória 2011; Bautista-Baños y col 2013; Simmonds y Preedy, 2016). Los valores en la composición nutricional dependen de la variedad, condiciones de crecimiento y madurez de consumo. Los principales azúcares que componen al fruto son glucosa, sacarosa y fructosa; la glucosa se encuentra en mayor cantidad durante los primeros estados de desarrollo, mientras

**Figura 1**. Planta y frutos de papaya

Fuente: CONABIO (2017)

**Cuadro 2.** Composición química y nutrimental de la papaya.

| Composición | Contenido (100 g de porción comestible) |
|---|---|
| **Humedad, %** | 88.8 |
| **Proteínas, %** | 0.6 |
| **Grasa, %** | 0.1 |
| **Cenizas, %** | 0.6 |
| **Carbohidratos, %** | 9.9 |
| **Potasio (K), mg** | 257 |
| **Calcio (Ca), mg** | 24 |
| **Fósforo (P), mg** | 5 |
| **Hierro (Fe), mg** | 0.1 |
| **Vitamina A, mg** | 21 |
| **Vitamina C, mg** | 62 |

Fuente: FAO (2017)

que, en los estados finales de maduración, predominan azúcares como la sacarosa y fructosa. Los frutos maduros contienen cientos de compuestos volátiles, incluyendo numerosos ésteres que son los responsables de su aroma característico (Oliveira y Vitória 2011).

## 5. Producción e importancia económica

La producción de papaya se encuentra localizada en países tropicales y subtropicales (FAO 2003). Su cultivo requiere labor durante todo el año, lo que la ha convertido en una excelente opción desde una perspectiva socioeconómica en los países que la producen (Oliveira y Vitória 2011).

La importancia de la papaya en la economía mexicana está demostrada por su amplia distribución y producción en regiones tropicales en el país (Oliveira y Vitória 2011). En el 2016, México ocupó el quinto lugar a nivel mundial (FAOSTAT 2018) con una producción anual que superó las 883 mil toneladas (**Cuadro 3**) y el primer lugar en exportación, con ventas anuales superiores a los 78 millones de dólares (SAGARPA 2017; 2017a). Los principales estados productores de este fruto fueron Oaxaca, Veracruz y Chiapas, en los que se cosechó el 61% del volumen nacional (SIAP 2018). En los últimos años, los estados de Puebla y México se han sumado a la producción de este fruto, siendo Maradol la principal variedad que se cultiva en México (Granados y col 2015).

**Cuadro 3.** Principales países productores de papaya en 2017

| Países | Producción (Toneladas) |
|---|---|
| India | 5,699,000 |
| Brasil | 1,424,650 |
| México | 951,922 |
| Indonesia | 904,284 |
| República Dominicana | 863,201 |
| Nigeria | 836,702 |
| República Democrática del Congo | 215,263 |
| Cuba | 212,579 |
| Colombia | 188,305 |
| Tailandia | 169,942 |

Fuente: FAOSTAT (2018)

## 6. Manejo poscosecha de papaya

Los requerimientos de los frutos para su manejo y preparación durante su mercadeo dependen de su susceptibilidad al daño mecánico y a ciertas enfermedades (Kader 2007). Los frutos de papaya son muy delicados y susceptibles a dañarse durante su manejo poscosecha, por lo que su recolección debe realizarse de forma manual y con mucho cuidado para evitar golpes (SAGARPA 2010).

Las frutas se cosechan cuando exhiben un ligero cambio del color verde y aparecen algunas zonas amarillas. Durante la cosecha de papaya, es recomendable conocer los índices de madurez de las variedades cultivadas en cada localidad, ya que los valores de estos índices pueden cambiar por las condiciones ambientales y de cultivo de cada lugar. Actualmente se establecen 6 índices de madurez para la papaya (**Figura 2**). De acuerdo con ciertas normas de calidad, la cosecha debe realizarse cuando su contenido en sólidos solubles es de 11.5 °Brix, ya que, si la fruta es cosechada muy inmadura, no alcanzará la calidad adecuada en su madurez comercial (Kader 2007; FAO 2017).

Para desprender el fruto de la planta se utilizan tijeras o un cuchillo afilado, los cuales se deben desinfectar con cierta frecuencia. El fruto se debe obtener cortando el pedúnculo a la altura de la mitad (SAGARPA 2010). En ocasiones solo basta con un movimiento de torsión de la fruta para romper el pedicelo (Kader 2007). De preferencia su cosecha debe realizarse antes de las 11 a.m. y después de las 4 p.m., esto para evitar la

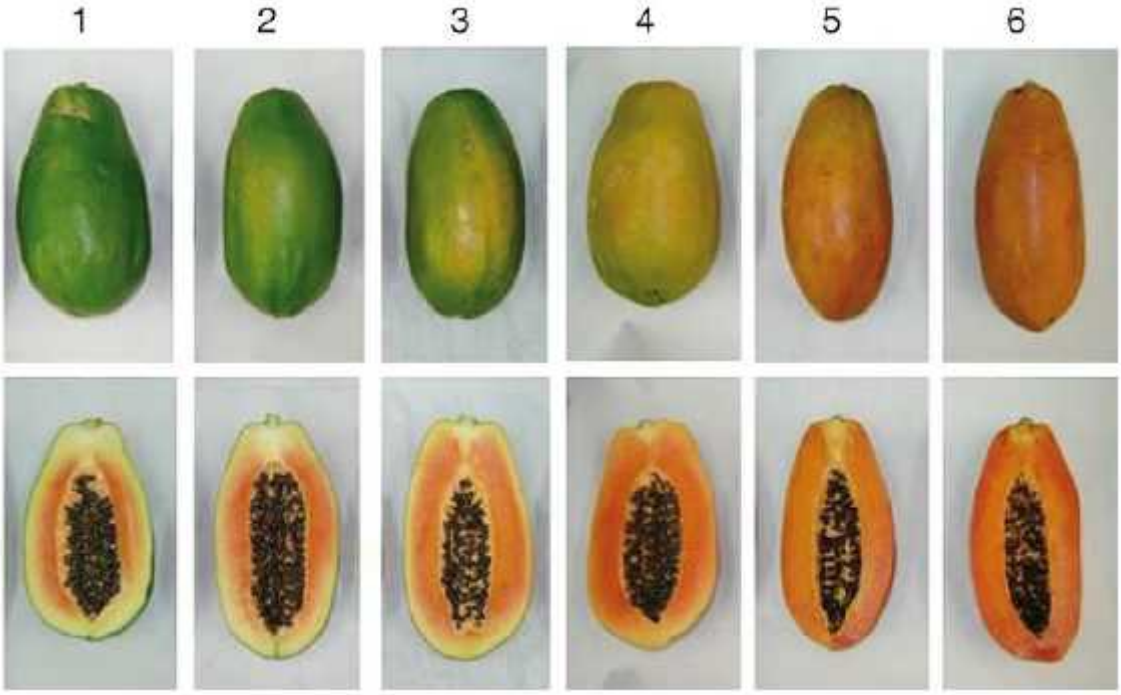



**Figura 2**. Índices de madurez de la papaya (cv. Maradol)

Fuente: Santamaría y col (2009)

exposición de la fruta al sol. Una vez cortados, los frutos deben ser manipulados cuidadosamente protegiéndolos con láminas de espuma o envolviéndolos en papel. Además, debe verificarse que la textura sea firme, sin áreas blandas al tacto, libre de magulladuras, manchas de látex, cicatrices y agujeros (SAGARPA 2009).

Durante el traslado de la fruta hacia el centro de empaque, se suelen utilizar cajas tipo pallet y cajas de campo. El llenado de cajas debe realizarse con mucho cuidado, así como su transporte. Posteriormente, las siguientes operaciones son la selección donde se eliminan aquellos frutos que no cumplen con el tamaño deseado o presentan defectos, y el lavado el cual se lleva a cabo mediante la inmersión de la fruta en agua con detergente que actúa como desinfectante y posteriormente se enjuaga con agua que puede contener fungicidas que brindan protección contra el ataque de hongos (Granados y col 2015). También es común el uso de métodos como las ceras, tratamientos térmicos, biocontroladores, atmósferas controladas, ozono, isotiocianatos, sales y aplicación de recubrimientos naturales como extractos de plantas, aceites esenciales y quitosano, para impedir el desarrollo de patógenos que producen enfermedades en el fruto (Kader 2007; Bautista-Baños y col 2013; Dotto y col 2015).

Una vez terminado el proceso de selección, se procede a empacar la fruta de manera manual en cajas de cartón, y se pueden acomodar seis, nueve o doce piezas dependiendo del tamaño (Granados y col 2015).

La temperatura de almacenamiento de los frutos de papaya se encuentra entre 8 y 12°C dependiendo del cultivar y del estado de madurez del fruto (Kader 2007;

Bautista-Baños y col 2013). Durante todo el manejo poscosecha los frutos pueden sufrir deterioro en su calidad causado principalmente por plagas, infecciones microbianas, proceso de maduración y condiciones ambientales; así como por una manipulación inadecuada, provocando pérdidas poscosecha que se traducen en pérdidas económicas (Kasso y Bekele 2016).

## 7. Pérdidas poscosecha de papaya

Las frutas y hortalizas frescas son productos perecederos ya que tienen una tendencia a deteriorarse por razones fisiológicas, plagas, infecciones y enfermedades. La manipulación de las condiciones ambientales y de almacenamiento para retrasar la senescencia puede reducir las pérdidas asociadas con un metabolismo acelerado; sin embargo, estas prácticas generalmente no son suficientes para proteger completamente los productos cosechados de la infección (Ventura y col 2004).

La papaya es susceptible al ataque de varias enfermedades que a menudo resultan en pérdidas poscosecha considerables. Estas enfermedades causadas por patógenos reducen su vida útil durante el almacenamiento. Uno de los principales problemas de este tipo es el desarrollo de antracnosis, enfermedad que reduce la calidad en frutos de papaya y que es considerada la enfermedad fúngica más devastadora de las frutas y hortalizas en los países tropicales del mundo siendo la responsable de un 50% de las pérdidas en productos frescos (Ali y col 2010, 2016; Bosquez-Molina y col 2010; Maqbool y col 2011).

Para disminuir las pérdidas poscosecha de la papaya y de otros frutos causadas por hongos y además alargar su vida útil, se utilizan algunos métodos como la aplicación de fungicidas, tratamiento térmico, radiación, agentes biocontroladores y recubrimientos naturales (aceites esenciales y quitosano), por mencionar algunos (Dotto y col 2015).

## B. ENFERMEDADES POSCOSECHA

A nivel mundial, las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas causadas por enfermedades fúngicas y bacterianas se han estimado en un 25%, las cuales pueden ocurrir durante la floración y maduración del fruto, o durante su posterior manejo poscosecha. Durante la floración las enfermedades pueden permanecer inactivas hasta tener condiciones fisiológicas favorables para la proliferación del patógeno (El Ghaouth y col 2004).

El desarrollo de enfermedades es causado principalmente por hongos de diversos géneros que, en algunos casos los síntomas aparecen durante el crecimiento del fruto en la planta y en otros permanecen en latencia, presentándose los síntomas hasta la maduración (Ramos-García y col 2010). Las enfermedades e infecciones pueden ocurrir en cualquiera de las etapas en el campo y durante la poscosecha, almacenamiento y transporte, siendo originadas por lesiones que se producen en el fruto facilitando la entrada de patógenos. Enfermedades como pudrición parda, mancha septoria, antracnosis, pudrición clara, moho verde/azul, causadas por *Phytophthora spp*., *Septoria citri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium spp* y *Galactomyces citri-aurantii*, respectivamente, son el resultado de las heridas

causadas por la manipulación en el campo o en las etapas posteriores, aunque también pueden desarrollarse por la penetración del patógeno por aberturas naturales propias del fruto, tales como lenticelas, estomas, grietas de crecimiento, entre otras (Simas y col 2017).

Existen tres tipos de enfermedades poscosecha: pudriciones superficiales, pudriciones pedunculares y pudriciones internas de la fruta, las cuales reducen la calidad de los frutos y causan pérdidas severas (Ventura y col 2004).

Los frutos de papaya son sensibles a la descomposición, las bajas temperaturas, así como a la rápida maduración y el ablandamiento lo cual limita el tiempo de almacenamiento, la manipulación y el potencial de transporte (Prasad y Anamika 2015). La importancia de las enfermedades poscosecha en la papaya varía con la región en la que crece y en función de las condiciones climáticas. Las enfermedades poscosecha causadas por patógenos fúngicos son los problemas más graves que enfrenta la papaya durante el proceso de comercialización, siendo *Colletotrichum gloeosporioides* el hongo que produce las mayores pérdidas, provocando la enfermedad denominada antracnosis. Se estima que las pérdidas poscosecha de papaya debido a enfermedades microbiológicas representan casi el 93% del total de las pérdidas (Ali y col 2015; Dotto y col 2015).

## 1. Antracnosis

La antracnosis es una de las enfermedades fúngicas más importantes en la papaya. El agente causal es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, el cual es un patógeno muy común en diversos frutos de plantas tropicales.

Este hongo ha causado serios problemas para los productores mexicanos debido a que las condiciones ambientales en las que se produce la papaya son favorables para su desarrollo. Además, es posible encontrar a una misma especie de este género atacando a diversos hospederos, e incluso varias especies del género *Colletotrichum* causando enfermedades en un mismo cultivo. Las esporas del hongo comúnmente provienen de peciolos infectados y atacan a la fruta en estado verde, desarrollando apresorios en condiciones favorables, para posteriormente penetrar la piel de los frutos, pero se pueden mantener latentes durante meses hasta que se inicia la maduración, momento en el cual se presentan los cambios físicos y químicos necesarios para el desarrollo de los síntomas (Ali y col 2010; Bósquez-Molina y col 2010; Santamaría y col 2011; Bogantes y Mora 2013; Márquez-Fernández y col 2013). El hongo forma acérvulos subcuticulares y subepidérmicos, separados con masas conidiales rosáceas a anaranjadas que cubren los centros de las lesiones, con setas, conidióforos septados, conidios hialinos extremos obtusos o elipsoidales color marrón pálido (Ventura y col 2004).

Las condiciones climáticas favorables para la incidencia de antracnosis son temperaturas cercanas a 28°C, generalmente en un rango de 20°C a 30°C, y con una humedad relativa de más del 95%. Además, los conidios requieren agua en estado libre para su germinación y liberación del acérvulo, solo cuando la humedad es mayor al 95% (Ventura y col 2004).

Las principales lesiones de la enfermedad (**Figura 3**) se muestran en forma redonda y pueden o no presentar hundimientos, mostrando un color marrón (Basulto y col 2011; Santamaría y col 2012; Quirós y col 2013), pero a medida que avanza la

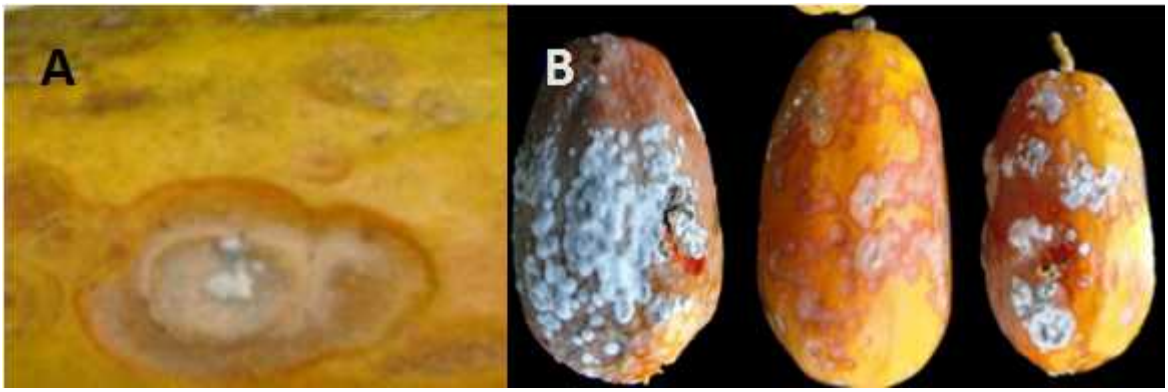



**Figura 3**. Síntomas de la enfermedad de antracnosis en papaya, A) Lesión característica de la enfermedad de antracnosis, B) Frutos de papaya con antracnosis

Fuente: Basulto y col (2011); Santamaría y col (2012)

infección, estas lesiones desarrollan erupciones de color naranja a rosado y frecuentemente aparecen anillos concéntricos (Siddiqui y Ali 2014). Siendo una infección latente, el hongo infecta los frutos inmaduros en el campo mientras que los síntomas aparecen solo después de la maduración (Maqbool y col 2011).

Esta enfermedad resulta de mucha preocupación para los productores de este fruto, ya que la infección reduce la calidad afectando la aceptación por los consumidores y su valor comercial (Rimá y col 2017). Su control se realiza principalmente en el campo, proporcionándole al cultivo una buena condición sanitaria, con prácticas culturales y con un programa de aplicación preventiva de fungicidas sintéticos protectores como mancozeb, propiconazol, procloraz y clorotalonil.

Sin embargo, el uso de fungicidas por largos periodos puede provocar que el patógeno desarrolle resistencia al mismo, contaminación ambiental y problemas en la salud de los consumidores. Por lo cual, se han explorado nuevas alternativas no químicas para el control de las enfermedades poscosecha causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya (Hewajulige y col 2007; Bogantes y Mora 2013; Ali y col 2015).

## C. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Se ha emprendido una nueva dirección en la búsqueda de alternativas para controlar las enfermedades poscosecha, con el enfoque en herramientas capaces de prevenir las pudriciones con un impacto mínimo en la salud humana y en el medio ambiente (Ventura y col 2004). Una de las estrategias para mejorar la seguridad,

calidad y vida útil de las frutas es identificar tratamientos no tóxicos, seguros, biodegradables y eficaces como agentes antimicrobianos mientras mantienen la calidad física y nutricional de los frutos (Ayón-Reyna y col 2017). Para este propósito se han utilizado diferentes tecnologías, entre las que se encuentran el almacenamiento a temperaturas bajas, el uso de empaques inteligentes que crean atmósferas modificadas, la aplicación de temperaturas altas, irradiación y formulaciones que contienen agentes biológicos, películas y recubrimientos comestibles. Estas últimas en particular han resultado una buena opción para la conservación de frutas y vegetales frescos, gracias al interés del consumidor por adquirir alimentos que sean seguros, nutritivos y que tengan un beneficio a la salud; además de que son consideradas como no dañinas para el medio ambiente; brindan protección de barrera y pueden incorporarse compuestos que enriquezcan su funcionalidad (Ávila-Sosa y López-Malo 2008; Ramos-Garcia y col 2010).

## 1. Recubrimientos comestibles

La aplicación de recubrimientos en frutas y hortalizas ha sido una práctica antigua. Algunos reportes de su uso datan de los siglos XII y XIII donde se menciona que en China se realizaba la inmersión de naranjas y limas en ceras para minimizar la pérdida de agua. En el siglo XV, en Asia se utilizó una película comestible obtenida de la grasa de leche de soya para mejorar la apariencia y preservación de los alimentos (García 2008).

Los recubrimientos comestibles se utilizan principalmente para mejorar la apariencia y la conservación de los alimentos ya que pueden proporcionar barreras

selectivas contra la respiración, la pérdida de humedad y la descomposición al crear una atmósfera modificada que reduce la disponibilidad de $O_2$ e incrementa la concentración de $CO_2$ (Ramos-García y col 2010; Maqbool y col 2011). Pueden elaborarse con ingredientes básicos que le aporten al fruto protección de barrera contra los gases y funcionen como vehículos para la incorporación de aditivos que refuercen su funcionalidad como son los antioxidantes, colorantes y agentes antimicrobianos (Ramos-García y col 2010). Algunas de las bondades que presentan los recubrimientos son su carácter comestible, su transparencia, el ser de fácil elaboración, de bajo costo, por lo regular son abundantes, no tóxicos y de fácil manipulación (Valdés y col 2015).

Un recubrimiento comestible se forma directamente sobre la superficie de los frutos aplicados en forma líquida, usualmente sumergiendo el producto en la solución y se elaboran a partir de una gran variedad de productos, como proteínas, polisacáridos y lípidos que pueden usarse de manera individual o combinados para otorgarle al fruto mejores propiedades mecánicas y de barrera (Ramos-García y col 2010; Falguera y col 2011). Además, en la formulación de los recubrimientos pueden añadirse plastificantes y emulsificantes con la finalidad de ayudar a mejorar sus propiedades finales, así como algunos compuestos antimicrobianos, como ácidos inorgánicos (carbonatos, bicarbonatos, etc.) y orgánicos, así como algunas sales (propionatos, sorbatos, benzoatos, etc.), parabenos, quitosano, enzimas, polipéptidos, aceites esenciales y otros extractos naturales (Valencia-Chamorro y col 2011).

Los recubrimientos ayudan a prolongar la vida de anaquel de los frutos debido a que disminuyen la pérdida de agua, controlan la velocidad de respiración, retrasan el envejecimiento y mejoran la calidad y valor comercial de los mismos, manteniendo de esta forma su calidad organoléptica y nutricional; también presentan propiedades de barrera como transferencia de distintas sustancias, adecuada permeabilidad al vapor de agua, solutos y una permeabilidad selectiva a gases y compuestos volátiles, desde el alimento hacia el exterior y viceversa (**Figura 4**). Entre los lípidos que se pueden incluir en los recubrimientos se encuentran las ceras (abeja, candelilla, carnauba), resinas, monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos; mientras que los polisacáridos más utilizados para la formulación de películas son pectinas de alto y bajo metoxilo, la celulosa y sus derivados, alginato, dextrina, carragenanos, goma arábiga y quitosano (Valdés y col 2015). Por otra parte, la incorporación de aceites esenciales en recubrimientos comestibles a base de polisacáridos ha ganado interés en las ciencias agrícolas debido a las propiedades bactericidas y fungicidas asociadas con los compuestos volátiles presentes en los aceites (Ali y col 2015a).

### a. Quitosano

El quitosano es un polisacárido compuesto por unidades de β- (1-4)-2-acetamida-D-glucosa y β-(1-4)-2-amino-D-glucosa y se obtiene del exoesqueleto de crustáceos, alas de algunos insectos, paredes celulares de hongos, algas, entre otros, mediante el proceso de desacetilación parcial de la quitina (Bill y col 2014; Sotelo-Boyás y col 2015;

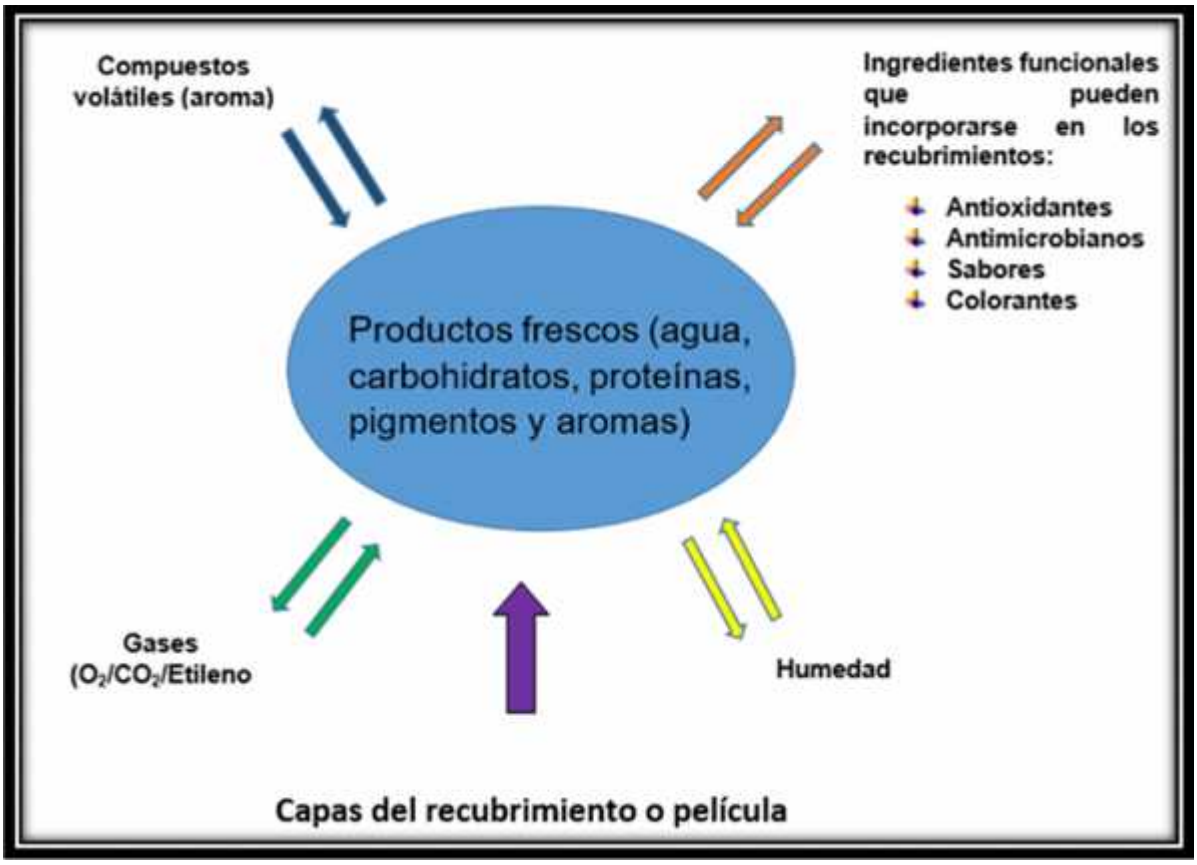



**Figura 4.** Propiedades de los recubrimientos comestibles

Fuente: Valdés y col (2015)

Valdés y col 2015). Se obtiene industrialmente mediante tratamiento de desacetilación química o enzimática y es dependiente de las condiciones del proceso, por ello se pueden obtener quitosanos de diferente peso molecular y grado de desacetilación (Araya y Meneses 2010). En el proceso de desacetilación, los grupos acetilo de la cadena molecular de la quitina se eliminan para formar grupos amino (**Figura 5**). En general, cuanto mayor es el grado de desacetilación, mayor es la solubilidad en condiciones ácidas, esperándose un quitosano con una carga positiva más alta y por lo tanto tenga una actividad antibacteriana más fuerte (Hosseinnejad 2016).

La aplicación del quitosano como recubrimiento es considerado como uno de los tratamientos más prometedores para el control de hongos en poscosecha. El desarrollo de hongos como *Alternaria alternata* (Sánchez-Domínguez y col 2007), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ayón-Reyna y col 2017), *Fusarium oxysporum, Rhizopus stolonifer y Penicillium digitatum* (Bautista-Baños y col 2004) ha sido inhibido usando diferentes concentraciones de quitosano.

El quitosano se ha convertido en uno de los polisacáridos preferidos para formar recubrimientos comestibles por ser de origen biológico, no tóxico, abundante en la naturaleza y tener propiedades antimicrobianas. Tiene la capacidad de formar recubrimientos semipermeables ayudando a prolongar la vida útil de los frutos, minimizando la tasa de respiración, reduciendo la pérdida de agua, regulando el intercambio de gases y formando una barrera que impide la entrada de hongos patógenos. Se sabe que tiene efecto fungistático e induce respuestas de defensa en

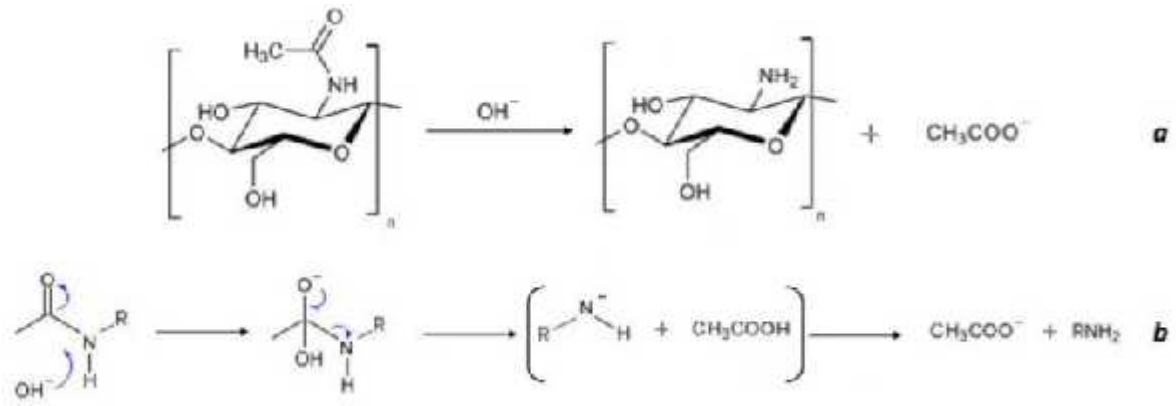



**Figura 5.** Mecanismo de desacetilación de la quitina para obtener quitosano, a) reacción generalizada y b) detalle del mecanismo de reacción.

Fuente: Hosseinnejad 2016

plantas, incluyendo la acumulación de hidrolizados antifúngicos y fitoalexinas, siendo así, una excelente alternativa para sustituir a los métodos convencionales (Li y col 2001; Ramos-García y col 2010). Es una sustancia que puede ser utilizada en combinación con otros compuestos tales como el almidón, proteínas y lípidos para atender funciones específicas. Un ejemplo de lípidos que pueden ser utilizados para la formulación de películas son los aceites esenciales, los cuales le confieren a los productos buenas propiedades de barrera, carácter insípido y transparencia (Ali y col 2010; Picard y col 2013; Valdés y col 2015).

El efecto fungistático del quitosano está en función de la concentración utilizada, el peso molecular y el grado de desacetilación. Este compuesto se adhiere a la membrana plasmática de los hongos por interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del quitosano y las cargas negativas de los fosfolípidos formadores de la membrana de los hongos. Una vez que se adhiere, causa una filtración a través de ella hasta llegar al citosol. Debido a que los hongos regulan los niveles de $Ca^{2+}$ manteniendo un nivel bajo en el citosol, al introducirse el quitosano en el citosol de las células fúngicas se transforma el mecanismo homeostático por la formación de canales en la membrana permitiendo el paso libre de iones calcio, lo que ocasiona una inestabilidad en la célula hasta su muerte. Además, el quitosano podría actuar de manera indirecta ya que podría formar una barrera en la superficie de los frutos que impide la penetración de los hongos, como *Colletotrichum gloeosporioides*, aunque no todos los hongos presentan la misma sensibilidad lo cual puede deberse a la composición en fosfolípidos de membrana y a la naturaleza de sus cargas (Ramos-García y col 2010; Picard y col 2013).

Se han realizado diversos estudios sobre la actividad antifúngica del quitosano. A este respecto, López-Mora y col (2013) evaluaron el efecto del quitosano al 1% contra el hongo *Alternaria alternata* en mango “Tommy Atkins” mostrando inhibición significativa en el crecimiento radial, germinación y esporulación del hongo, debido a una intensa y amplia vacuolización del micelio y esporas, la salida de material citoplasmático y la formación de material fibrilar alrededor de las células. Por su parte, Ma y col (2016) evaluaron la supervivencia microbiana en melones enteros aplicando recubrimientos con quitosano (1%), arginato láurico, aceite de canela y EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid) observando que los recubrimientos combinados con estos componentes reducían significativamente el desarrollo de mohos y levaduras en los frutos; así como su efecto contra el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*. De igual manera, Zhang y Quantick (2016) aplicaron recubrimientos comestibles de quitosano en concentraciones de 1 y 2%, en fresas y frambuesas para inhibir el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea* y *Rhizopus sp.*, encontrando una reducción significativa de su crecimiento comparado con el control, durante su almacenamiento a 13°C.

Se ha demostrado el efecto de recubrimientos comestibles a base de quitosano en la retención de vitamina C, como el reportado por Suseno y col (2014) quienes aplicaron un recubrimiento en plátano elaborado a base de quitosano (1, 1.5 y 2%) con diferentes grados de desacetilación (70 y 80%) y añadieron como emulsificante trietanolamina. La formulación con 2% de quitosano y 80% de grado de desacetilación sin emulsificante mostró ser efectiva en la retención de vitamina C

durante su almacenamiento a 30°C por 8 días en comparación con las otras formulaciones. Por su parte, Hewajulige y col (2009) desarrollaron un recubrimiento con diferentes concentraciones de quitosano y lo aplicaron en frutos de papaya para inhibir el desarrollo de antracnosis, encontrando una completa inhibición de la germinación de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides,* se redujo la severidad de antracnosis, y se encontró una mayor concentración de $CO_2$ en la cavidad interna del fruto. Esto pudo deberse a que el quitosano modifica la atmósfera interna del fruto, causando respiración anaeróbica, dado que este compuesto es más permeable al $O_2$ que al $CO_2$, además se le puede atribuir la inducción de la actividad elicitadora de las enzimas quitinasa y β, 1-3 glucanasa, evitando la madurez y senescencia del fruto.

También se ha utilizado el quitosano en forma de nanopartículas, las cuales son consideradas una estrategia prometedora que mantiene la calidad poscosecha de los frutos actuando como sustitutos de otros compuestos que se utilizan actualmente en forma de recubrimientos como las ceras (Ferrão y col 2018).

Los recubrimientos y películas comestibles a base de quitosano son sistemas que además pueden usarse como acarreadores de compuestos activos tales como los aceites esenciales, los cuales están recibiendo mucha atención ya que tienen una actividad biológica potencial. Algunos de estos aceites esenciales son el clavo, orégano, tomillo, albahaca, mostaza o canela, los cuales están categorizados como compuestos tipo GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) por la USFDA (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos) (Yuan y col 2016).

### b. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios producidos por plantas aromáticas, por lo que se consideran como compuestos naturales, volátiles y complejos que se caracterizan por un fuerte olor (Abdolahi y col 2010). Pueden encontrarse en diferentes partes de la planta como son hojas, raíces, flores y cáscaras (Ramos-García y col 2010). Su composición incluye mezclas de terpenos, aldehídos, terpenoides y alcoholes, los cuales suelen sintetizarse en respuesta a las condiciones de estrés, produciendo efectos antibacterianos, antivirales y antifúngicos (Abdolahi y col 2010a). Algunos compuestos antimicrobianos que se han identificado en plantas son fenoles, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres e hidrocarburos.

Se pueden obtener mediante diversos métodos que incluyen la destilación por vapor y la hidrodesinización como una extracción de fluido supercrítica, por lo tanto, la fracción de aceite esencial extraída es a menudo una mezcla de varios compuestos. Sin embargo, los ingredientes alimentarios tradicionales, como algunas especias y hierbas, también tienen efectos antimicrobianos sobre los patógenos que atacan a humanos (Jaeger y col 2014).

Entre las ventajas de los aceites esenciales se incluyen su naturaleza no tóxica para la salud humana y su amplia aceptación por los consumidores (Ali y col 2015). Están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) como compuestos tipo GRAS debido a su amplia disponibilidad y por su uso en la industria alimentaria y como agentes aromatizantes, además de su capacidad antioxidante y antimicrobiana (López-Mata y col 2012; Sivakumar y Bautista-Baños 2014; Guerreiro y col 2015).

Estos atributos y una creciente demanda por opciones de aditivos alimentarios naturales han llevado a que surja el interés por el uso de los aceites esenciales como una potencial alternativa antimicrobiana (Yuan y col 2016). Actualmente se utilizan para el control de patógenos fúngicos en frutos, aplicándolos por atomización o por inmersión (Abdolahi y col 2010; Ali y col 2015). En algunas especies de plantas, los aceites esenciales cumplen un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra fitopatógenos (Barrera-Necha y García-Barrera 2008), por esta razón su incorporación puede ser un medio conveniente a través del cual se puede controlar el desarrollo de microorganismos patógenos que producen enfermedades poscosecha (Bosquez-Molina y col 2010).

El uso de los aceites esenciales en la preservación de los alimentos está frecuentemente limitado por su alto costo de aplicación, así como por su intenso aroma y potencial toxicidad. Existen reportes de toxicidad en humanos por la utilización de estos aceites puros o en concentraciones altas, ocasionando daños a la salud. Sin embargo, su uso en concentraciones mínimas no genera alteraciones en el organismo (Ramos-García y col 2010; Yuan y col 2016).

La actividad antifúngica de los aceites esenciales está asociada a su contenido de fenoles monoterpenos. El mecanismo de acción se basa en la capacidad de los grupos hidroxilo presentes en los compuestos fenólicos de los aceites para interactuar con la membrana citoplasmática del patógeno, alterando de esta manera su estructura y función; además, también se presenta degradación de la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz (Rosas-Gallo y López-Malo 2011).

En la literatura se pueden encontrar estudios sobre el uso de aceites esenciales contra algunos hongos patógenos que afectan a diferentes frutos, como el reportado por Simas y col (2017), quienes extrajeron aceites esenciales de diferentes cítricos y evaluaron su efecto sobre el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea*, encontrando que los aceites demostraron tener propiedades antifúngicas. Maqbool y col (2010) aplicaron un recubrimiento a base de aceite esencial de canela para inhibir el desarrollo de antracnosis en plátano producida por *Colletotrichum musae*, encontrando una baja incidencia y severidad de la enfermedad en los tratamientos con mayor concentración de aceite. Así mismo, Maqbool y col (2011) desarrollaron un recubrimiento comestible a base de goma arábica al 10% combinada con aceite esencial de canela al 0.4% para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum musae* en papaya y plátano, respectivamente, encontrando un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en *C. musae* del 73.4% y en *C. gloeosporioides* del 70%, así como un porcentaje de inhibición de la germinación de conidios del 88 y 85%, respectivamente.

Se ha encontrado que los aceites esenciales obtenidos de diversas plantas, así como sus componentes tienen una importante actividad antifúngica. Sin embargo, un problema para los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios es su alta volatilidad. Para contrarrestar este problema se han mezclado con otros compuestos como el quitosano. Tal es el caso de Correa-Pacheco y col (2017), quienes aplicaron un recubrimiento a base de nano partículas de quitosano y aceite esencial de tomillo para inhibir el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate, encontrando una alta actividad antifúngica. También, Ma y col (2016)

encontraron una alta inhibición del desarrollo de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogene*s en melones al aplicar un recubrimiento a base de quitosano, arginato láurico, EDTA y aceite esencial de canela. Además, algunos estudios demuestran que la incorporación de aceites esenciales en recubrimientos comestibles aplicados a frutos incrementa su actividad antioxidante (Contreras-Oliva y col 2012; Melgarejo-Flores y col 2013; Bonilla y col 2018).

En este sentido, Mohammadi y col (2015) encontraron que un recubrimiento de nano partículas de quitosano en combinación con aceite esencial de *Zataria multiflora* mostró altos niveles de actividad antioxidante en pepinos en comparación con el recubrimiento sólo con nano partículas de quitosano y el control. Por su parte, López-Mata y col (2012), evaluaron el efecto de un recubrimiento comestible a base de quitosano y aceite esencial de canela sobre la capacidad antioxidante de fresas frescas, encontrando que la combinación resultaba efectiva para mantener la capacidad antioxidante de los frutos.

También se ha demostrado el efecto benéfico de los aceites esenciales en combinación con quitosano para reducir la pérdida de contenido nutrimental. Xing y col (2011) formularon recubrimientos comestibles a base de quitosano y aceite esencial de canela y los aplicaron en pimiento morrón encontrando buenos resultados sobre la retención de vitamina C. Del mismo modo, Ali y col (2015) recubrieron pimientos con quitosano y aceite de té de limón para inhibir antracnosis, observando que el uso combinado de estos compuestos retrasaba la incidencia de esta enfermedad y mantenía la calidad poscosecha del fruto.

Por otra parte, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales ha sido ampliamente reportada en la literatura, al igual que la actividad antifúngica y antibacteriana del quitosano; sin embargo, muy pocos estudios reportan el efecto antifúngico de la combinación de estos dos compuestos. Por esta razón, esta investigación tiene como principal objetivo evaluar la actividad antifúngica de un recubrimiento elaborado a base de quitosano y aceite esencial para inhibir el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* que ocasiona la enfermedad de antracnosis en frutos de papaya durante su almacenamiento comercial.

# IV. JUSTIFICACIÒN

La papaya es un fruto tropical que tiene gran aceptación gracias a su sabor placentero y gran contenido nutrimental. México se encuentra dentro de los principales productores a nivel mundial, ocupando el quinto lugar de producción y el primer lugar como exportador, por lo cual, es de vital importancia mantener su calidad y disminuir las pérdidas durante su manejo poscosecha. La principal causa de pérdidas poscosecha de la papaya es la antracnosis, enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides.* Actualmente los principales métodos usados para controlar el desarrollo de hongos en frutos se basan en la aplicación de fungicidas químicos; sin embargo, su uso excesivo puede inducir resistencia en ciertos microorganismos y provocar daños en la salud del consumidor y el medio ambiente. Una de las alternativas es la utilización de recubrimientos naturales tales como el quitosano y los aceites esenciales, a los cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas y no representan un riesgo a la salud por ser de origen natural, además de tener la capacidad de mezclarse con otros compuestos y formar recubrimientos que permitan mantener la calidad del fruto por más tiempo. Sin embargo, pocos son los estudios que evalúan el efecto combinado del quitosano con aceites esenciales con el fin de encontrar un efecto sinérgico en el control de patógenos en papaya.

Por esta razón, resulta interesante evaluar el efecto de la aplicación de un recubrimiento elaborado a base de quitosano solo y en combinacion con un aceite esencial, seleccionado de 5 diferentes (albahaca, canela, clavo, menta y té de limón)

para inhibir el desarrollo de la antracnosis y conocer el efecto en la calidad poscosecha de frutos de papaya.

# V. HIPÓTESIS

La aplicación de un recubrimiento elaborado con quitosano y aceite esencial de menta inhibe el desarrollo de antracnosis ocasionado por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya y mantiene su calidad poscosecha durante el almacenamiento.

# VI. OBJETIVOS

## A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano combinado con aceite esencial de menta para inhibir el desarrollo de antracnosis y su capacidad para mantener la calidad poscosecha en frutos de papaya durante su almacenamiento.

## B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar *in vitro* e *in vivo* la efectividad de 5 aceites esenciales (albahaca, canela, clavo, menta y té de limón) para retardar el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*
2. Evaluar el efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano al 1% combinado con aceite esencial más efectivo sobre el desarrollo *in vitro* (germinación de conidios y crecimiento radial) e *in vivo* (incidencia y severidad de antracnosis en papaya) del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*
3. Determinar el efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano combinado con un aceite esencial sobre los parámetros de calidad poscosecha (pérdida de peso, firmeza, color externo, sólidos solubles totales) durante el almacenamiento de frutos de papaya inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides*.
4. Analizar el efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano combinado con un aceite esencial sobre la actividad antioxidante (ABTS, DPPH), fenólicos totales y vitamina C en frutos de papaya inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides.*

5. Analizar la microestructura (microscopía electrónica de barrido) del área infectada en frutos de papaya recubiertos con el mejor tratamiento.

# VII. MATERIALES Y MÉTODOS

## A. ETAPA 1

### 1. Materiales

#### a. Aislamiento e identificación del hongo

El aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* se realizó a partir de un fruto de papaya cultivar Maradol con síntomas de antracnosis. Para aislar el patógeno se tomó parte del tejido infectado y se colocó en el centro de placas de Petri que contenían agar papa dextrosa (PDA, MCD LAB, Tlalnepantla, Edo. de México, México) y se incubó a 25°C±2°C. Una vez observado el crecimiento micelial en las placas, el hongo se volvió a aislar en PDA fresco para obtener cultivos puros. Los aislados fueron identificados con base en sus características morfológicas y culturales por tinciones con azul de lactofenol y observados en un microscopio óptico (Axiophot photomicroscope Carl Zeiss, Germany) con objetivos 10 y 40X. La identidad del hongo se confirmó mediante técnicas moleculares utilizando los espaciadores transcritos internos ITS1-ITS2 (Ayón-Reyna y col 2017).

#### b. Aceites esenciales y quitosano

Se utilizaron 5 aceites esenciales: aceite de hoja de canela (AEC) *(Cinnamomum zeylanicum),* clavo rectificado (AECl) *(Syzygium aromaticum),* menta (AEM) *(Mentha piperita* L.*)* (Aceites y Esencias, S.A, Ciudad de México, México)*,* y aceites esenciales de albahaca (AEA) *(Ocimum basilicum)* y té de limón (AEL)*(Cymbopogon citratus)*(Sigma Aldrich, St Luis, MO, EU). Se utilizó quitosano en polvo de grado alimenticio, adquirido en Agrinos, S.A., Sonora, México.

## 2. Métodos

### a. Preparación del inóculo

Las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* se obtuvieron de un cultivo de dos semanas y fueron suspendidas en agua destilada estéril. La suspensión conidial se ajustó a una concentración de 1 x $10^6$ conidios/mL con una cámara de Neubauer y se añadió Tween-80 al 0.5% para evitar la aglomeración de esporas (Ayón-Reyna y col 2017).

### b. Ensayos preliminares *in vitro* e *in vivo* para la detección del aceite esencial y la concentración con mayor actividad antifúngica

Se realizaron ensayos preliminares *in vitro* (crecimiento micelial) para la selección de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Xing y col 2010) para cada aceite, con la cual se obtuviera el 100% de inhibición contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Una vez seleccionada la CMI de cada aceite, se realizaron ensayos *in vivo* (severidad de antracnosis) para seleccionar el aceite (con su respectiva concentración seleccionada en el ensayo *in vitro*) que presentó la mayor actividad antifúngica.

#### 1) Crecimiento micelial del hongo

Se realizó un ensayo de inhibición *in vitro* de crecimiento micelial para los 5 aceites esenciales, utilizando la técnica de "poción venenosa" con algunas modificaciones (Aloui y col 2014). Se añadió Tween-80 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) en el medio PDA a una concentración final de 1% (v/v) para aumentar la

solubilidad en aceite, antes de ser esterilizado a 121°C por 15 minutos. A continuación, se adicionaron asépticamente los aceites esenciales al medio de PDA fundido estéril (45ºC aproximadamente) hasta obtener diferentes concentraciones para cada uno de ellos (según la literatura), las cuales fueron para albahaca 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.45 y 0.55% (Marandi y col 2011; Idris y col 2015) , canela y clavo 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25% (Ranasinghe y col 2002,2005; Idris y col 2015; Mohammadi y col 2015), menta 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.25 y 0.375% (Dantas y col 2016; Rimá y col 2017) y té de limón 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 y 0.3% (Palhano y col 2004; Duamkhanmanee 2008; Maqbool y col 2011).

Los medios resultantes se vertieron inmediatamente en placas de Petri (9 cm de diámetro). Las placas se solidificaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la inoculación puntual con 1 µL de una suspensión de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* a una concentración de 1 X $10^6$ conidios/mL. Las placas de Petri inoculadas fueron incubadas a 25ºC durante 7 días, hasta el momento en el cual el crecimiento del control alcanzó el borde de la placa. Placas conteniendo PDA con Tween-80 al 1% (v/v) y sin aceite esencial se utilizaron como control de crecimiento positivo.

Para cada concentración de aceite, se realizaron 3 réplicas y 6 repeticiones. Se midió la fungitoxicidad de los aceites esenciales en términos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\%Inhibicion\ del\ crecimiento\ radial\ micelial = \frac{C-T}{C} X100$$

Dónde:

C= es la medida del crecimiento radial del hongo en el control.

T= es el crecimiento radial del hongo en presencia de cada aceite esencial.

La CMI para cada uno de los aceites esenciales se define como la menor concentración que presenta el 100% de inhibición.

**2) Obtención y preparación de los frutos**

Los frutos de papaya se obtuvieron del mercado de la localidad en estado de desarrollo 4 (piel ligeramente naranja con rayas verdes y pulpa completamente naranja) y con ausencia de daños físicos. Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde se lavaron y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. Una vez desinfectados se inocularon mediante inmersión en una suspensión de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* (1 x $10^6$ conidios/mL) por 5 minutos (Ayón-Reyna y col 2017). Una vez inoculados, los frutos se dividieron en 6 lotes los cuales fueron elegidos al azar para la aplicación de los siguientes tratamientos, T1: Control (agua destilada); T2: AEA (0.35%); T3: AEC (0.15%); T4: AECl (0.15%); T5: AEM (0.2%); T6: AEL (0.05%).

Los frutos se sumergieron en sus respectivas dispersiones a temperatura ambiente por un periodo de 3 minutos, se colocaron sobre papel estraza a temperatura ambiente para retirar el exceso de humedad y después se almacenaron

a 12°C por un periodo de 20 días, con retiros cada 0, 5, 10, 15 y 20 días para su posterior análisis. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y cada tratamiento incluyó 12 frutos.

### 3) Severidad

La severidad de la enfermedad se evaluó de manera visual (Ayón-Reyna y col 2017) en intervalos de 5 días, usando una escala del 1 al 5, donde 1 representa que no hay síntomas de antracnosis en el fruto. Una puntuación de 2 representa que hasta un cuarto (1-25%) de la superficie del fruto presentaba síntomas. Se registró una calificación de 3 cuando 26-50% de la superficie de la fruta estaba infectada con antracnosis. Si el 51-75% de la superficie de la fruta mostraba síntomas de antracnosis, se calificó con una puntuación de 4. Si los síntomas de antracnosis aparecieron en más del 76% de la superficie del fruto, se calificó con una puntuación de 5.

## B. ETAPA 2

### 1. Materiales

### a. Obtención de los frutos

Los frutos de papaya fueron obtenidos del mercado de la localidad bajo los mismos criterios que se utilizaron para los ensayos preliminares, además de seleccionarse y desinfectarse de la misma forma.

### 2. Métodos

### a. Preparación de las dispersiones formadoras de los recubrimientos

Se preparó una solución para el recubrimiento a base de quitosano solamente, siguiendo la técnica de Aloui y col (2014) con algunas modificaciones, disolviendo quitosano (Q) (1%, p/v) en una solución acuosa de ácido acético glacial (1%, v/v) a 40ºC durante 12 horas (Kyu y col 2007; Perdones y col 2012; Ali y col 2015a). Para preparar la emulsión compuesta sólo por el aceite esencial seleccionado se utilizó la metodología de Sandoval (2015), para la cual se tomó la cantidad necesaria de aceite para obtener la concentración deseada, disolviéndose en agua destilada a 35°C mediante agitación por 5 minutos, utilizando un Ultra-turrax (Dispersador T18 basic ultra-turrax, IKA, UK) a una velocidad de 13,500 rpm. Para la dispersión formadora del recubrimiento obtenido de la combinación del quitosano con el aceite esencial se siguió la metodología propuesta por Ali y col (2015a), en donde se suspendió la cantidad necesaria del aceite esencial seleccionado hasta obtener la concentración deseada en la solución de quitosano previamente formada, antes de ser homogeneizadas a 13,500 rpm durante 4 minutos. Todas las soluciones se ajustaron a un pH de 5.6 añadiendo NaOH (1 M). Durante estas preparaciones se utilizó como emulsificante Tween-80 al 1% para estabilizar la dispersión por lo menos 24 horas y mejorar la permeabilidad al vapor de agua y sus propiedades mecánicas.

### b. Aplicación de los tratamientos

Los frutos de papaya previamente desinfectados fueron inoculados mediante inmersión en una suspensión de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* ($1 \times 10^6$ conidios/mL) por 5 minutos (Ayón-Reyna y col 2017). Una vez inoculados, los frutos se dividieron al azar en 4 lotes para la aplicación de los siguientes tratamientos: T1:

Control (agua destilada); T2: Q (1%); T3: AES (aceite esencial seleccionado); T4: Q (1%) + AES.

Los frutos fueron sumergidos en sus respectivas dispersiones por un periodo de 5 min (Xing y col 2011) y se colocaron sobre papel estraza a temperatura ambiente para retirar el exceso de humedad y posteriormente ser almacenados a 12°C por un periodo de 20 días, con retiros cada 0, 5, 10, 15 y 20 días para su posterior análisis. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y cada tratamiento incluyó 12 frutos.

### c. Actividad antifúngica *in vitro* de los tratamientos

La actividad antifúngica de los tratamientos se evaluó *in vitro* utilizando la metodología de crecimiento micelial descrita anteriormente y la metodología de germinación de conidios reportada por Aloui y col (2014) con algunas modificaciones.

#### 1) Germinación de conidios

Para la inhibición de la germinación conidial se pipetearon 100 µL de la suspensión conidial (1 X $10^6$ conidios/mL) en las cajas con PDA (control) y PDA adicionadas con el aceite esencial seleccionado Q, AES y Q+AES, se esparció con un asa estéril, posteriormente las cajas se incubaron a 25ºC durante 6 h. La germinación de los conidios se examinó bajo un microscopio óptico con una ampliación de 40x (Microscopio fotoeléctrico Axiophot Carl Zeiss, Alemania). Se examinaron cien conidios y la germinación se estableció mediante el desarrollo de tubos germinativos. Un conidio se consideró germinado cuando la longitud del tubo germinativo se igualó o excedió la mitad de la longitud del conidio. Los resultados

fueron expresados como porcentaje de inhibición de la germinación de acuerdo con la fórmula descrita por Ong y col (2013).

$$\%Inhibición\ de\ la\ germinación = 1 - \frac{Gr}{Gc} x100$$

Dónde:

Gr= Número de esporas germinadas en el tratamiento

Gc= Número de esporas germinadas en el control

**2) Efecto fungistático / fungicida**

El efecto fungistático o fungicida de los tratamientos se llevó a cabo según lo reportado por Bill y col (2014). Discos de agar de las cajas utilizadas en el ensayo de crecimiento radial micelial que no mostraron crecimiento del hongo, fueron transferidos a cajas con PDA fresco durante 7 días a 25°C, para observar cualquier recuperación de crecimiento. Se determinó el efecto fungistático si se observó crecimiento después del periodo de incubación y efecto fungicida si no se observó crecimiento.

**d. Actividad antifúngica *in vivo* de los tratamientos**

**1) Incidencia**

Incidencia de la enfermedad se evaluó de acuerdo con la metodología de Ayón-Reyna y col (2017), la cual se basa en la aparición de los síntomas de antracnosis en la superficie de los frutos. Se evaluó el efecto de los 4 tratamientos desde el primer día que se presentaron los síntomas de la enfermedad en el fruto. Los resultados se

expresaron como el número de frutas que mostraron síntomas de antracnosis del total de frutas en cada tratamiento.

**2) Severidad**

La severidad de los tratamientos se realizó de la misma manera que los ensayos preliminares, realizados en la etapa 1.

**e. Análisis de calidad**

**1) Pérdida de peso**

La pérdida de peso se determinó de acuerdo con la metodología reportada por Henríquez y col (2005). Se pesaron 12 frutos de cada tratamiento durante todo el almacenamiento. Se registró el peso de los frutos cada 2 días con el empleo de una balanza Sartorius modelo TE 4101 (Goettingen, Alemania). Los valores se expresaron como porcentaje de pérdida de peso en relación con el peso inicial del mismo, según la siguiente ecuación:

$$\%\ \text{pérdida de peso} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso final}} * 100$$

**2) Firmeza**

La medición de la firmeza se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Marangoni y col (1995), con algunas modificaciones. Para realizar este procedimiento se tomaron cortes de igual tamaño de la región ecuatorial de cada fruto, obteniéndose un total de 9 mediciones por fruto. Se utilizó un penetrómetro chatillón DFE 100 (DFE AMETEK, Florida, E.U.) con una punta plana de 11 mm de

diámetro a una velocidad de penetración constante (50 mm/min – 5 mm de penetración).

**3) Color externo**

El color en cáscara se evaluó utilizando un colorímetro Minolta CR 200 (Minolta Chromameter, Japón) y se registraron los parámetros de luminosidad (L*) y ángulo de matiz (H°), en tres puntos ecuatoriales equidistantes de cada fruto, se midieron los días 0, 5, 10, 15 y 20 durante el periodo de almacenamiento a 12°C.

**4) Sólidos solubles totales**

Se determinó el contenido de sólidos solubles totales de acuerdo con el método oficial 22.014 de la (AOAC, 2012) utilizando un refractómetro manual (Atago Fisher Scientific, GA, USA). La evaluación se realizó colocando una gota de jugo de cada muestra directamente sobre el refractómetro. El contenido de sólidos solubles totales (SST) se reportó como porcentaje de azúcar (º Brix).

**f. Capacidad antioxidante**

**1) Ensayo ABTS**

El método de ABTS se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado $ABTS^{\bullet+}$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Además, tiene la ventaja que el ion ABTS es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Londoño 2012). Este método se llevó a cabo

según lo reportado por López-Angulo y col (2014) con algunas modificaciones. El radical ABTS se generó mezclando 5 mL de la solución ABTS (7mM en agua) y 88 µL de persulfato de potasio (140 mM). La mezcla se mantuvo en reposo de 12-16 horas a temperatura ambiente protegida de la luz. Una vez formada la solución del radical ABTS se diluyó con una solución buffer de fosfatos (pH 7.4) hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734 nm. El ensayo se llevó a cabo en tubos de vidrio mezclando 0.1 mL del extracto metanólico (previamente descrito) con 2 mL de la solución del radical, la mezcla se dejó en reposo por 30 minutos a 27°C en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm (UNICO SQ-2800 UV/VIS, Dayton, NJ, EUA). Una curva de calibración de Trolox se preparó en el rango de 0-225 µg/mL y la actividad antioxidante fue expresada en µmol equivalente de Trolox sobre 100 g de fruto fresco.

**2) Ensayo DPPH**

Este ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar al radical DPPH$^{\bullet}$. La reacción de estabilización ocurre principalmente mediante un mecanismo de transferencia de electrones con un aporte mínimo de transferencia de átomos de hidrógeno (Londoño 2012). Se llevó a cabo según lo reportado por López-Angulo y col (2014) con algunas modificaciones. Se tomaron 180 µL de una solución de DPPH 150 mM en metanol y se mezclaron con 20 µL del extracto metanólico en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se dejó reposar la mezcla por 30 min (27°C/en oscuridad) y se leyó la absorbancia a 525 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific Multiskan, Go, USA). Una curva de calibración de Trolox fue preparada en el rango de 0-225 µg/mL y la actividad

antioxidante fue expresada en µmol equivalente de Trolox sobre 100 gramos de fruto fresco.

### g. Análisis nutricional y compuestos bioactivos

#### 1) Vitamina C

El contenido de ácido ascórbico se determinó utilizando el método descrito por Dürüst y col (1997) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en una reacción de óxido-reducción donde el ácido ascórbico presente en la muestra reacciona con un tinte conocido como 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI); en donde el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico y el DCPI es reducido ganando los dos átomos de hidrógeno que pierde cada molécula de ácido ascórbico. Cuando el DCPI se reduce cambia de color azul fuerte a rosa y este cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente.

La vitamina se extrajo homogenizando 0.5 g de tejido fresco con 15 mL de una solución de ácido oxálico (0.4%, p/v) y posteriormente se hizo reaccionar con el DCPI (0.0012%, p/v). Para obtener la lectura se empleó un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Milton Roy, México, D.F.) a una longitud de onda de 520 nm.

Para la determinación de vitamina C se obtuvieron dos valores de absorbancia llamados $L_1$ y $L_2$, siendo $L_1$ la absorbancia de todo el DCPI y $L_2$ la absorbancia del remanente de DCPI después de reaccionar con el ácido ascórbico. Para obtener el valor $L_1$ primeramente el equipo se ajustó a cero utilizando agua desionizada y se registró la absorbancia obtenida para una mezcla de 1 mL de la solución de ácido oxálico, 1 mL de solución de buffer de acetato de sodio y 8 mL de la solución de DCPI después de 15 segundos. Posteriormente, el instrumento se ajustó de nuevo a

cero con una mezcla de 1 mL del extracto vitamínico, 1 mL de la solución buffer de acetato y 8 mL de agua desionizada. Inmediatamente después, la absorbancia de la mezcla de 1 mL de solución estándar de ácido ascórbico, 1 mL de buffer de acetato y 8 mL de DCPI se registró como $L_2$. Los valores de $L_2$ se registraron para cada muestra y por diferencia con $L_1$ se obtuvieron las concentraciones de vitamina C utilizando una curva estándar de ácido ascórbico. Se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en mg ácido ascórbico/100 g de fruto fresco.

### 2) Fenólicos totales

Los fenólicos totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteau (FC) descrito por Mora-Rochín y col (2010) con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de muestra y se homogenizaron con 10 mL de metanol (100%), la mezcla se molió en un Ultra-turrax (IKA T18 basic) por 1 minuto, se sónico por 30 min, se filtró y se recuperó el sobrenadante, el residuo se extrajo de nuevo bajo las mismas condiciones, los sobrenadantes se mezclaron y se aforaron a 50 mL con agua desionizada; se tomaron 10 µL de esta solución, se le añadió 0.1 mL de reactivo de Folin Ciocalteau y la mezcla se dejó reposar de 1-8 min. A la mezcla se le añadió una solución de carbonato de sodio saturada y se mantuvo por 30 min a $40^0$C en baño maría. La absorbancia se evaluó a 765 nm en un espectrofotómetro (UNICO, 2800 UV/VIS). La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico y los resultados se reportaron como mg de ácido gálico/100 gramos de fruto fresco.

## h. Desarrollo de la enfermedad

### 1) Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se realizó la evaluación de los cambios microestructurales y proceso de infección de antracnosis en el tejido de la papaya siguiendo la metodología de Cárdenas-Pérez y col (2017) utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental (Zeiss, Evo LS10, Alemania). Se seleccionaron cubos de aproximadamente 1 $cm^3$ ubicados a aproximadamente en el centro de la papaya, cortándolas con un bisturí. Las evaluaciones se llevaron a cabo a los 0, 1 y 10 días. Los cubos se montaron sobre cinta conductora de carbono de doble cara y se observaron directamente bajo el microscopio electrónico en modo ambiental a 20 Pa de vapor de agua y 20 kV. Se utilizó un detector de electrones retrodispersados (NTS BSD). Las imágenes se capturaron a 100, 200, 300, 500, 1 000, 2 000 X y se almacenaron en formato TIFF.

### i. Análisis estadístico

El diseño experimental se realizó con dos factores: tiempo de almacenamiento con 5 niveles (0, 5, 10, 15 y 20 días) y tipo de tratamiento con 4 niveles (Control, Quitosano, Aceite Esencial y Quitosano + Aceite Esencial). Se realizó un diseño experimental completamente al azar con 3 réplicas y 3 repeticiones en cada réplica considerando 60 frutos por réplica. Estos datos se analizaron a través de análisis de varianza usando Statgraphics Plus 5.1 y las medias se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($p<0.05$). Las medias con el correspondiente LSD para cada nivel se representaron usando el programa SigmaPlot 12.0.

# VIII. RESULTADOS

## A. ETAPA 1

### 1. Identificación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*

Las esporas del hongo teñidas con azul de lactofenol y visualizadas en un microscopio óptico para conocer sus características morfológicas presentaron forma cilíndrica y un tamaño de aproximadamente 7-13 µm de largo (**Figura 7)**. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Than y col (2008). Estos autores observaron que los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de chiles y mangos procedentes de Tailandia presentaron forma cilíndrica con un largo de 13.5 µm. También, Rodríguez-López y col (2009) reportaron que los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* en aguacate eran de forma cilíndrica y variaban en tamaño con medidas que oscilaban desde los 9 a los 24 µm de largo.

Los análisis para la identificación molecular del hongo mostraron que la secuencia de nucleótidos obtenida presentó un 99% de similitud con la reportada en la base de datos del banco mundial de genes (GenBank) para *Colletotrichum gloeosporioides,* encontrando similitud con 540 pb de un total de 548 pb (**Figura 8**).

Una vez que se comprobó la identidad del hongo, se procedió a re-aislarlo en PDA fresco y se conservó a 25 °C para su posterior uso.

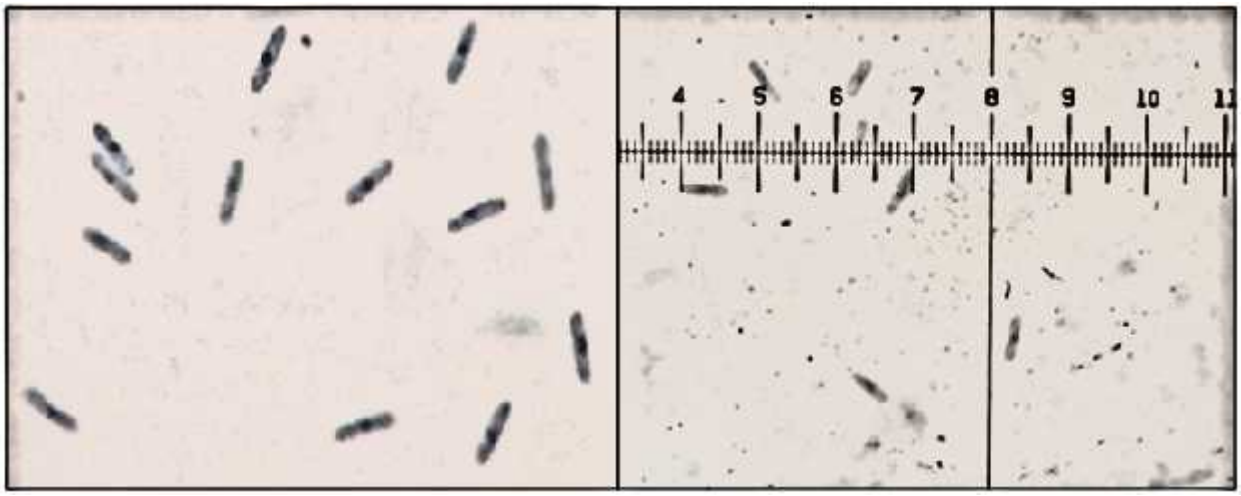



**Figura 7.** Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de papayas infectadas con antracnosis y teñidas con azul de lactofenol. Tomadas en un microscopio óptico a una magnificación de 40x.

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---|---|---|---|---|
| 966 bits(523) | 0.0 | 540/548(99%) | 1/548(0%) | Plus/Plus |

```
Query  2    GGGGCTCTGAATTACGCTCTACACCCTTTGTGACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGG  61
            ||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GGGGCACTGAGTTACGCTCTACACCCTTTGTGACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGG  60

Query  62   TAGAGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGG  121
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TAG-GGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGG  119

Query  122  ATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACT  181
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  120  ATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACT  179

Query  182  TTTAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA  241
            |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  180  TTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA  239

Query  242  ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  240  ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC  299

Query  302  ATTCTGGCGGTCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGG  361
            |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  300  ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGG  359

Query  362  GGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTG  421
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  360  GGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTG  419

Query  422  CGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAT  481
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  420  CGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAT  479

Query  482  TTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAA  541
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  480  TTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAGG  539

Query  542  CCGGGAGG  549
            ||||||||
Sbjct  540  CCGGGAGG  547
```

**Figura 8**. Comparación de la secuencia del espaciador transcrito interno 2 del DNA del hongo aislado y la secuencia de *Colletotrichum gloeosporioides* (número de accesión KP900277.1) depositada en la base de datos del Banco Mundial de Genes.

## 2. Selección del mejor aceite esencial y su concentración mínima inhibitoria (CMI)

### a. Crecimiento micelial

Los resultados mostraron que el poder de cada aceite para inhibir el desarrollo del hongo es dependiente de la concentración, es decir, que al aumentar la concentración de aceite aumenta el porcentaje de inhibición, hasta llegar a su CMI (Tzortzakis y Economakis, 2007; Abdolahi y col 2010a). Para el AEA se probaron concentraciones de 0.2-0.55%, encontrándose un 100% de inhibición a concentraciones iguales o mayores a 0.35%, por lo que se seleccionó 0.35% como la CMI por ser la concentración menor con 100% de inhibición (**Figura 9A)**. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Idris y col (2015), quienes utilizaron aceite esencial de albahaca en diferentes concentraciones para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum musae,* observando que conforme aumentaba la concentración del aceite de igual manera aumentaba el porcentaje de inhibición, encontrando ausencia de crecimiento radial a una concentración de 0.15%.

En el caso de los AEC y AECL se obtuvo una CMI de 0.15%. Ambos aceites tuvieron un comportamiento similar, las tres concentraciones menores fueron estadísticamente diferentes entre sí y a partir de 0.15% el porcentaje de inhibición fue de 100% (**Figuras 9B y 9C**). Algunos autores coinciden con las CMI encontradas para estos aceites, observando alta inhibición *in vitro* del crecimiento de algunos

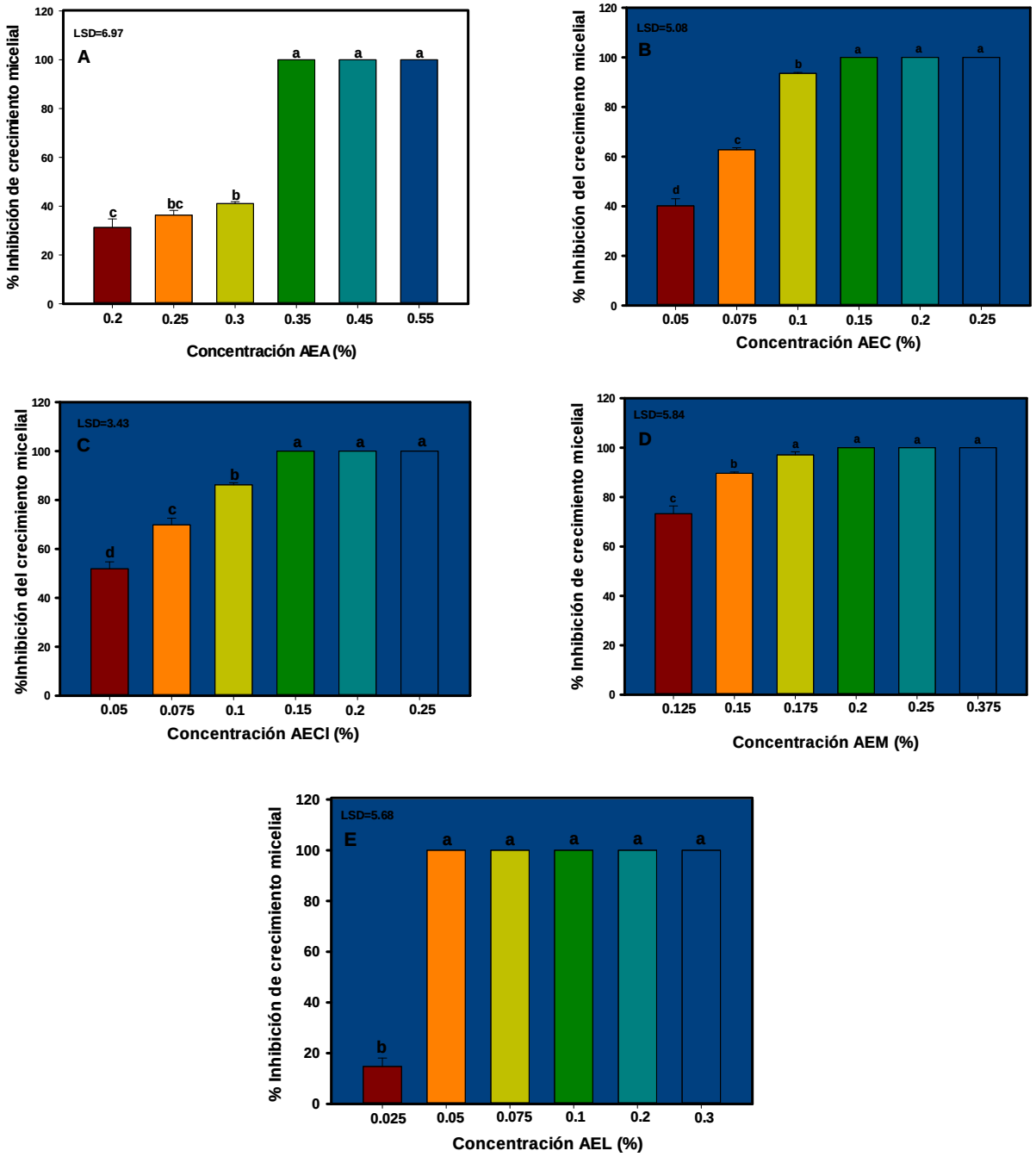



**Figura 9**. Inhibición del crecimiento radial micelial AEL(A), AEM (B), AEA (C), AEC (D) y AECL (E) contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con α=0.05.

hongos como *Phytophthora drechsleri, Penicillium citrinum, Rhizopus nigricans* y *Aspergillus flavus*. Ellos mencionan que puede deberse a la actividad antimicrobiana de los componentes principales de estos aceites como el eugenol, cinamaldehído, carvacrol, entre otros; ya que se cree que pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la funcionalidad del material genético del hongo, ya que contienen un núcleo aromático y un grupo fenólico -OH que se sabe que son reactivos y pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos sulfhidrilo –SH, dando como resultado la desactivación de enzimas en hongos (Farag y col 1989; Velluti y col 2003; Xing y col 2012; Aguilar-González y col 2015; Mohammadi y col 2016). Además, se cree que estos compuestos desintegran la membrana externa de las bacterias, liberando lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP (Hosseini y col 2009; Xing y col 2012; Peng y Li 2014).

En el caso del AEM, 0.2% fue la concentración mínima en la cual se obtuvo un 100% de inhibición del crecimiento micelial. Aunque como se puede apreciar en la **Figura 9D**, la concentración de 0.175%, no fue significativamente diferente a las tres concentraciones mayores. Sin embargo, las dos concentraciones menores presentaron diferencias estadísticas, aunque con porcentajes altos de inhibición. La CMI obtenida en esta investigación concuerda con lo reportado por Moreira y col (2012) y por Freire y col (2012).

En el caso del AEL, la CMI fue de 0.05%, siendo estadísticamente diferente a 0.025% (**Figura 9E**). La CMI del AEL concuerda con la encontrada por Tzortzakis y Economakis (2007), quienes observaron que el crecimiento radial de varios hongos

fitopatógenos (*Colletotrichum coccodes, Botrytis cinerea, Cladosporium herbarum, Rhizopus stolonifer, Aspergillus niger*) se inhibía completamente a una concentración de 0.05%. Se piensa que la actividad antimicrobiana y conservadora del aceite de té de limón se debe a sus componentes fitoquímicos como alcaloides y taninos (Maqbool y col 2011).

**b. Severidad**

Los resultados de severidad visual se muestran en la **Figura 10**. No se presentaron síntomas de antracnosis en ninguno de los tratamientos durante los primeros 5 días; sin embargo, para el día 10 se apreció un incremento significativo en todos los tratamientos. Los aceites de albahaca, menta y té de limón no mostraron diferencia significativa con respecto al control, mientras que los aceites de canela y clavo presentaron mayor severidad con respecto a los demás, incluso por arriba del control; es decir, tuvieron un efecto estimulante. Al final del almacenamiento, el aceite esencial de menta fue el tratamiento que presentó la menor severidad, obteniendo diferencia significativa con respecto al resto de los tratamientos, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí.

Bósquez-Molina y col (2010) evaluaron el efecto de aceites esenciales de tomillo y limón mexicano en concentraciones de 0.10, 0.12 y 0.14% contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* en frutos de papaya, observando mayor severidad de antracnosis en frutos tratados con las concentraciones más altas, incluso mayores que el control.

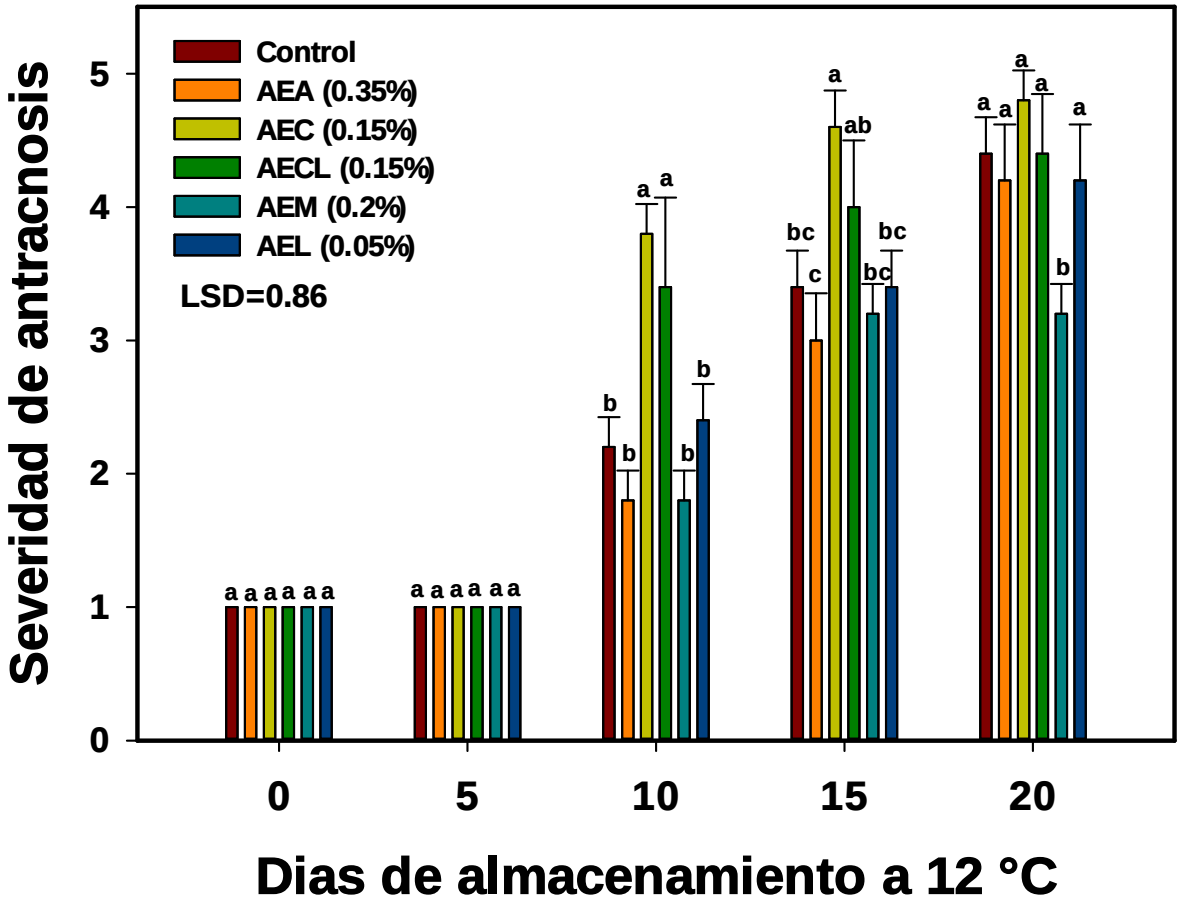



**Figura 10**. Severidad de antracnosis en papaya durante el almacenamiento a 12°C. La fruta fue inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratada con 5 aceites esenciales antes del almacenamiento. Letras diferentes en el mismo día indican diferencia significativa con α=0.05.

Ellos mencionaron que este resultado puede deberse a un efecto fitotóxico de los aceites esenciales en el tejido del fruto, cambiando la capacidad del tejido de la epidermis para detener la germinación del hongo.

Los resultados de los experimentos *in vitro*, mostraron mayor inhibición del crecimiento micelial que los ensayos *in vivo*; sin embargo, se sabe que se necesitan altas concentraciones de aceite cuando se aplican en frutos, debido a las interacciones existentes entre los compuestos fenólicos y la matriz del fruto, además de ser rico en nutrientes que proporcionan un ambiente excelente para el crecimiento del hongo, así como su reparación y regeneración de componentes celulares (Kalemba y Kunicka 2003; Feng y col 2007; Tzortzakis y Economakis 2007; Ali y col 2016). Por ello, se puede esperar que *Colletotrichum gloeosporioides* muestre una menor sensibilidad a los aceites esenciales sobre la superficie de la papaya que cuando se evalúa *in vitro*. Abdolahi y col (2010a) atribuyen esta diferencia de porcentaje de inhibición en ensayos *in vitro* e *in vivo* al cambio en el sitio de acción de los aceites esenciales, ya que el fruto al ser una matriz con una composición química muy variada, los aceites pueden alternarse entre dañar la membrana de las esporas o estar actuando con otro compuesto del fruto, permitiendo así que el hongo crezca y no se inhiba completamente. La actividad antimicrobiana de los compuestos se encuentra en el siguiente orden: compuestos fenólicos con mayor actividad, seguido de alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres e hidrocarburos. También se ha propuesto que los aceites esenciales inhiben la acción de enzimas como la pectinasa y celulasa, que producen los hongos durante el proceso de infección (Abdolahi y col 2010, 2010a). La capacidad de estos compuestos para impedir el crecimiento de los

hongos depende de sus propiedades lipofílicas y de la interferencia en reacciones enzimáticas de la membrana, las cuales son vitales para la propagación del hongo (Caccioni y Guizzardi 1994).

En la **Figura 11** se muestran imágenes en las que se puede apreciar la severidad de antracnosis en las papayas inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratadas con los diferentes aceites esenciales al inicio y al final del almacenamiento a 12°C. En las mismas se observa el daño ocasionado por el hongo con síntomas como zonas oscuras hundidas y con micelio color blanco y color salmón. Estos resultados son similares al estudio realizado por Tapia-Tussell y col (2008) en el que identificaron y caracterizaron al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* causante de antracnosis en frutos de papaya, encontrando lesiones típicas de antracnosis en forma redonda y hundidas, con áreas naranja-rosáceas, formadas por las masas de conidios que cubren el centro de la lesión apareciendo anillos concéntricos.

## B. ETAPA 2

### 1. Actividad antifúngica *in vitro* de los tratamientos

#### a. Crecimiento micelial

En la etapa 1 se mostró que el AEM al 0.2% presentó la mayor actividad antifúngica en contra de *Colletotrichum gloeosporioides* en comparación con los otros aceites evaluados, razón por la cual se utilizó este aceite para las evaluaciones de la etapa 2.

| Tratamiento | Día 0 | Día 20 | Tratamiento | Día 0 | Día 20 |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | | | AECL (0.15%) | | |
| AEA (0.35%) | | | AEM (0.2%) | | |
| AEC (0.15%) | | | AEL (0.05%) | | |

**Figura 11**. Síntomas de antracnosis después de 20 días de almacenamiento a 12°C en papayas inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratadas con 5 aceites esenciales.

Los resultados de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los tratamientos quitosano (Q), aceite esencial de menta (AEM) y Q+AEM se muestran en la **Figura 12**. Los tratamientos evaluados no mostraron diferencias significativas entre ellos ya que no presentaron crecimiento del hongo durante el periodo de incubación; sin embargo, el control presentó un crecimiento potencial desde las primeras 24 horas de incubación a 25 °C. Esto refleja la efectividad *in vitro* de los tres tratamientos para obtener un 100% de inhibición contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

El aceite esencial de menta fue evaluado a la misma concentración que en el presente estudio por Freire y col (2012) de manera *in vitro* contra varios hongos fitopatógenos (*Aspergillus flavus, glaucus* y *niger)*, encontrando un 100% de inhibición del crecimiento micelial. Este comportamiento puede deberse al mentol, uno de los principales componentes del aceite esencial de menta, el cual se sabe tiene actividad antimicrobiana.

Algunas fracciones en los aceites esenciales pueden interaccionar con la membrana celular, provocando un aumento en su permeabilidad y la fuga de constituyentes intracelulares vitales, así como afectar la respiración celular. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, las interacciones con las enzimas y proteínas de la misma causan un flujo opuesto de protones, afectando la actividad celular.

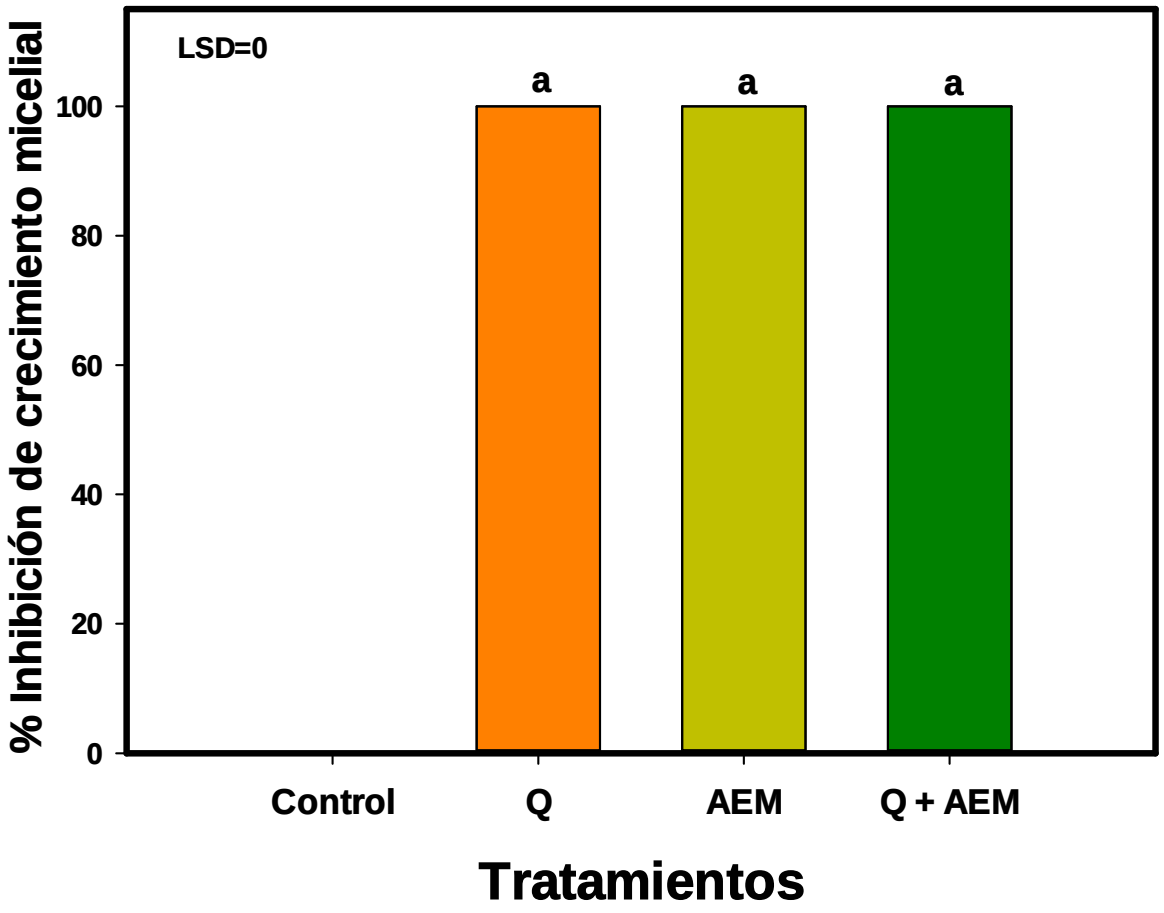



**Figura 12.** Inhibición del crecimiento micelial de los tratamientos control, quitosano (Q), aceite esencial de menta (AEM), y su combinación (Q+AEM) contra *Colletotrichum gloeosporioides* después de un periodo de incubación de 7 días a 25°C. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre los tratamientos con α=0.05 y LSD=0.

Sus constituyentes químicos son característicamente hidrófobos y se acumulan en ambientes ricos en lípidos de las estructuras de la membrana celular, causando daños estructurales y funcionales (Farag y col 1989; Velluti y col 2003; Abdolahi y col 2010a; Xing y col 2012).

De manera *in vitro,* el quitosano ha sido utilizado para combatir la proliferación de distintos hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum, Penicillium digitatum, Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides,* observando alta inhibición de su crecimiento en concentraciones cercanas a las usadas en el presente estudio (Bautista-Baños y col 2003, 2004; Hewajulige y col 2007). Se cree que dicho polisacárido puede provocar alteraciones morfológicas y celulares en las hifas de los hongos, retrasando su crecimiento al afectar varios estados de su desarrollo.

Por su parte, Alvarado-Hernández y col 2011, evaluaron el efecto antifúngico del quitosano de manera *in vitro* contra *Rhizopus stolonifer* encontrando un porcentaje de inhibición alto. Este estudio concuerda con lo reportado por Mohammadi y col (2015), quienes encontraron valores altos de inhibición *in vitro* contra *Phytophthora drechsleri* al utilizar quitosano. También, Hewajulige y col (2007) utilizaron un recubrimiento de quitosano al 1% para combatir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* obteniendo inhibición total del crecimiento micelial y de la germinación de los conidios. Este comportamiento puede deberse a la capacidad antifúngica del quitosano al estimular la respuesta de defensa en el huésped.

El uso combinado del quitosano con diversos aceites esenciales ha demostrado excelente actividad antifúngica contra diversos hongos fitopatógenos de manera *in vitro* alcanzando valores altos de inhibición (Ali y col 2014; Bill y col 2014; Mohammadi y col 2016). Este comportamiento se atribuye al poder antifúngico del quitosano, a su naturaleza poli catiónica y a la longitud de su cadena. El mecanismo antifúngico del quitosano implica una morfogénesis de las moléculas de quitosano con la pared celular impidiendo el crecimiento de los hongos. Además, se ha observado microscópicamente que oligómeros de quitosano se difunden dentro de las hifas del hongo bloqueando la actividad enzimática responsable de su crecimiento (Eweis y col 2006).

Dantas-Guerra y col (2015) observaron valores superiores al 90% de inhibición del crecimiento micelial de 4 hongos fitopatógenos al aplicar quitosano en combinación con aceite esencial de *Mentha piperita* y *Mentha villosa*, mencionando que esto pudo deberse al daño a la membrana fúngica ocasionado por el quitosano al interaccionar sus grupos aminos positivos con los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente, dando como resultado un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática del hongo. También mencionaron que una vez que el quitosano entra al citoplasma, se transloca al núcleo e interfiere con la síntesis de ARN y proteínas.

### b. Germinación de conidios

Los resultados de inhibición de la germinación de los conidios se observan en la **Figura 13.** Todos los tratamientos lograron inhibir el desarrollo del tubo germinativo,

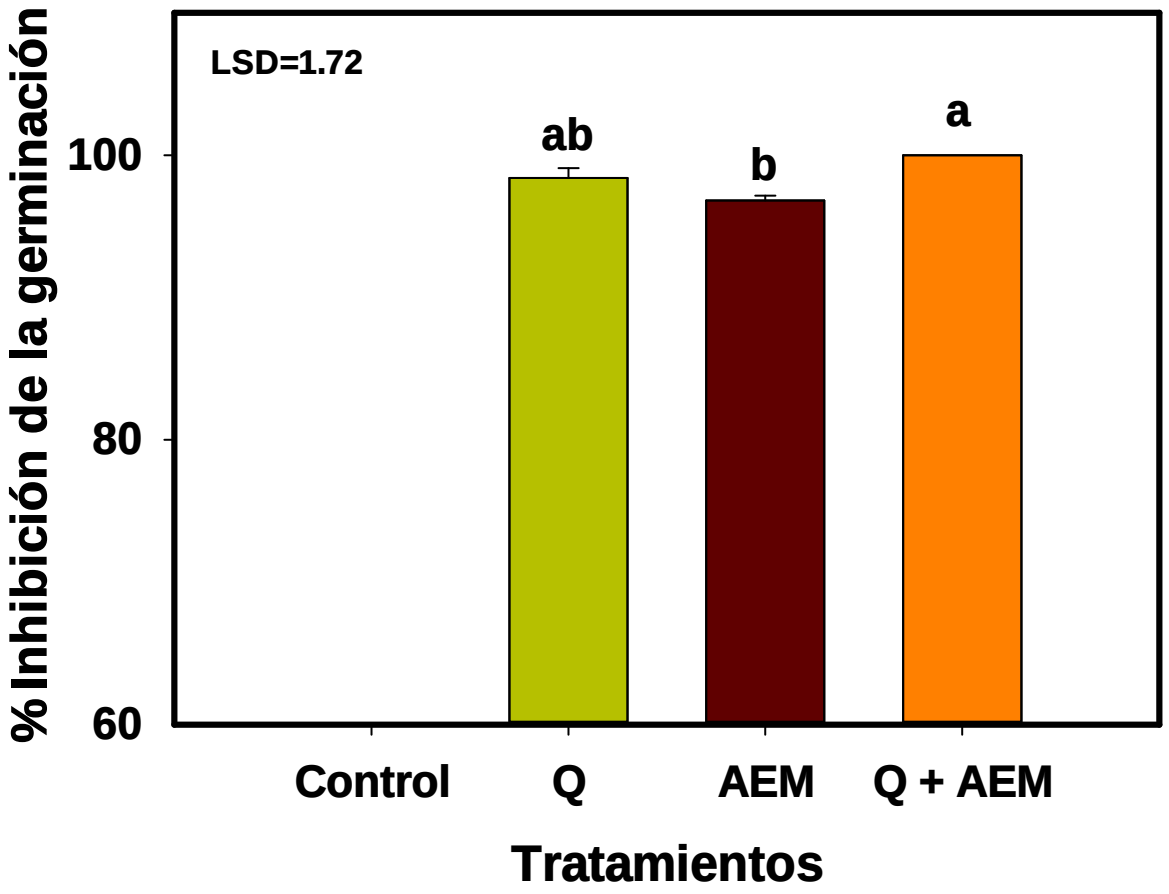



**Figura 13.** Inhibición de la germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* de los tratamientos control, quitosano (Q), aceite esencial de menta (AEM), y su combinación (Q+AEM) después de un periodo de incubación de 6 horas en papa dextrosa agar (PDA) a 25°C. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos (α=0.05) y LSD=1.72.

presentándose el mayor porcentaje de inhibición en la combinación Q+AEM con un 100% seguido del Q con un 98% y AEM con un 96%. Los tratamientos AEM y Q no mostraron diferencia significativa entre ellos y a su vez, el tratamiento Q no tuvo diferencia significativa con el tratamiento combinación; sin embargo, los tratamientos AEM y Q+AEM si tuvieron diferencia significativa. Todos los valores de inhibición de los tratamientos son altos, lo que demuestra su efectividad para retardar la germinación de las esporas. La efectividad de los aceites esenciales a bajas concentraciones, tales como té de limón, clavo, menta y eucalipto, ha sido reportada para inhibir la germinación de esporas de algunos hongos como *Colletotrichum coccodes, Botrytis cinerea, Cladosporium herbarum, Rhizopus stolonifer, Aspergillus niger* (Tzortzakis y Economakis 2007), *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (Sharma y col 2017) y *Colletotrichum gloeosporioides* (Padman y Janardhana 2012), obteniendo valores altos de inhibición.

El porcentaje de germinación de conidios para el tratamiento de AEM en el presente estudio concuerda con el obtenido por Feng y col (2007), al obtener un 95.1% de inhibición contra *Alternaria alternata* al aplicar aceite esencial de cassia. Maqbool y col (2010) también encontraron valores altos de inhibición de la germinación de conidios de *Colletotrichum musae* (>85%) al aplicar aceite de canela, atribuyendo este comportamiento a los compuestos volátiles presentes en los aceites, los cuales pueden afectar el crecimiento del hongo antes de su volatilización.

La germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* por la acción del quitosano ha sido reportada por Ali y col (2010) quienes obtuvieron un 100% de inhibición de la germinación de conidios aislados de frutos de papaya al aplicar

quitosano al 2%, observando una deformidad en los conidios al aplicar este compuesto. Por su parte, Barrera-Necha y col (2017), evaluaron nanopartículas de quitosano en combinacion con aceite de tomillo contra *Colletotrichum gloeosporioides* encontrando un 100% de inhibición de su germinación, atribuyendo este resultado al mecanismo de acción del aceite al alterar la permeabilidad de la célula fúngica.

También se ha evaluado la inhibición de la germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*, *musae* y *capsici* al combinar distintos polisacáridos como goma arábica con diferentes aceites esenciales como canela y té de limón encontrando valores altos de inhibición (Maqbool y col 2011; Ali y col 2014), lo que sugiere que combinando este tipo de compuestos actuarían como una barrera que limita la penetración del tubo germinativo del hongo.

### c. Efecto fungistático / fungicida

Todos los tratamientos mostraron efecto fungicida contra el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides*, una vez que se resembraron en placas con PDA fresco por un periodo de incubación de 7 días a 25°C. Durante este periodo, no se observó crecimiento en las placas, lo cual demuestra que los tratamientos ejercen un efecto fungicida y no permiten el desarrollo del hongo aun cuando se le proporcionen las condiciones y los nutrientes necesarios. Por su parte, el tratamiento control mostró crecimiento normal del hongo desde las primeras 24 horas de incubación (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Efecto fungistático / fungicida *in vitro* de los tratamientos control, quitosano (Q), aceite esencial de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) contra *Colletotrichum gloeosporioides* después de un periodo de incubación de 7 días a 25°C.

| **Tratamiento** | **Crecimiento radial de *C. gloeosporioides* (cm)** |
|---|---|
| Control | 7.23[a] |
| Quitosano (1%) | 0[b*] |
| AEM (0.2%) | 0[b*] |
| Quitosano + AEM | 0[b*] |

Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas entre los tratamientos (α=0.05), LSD=0; *Efecto fungicida, [+]Efecto fungistático.

En la literatura se reporta el efecto fungicida de algunos aceites esenciales como tomillo y limón mexicano contra algunos hongos fitopatógenos, entre ellos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, usados en concentraciones bajas (Caccioni y col 1994; Bosquez-Molina y col 2010). Sharma y col (2017) aplicaron aceite de clavo, menta y té de limón en concentraciones bajas para inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, observando un comportamiento fungicida que atribuyeron a la naturaleza lipofílica de los aceites, lo que facilitó la penetración de la bicapa lipídica fúngica, causando su alteración. También este efecto ha sido observado al combinar ciertos polisacáridos con aceites esenciales, como en el estudio realizado por Bill y col (2014) cuando formularon diferentes recubrimientos comestibles combinando aceite de tomillo con quitosano, *aloe vera* y goma arábica para combatir al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, observando actividad fungicida en los tratamientos combinados de aceite de tomillo con aloe vera y quitosano, explicando que al incorporar el aceite esencial con quitosano inducía la actividad de enzimas como la quitinasa y β-1,3-glucanasa, las cuales juegan un papel importante en el mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos al facilitar las reacciones bioquímicas implicadas en la hidrólisis de polímeros de la pared celular de los hongos.

Barreto y col (2016) utilizaron quitosano en combinación con aceite esencial de orégano para inhibir el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*, observando un efecto fungicida durante su periodo de incubación; además, se inhibió la germinación de esporas y la esporulación de estos hongos.

## 2. Actividad antifúngica *in vivo* de los tratamientos

### a. Incidencia de antracnosis

En la **Figura 14** se muestran los resultados de incidencia de la enfermedad en los frutos de papaya. Durante los primeros 4 días de almacenamiento no se observaron síntomas de antracnosis en los tratamientos, fue hasta el día 8 donde se apreciaron algunos síntomas en los frutos control (sin tratar), mientras que en los frutos tratados no hubo tales, teniendo ese día diferencia estadística con respecto al control.

El día 12 de evaluación se visualizaron los primeros síntomas de antracnosis en los frutos recubiertos con Q y Q+AEM, presentando el 50% de sus frutos la enfermedad. Para el caso de los tratamientos control y AEM, todos los frutos (100%) presentaron la enfermedad.

Al día 16 el 100% de los frutos en los tratamientos control, AEM y Q+AEM presentaron la enfermedad, teniendo diferencia estadística con los frutos recubiertos con Q, que mantuvo sin cambios sus valores de incidencia durante dos evaluaciones más (días 12 y 16), con sólo el 50% de sus frutos con síntomas de antracnosis. Esto indica que la aplicación de quitosano sobre la superficie de las papayas le otorgó una resistencia adicional contra el hongo por hasta 4 días.

Al finalizar el periodo de almacenamiento a 12 °C, todos los frutos sin tratar y tratados con los diferentes recubrimientos desarrollaron la enfermedad, sin presentarse diferencia estadística entre ellos.

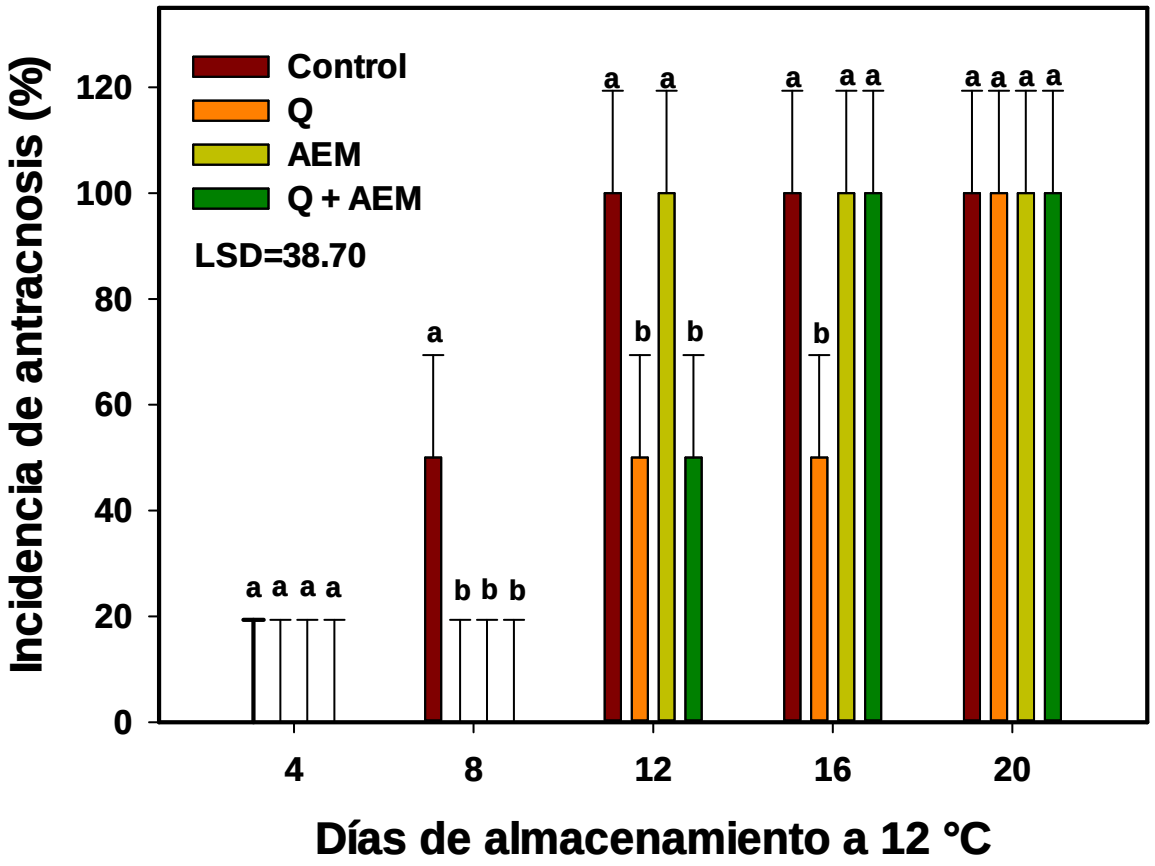



**Figura 14.** Incidencia de la enfermedad antracnosis durante el almacenamiento a 12 °C en frutos de papaya tratados con quitosano, AEM y Q+AEM. Letras diferentes en el mismo día de evaluación indican diferencia significativa entre los tratamientos (α=0.05) y LSD=38.70.

El uso del quitosano en forma de recubrimiento ha sido reportado anteriormente en la literatura. Li y Yu (2001) en su estudio recubrieron frutos de durazno utilizando dos diferentes concentraciones de quitosano para retardar la pudrición provocada por el hongo *Monilinia fructicola* durante 6 días a 23°C. Observaron una menor incidencia de la enfermedad al aplicar quitosano (42.3%) en comparación con el control (100%) al final del periodo de almacenamiento, concluyendo que el quitosano tiene potencial para controlar la pudrición de los duraznos ya que retrasa la expansión de las lesiones al inducir la agregación y contorción del micelio, además de producir la ruptura de las proteínas en las células fúngicas.

Por su parte, Hewajulige y col (2007) evaluaron un recubrimiento a base de quitosano al 1% en frutos de papaya para inhibir el desarrollo de antracnosis durante un periodo de almacenamiento de 14 días a 13.5°C. La incidencia de la enfermedad se vio reducida en los frutos tratados obteniendo alrededor de un 20%, en comparación con los frutos control que alcanzaron valores de 90%. Explicaron que esto pudo deberse a que el quitosano forma una barrera alrededor del fruto la cual impide el flujo de nutrientes al exterior, bloqueando de esta manera el crecimiento del patógeno. Un comportamiento similar obtuvo Bill y col (2014) cuando utilizaron diferentes recubrimientos de quitosano, goma arábica y *aloe vera*, en diferentes proporciones o en combinación con aceite de tomillo, con el propósito de inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de aguacate almacenado por 5 días a 20°C. Observaron una menor incidencia en los frutos recubiertos con las combinaciones de quitosano con aceite de tomillo (40%), y *aloe vera* con aceite de tomillo (50%) comparados con los frutos recubiertos con sólo aceite de tomillo (60%). Esta

tendencia es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que nuestra combinación fue más efectiva que al aplicar sólo el aceite de menta.

### a. Severidad

En la **Figura 15** se pueden observar los resultados de la severidad que presentaron los frutos de papaya inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* al aplicar los distintos tratamientos durante su almacenamiento a 12°C. Los primeros 6 días de almacenamiento los valores de área dañada en los frutos de papaya en los distintos tratamientos se mantuvieron entre 0 y 25%. A partir del día 8, los frutos tratados con quitosano obtuvieron valores menores de severidad con respecto a los frutos control observándose diferencia estadística entre ellos; sin embargo, no tuvo diferencia significativa con respecto a los frutos tratados con AEM y la combinación Q+AEM. Los frutos sin tratar obtuvieron valores superiores al 26% en superficie dañada a partir del día 10 de evaluación mostrando diferencia significativa con respecto a los tratamientos de quitosano y la combinación.

Los dos últimos días de evaluación se presentó diferencia estadística significativa entre todos los tratamientos, alcanzando el tratamiento control los valores más altos de severidad mientras que los valores menores correspondieron al tratamiento con quitosano. En la **Figura 16** se observan los frutos de papaya de cada uno de los tratamientos en los días 0, 5, 10, 15 y 20, observando que al final del almacenamiento son mayores

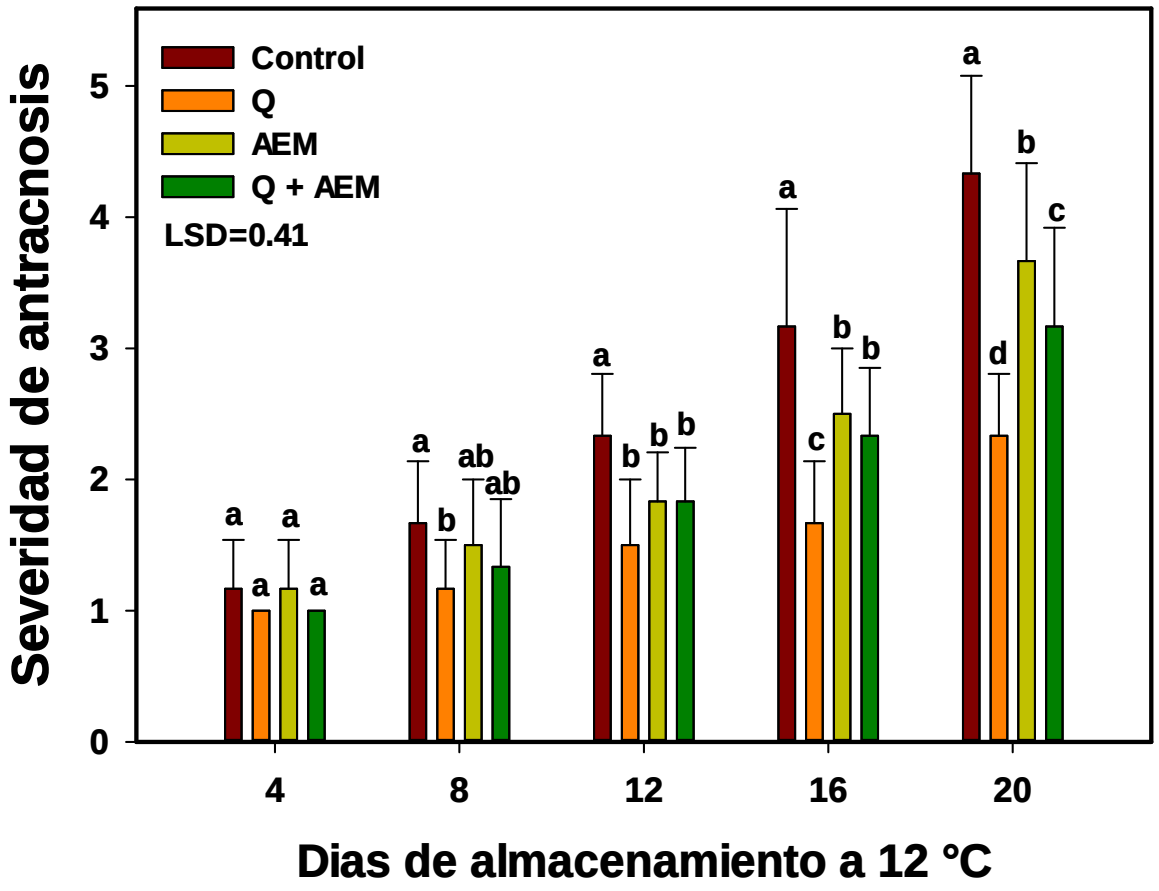



**Figura 15.** Severidad de antracnosis en frutos de papaya tratados con quitosano, AEM y Q+AEM durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Letras diferentes en el mismo día de evaluación indican diferencia significativa entre los tratamientos (α=0.05) y LSD=0.41.

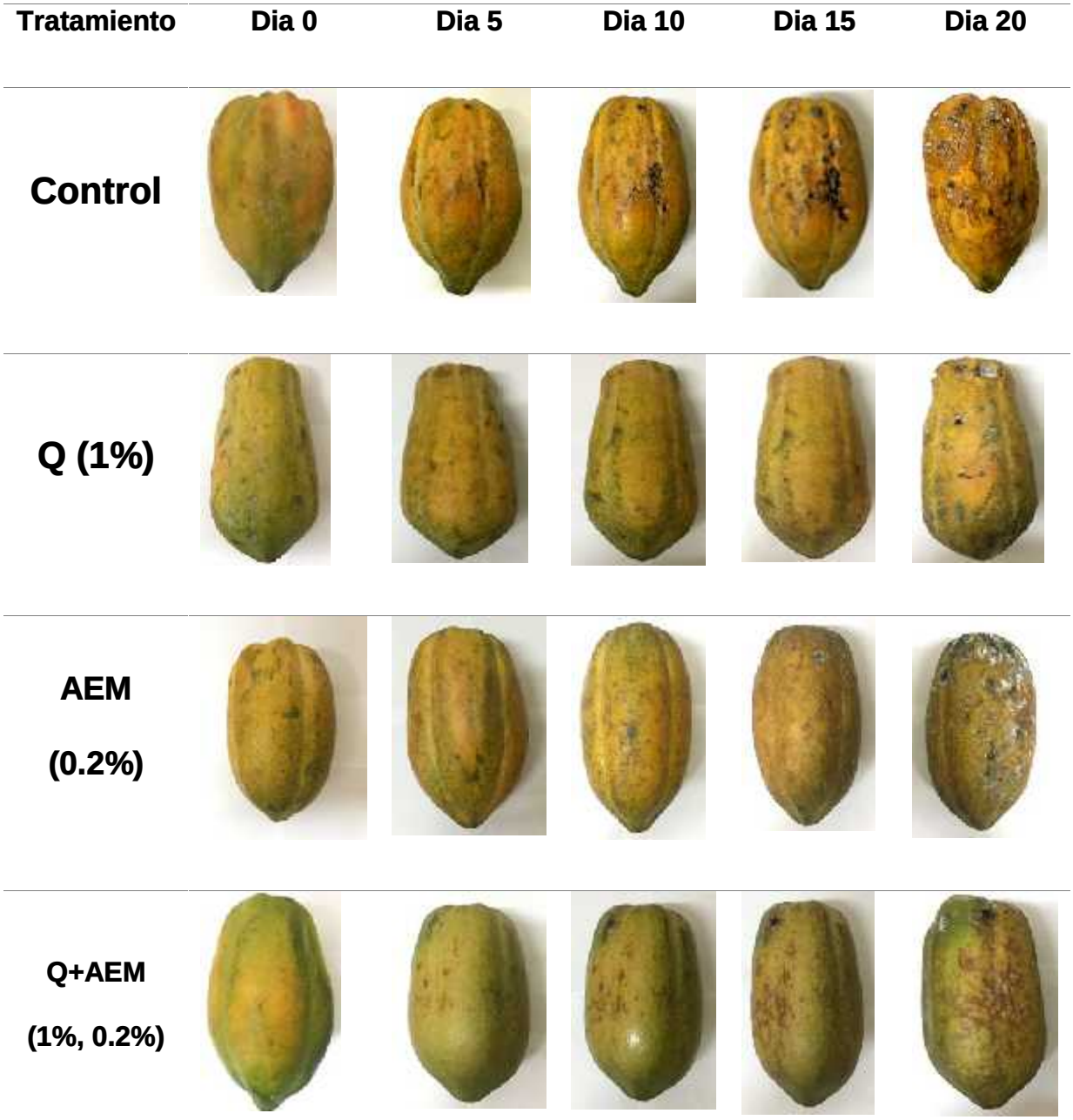



**Figura 16.** Visualización de la severidad de antracnosis en frutos de papaya a lo largo del periodo de almacenamiento a 12 °C para los tratamientos control, quitosano (Q), aceite esencial de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM).

los síntomas presentes en los frutos control. Estos resultados nos muestran el potencial antifúngico de cada uno de los tratamientos contra el desarrollo de antracnosis, observando que todos retardan el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* durante el almacenamiento a 12 °C.

Sin embargo, cabe destacar que el mejor tratamiento contra esta enfermedad es el de quitosano (1%) al mostrar los valores más bajos de severidad. Resultados similares a los del presente estudio fueron observados por Bautista-Baños y col (2003) cuando aplicaron un recubrimiento a base de quitosano al 0.5 y 1.5% de manera individual y combinada con extractos acuosos de semilla de papaya. Encontraron valores de severidad entre 1 y 2 (0-25% de daño) en frutos de papaya control mientras que en aquellas tratadas sólo con quitosano o en combinación al 1.5% fueron menores.

El desarrollo de antracnosis en frutos de papaya también se ha buscado mitigar combinando quitosano con carbonatos, encontrando una menor severidad en los frutos tratados con quitosano sólo o en combinación, en comparación con los frutos no tratados (Sivakumar y col 2005). Kyu y col (2007) reportaron resultados similares al aplicar quitosano sólo o en combinación con aceite esencial de canela en frutos de papaya inoculados con *Colletotrichum gloeosporioide*s. Todos los valores de severidad fueron menores comparados con los frutos sin tratar; sin embargo, la severidad más baja la obtuvo el quitosano de manera individual. Es posible que el recubrimiento de quitosano en los frutos actúe como una barrera que limita la penetración del tubo germinativo de *Colletotrichum gloeosporioides*; aunque también se cree que el quitosano induce varios mecanismos de defensa del huésped, como la

inducción de barreras físicas y la producción de fitoalexinas (Hewajulige y col 2009; Li y col 2015).

Mohammadi y col (2015) aplicaron un recubrimiento a base de quitosano en combinacion con aceite de zataria y canela para inhibir el desarrollo de *Botrytis cinerea* en frutos de fresa, observando un retraso en el desarrollo de este hongo. Ellos sugieren que el mecanismo antifúngico de esta combinación se debe a que los compuestos presentes en los aceites (como eugenol o timol) alteraron la superficie y estructura de la pared celular fúngica y el quitosano actuó como potenciador al reducir la síntesis de la pared celular y facilitar su muerte.

### 3. Análisis de calidad

#### a. Pérdida de peso

La pérdida de peso en los frutos es un reflejo de la salida de agua a través de la cáscara por medio del proceso de transpiración, así como también y en menor medida de la salida de compuestos volátiles (Picard y col 2013).

De acuerdo con la **Figura 17**, la tendencia observada durante el almacenamiento de los frutos de papaya es un incremento en la pérdida de peso alcanzando valores no mayores al 5%. Los tratamientos control y Q no tuvieron diferencia estadística ($p \leq 0.05$) entre ellos durante todo el proceso de evaluación. Se observó que, a los 10 y 15 días, los tratamientos de AEM y Q+AEM no tuvieron diferencia entre ellos, pero si con respecto a los frutos no tratados los cuales tuvieron menor pérdida de peso que los tratados. El último día de evaluación los tratamientos control, Q y Q+AEM no

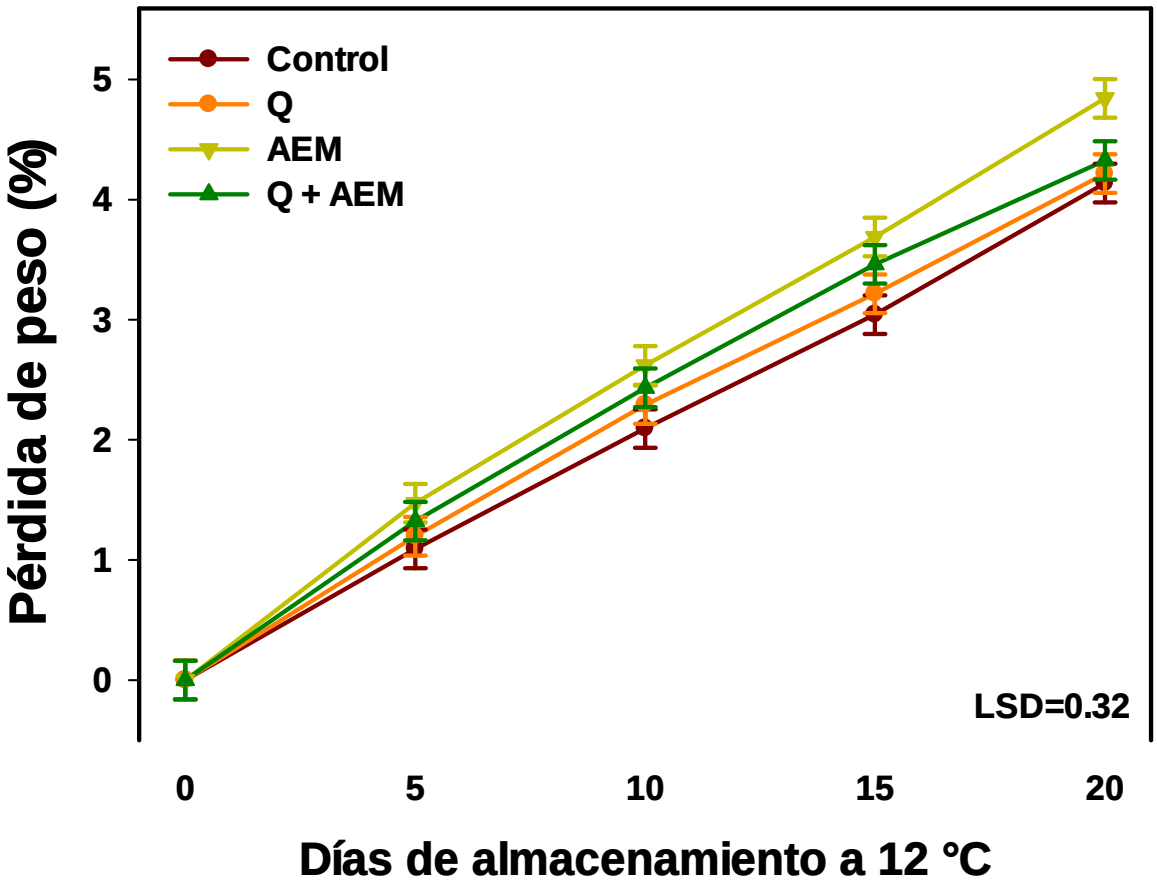



**Figura 17.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano (Q), aceite de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) sobre el porcentaje de pérdida de peso en frutos de papaya cv. Maradol inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Las barras verticales indican LSD=0.32 (α=0.05).

obtuvieron diferencia entre ellos. Esto indica que la pérdida de peso fue resultado del proceso natural de maduración (Ali y col 2015).

El tratamiento AEM fue quien obtuvo el mayor porcentaje de pérdida de peso durante todo el almacenamiento teniendo diferencias significativas con el resto de los tratamientos sólo al final. Este comportamiento también lo observaron Picard y col (2013) al recubrir frutos de papaya con aceite esencial de menta presentando mayor pérdida de peso lo que atribuyeron a un daño en la cáscara ocasionado por el aceite. También, Pontigo-Suárez y col (2015) reportaron una mayor pérdida de peso en frutos de papaya recubiertos con aceite de orégano en comparación con frutos no recubiertos, explicando que esto probablemente se debió a que la permeabilidad del recubrimiento fue demasiado alta sobre el fruto y también a que el aceite provocó un estrés en el fruto al detectar un agente extraño que limitaba su consumo de oxígeno aumentando su tasa de respiración y por lo tanto mayor pérdida de agua.

En este estudio, la adición de aceite de menta tuvo un impacto negativo sobre la retención de agua siendo este parámetro un factor crucial para preservar la fruta, ya que una gran pérdida de peso disminuye la apariencia de los frutos. Sin embargo, según Almeida-Castro y col (2011) se requiere una pérdida de peso mayor al 5% para el deterioro de las papayas; y dado que el valor final obtenido por los tratamientos, incluso el porcentaje más alto obtenido por el AEM no sobrepasa este valor, se puede considerar que la pérdida de peso no fue tan considerable como para afectar la calidad del fruto.

Contrario a lo observado en este estudio, Ali y col (2014) encontraron menor pérdida de peso en chiles recubiertos con aceites esenciales de propóleo y canela.

En este caso, el recubrimiento tuvo un efecto como barrera semipermeable contra los gases y la movilización de solutos, disminuyendo la pérdida de peso.

**b. Firmeza**

La firmeza es uno de los atributos que dicta la vida y calidad poscosecha de los frutos. Los resultados de firmeza obtenidos al recubrir frutos de papaya con los diferentes tratamientos durante un periodo de almacenamiento de 20 días a 12 °C se muestran en la **Figura 18**. El valor inicial promedio de firmeza de los frutos fue de 87 N observándose una disminución conforme avanzó el tiempo de almacenamiento para todos los tratamientos. Durante los días 5 y 10, los tratamientos AEM, Q y control presentaron un porcentaje de pérdida de firmeza similar, mientras que el tratamiento Q+AEM presentó la mayor pérdida de firmeza ($p \leq 0.05$) en el día 5 con respecto a los demás tratamientos, seguido de una retención el resto del almacenamiento. Debido a que los frutos no tratados presentaron una pérdida de firmeza constante durante todo el almacenamiento, en las dos últimas evaluaciones los tratamientos Q+AEM y AEM obtuvieron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al control, el cual obtuvo los valores más bajos de firmeza al finalizar el periodo de almacenamiento.

El ablandamiento en los frutos se debe al deterioro de la estructura celular, la composición de la pared celular y los materiales intracelulares (Ali y col 2011; Olufunmilayo y Uzoma 2016). Este comportamiento también se ha podido observar en pepinos recubiertos con quitosano y en combinación con aceite de canela,

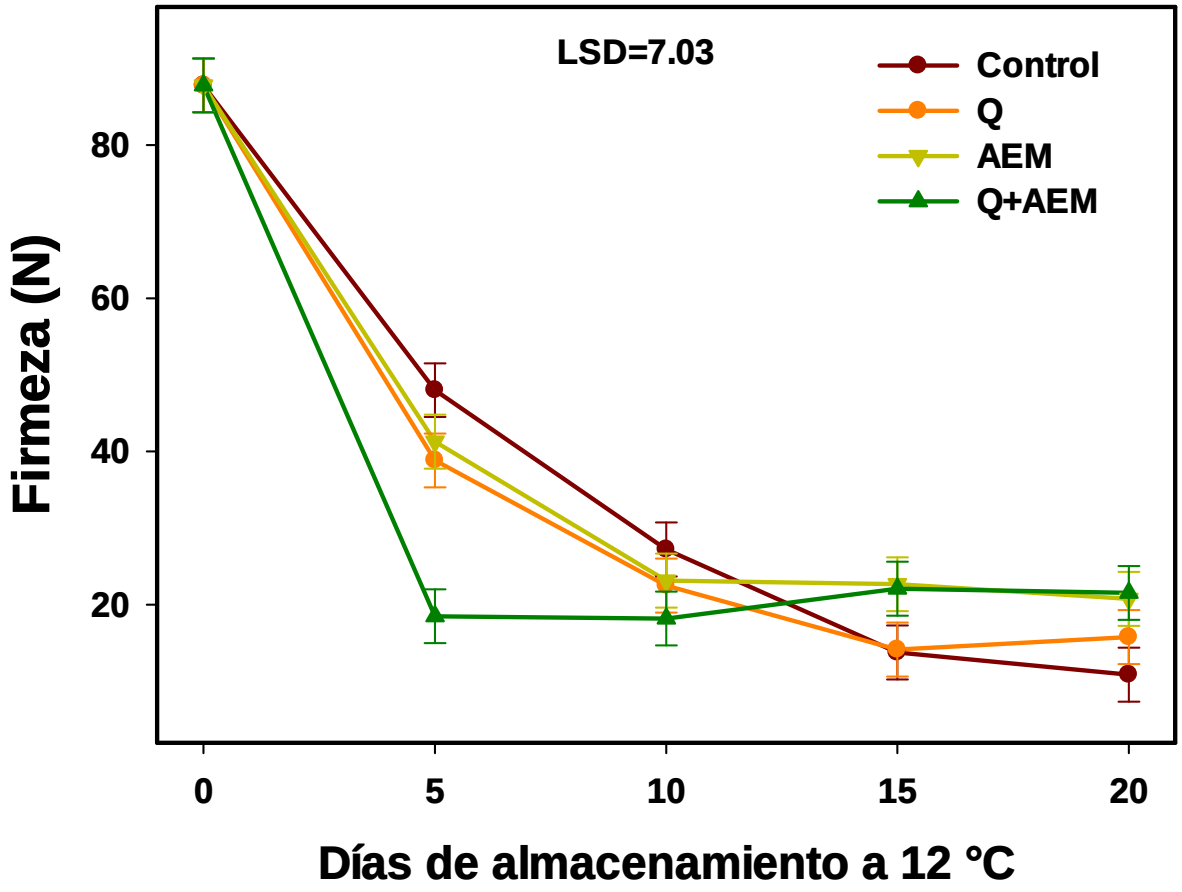



**Figura 18.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano (Q), aceite de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) sobre la firmeza en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Las barras verticales indican LSD=7.03 (α=0.05).

encontrando mejor retención de la firmeza en los pepinos recubiertos (Mohammadi y col 2015).

A pesar de que el recubrimiento con quitosano solo tuvo un mejor control de la enfermedad, no tuvo la mayor firmeza obteniendo el mismo comportamiento que el resto de los tratamientos al final del almacenamiento. Resultados similares obtuvieron Bautista-Baños y col (2003) observando mayor firmeza al recubrir frutos de papaya con extractos de semilla de papaya y su combinación con quitosano para inhibir antracnosis que cuando lo aplicaron de manera individual. Ellos sugirieron que los tratamientos con extracto de semilla de papaya retrasaron el proceso de maduración de la fruta dando como resultado una fruta más firme. Por su parte, Hewajulige y col (2007) recubrieron frutos de papaya con quitosano al 1% para inhibir el desarrollo de antracnosis encontrando mejor retención de la firmeza en los frutos tratados en comparación con los frutos control. Estos autores comentaron que este comportamiento pudo deberse a un retraso en el proceso de maduración y senescencia del fruto, gracias a que es más permeable al $O_2$ que al $CO_2$.

El uso combinado del quitosano con aceites esenciales para retener la firmeza en los frutos ha sido reportado en la literatura. Olufunmilayo y Uzoma (2016) observaron una mayor retención de la firmeza en frutos de pepino recubiertos con quitosano en combinación con aceite de té de limón en comparación con los frutos control los cuales mostraron una disminución en su firmeza. Ellos mencionan que esto pudo deberse a la inhibición que ejercieron estos compuestos sobre enzimas hidrolíticas de la pared celular impidiendo la lisis de las pectinas y almidón. Además, esta retención en la firmeza también la atribuyeron a la actividad antifúngica del

recubrimiento y su capacidad para cubrir la cutícula del fruto y las lenticelas, minimizando la infección, la respiración y otros procesos metabólicos durante el almacenamiento.

Barreto y col (2016) recubrieron frutos de tomate cherry con quitosano combinado con aceite esencial de orégano para inhibir el desarrollo de *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*, mostrando mayor firmeza al aplicar el recubrimiento. Relacionaron este efecto con la formación de una barrera semipermeable al $O_2$, $CO_2$, agua y solutos, debido a la hidrofobicidad otorgada del aceite al quitosano mejorando sus propiedades físicas de barrera. También, Correa-Pacheco y col (2017) encontraron mayor firmeza al recubrir frutos de aguacate con quitosano y aceite de tomillo en comparación con los frutos control.

Contrario a lo obtenido en este estudio, existen en la literatura reportes del uso de algunos aceites esenciales utilizados de manera individual que no ayudaron a la retención de la firmeza en frutos como pimiento (Ali y col 2015) y mango Kent (Mattiuz y col 2015) observando valores de firmeza similares a los frutos sin recubrir.

### c. Luminosidad externa (L*)

La luminosidad de los frutos de papaya partió de un valor promedio de 57.6 para todos los tratamientos y no se observaron cambios durante el almacenamiento manteniendo sus valores, por lo que la aplicación de estos recubrimientos no tuvo efecto sobre la luminosidad de las papayas (**Figura 19A**). En el último día de almacenamiento se observó un descenso en los frutos no recubiertos. A pesar de no

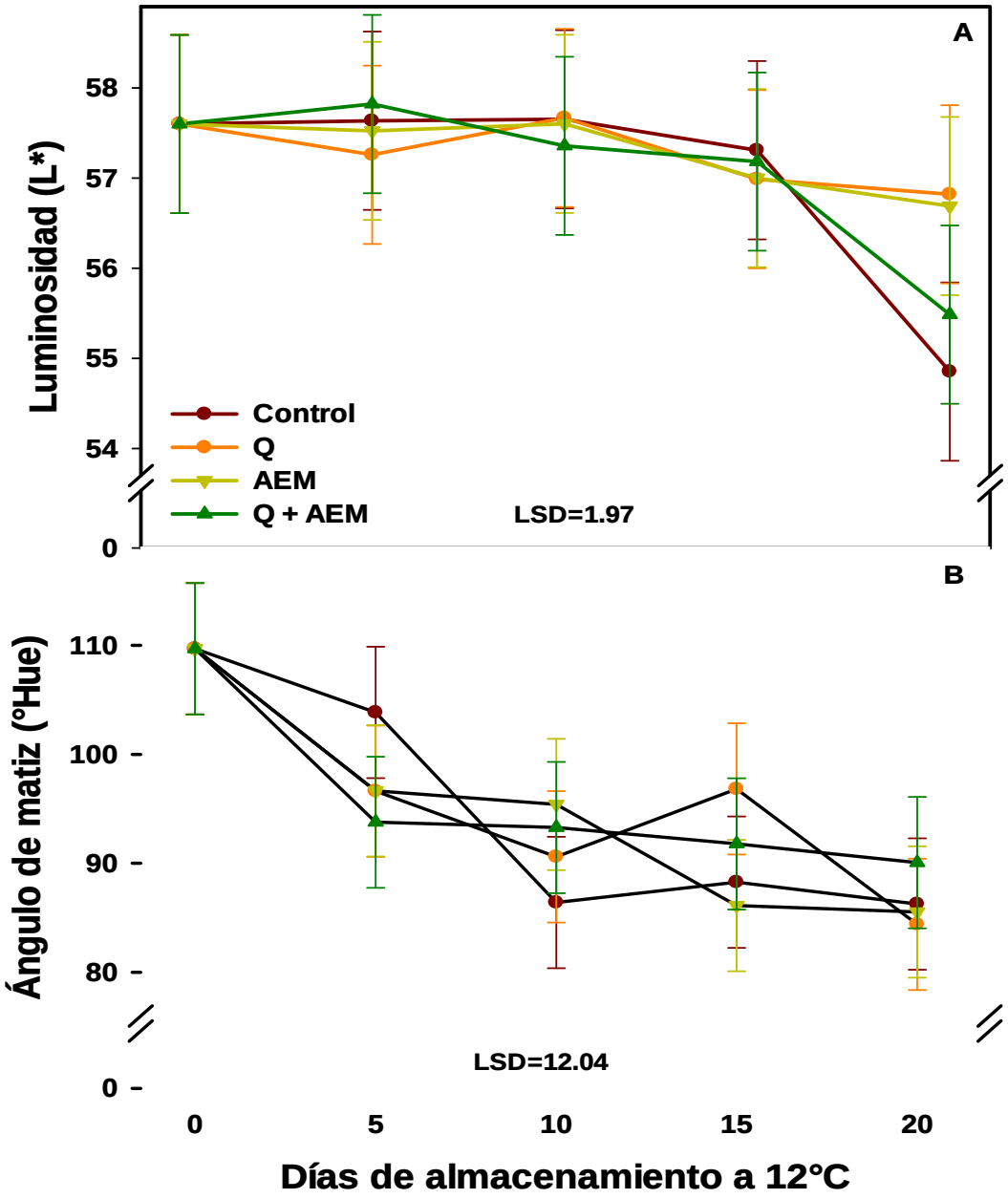



**Figura 19.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano (Q), aceite de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) sobre los valores de luminosidad (A) y ángulo de matiz (B) en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Las barras verticales indican LSD= 1.97 (A) y 12.04 (B), respectivamente con (α=0.05).

valores más altos de luminosidad en comparación con los tratamientos control y Q+AEM, esto puede ser debido a que los recubrimientos a base de Q y AEM propiciaron una baja velocidad de respiración, modificando la atmósfera interna de la fruta, dando como resultado un cambio de color reducido (Ali y col 2011). Resultados similares fueron reportados por Perdones y col (2012) quienes no encontraron diferencias estadísticas al recubrir frutos de fresas con quitosano y aceite esencial de limón durante su periodo de almacenamiento; además, también observaron una disminución en los valores de L* al finalizar las evaluaciones, esto como consecuencia de la pérdida de humedad superficial que podría ser responsable de un color más oscuro.

Los valores de luminosidad obtenidos en el presente estudio concuerdan con los reportados por Almeida-Castro y col (2011) quienes recubrieron frutos de papaya con almidón de yuca al 2% y obtuvieron valores de 57 y 58, los cuales se consideran en madurez de consumo para papaya. También coinciden con lo reportado por Santamaría y col (2009) al obtener valores de luminosidad en papaya Maradol de 58.3 en un estado de maduración 4.

Sin embargo, difieren con lo reportado por Ali y col (2011) ya que ellos obtuvieron valores menores de luminosidad en frutos de papaya recubiertos con quitosano que en frutos no recubiertos. Así mismo, Dantas-Guerra y col (2016) encontraron valores mayores de luminosidad en tomate cherry al ser recubierto con quitosano en combinación con aceite esencial de menta.

### d. Ángulo de matiz (H°)

El color de la cáscara es la característica más utilizada para evaluar el estado de maduración de los frutos de papaya y las características para su cosecha se basan en el cambio de color de verde oscuro a claro con aparición de tonos amarillos. Un valor en H° de 0° representa un color rojo púrpura; 90° amarillo; 180° un color verde-azulado y de 270° un color azul (Rivera-López y col 2005; Almeida-Castro y col 2011).

En la **Figura 19B** se muestran los resultados para el parámetro H° obtenidos en los frutos de papaya recubiertos con AEM, Q y Q+AEM. El ángulo de matiz partió de un valor promedio de 109.68° y disminuyó durante el almacenamiento. Durante todo el proceso de evaluación el análisis estadístico no arrojó diferencias ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. Al final del periodo de almacenamiento se obtuvo un valor promedio de 86°, por lo que se presentó una disminución de 23%.

Como se mencionó anteriormente, el color de piel en las papayas cambia de verde (H°=125) a amarillo-naranja (H°=74) durante los 6 estados de maduración (Santamaría y col 2009), por lo que nuestros valores concuerdan con los mencionados en la literatura, ya que se partió de un estado de maduración 4 (H°=110) y mostrando las papayas una coloración amarilla al finalizar las evaluaciones (H°=86.25) correspondiente a un estado de maduración cercano a 5, es decir, en maduración comercial. Estos cambios en el color se deben a la degradación de pigmentos verdes como la clorofila, al desmantelamiento del aparato fotosintético, así como a la síntesis de antocianinas y carotenoides (pigmentos amarillos y rojos), responsables del color en la maduración de los frutos (Picard y col 2013).

Un comportamiento similar al obtenido reportó Guerreiro y col (2015). Estos autores no encontraron diferencias estadísticas en el valor H° al recubrir berries con mezclas de alginato con citral y eugenol, observando que este valor disminuía conforme avanzaban los días. Xing y col (2011) tampoco observaron diferencias en este parámetro al recubrir pimientos con quitosano y aceite de canela. Por su parte, Ali y col (2015) no reportaron diferencias en el valor de H° al recubrir frutos de papaya con aceite de té de limón mencionando que el aceite no interfirió con el proceso de maduración de los frutos. Este efecto de disminución también fue observado por Jongsri y col (2016) al recubrir frutos de mango con quitosano; sin embargo, ellos encontraron diferencias estadísticas al final del almacenamiento donde los frutos recubiertos retardaron el color un poco más, esto debido a la modificación de la atmósfera interna en el fruto provocada por el quitosano deteniendo el proceso de degradación de la clorofila.

### e. Sólidos solubles totales

El contenido de sólidos solubles totales aumenta conforme avanza la maduración. No se observó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos en los primeros 15 días de evaluación, partiendo de un valor inicial promedio de 6.37 °Brix, el cual incrementó conforme avanzó el tiempo de almacenamiento. Fue hasta el día 20 donde se observaron diferencias significativas entre los frutos recubiertos con AEM, Q y Q+AEM con respecto a los frutos control (sin recubrir), obteniendo mayor contenido de sólidos en este último tratamiento, alcanzando valores finales de 7.25, 6.72, 6.85 y 6.67 °Brix para el control, AEM, Q y Q+AEM, respectivamente (**Figura**

**20**). Esto puede deberse a la descomposición de carbohidratos en azúcares simples, y también a la biosíntesis de carotenoides y ácidos orgánicos (Ali y col 2016).

El uso de recubrimientos a base de quitosano y/o aceite esencial de menta retrasó el proceso de maduración de los frutos de papaya al obtener valores menores de sólidos solubles al final del periodo de almacenamiento. El comportamiento que tuvieron los frutos tratados podría estar relacionado con un retraso en el proceso de maduración (López-Mora y col 2013). Estudios previos han reportado que el uso de quitosano (Ali y col 2010), extractos de semilla de papaya (Bautista-Baños y col 2003), goma arábica y aceites de té de limón y canela (Maqbool y col 2011) aplicados en frutos de papaya mantienen valores bajos en su contenido de sólidos solubles. Este mismo comportamiento también se observó en frambuesas recubiertas con alginato y citral (Guerreiro y col 2016).

En un estudio realizado por Ali y col (2011) se observaron valores menores en el contenido de sólidos solubles en papayas recubiertas con quitosano que en aquellas sin tratar, atribuyendo este comportamiento a una disminución en la actividad metabólica y a la respiración, retardando de esta manera el proceso de maduración. Además, las propiedades filmogénicas del quitosano resultan en una excelente película semipermeable en los frutos, modificando la atmósfera interna al reducir el $O_2$ y aumentado el $CO_2$ suprimiendo la producción de etileno y minimizando la síntesis y uso de metabolitos, lo que resulta en un menor contenido de sólidos debido a la hidrólisis lenta de carbohidratos a azúcares.

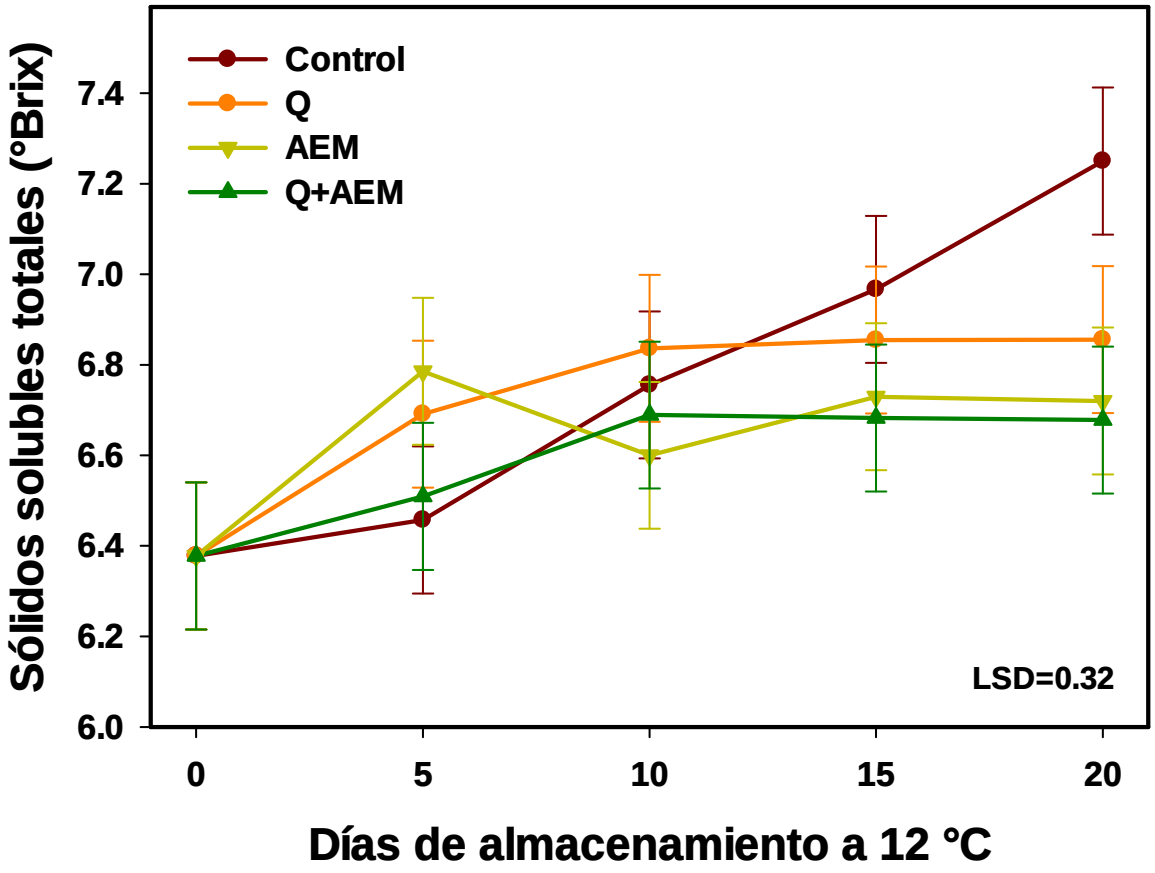



**Figura 20.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano (Q), aceite de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) sobre los valores de sólidos solubles totales en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Las barras verticales indican LSD=0.32, (α=0.05).

También se han reportado en la literatura resultados diferentes a los obtenidos en el presente estudio donde no se encontraron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles en frutos de papaya no tratados y los recubiertos con aceite de jengibre y goma arábica (Ali y col 2016), quitosano con aceite de menta (Picard y col 2013) y aceite de té de limón (Ali y col 2015), por lo que el uso de estos tratamientos no afectó el proceso natural de maduración de los frutos.

## 4. Análisis nutricional y compuestos bioactivos

### a. Ácido ascórbico

La vitamina C (ácido ascórbico) es un importante nutriente relacionado con la biosíntesis de los aminoácidos y la adrenalina, el mantenimiento del colágeno, la desintoxicación del hígado y el papel preventivo frente a varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Ordóñez-Santos y Yoshioka-Tamayo 2012). Además, es un fuerte antioxidante capaz de desactivar una gran variedad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en sistemas acuosos (Ordóñez-Santos y Vásquez-Riascos 2012a). La mayoría de las plantas y animales sintetizan ácido ascórbico a partir de la glucosa; sin embargo, los humanos son incapaces de sintetizarlo y requieren obtenerlo de la dieta. El ácido ascórbico es requerido como un cofactor para la actividad enzimática y su deficiencia dietética causa una enfermedad conocida como escorbuto (Londoño 2012).

En la **Figura 21A** se puede apreciar un descenso en el contenido de esta vitamina conforme el paso del tiempo, partiendo de un valor inicial de 46.50 mg AA/100 gff. Este valor es cercano al reportado por Wall (2006) quienes encontraron un valor de 51.2 mg AA/100 gff en papaya, en estado de maduración 3. También son

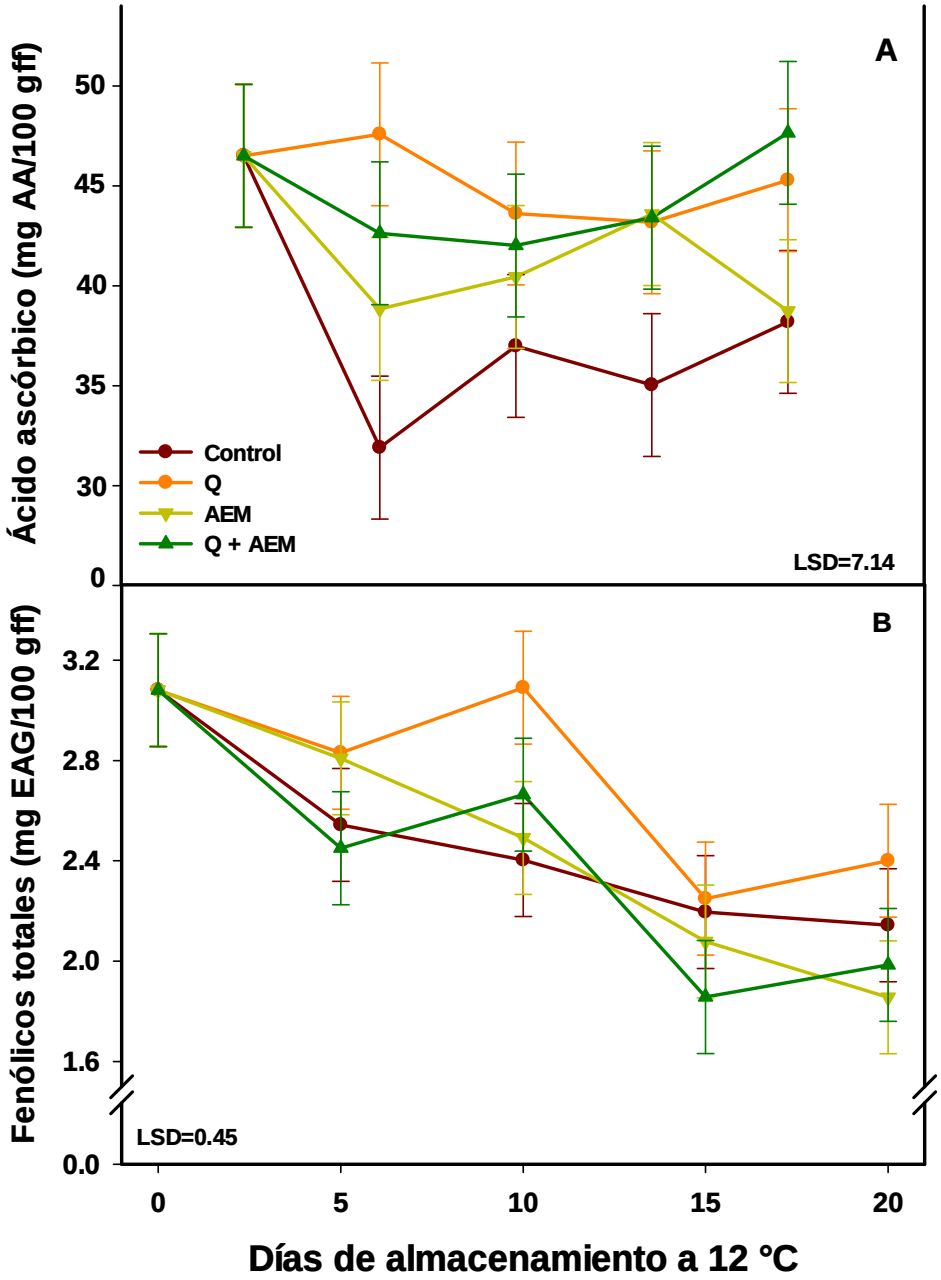



**Figura 21.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano (Q), aceite de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) sobre el contenido de vitamina C (A) y compuestos fenólicos totales (B) de frutos de papaya cv. Maradol inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Las barras verticales indican LSD=7.14 y 0.45, respectivamente (α=0.05).

cercanos a los de Gayosso-García Sancho y col (2011) quienes encontraron un valor promedio de 58.6 mg AA/100 gff en papaya en estado de maduración 4. Ellos mencionan que el contenido de vitamina C en los frutos puede variar dependiendo del tipo de cultivo de la fruta, tipo de suelo, el clima y el nivel de madurez del fruto.

El contenido de vitamina C presentó una tendencia de disminución con el paso de los días. Esta disminución en la pérdida de vitamina puede atribuirse a la baja permeabilidad al $O_2$ que inducen los recubrimientos, retrasando las reacciones de oxidación que degradan la vitamina (Ali y col 2011).

Los frutos sin recubrir (control) presentaron una disminución más pronunciada en comparación con el resto de los tratamientos, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con los tratamientos de Q y Q+AEM durante casi todas las evaluaciones, excepto al día 10, donde no se presentó diferencia entre todos los tratamientos. Petriccione y col (2015) recubrieron frutos de níspero con quitosano y observaron mayor pérdida de ácido ascórbico en frutas sin recubrimiento, adjudicando este comportamiento a la baja permeabilidad al oxígeno otorgada por el recubrimiento, reduciendo la actividad de enzimas y evitando la deterioración del fruto.

Al día 15, los frutos de papaya recubiertos con los distintos tratamientos mostraron diferencias estadísticas con los frutos control. Sin embargo, al finalizar el periodo de almacenamiento los frutos tratados con Q+AEM fueron significativamente diferentes con respecto a los frutos control y AEM, pero no con los tratados con Q. A pesar de esto, fueron los frutos tratados con Q+AEM y Q los que retuvieron los valores iniciales de ácido ascórbico, teniendo valores finales de 47.65 y 45.28 mg

AA/100 gff, respectivamente, en comparación con los frutos control en los cuales su valor disminuyó hasta 38.19 mg AA/100 gff.

Barreto y col (2016) encontraron una mayor retención en el contenido de ácido ascórbico al recubrir frutos de tomate cherry con quitosano en combinacion con aceite esencial de orégano. Otros reportes en la literatura mencionan que el quitosano aplicado en frutos de mango (Jongsri y col 2016) y kiwi (Kaya y col 2016) mantiene valores mayores en su contenido de acidó ascórbico al final del almacenamiento, esto debido a que el recubrimiento retrasó la reducción de este compuesto durante la maduración.

**b. Fenólicos totales**

El contenido de compuestos fenólicos que presentaron los frutos de papaya a lo largo del periodo de almacenamiento a 12 °C por 20 días se puede apreciar en la **Figura 21B**. El contenido inicial partió de un valor promedio de 3.08 mg EAG/100 gff, mostrando una tendencia a disminuir a lo largo de los días para todos los tratamientos. Se sabe que durante la maduración el contenido de compuestos fenólicos aumenta, pero durante el proceso de senescencia disminuye (Gayosso-García sancho y col 2011), por lo tanto, los frutos de papaya comenzaron el proceso de senescencia dado el comportamiento que tuvieron.

Los tratamientos control y AEM no presentaron diferencia estadística ($p \leq 0.05$) durante los 20 días de evaluación. Estos resultados concuerdan con los reportados por Barreto y col (2016) quienes no encontraron diferencias estadísticas en cuanto al contenido de compuestos fenólicos en frutos de tomate cherry recubiertos y no

recubiertos con quitosano y aceite esencial de orégano, mencionando que la degradación de estos compuestos está relacionada con la maduración de frutos climatéricos y con la acción del etileno.

Por otra parte, el tratamiento con Q presentó valores ligeramente mayores que el resto de los tratamientos, mostrando diferencias significativas con el control y el AEM al día 10, reteniendo la pérdida de estos compuestos. Estos resultados concuerdan con Petriccione y col (2015) quienes recubrieron frutos de níspero con quitosano y observaron menor disminución de estos compuestos que los frutos sin recubrir, sugiriendo que el quitosano pudo mejorar el estado antioxidante de los frutos al afectar positivamente el metabolismo fenólico. Este comportamiento se puede relacionar con una inducción en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que es la encargada de la síntesis de estos compuestos, por medio de la atmósfera controlada que crea el quitosano sobre los frutos. Además, esta enzima juega un papel importante en la resistencia a la enfermedad de antracnosis en frutos (Bill y col 2014).

Al día 15 tampoco se observaron diferencias entre tratamientos obteniendo un valor promedio de 2.09 mg EAG/100 gff; sin embargo, el último día de evaluación los frutos de papaya tratados con Q mostraron la mayor retención de compuestos fenólicos (2.40 mg EAG/100 gff), teniendo diferencias significativas solo con los frutos tratados con AEM (1.85 mg EAG/100 gff), pero no con lo frutos control y Q+AEM (2.14 y 19.98 mg EAG/100 gff, respectivamente). Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Sánchez-Gonzalez y col (2011) quienes no encontraron diferencias significativas sobre el contenido de compuestos fenólicos en

frutos de uvas recubiertas con hidroxipropilmetilcelulosa, quitosano y aceite de bergamota y las no recubiertas, por lo que la pérdida en el contendido de estos compuestos durante la maduración se dio de manera natural.

Nuestros resultados no concuerdan con los encontrados por Sellamuthu y col (2013) quienes observaron que frutos de aguacate recubiertos con aceite de tomillo mostraban una mejor retención de compuestos fenólicos. También, Melgarejo-Flores y col (2013) demostraron que la aplicación de aceite de canela mantenía un mayor contenido en compuestos fenólicos en uvas, esto debido a los monoterpenoides fenólicos que se encontraban en el aceite.

## 5. Actividad antioxidante

### a. ABTS

Los resultados de la actividad antioxidante de los frutos de papaya recubiertos con los tratamientos AEM, Q y Q+AEM medida por el método de ABTS se muestran en la **Figura 22A**. La actividad de los frutos aumentó conforme el paso de los días partiendo de un valor promedio de 31.72 mg ET/100 gff, sin presentarse diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos durante las evaluaciones a los días 0, 5, 10 y 15. Este aumento en la capacidad antioxidante de los frutos recubiertos con quitosano puede deberse a un cambio en la atmósfera interna de los frutos, aumentando el contenido de vitamina C y por lo tanto un aumento en su capacidad antioxidante (Contreras-Oliva y col 2012), además podría atribuirse a la presencia, en los recubrimientos, de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos y terpenoides procedentes de los aceites esenciales, los cuales podrían ejercer esta actividad por

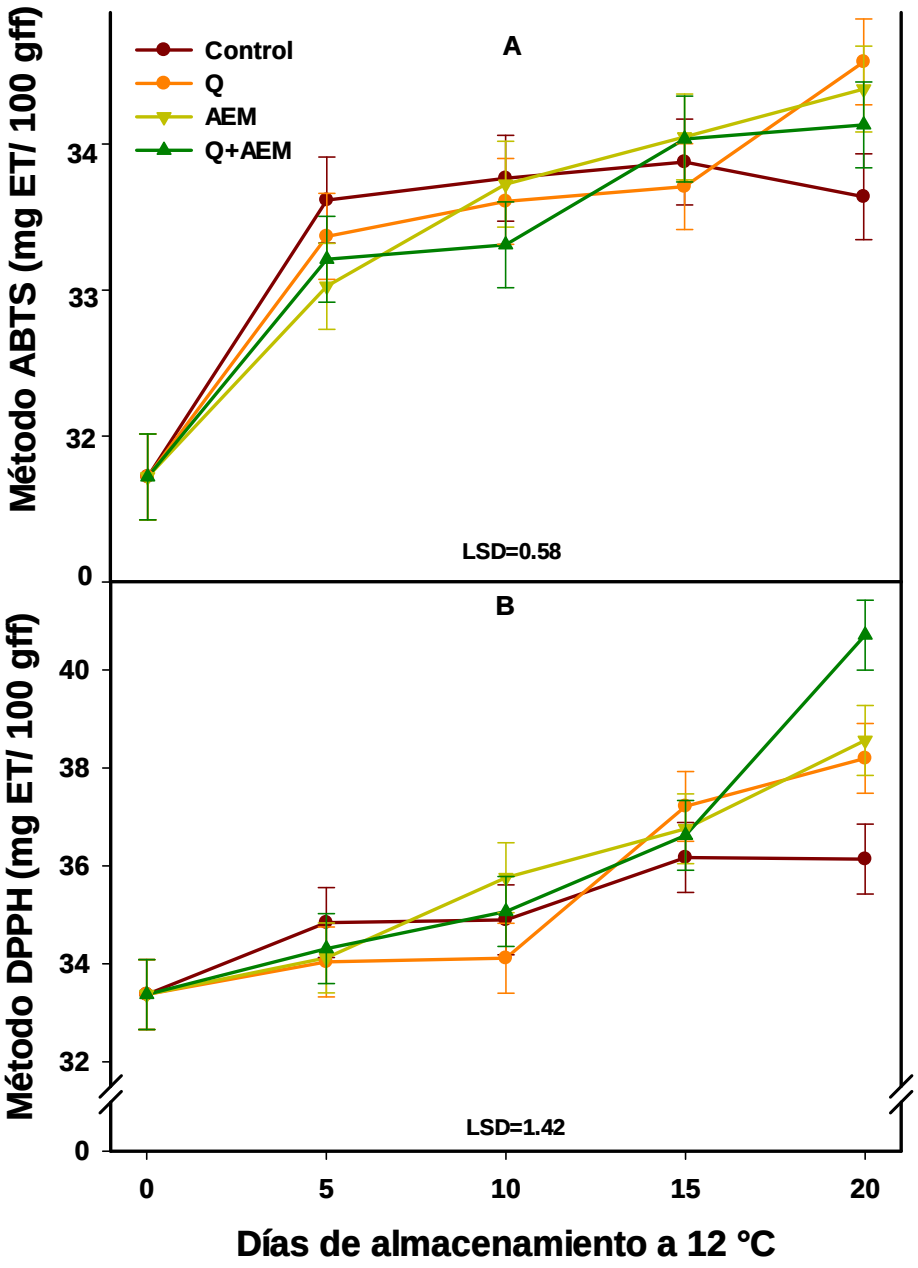



**Figura 22.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano (Q), aceite de menta (AEM) y su combinación (Q+AEM) sobre la capacidad antioxidante obtenida por el método de ABTS (A) y DPPH (B) en frutos de papaya cv. Maradol inoculadas durante un período de almacenamiento de 20 días a 12 °C. Las barras verticales indican LSD=0.58 y 1.42, respectivamente (α=0.05).

varios mecanismos posibles: eliminación de radicales libres, donantes de hidrógeno, quelantes de metales de transición y capacidad de extinción de oxígeno singulete (Yuan y col 2016).

Al día 20 de evaluación, el análisis estadístico arrojó diferencias entre los tratamientos Q y AEM con respecto a los frutos control, en donde los frutos recubiertos con estos tratamientos tuvieron valores mayores de actividad antioxidante, obteniendo un valor de 34.56, 34.37 y 33.63 mg ET/100 gff para Q, AEM y control, respectivamente. Por su parte ese mismo día, el tratamiento Q+AEM no tuvo diferencia estadística con los demás tratamientos, obteniendo un valor final de 34.13 mg ET/100 gff.

La actividad antioxidante del quitosano puede atribuirse a la capacidad de sus grupos aminos libres residuales que forman radicales macromoleculares estables y grupos de amonio (Yuan y col 2016). Esta alta actividad antioxidante también se obtuvo al utilizar aceites esenciales de jengibre y eugenol (Bonilla y col 2018), esto debido a su capacidad de donar átomos de hidrógeno o electrones, capturar radicales libres y así, terminar el mecanismo de reacción en cadena del radical peróxido. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Melgarejo-Flores y col (2013) quienes encontraron mayor actividad antioxidante en uvas tratadas con aceite de canela que sin tratar, justificando que se debió a la inducción de los mecanismos de defensa en los frutos por parte del aceite. Además, en este mismo estudio los autores no encontraron diferencias estadísticas en el contenido de compuestos fenólicos, al igual que lo reportado por nosotros.

Esta actividad antioxidante no puede relacionarse con el contenido de fenólicos totales, ya que este fue en descenso y no mostró diferencias estadísticas con los frutos control. Sin embargo, esta alta actividad antioxidante puede deberse a su composición en compuestos de naturaleza no fenólica los cuales se sabe que poseen buena actividad antioxidante, ya que Baschieri y col (2017) investigaron la capacidad antioxidante de compuestos como el linalol, limoneno y citral derivados de aceites esenciales, mediante el consumo de $O_2$ durante la autooxidación de cumeno, ya que estos compuestos reducen la velocidad de oxidación de este compuesto. La magnitud del efecto antioxidante aumentó con la reactividad de los componentes presentes en los aceites esenciales con radicales peroxilo, porque más radicales peroxilo reaccionaban competitivamente con estos compuestos en lugar de hacerlo con el sustrato oxidable.

**b. DPPH**

El efecto de los tratamientos de AEM, Q y Q+AEM sobre la actividad antioxidante por el método de DPPH en los frutos de papaya se observa en la **Figura 22B**. El valor de este parámetro fue en aumento durante el periodo de almacenamiento para todos los tratamientos, partiendo de un valor inicial promedio de 33.37 mg ET/ 100 gff.

En el último día de evaluación el tratamiento con Q+AEM aumentó sus valores teniendo diferencias estadísticas con respecto al resto de los tratamientos, obteniendo un valor final de actividad de 40.71 mg ET/100 gff. Ese mismo día los tratamientos de AEM y Q, no presentaron diferencias entre ellos, pero si con

respecto a los frutos sin recubrir, los cuales presentaron los valores más bajos de capacidad antioxidante.

Este comportamiento también lo observaron Jongsri y col (2016) al obtener una mayor actividad antioxidante en frutos de mango recubiertos con quitosano de alto peso molecular en comparación con los no recubiertos, mencionando que esto pudo deberse a varios compuestos bioactivos presentes en el fruto como compuestos fenólicos y vitamina C. Otros estudios también han encontrado una mayor capacidad en frutos de fresa (Wang y Gao 2013), níspero (Petriccione y col 2015) y aguacate (Bill y col 2014) tratados con quitosano.

La actividad antioxidante del quitosano puede deberse a la capacidad de sus grupos aminos residuales libres que reaccionan con radicales libres formando radicales macromolecularmente estables y grupos amonio. Sin embargo, esta actividad es dependiente de la concentración, el peso molecular, grado de desacetilación y la duración del ensayo. Esta actividad se incrementa cuando se le adicionan compuestos naturales como los aceites esenciales, esto atribuido a su composición en compuestos bioactivos como ácidos fenólicos y terpenoides, los cuales pueden ejercer esta actividad antioxidante mediante los mecanismos de atrapamiento de radicales libres, donadores de hidrógeno, quelación de metales de transición y extinción del oxígeno singulete (Yuan y col 2016).

La combinación de polisacáridos con aceites esenciales ha resultado en una mayor actividad antioxidante, tal es el caso del estudio de Melgarejo-Flores y col (2013) quienes recubrieron frutos de uvas con pectinas en combinación con aceite de

canela, obteniendo valores altos de actividad antioxidante, debido a la inducción de mecanismos de defensa en el fruto.

## 6. Análisis microestructural del área infectada

### a. Microscopía electrónica de barrido

Se realizó un análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) con el fin de observar cambios en el desarrollo de la enfermedad de los frutos tratados con Q, debido a que éste fue el tratamiento que presentó los valores menores de severidad de antracnosis, y de los frutos control, con el fin de comparar el efecto de dicho tratamiento. El análisis de las microfotografías obtenidas mostró que la superficie de los frutos de papaya sin recubrir (control) al inicio del almacenamiento tenía una apariencia rugosa y con fisuras, las cuales se consideran características morfológicas típicas de la papaya (**Figura 23A**) (Ong y col 2013; Ayón-Reyna y col 2017); mientras que la superficie de las papayas recubiertas con Q presentó una apariencia más lisa y homogénea (**Figura 23B**) produciendo una cubierta uniforme sobre el tejido, similar a lo obtenido por Wang y col (2011). Esto puede ser benéfico ya que cubre las aberturas naturales del fruto como estomas o lenticelas, así como grietas por las cuales se facilita la entrada de patógenos. Además, se sabe que el quitosano forma una barrera semipermeable en la superficie de los frutos limitando la pudrición fúngica por su actividad antifúngica directa, limitando la transferencia de oxígeno y la actividad respiratoria de los patógenos (Zhou y col 2016; Ferrão y col 2018).

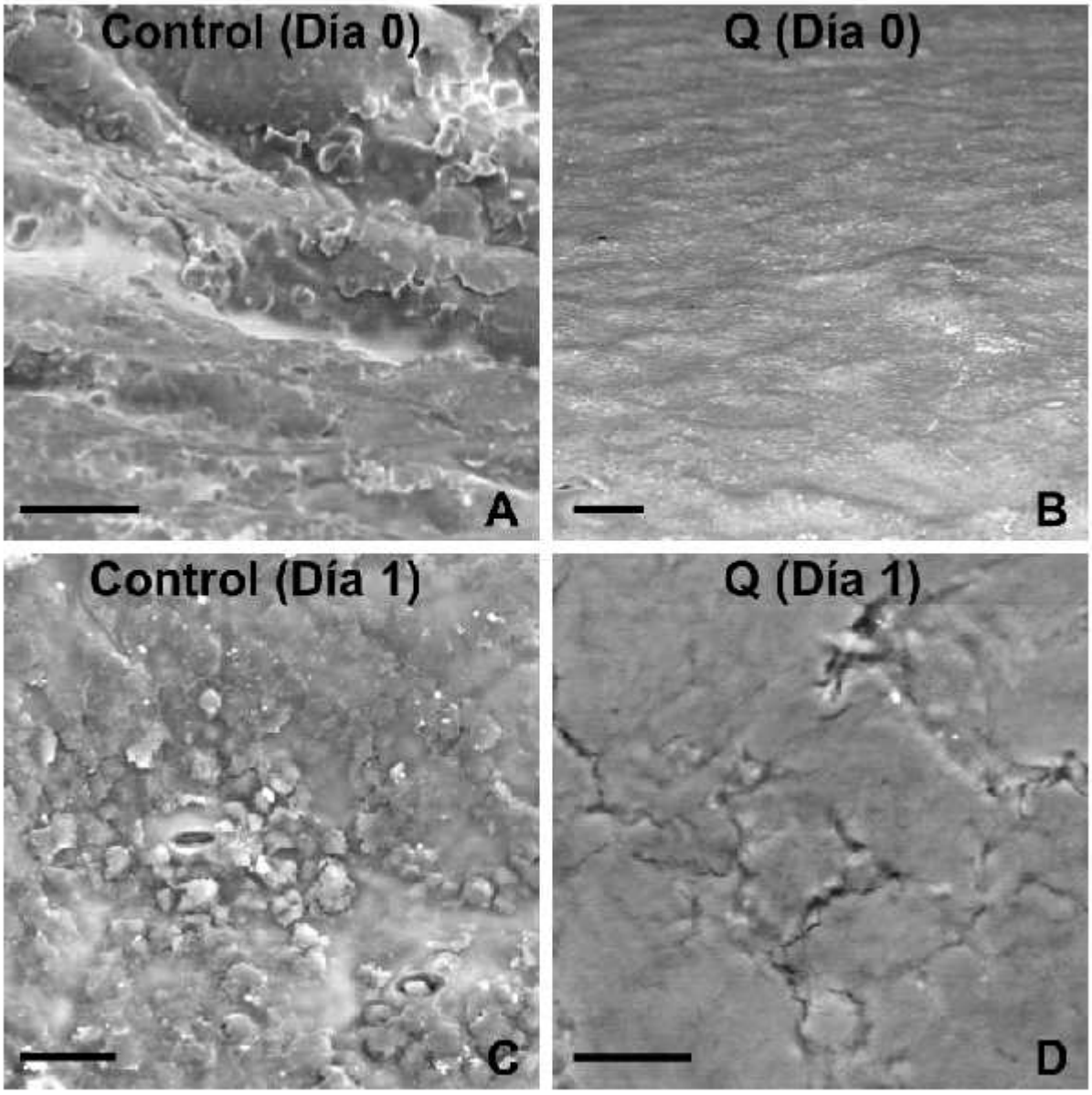



**Figura 23.** Imágenes de MEB de papayas no recubiertas (A [barra=10 µm], C [barra= 20 µm]) y recubiertas con Q (B [barra=100 µm], D [barra= 10 µm]) a los 0 y 1 días de almacenamiento. Las muestras control ilustran la morfología normal de la superficie de la papaya siendo está irregular, mientras que el recubrimiento de quitosano otorga una superficie más homogénea en los frutos.

Transcurridas 24 horas, las fotografías de MEB mostraron estomas abiertos sobre la superficie de los frutos control (**Figura 23C**), mientras que en los frutos tratados con Q no se visualizaron aberturas propias del fruto por donde pudiera penetrar el hongo, observándose cierta presencia de agrietamiento por parte del recubrimiento, pero aun así con apariencia uniforme (**Figura 23D**). Nuestros resultados son similares a lo reportado por Ferrão y col (2018) quienes elaboraron un recubrimiento a base de nanopartículas de quitosano aplicado en frutos de uvas, observando una apariencia lisa y homogénea del recubrimiento. También concuerdan con lo reportado por Dotto y col (2015), quienes obtuvieron un recubrimiento a base de quitosano aplicado a frutos de papaya, el cual tuvo una apariencia uniforme y homogénea, mencionando que esta característica puede ser benéfica para una mayor actividad antimicrobiana ya que proporciona una barrera más efectiva entre la fruta y el ambiente externo.

Por otro lado, la visualización de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* mediante MEB al inicio de la evaluación, se muestran depositadas sobre la superficie de la papaya, teniendo un tamaño entre 9.6 y 20 µm y una forma conidial ovoide y cilíndrica (**Figura 24A**), lo que concuerda con lo reportado por Peres y col (2002). En este sentido, se aprecia que la aplicación de un recubrimiento de Q formó una capa que cubrió las esporas que se encontraban sobre la superficie del fruto, además de observarse un tejido más liso y homogéneo (**Figura 24B**).

La aparición de las primeras hifas se observó en los frutos control durante las primeras 24 horas, esto sugiere que la germinación de los conidios se presentó algunas horas después de la inoculación (**Figura 24C**). Esto concuerda con los

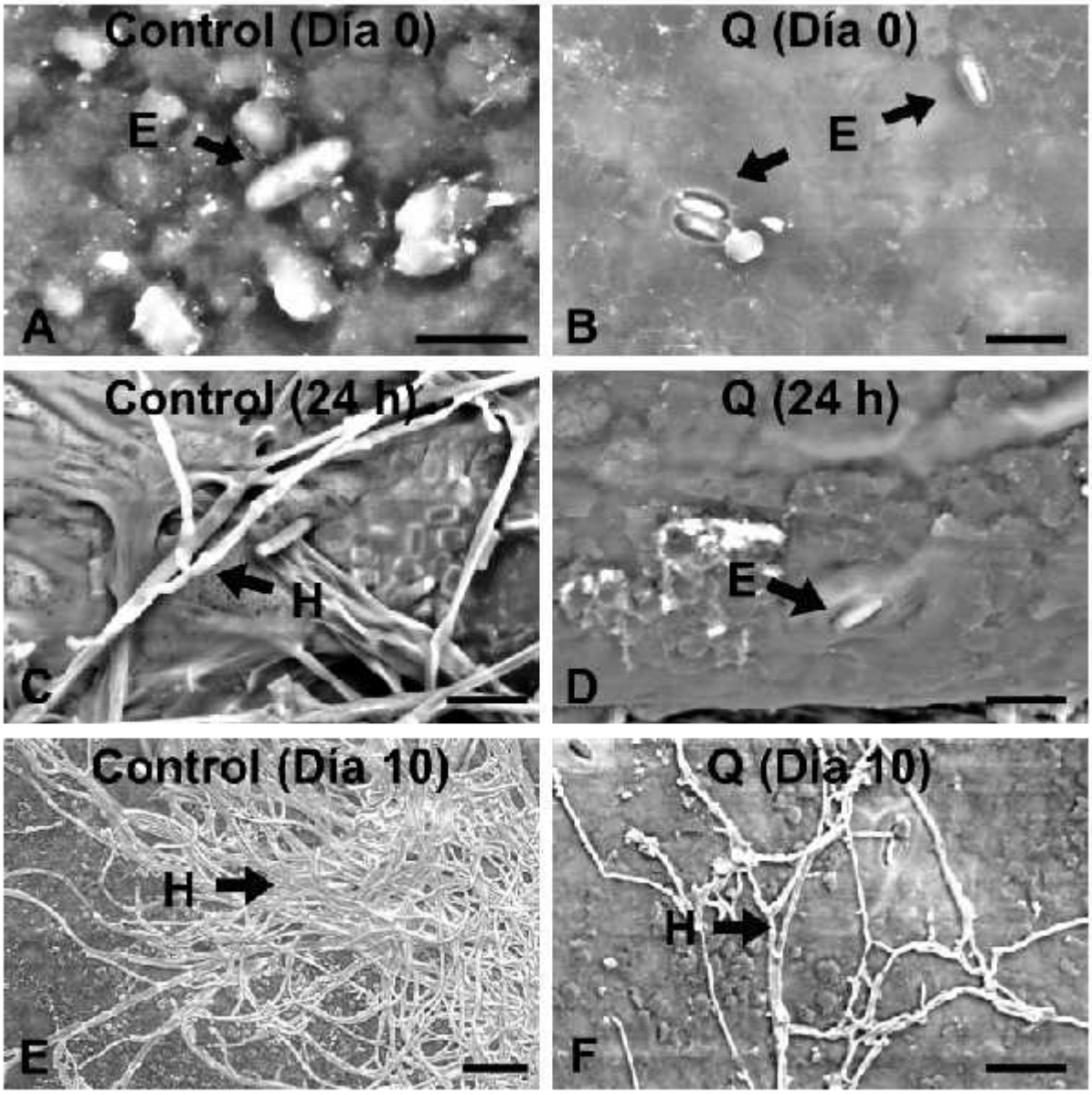



**Figura 24.** Imágenes de MEB de esporas e hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya Maradol. Espora fúngica sobre la superficie sin recubrir (A) barra= 5 µm, y recubierta con quitosano (B) barra=10 µm. Hifas sobre la superficie sin recubrir (C), y espora recubierta con Q sin presencia de tubo germinativo ni hifas (D), barra=10 µm. Abundantes hifas sobre la superficie sin recubrir (E) barra=20µm, y escasa presencia de hifas en superficie recubierta con Q (F) barra=10 µm. E=espora, H=hifas.

resultados de germinación de conidios obtenidos en el presente estudio donde a las 6 horas de incubación una buena cantidad de esporas se encontraban germinadas en el tratamiento control. Sin embargo, al término de 24 horas de haberse inoculado los frutos y recubiertos con Q, las esporas con tratamiento se aprecian sin germinar sobre el tejido del fruto mostrándose aún cubiertas (**Figura 24D**).

La incidencia y la severidad de antracnosis sobre los frutos de papaya recubiertos con los tratamientos a base de Q se vieron disminuidas, lo cual puede apreciarse en la **Figura 24F** en la cual se observa un escaso desarrollo de hifas sobre la epidermis del fruto al décimo día de evaluación, en contraste con el abundante desarrollo de micelio en los frutos control (**Figura 24E**). El efecto antifúngico del Q puede ser debido a su naturaleza catiónica, fuertemente

asociada a la composición de la membrana celular de los hongos lo cual afecta su integridad y permeabilidad, además de asociarse con la disminución en la actividad respiratoria de los hongos y con la actividad de algunas enzimas (Beyki y col 2014; Dotto y col 2015).

La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido documentada ampliamente, como el estudio realizado por Zahid y col (2012) quienes utilizaron un recubrimiento a base de quitosano para inhibir el desarrollo de dos especies de *Colletotrichum* en frutos de plátano, papaya y pitahaya, observando mediante microscopía de barrido una alta actividad antifúngica en el recubrimiento. Los autores observaron mediante las micrografías una aglomeración de los conidios en los frutos tratados en comparación con los no tratados en los que se observaban esporas con una morfología normal, explicando que el posible mecanismo de acción del quitosano se

debe a la interacción de sus grupos amonio (cargas positivas) con los grupos negativos de los fosfolípidos formadores de la pared celular fúngica, aumentando la permeabilidad de la membrana plasmática. Además, esta inhibición puede ser debido al contacto directo del quitosano con el patógeno entrando por la pared celular fúngica interaccionando con su ADN y modificando su configuración, inhibiendo la síntesis de ARNm y la síntesis de proteínas. Este mecanismo antifúngico del quitosano también lo reportan Ali y Mahmud (2008) cuando evaluaron *in vitro* el efecto de este polisacárido sobre la inhibición de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de papaya y observaron mediante microscopía de barrido malformaciones en las terminaciones de las hifas asi como hinchazón en sus paredes, comparadas con las de los controles, donde en condiciones normales presentaron una apariencia lisa y sin hinchazón.

Por su parte, Chowdappa y col (2014) observaron mediante microscopía electrónica de barrido que la aplicación de quitosano con nanopartículas de plata inhibía completamente la germinación de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango. Ramos-García y col (2012) aplicaron una combinacion de quitosano, miel de abeja y aceite esencial de lima en frutos de tomate para inhibir el desarrollo del hongo *Rhizopus stolonifer* y *Escherichia coli*, y observaron mediante microscopía electrónica de barrido que este hongo no mostraba desarrollo de esporangiosporas y el micelio se observaba distorsionado e hinchado, además no se presentó crecimiento de la bacteria al aplicar el recubrimiento. Esto puede deberse a la actividad quelante del quitosano, limitando la captación de nutrientes a las

bacterias gracias a la barrera del biopolímero, además de penetrar fácilmente la membrana de la célula microbiana alterando su metabolismo (Wang y col 2011).

Resultados diferentes a los de este estudio reportan Hafsa y col (2016), ya que su recubrimiento a base de quitosano al 1% no fue efectivo para inhibir el desarrollo de bacterias y hongos.

Nuestros resultados sugieren que la aplicación de recubrimientos comestibles elaborados a base de quitosano en frutos de papaya es una buena opción para impedir el desarrollo de antracnosis, además de mantener su calidad poscosecha.

# IX. CONCLUSIONES

El aceite esencial de menta al 0.2% fue el más efectivo de los 5 aceites esenciales para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya almacenados por 20 días a 12 °C.

Los tratamientos AEM, Q y Q + AEM lograron altos valores de inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* durante el periodo de incubación a 25 °C.

Los frutos de papaya recubiertos con Q y Q + AEM tuvieron los valores menores de incidencia y severidad durante el periodo de almacenamiento a 12 °C, retardando la aparición de síntomas de antracnosis durante 4 días en comparación con el control.

Los tratamientos AEM, Q y Q + AEM no afectaron la pérdida de peso, la luminosidad y el color externo, pero disminuyeron el contenido de SST y mantuvieron la firmeza en los frutos de papaya almacenados a 12 °C.

Los recubrimientos a base de Q y Q + AEM retardaron la pérdida de vitamina C y no tuvieron efecto sobre el contenido de fenólicos totales en frutos de papaya almacenados por 20 días a 12 °C.

La actividad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH fue mayor en los frutos recubiertos con Q y Q+ AEM que en el control.

Se observó mediante MEB que el recubrimiento a base de Q proporcionó a la papaya una superficie más homogénea, retardando el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Con base en los resultados encontrados en el presente trabajo, se podría sugerir la aplicación de un recubrimiento a base de Q y Q+AEM para retardar la aparición de antracnosis, mantener la calidad poscosecha, retención de vitamina C y aumentar la actividad antioxidante de frutos de papaya almacenados a 12°C por 20 días.

# X. BIBLIOGRAFÍA

Abdolahi A, Hassani A, Ghosta Y, Javadi T, Meshkatalsadat HM. 2010. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. Journal of Food Safety. 30:341-352.

Abdolahi A, Hassani A, Ghosta Y, Bernousi I, Meshkatalsadat HM. 2010a. Study on the potential use of essential oils for decay control and quality preservation of tabarzeh table grape. Journal of Plant Protection Research. 50: 45-52.

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

Al Eryani- Raqeeb A, Mahmud TMM, Syed OSR, Mohamed ZAR, Al Eryani AR.2009. Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya. International Journal of Agricultural Research.4: 53-68.

Ali A, Muhammad MT, Sijam K, Siddiqui Y. 2010. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. International Journal of Food Science and Technology. 45: 2134-2140.

Ali A, Muhammad MTM, Sijam K, Siddiqui Y. 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. Food Chemistry. 124: 620-626.

Ali A, Ling CW, Zahid N, Kying OM. 2014. Efficacy of propolis and cinnamon oil coating in controlling post-harvest anthracnose and quality of chilli (*capsicum annuum* l.) during cold storage. Food and Bioprocess Technology. 7:2742-2748.

Ali A, Pheng TW, Mustafa MA. 2015. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of ´Sekaki´ papaya. Journal of Applied Microbiolology. 118: 1456-1464.

Ali A, Mohd NN, Mustafa AM. 2015a. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. Food Packaging and Shelf Life. 3: 56-61.

Ali A, Hei GK, Keat YW. 2016. Efficacy of ginger oil and extract combined with gum arabic on anthracnose and quality of papaya fruit during cold storage. Journal of Food Science and Technology. 53:1435–1444.

Almeida-Castro A, Reis-Pimentel JD, Santos-Souza D, Vieira de Oliveira T, da Costa Oliveira M. 2011. Estudio de la conservación de la papaya (Carica papaya L.)

asociado a la aplicación de películas comestibles. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2: 049-060.

Aloui H, Khwaldia K, Licciardello F, Mazzaglia A, Muratore G, Hamdi M, Restuccia C. 2014. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. International Journal of Food Microbiology. 170: 21–28.

Alvarado-Hernández AM, Barrera-Necha LL, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-Valle MG. 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. 2: 127-134.

AOAC. 2012. Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Washington DC, USA. Disponible en: http://www.aoac.org/aoac. Consultado el 08 de abril de 2017.

Araya A, Meneses L. 2010. Influencia de algunos ácidos orgánicos sobre las propiedades fisicoquímicas de películas de quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo. Revista Tecnológica ESPOL-RTE. 23: 143-148.

Ávila-Sosa R, López-Malo A. 2008. Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2: 4-13.

Ayón-Reyna LE, Tamayo-Limón R, Cárdenas-Torres F, López-López ME, López-Angulo G, López-Moreno HS, López-Cervantes J, López-Valenzuela, Vega-García MO. 2015. Effectiveness of hydrothermal-calcium chloride treatment and chitosan on quality retention and microbial growth during storage of fresh-cut papaya. Journal of Food Science. 80: 594-601.

Ayón-Reyna LE, González-Robles A, Rendón-Maldonado JG, Báez-Flores ME, López-López ME, Vega-García MO. 2017. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. Postharvest Biology and Technology. 124: 85–90.

Barrera-Necha LL, García-Barrera LJ. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp*. aislado de papaya (Carica papaya). Revista UDO Agrícola. 8: 33-41.

Barreto T, Andrade S, Maciel FJ, Arcanjo OMN, Madruga SM, Meireles B, Cordeiro TMA, Souza LE, Magnani M. 2016. A chitosan coating containing essential oil from *origanum vulgare* l. to control postharvest mold infections and keep the quality of cherry tomato fruit. Frontiers in Microbiology. 1:1-14.

Baschieri A, Daci A.M, Folifack TJL, Valgimigli L, Amorati R. 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. Food Chemistry. 232: 656-663.

Basulto FS, Plaza DR, Alonso GO, Fernández SJ, Saavedra LA. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya Maradol. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2: 631-643.

Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, Wilson CL. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection. 22:1087-1092.

Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología. 22: 178-186.

Bautista-Baños S, Sivakumar D, Bello-Pérez A, Villanueva-Arce R, Hernández-López M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. Crop Protection. 49:8-20.

Beyki M, Zhaveh S, Khalili ST, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Bayat M, Tabatabaei M, Mohsenifar A. 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products. 54: 310-319.

Bill M, Sivakumar D, Korsten L, Thompson KA. 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. Crop Protection. 64: 159-167.

Bogantes AA, Mora NE. 2013. Incidencia y severidad de la antracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). Agronomía Mesoamericana. 24:411-417.

Bonilla J, Poloni T, Lourenço RV, Sobral PJA. 2018. Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. Food Bioscience. 232: 107-114.

Bosquez-Molina E, Ronquillo-de Jesús E, Bautista-Baños S, Verde-Calvo JR, Morales-López J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. Postharvest Biology and Technology. 57:132–137.

Caccioni DRL, Guizzardi M. 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. Journal of Essential Oil Research. 6: 173-179.

Cárdenas-Pérez S, Méndez-Méndez JV, Chanona-Pérez JJ, Zdunek A, Güemes-Vera N, Calderón-Domínguez G, Rodríguez-González F. 2017. Prediction of

the nanomechanical properties of apple tissue during its ripening process fromits firmness, color andmicrostructural parameters. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 39: 79–87.

Chala A, Getahun M, Alemayehu S, Tadesse M. 2014. Survey of mango anthracnose in southern Ethiopia and *in-vitro* screening of some essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides*. International Journal of Fruit Science. 14:157–173.

Chen LS, Chu C, Liu CD, Chen RS, Tsay JG. 2006. PCR-Based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. Journal Phytopathology. 154: 654-662.

Chowdappa P, Gowda S, Chethana CS, Madhura S. 2014. Antifungal activity of chitosan-silver nanoparticle composite against *Colletotrichum gloeosporioides* associated with mango anthracnose. African Journal of Microbiology Research. 8: 1803-1812.

Contreras-Oliva A, Pérez-Gago MB, Salvador A, Bermejo A, Rojas-Argudo C. 2012. Physico-chemical, sensory and nutritional quality of oranges cv. Valencia coated with chitosan. Agrociencia. 441-453.

Correa-pacheco ZN, Bautista-Baños S, Valle-Marquina MA, Hernández-López M. 2017. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth in vitro and on cv. Hass avocado and fruit quality. Journal of Phytopathology. 165: 297–305.

[CONABIO] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2017. Obtenido de sistema de información de organismos vivos modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de bioseguridad. Disponible de: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20898_sg7.pdf. Consultado el 24 de febrero de 2017.

Dantas-Guerra IC, Lima de Oliveira PD, Lima de Souza PA, Suassuna CLAS, Fechine TJ, Barbosa-Filho JM, Madruga MS, Leite de Souza E. 2015. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha* × *villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. International Journal of Food Microbiology. 214: 168–178.

Dantas-Guerra IC, Lima OPD, Fernandes SMM, Carneiro LASS, Fechine TJ, Barbosa-Filho JM, Madruga MS, Leite de SE. 2016. The effects of composite coatings containing chitosan and Mentha (*piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 34: 112–121.

Dotto LG, Vieira MLG, Pinto LAA. 2015. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. Food Science and Technology. 64: 126-130.

Duamkhanmanee R. 2008. Natural essential oils from lemon grass (*Cymbopogon citratus*) to control postharvest anthracnose of mango fruit. International Journal of Biotechnology. 10: 1004-108.

Dürüst N, Sümengen D, Dürüst Y. 1997. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 2085-2087.

El Ghaouth A, Wilson C, Wisniewski M. 2004. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables. Volumen II. Diseases of Fruits and Vegetables. Kluwer Academic Publishers. 511-535.

Eweis M, Elkholy SS, Elsabee MZ. 2006. Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. Biological Macromolecules. 38: 1-8.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2003. PAPAYA, Post-harvest operations. Disponible: http://www.fao.org/3/a-av012e.pdf. Consultado el 15 de enero de 2017.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. Disponible de: http://www.fao.org/docrep/x5056s/x5056S00.htm#Contents. Consultado el 11 de febrero de 2017.

[FAOSTAT] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Obtenido de http://www.fao.org/faostat/es/#data. Consultado el 17 de enero de 2018.

Falguera V, Quintero JP, Jimenez A, Aldemar MJ, Ibarz A. 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. Trends in Food Science & Technology. 22: 292-303.

Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, El-Baroty GSA. 1989. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection. 52: 665-667.

Feng W, Zheng X. 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo*. Food Control. 18: 1126-1130.

Ferrão CBMN, de Mendonça Soares BL, Marques DK, Ferreira LC, Canto D, Flores MAP, da Costa TFJH, Galembeck A, Montenegro STL, Montenegro SAT, Montenegro STC. 2018. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. Postharvest Biology and Technology. 139: 56-66.

Freire MM, Gulab NJ, Onkar DD, Marangon JC, Coura BR, Moreira VVM. 2012. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. Journal of Food Safety. 32: 29–36.

Gayosso-García Sancho LE, Yahia EM, González-Aguilar GA. 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. Food Research International. 44:1284-1291.

García PMA. 2008. Películas y Cubiertas de quitosano en la conservación de vegetales. Ciencia y Tecnología de Alimentos. 18: 71-76.

Granados RR, Salceda LR, Longar BMP. 2015. Situación actual y perspectivas tecnológicas para la papaya (*Carica papaya* L.) en el distrito de Veracruz, Veracruz. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 749-761.

Guerreiro CA, Gago CML, Faleiro LM, Miguel MGC, Antunes MDC. 2015. The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on Arbutus unedo L. fresh fruit storage. Postharvest Biology and Technology. 100: 226–233.

Guerreiro AC, Gago CML, Miguel MGC, Faleiro ML, Antunes MDC. 2016. The influence of edible coatings enriched with citral and eugenol on the raspberry

storage ability, nutritional and sensory quality. Food Packaging and Shelf Life. 9: 20-28.

Hafsa J, Smach MA, Ben KMR, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H, Rouatbi S. 2016. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. LWT - Food Science and Technology. 68: 356-364.

Henriquez C, González R, Krarup C. 2005. Tratamientos térmicos y progresión del daño por enfriamiento y de la pigmentación de tomates en poscosecha. Ciencia e Investigación Agraria. 32:113-23.

Hewajulige IGN, Sivakumar D, Wijesundera RLC, Sultanbawa Y, Wilson Wijeratnam RS. 2007. Effect of chitosan coating on the control of anthracnose and overall quality retention of papaya (*Carica papaya* L.) during storage. Acta Horticulturae. 245-250.

Hewajulige IGN, Sultanbawa Y, Wilson WRS, Wijesundara RLC. 2009. Mode of action of chitosan coating on anthracnose disease control in papaya. Phytoparasitica. 37:437–444.

Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi MA. 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and

cinnamon essential oils. Journal of Food Processing and Preservation. 33: 727-743.

Idris FM, Ibrahim AM, Forsido SF. 2015. Essential oils to control Colletotrichum musae in vitro and in vivo on banana fruits. American-eurasian Journal Agriculture & Enviromental Science.15: 291-302.

[IFAS] Institute of Food and Agricultural Sciences. 2015. Una mirada a la producción, el comercio y el consumo de papaya a nivel mundial. University of florida. FE917. Obtenido de: http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FE/FE91700.pdf. Consultado el 03 de abril de 2017.

Jaeger H, Knorr D, Meneses N, Reineke K, Schlueter O. 2014. Food safety: shelf life extension technologies. Encyclopedia of Agriculture and Food Sistema. 3: 289-303.

Jongsri P, Wangsomboondee T, Rojsitthisak P, Seraypheap K. 2016. Effect of molecular weights of chitosan coating on postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruit. LWT - Food Science and Technology. 73: 28-36.

Kader AA. 2007. Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. California, USA: Universidad de california. 437-440.

Kalemba D, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10: 813-829.

Kasso M, Bekele A. 2016. Post-harvest loss and quality deterioration of horticultural crops in Dire Dawa Region, Ethiopia. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 17: 88-96.

Kaya M, Cesonienė L, Daubaras R, Leskauskaitė D, Zabulionė D. 2016. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. International Journal of Biological Macromolecules. 85: 355-360.

Kyu KWN, Jitareerat P, Kanlayanarat S, Sangchote S. 2007. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. Postharvest Biology and Technology. 45: 333–340.

Li H, Yu T. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81: 269-274.

Li H, Wang Y, Liu F, Yang Y, Wu Z, Cai H, Zhang Q, Wang Y, Li P. 2015. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. Scientia Horticulturae.186: 77-83.

Londoño LJ. 2012. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Corporación Universitaria Lasallista. 9: 129-162.

López-Angulo G, Montes-Ávila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Ahumada-Santos YP, Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α-glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three Echeveria DC. Species from México. Arabian Journal of Chemistry. 1-10.

López-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Navarro-Preciado C, Ornelas-Paz JJ, Estrada-Alvarado MI, Gassos-Ortega LE, Rodrigo-García J. 2012. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 15: 33-43.

López-Mora LI, Gutiérrez-Martínez P, Bautista-Baños S, Jiménez-García LF, Zavaleta-Mancera HA. 2013. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en Alternaria alternata y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. Revista Chapingo Serie Horticultura. 19: 315-331.

Ma Q, Zhang Y, Critzer F, Davidson MP, Zhong Q. 2016. Quality attributes and microbial survival on whole cantaloupes with antimicrobial coatings containing chitosan, lauric arginate, cinnamon oil and ethylenediaminetetraacetic acid. International Journal of Food Microbiology. 235: 103–108.

Maqbool M, Ali A, Alderson GP. 2010. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. International Journal of Agriculture and Biology. 12: 516-520.

Maqbool M, Ali A, Alderson PG, Mohamed MTM, Siddiqui Y, Zahid N. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. Postharvest Biology and Technology: 62: 71–76.

Marandi RJ, Hassani A, Ghosta Y, Abdollahi A, Pirzad A, Sefidkon F. 2011. Control of penicillium expansum and Botrytis cinerea on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Journal of Medicinal Plants Research. 5: 626-634.

Marangoni GA, Jackman LR, Stanley WD. 1995. Chilling-associated softening of tomato fruit is related to increased pectin methyl esterase activity. Journal of Food Science. 60:1277-1281.

Márquez-Fernández FO, Cano M, Salinas A, Guzmán LO, Espinoza C, Trigos A. 2013. Composición química de glomérulos producidos por *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Micología. 38: 1-7.

Mattiuz BH, Ducamp-Collin MN, Machado Mattiuz CF, Vigneault C, Marques KM, Sagoua W, Montet D. 2015. Effect of propolis on postharvest control of

anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. Scientia Horticulturae. 184: 160-168.

Melgarejo-Flores BG, Ortega-Ramírez LA, Silva-Espinoza BA, González-Aguilar GA, Miranda MRA, Ayala-Zavala JF. 2013. Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil. Postharvest Biology and Technology. 86: 321-328.

Mora-Rochín S, Gutiérrez-Uribe JE, Serna-Saldívar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. Journal of Cereal Science. 52: 502-508.

Moreira FM, Newandram JG, Dev DO, Marangon JC, Coura BR, Moreira VVM. 2012. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. Journal of Food Safety. 32: 29–36.

Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini MS. 2015. Postharvest treatment of nanochitosan-based coating loaded with *Zataria multiflora* essential oil improves antioxidant activity and extends shelf-life of cucumber. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 33: 580-588.

Mohammadi A, Hashemi M, Masoud HS. 2016. Integration between chitosan and *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil for controlling

*Phytophthora drechsleri*, the causal agent of cucumber fruit rot. Food Science and Technology. 65: 349–356.

Oliveira GJ, Vitória AP. 2011. Papaya: Nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An Overview. Food Research International. 44: 1306–1313.

Olufunmilayo SO, Uzoma O. 2016. Postharvest physicochemical properties of cucumber fruits (*Cucumber sativus* L) treated with chitosan-lemon grass extracts under different storage durations. African Journal of Biotechnology. 15: 2758-2766.

Ong KM, Kazi KF, Forney FC, Ali A. 2013. Effect of gaseous ozone on papaya anthracnose. Food Bioprocess Technology. 6: 2996-3005.

Ordóñez-Santos LE, Yoshioka-Tamayo LS. 2012. Cinética de degradación térmica de vitamina c en pulpa de mango (*Mangifera indica* L). Vitae. 19: 81-83.

Ordóñez-Santos LE, Vásquez-Riascos AM. 2012. Cambios en la concentración de ácido ascórbico en el procesamiento de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Vitae. 19: 84-86.

Padman M, Janardhana GR. 2012. Screening for inhibitory activities of essential oils on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., the

causal agent of leaf spot disease of *Murraya koenigii* L. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 45:1575-1581.

Palhano FL, Vilches TTB, Santos RB, Orlando MTD, Ventura JA, Fernandes PMP. 2004. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. International Journal of Food Microbiology. 95: 61–66.

Peng Y, Li Y. 2014. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. Food Hydrocolloids. 36: 287-293.

Perdones A, Sánchez-González L, Chiralt A, Vargas M. 2012. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. Postharvest Biology and Technology. 70: 32–41.

Peres RNA, Kuramae EE, Dias CMS, De Souza LN. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. Journal Phytopathology. 150: 128-134.

Petriccione M, Pasquariello MS, Mastrobuoni F, Zampella L, Di Patre D, Scortichini M. 2015. Influence of a chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of loquat fruit during postharvest life. Scientia Horticulturae. 197: 287-296.

Picard I, Hollingsworth RG, Wall M, Nishijima K, Salmieri S, Dang VK, Lacroix M. 2013. Effects of chitosan-based coatings containing peppermint essential oil on the quality of post-harvest papaya fruit. Postharvest Technology and Innovation. 3: 178-189.

Pino JA. 2015. Papaya fruit aroma compounds-state of the art research. En T. S. Dimitrov, I. I. Vitanova. Tropical fruits from cultivation to consumption and health benefits-papaya. New York: Nova Science Publishers, Inc. 9-34.

Prasad RR, Anamika. 2015. Effects of plant leaf extract against *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) sac. causing post-harvest disease of papaya. Journal of Agricultural Science. 7: 195-198.

Quirós BM, Peres AN, Arauz LF. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). Agronomía Costarricense. 37: 23-38.

Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K. 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology. 35: 208–211.

Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K. 2005. An integrated strategy to control post-harvest decay of Embul banana by combining essential oils with modified atmosphere packaging. International Journal of Food Science and Technology. 40: 97–103.

Ramos-García ML, Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Bosquez-Molina E, Alia-Tejacal I, Estrada-Carrillo M. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. Revista Mexicana de Fitopatología. 28: 44-57.

Rico RF, Gutiérrez CC, Díaz-Moreno C. 2012. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales en la calidad microbiológica de mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente procesado. Vitae. 19: 117-119.

Rimá de OKA, Ramos BLR, De Araujo SA, Saraiva CMP, Leite de SE. 2017. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. Food Microbiology. 66: 96-103.

Rivera-López J, Vázquez-Ortiz FA, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. 2005. Efecto del corte y la temperatura de almacenamiento en la calidad de papaya fresca cortada (*Carica papaya* L.cv. “maradol”). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 6: 83-94.

Rodríguez-López ES, González-Prieto JM, Mayek-Pérez N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. y sacc. en aguacatero (*persea americana*mill.): aspectos bioquímicos y genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología. 27: 53-63.

Rosas-Gallo A, López-Malo A. 2011. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos. 5: 41-50.

[SAGARPA]. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.2009. Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional de la papaya mexicana e identificación de necesidades de infraestructura logística. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/PAPAYA2009.pdf. Consultado el 22 de febrero de 2017.

[SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Producción y manejo postcosecha de papaya maradol en la planicie huasteca. Disponible en: http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/handle/123456789/2719. Consultado el 21 de febrero de 2017.

[SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. 2017. Obtenido de

http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/PapayaMexicana.aspx. Consultado el 22 de febrero de 2017.

[SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. 2017a. Disponible en: http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/papaya-toda-una-maravilla. Consultado el 15 de febrero de 2017.

Sandoval GJM. 2015. Aplicación de un recubrimiento de aceite esencial de menta-quitosano en mango de exportación mínimamente procesado. Efecto sobre la calidad nutricional y el desarrollo de microorganismos [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 164.

Sánchez-Domínguez D, Bautista-Baños S, Castillo P. 2007. Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. Anales de Biología. 29: 23-32.

Santamaría BF, Sauri DE, Espadas y GF, Díaz PR, Larqué SA, Santamaría JM. 2009. Postharvest ripening and maturity indices for Maradol papaya. Interciencia. 34: 583-588.

Santamaría BF, Díaz PR, Gutiérrez AO, Santamaría MJ, Larqueé SA. 2011. Control of two species of *Colletotrichum* causing anthracnose in Maradol papaya fruits. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2: 631-643.

Santamaría JM, Herrera-Valencia V, Fuentes G, Menéndez M, Idrovo F, Vallejo-Reyna MA, Peraza-Echeverría S. 2012. Sobrexpresión controlada del gen npr1 en papaya utilizando un promotor inducible por etanol: una estrategia biotecnológica para el control de la antracnosis. Disponible en: https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/Eventos/CIBIOGEM/Taller-Intersecretarial Investigacion/Presentaciones/16_Sobreexpresion_controlada_Jorge-Santamaria.pdf. Publicado 2 de agosto de 2012.

Sellamuthu PS, Mafune M, Sivakumar D, Soundy P. 2013. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93: 3024-3031.

Sharma A, Rajendran S, Srivastava A, Sharma S, Kundu B. 2017. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 123: 308-313.

[SIAP] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do. Consultado el 17 de enero de 2018.

Siddiqui Y, Ali A. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). En Bautista-Baños S. Postharvest decay: control strategies. United States of America: Academic Press. 34.

Simas LRD, de Amorium HBMS, Goulart RVF, Alviano SC, Alviano SD, R da Silva AJ. 2017. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. Industrial Crops and Products. 98: 108–115.

Simmonds JMS, Preedy RV. 2016. Nutritional composition of fruit cultivars. UK. Academic Press. 798.

Sivakumar D, Sultanbawa Y, Ranasinghe N, Kumara P, Wijesundera R. 2005. Effect of the combined application of chitosan and carbonate salts on the incidence of anthracnose and on the quality of papaya during storage. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 80: 447–452.

Sivakumar D, Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Crop Protection. 64: 27-37.

Suseno N, Savitri E, Sapei L, Padmawijaya KS. 2014. Improving shelf-life of cavendish banana using chitosan edible coating. Procedia Chemistry. 9: 113-120.

Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A, Peréz-Brito D. 2008. PCR-Based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. Molecular Biotechnology. 40: 293–298.

Than PP, Jeewon R, Hyde KD, Pongsupasamit S, Mongkolporn O, Taylor PWJ. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum spp*.) in Thailand. Plant Pathology. 57: 562-572.

Tzortzakis GG, Economakis CD. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cympopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 8: 253-258.

Valdés FD, Bautista BS, Fernández VD, Ocampo RA, Garcia PA, Falcón RA. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias. 24: 52-57.

Valencia-Chamorro SA, Palou L, Del rio MA, Pérez-Gago MB. 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 51: 872-900.

Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Egido J, Marín S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. International journal of Food Microbiology. 89: 145-154.

Ventura JA, Costa H, Tatagiba JD. 2004. Papaya diseases and integrated control. En S. Naqvi. Diseases of fruits and vegetables. Volume II. United States of America. Kluwer Academic Publishers. 67.

Wall MM. 2006. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. Journal of Food Composition and Analysis. 19: 434-445.

Wang L, Liu F, Jiang Y, Chai Z, Li P, Cheng Y, Jing H, Leng X. 2011. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59: 12411-12419.

Wang YS, Gao H. 2013. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x aranassa* Duch.). LWT - Food Science and Technology. 52: 71-79.

Xing XLY, Xu Q, Yun J, Lu Y. 2010. Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum in vitro* and *in*

*vivo* fruit test. International Journal of Food Science and Technology. 45: 1837–1842.

Xing Y, Li X, Xu Q, Yun J, Lu Y, Tang Y. 2011. Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Food Chemistry. 124: 1443–1450.

Xing Y, Xu Q, Che Z, Li X, Li W. 2011a. Effects of chitosan-oil coating on blue mold disease and quality attributes of jujube fruits. Food and Function. 2: 466-474.

Xing Y, Xu Q, Li X, Che Z, Yun J. 2012. Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus Nigricans*, *Aspergillus Flavus* and *Penicillium Citrinumin Vitro* and in wounded fruit test. Journal of Food Safety. 32: 84-93.

Yuan G, Chen X, Li D. 2016. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. Food Research International Journal. 89:117-128.

Zahid N, Ali A, Manickam S, Siddiqui Y, Maqbool M. 2012. Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum spp*. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. Journal of Applied Microbiology. 1-15.

Zhang D, Quantick P. 2016. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 73: 763-767.

Zhou Y, Zhang L, Zeng K. 2016. Efficacy of *Pichia membrane efaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. Biological Control. 96: 39-47.

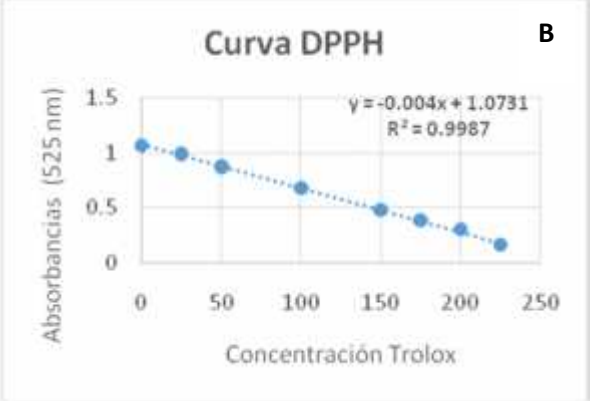
## ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| AA | Ácido ascórbico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| α | Alfa |
| a.m. | *ante meridiem* |
| °H | Ángulo de matiz |
| AOAC | Association of oficial analytical chemists |
| β | Beta |
| $Ca^{2+}$ | Calcio |
| cm | Centímetro (s) |
| $cm^2$ | Centímetro (s) cuadrado (s) |
| $cm^3$ | Centímetro (s) cúbico (s) |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| cv | Cultivar |
| $CO_2$ | Dióxido de carbono |
| Ej. | Ejemplo |
| EAG | Equivalentes de ácido gálico |
| ET | Equivalentes de Trolox |
| FDA | Food and Drugs Administration / Administración de alimentos y medicamentos |
| GRAS | Generalmente reconocidos como seguros |
| °Brix | Grados Brix |
| °C | Grados Celsius |
| g | Gramos |
| gff | Gramo (s) de fruto fresco |
| ITS | Internal transcribed spacer |
| Kg | Kilogramos |

| | |
|---|---|
| kV | Kilovoltio (s) |
| LSD | Least significant differences / Diferencia mínima significativa |
| X | Magnificación |
| µL | Microlitro (s) |
| µm | Micrómetro (s) |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| µg | Microgramo (s) |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro (s) |
| mm | Milímetro (s) |
| mM | Milimolar |
| min | Minuto (s) |
| $O_2$ | Molécula de oxígeno |
| nm | Nanómetro (s) |
| N | Normalidad |
| PDA | Papa dextrosa agar |
| pb | Pares de bases |
| % | Porcentaje |
| p.m. | *post meridiem* |
| pH | Potencial hidrógeno |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RGB | Red, green, blue / Rojo, verde, azul |
| rpm | Revoluciones por minuto |

# ANEXOS

## 1. Curvas de calibración



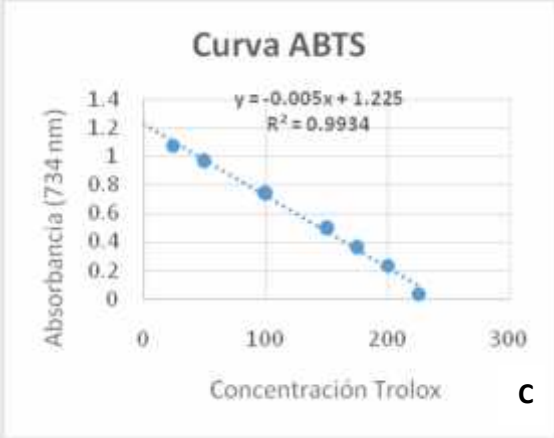
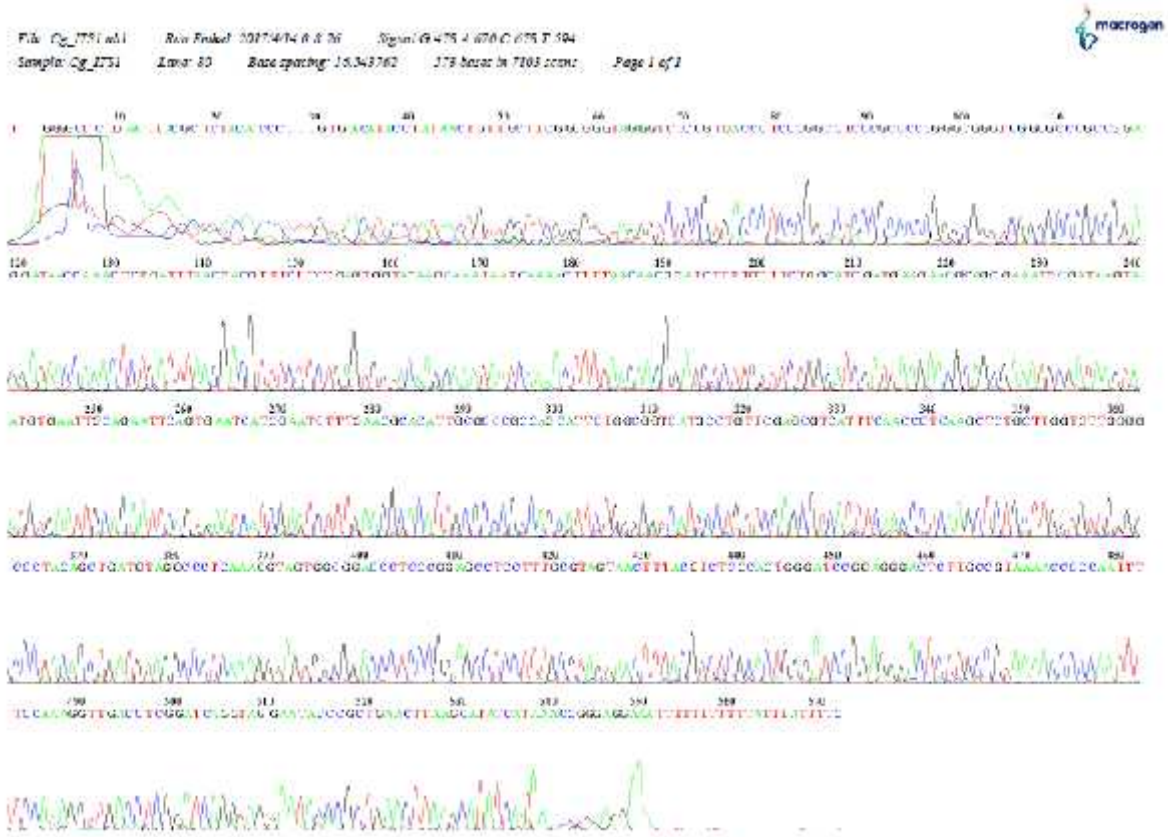




Figura A. Curva de calibración de fenólicos totales; Figura B. Curva de calibración de la capacidad antioxidante por el método de DPPH; Figura C. Curva de calibración de la capacidad antioxidante por el método de ABTS.

**2. Secuencia de la región ITS1 del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y su correspondiente cromatograma**

```
>170413-027_A19_Cg_ITS1.ab1      573
TGGGGCTCTGAATTACGCTCTACACCCTTTGTGACATACCTATAACTGTT
GCTTCGGCGGGTAGAGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGG
CGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTC
TTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTG
TTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG
CATTCTGGCGGTCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTG
CTTGGTGTTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGG
ACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGAT
CCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCG
GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAACCGGGAGGA
AATTTTTTTTTTTATTTATTTTC
```