



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN CBS
UNIDAD IZTAPALAPA**

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO
DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.**

PRESENTA

ING. EN ALIMENTOS: ELBA RONQUILLO DE JESÚS

ASESORA: DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA

LECTORA: DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS

**LABORATORIO: FISIOLOGÍA POSTCOSECHA DE FRUTAS Y
HORTALIZAS, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

México, D. F., Septiembre de 2007

El presente trabajo se realizó en:

El laboratorio de Fisiología Postcosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Biotecnología, Edificio S-156, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El laboratorio de Fitopatología del Departamento de Interacciones Planta-insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos de Yautepec, Morelos.

DEDICATORIA

A mi **madre** y hermanos **Ana Luisa, Rodrigo, Cesar, Miguel y Silbano** con amor y respeto por creer en mí, por su apoyo incondicional en cada paso que he dado, por estar conmigo en todo momento.

A **Baudelio**, por compartir conmigo un poco de su indudable conocimiento, por motivarme a seguir adelante y por su desinteresado apoyo.

A mis **amigos** y **compañeros** de la **UAM-I**, por apoyarme cuando lo he necesitado, pero sobre todo por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora: **Dra. Elsa Bósquez Molina**

A la **Dra. Silvia Bautista Baños**

Al **Dr. Ramón Verde Calvo**

A la **Dra. Gloria Maribel Trejo Aguilar**

Por su apoyo y guía para la realización de este proyecto.

CONTENIDO

1.- INTRODUCCIÓN	6
2.- JUSTIFICACIÓN	10
3.- ANTECEDENTES	11
4.- OBJETIVOS	15
4.1 OBJETIVOS GENERALES	15
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5.- HIPOTESIS	16
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 PRIMERA ETAPA	17
6.2 SEGUNDA ETAPA	20
6.3 TERCERA ETAPA	24
7.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
7.1 ETAPA I	27
7.2 ETAPA IIa	33
7.3 ETAPA IIb	37
7.4 ETAPA III	39
8.- CONCLUSIONES	41
9.- BIBLIOGRAFÍA	42
10.- ANEXO	44

1.- INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas constituyen una gran variedad de alimentos de enorme interés por los beneficios que aporta su ingesta. Debido a su riqueza en vitaminas, principalmente A y C, elementos minerales como el potasio, alto contenido de fibra soluble e insoluble, compuestos funcionales y gran cantidad de agua, el consumo de estos productos es imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada. Los alimentos de origen vegetal, además de los frutos, incluyen semillas (cereales, legumbres, frutos secos), inflorescencias, tubérculos, raíces, bulbos, tallos, hojas, yemas vegetativas y florales, poseen en general las propiedades antes mencionadas. (Cano y col., 2005).

La calidad estética, funcional y vida útil de los productos vegetales cosechados depende en gran medida, de la influencia de los factores ambientales y culturales que prevalecieron durante su crecimiento y desarrollo; algunos de estos factores como la inadecuada nutrición mineral y deficiente control fitopatológico constituyen el origen de grandes pérdidas postcosecha (en calidad, cantidad y económicas) de los productos hortofrutícolas.

En el período postcosecha las principales causas del deterioro se deben a malas prácticas en el manejo y carencia o inadecuada aplicación de tecnologías para la conservación en fresco.

Las pérdidas debidas a las enfermedades causadas por diversos microorganismos como hongos, bacterias y virus en postcosecha se estiman de un 10 al 30% del total de la producción agrícola de pudriciones y en algunos cultivos percederos no son raras las pérdidas superiores al 50 %, sobre todo en los países en vías de desarrollo. (Mendoza 1996).

Los factores postcosecha que más influencia tienen en el deterioro de productos vegetales son la temperatura, la humedad relativa, la composición de la atmósfera que los rodea (sobre todo las concentraciones de CO₂, O₂ y etileno), la luz y los microorganismos oportunistas que penetran en tejidos debilitados por daños mecánicos.

De los agentes microbianos causantes de enfermedades en frutas, los hongos son los que más presentan variación morfológica, patogénica y amplia adaptación ambiental; por lo cual tienen la capacidad de atacar a los cultivos en sus diferentes etapas de desarrollo.

Una de las enfermedades poscosecha más importantes y que se desarrolla en muchos productos de importancia comercial es la denominada antracnosis, la cual tiene su origen en la huerta; esta es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* que se

establece como infección latente en etapas tempranas del desarrollo de las frutas (no produce síntomas al instante sino hasta que las condiciones del medio son más favorables lo cual usualmente ocurre durante el proceso de maduración en el almacenamiento). Otras que también son importantes pero que se desarrollan durante el almacenamiento son: la pudrición por *Aspergillus niger*, pudrición por *Mucor hiemalis*, pudrición por *Phomopsis destructum* y pudrición por *Rhizopus stolonifer*; la pudrición café característica de naranjas y limones en almacenamiento es ocasionada por *Fusarium sp.* (Snowdon, 1990 y Agrios, 1999)

De los mencionados, se consideraron como los principales hongos de interés en este proyecto a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium sp.*, en virtud de la amplia gama de productos hortofrutícolas de valor comercial que deterioran.

- ***Colletotrichum gloeosporioides***. Es el hongo causante de la antracnosis que es una enfermedad cuya sintomatología en los frutos se manifiesta como manchas grandes o pequeñas de colores oscuros, o lesiones sumidas que poseen un contorno ligeramente levantado causando lesiones de tipo ulceroso en frutos y hortalizas en la etapa postcosecha, generando pérdidas considerables. La infección ocurre en precosecha durante todo el año, pero en especial a temperaturas de 25 a 35 °C con humedad relativa elevada (HR mayor de 90 %). Sin embargo permanece latente y normalmente se manifiesta cuando las condiciones le son favorables al hongo, proceso que coincide con la maduración del fruto en postcosecha (Agrios, 1999).
- ***Rhizopus stolonifer***. Es un hongo fitopatógeno oportunista causante de la pudrición blanda de muchas frutas y hortalizas. Es el moho común del pan, que también infecta a hortalizas, bulbos, semillas etc., y es importante sólo durante el almacenamiento, transporte y venta en el mercado de otros productos. Cuando las condiciones son favorables, la enfermedad avanza con gran rapidez en los recipientes, de ahí que las pérdidas sean considerables en tan sólo un corto tiempo.

Los síntomas al principio, en las zonas infectadas de los órganos carnosos aparecen como si estuvieran embebidas en agua y son muy blandas. Aun cuando la cáscara de los tejidos que han sido infectados se mantenga intacta, el órgano carnoso ablandado pierde humedad gradualmente hasta que se arruga y momifica. Sin embargo es más frecuente que la cáscara blanda se rompa durante su manipulación o cuando se producen magulladuras. La infección y pudrición se favorecen en un medio ambiente cálido-húmedo y la temperatura óptima para su crecimiento es aproximadamente de 24 a 27 °C y la mínima es de 5 °C (Snowdon, 1990).

- ***Fusarium sp.*** La pudrición café característica de naranjas y limones en almacenamiento es ocasionada por este hongo, que también se manifiesta como “moho amarillo o rosado” en raíces, tubérculos y bulbos, tomates etc. Con respecto a la mayoría de las hortalizas, la contaminación por *Fusarium* también se puede producir en

el campo o durante la cosecha. Las pérdidas son particularmente considerables durante el almacenamiento en papa, frijol, chícharo, ejote etc.

Los tejidos afectados aparecen ligeramente húmedos y muestran un color café claro al principio, pero más tarde adquieren un color café oscuro y se secan un poco. Conforme se extienden las áreas putrefactas, a menudo se hunden, la cáscara del fruto se arruga y aparece sobre ellas un pequeño penacho de moho de color blanquizco, rosa o amarillo. La infección de los tejidos más blandos, tales como los de los tomates y las cucurbitáceas, se desarrolla con mayor rapidez y se caracteriza por la formación de un micelio y tejidos putrefactos de color rosa.

Otros frutos que también se ven afectados por alguna especie de *Fusarium* son: papaya, melón, sandía, manzana, pera, plátano, aguacate y ciruela mexicana presentando síntomas similares. (Snowdon, 1990; Agrios, 1999).

De acuerdo con Mendoza (1996), el primer paso para reducir las pérdidas es obtener un diagnóstico correcto de la enfermedad, ya que de éste dependerá la elección del método apropiado de control. Conociendo los síntomas de una enfermedad, el agente causal, las condiciones que la favorecen, los métodos de control disponibles y la detección a tiempo o pronosticando su aparición, se podrían reducir y/o evitar la mayoría de los daños causados por los patógenos en diferentes cultivos.

Tradicionalmente los métodos de control de enfermedades postcosecha en productos vegetales consisten en la aplicación de productos químicos sintéticos; sin embargo, los consumidores demandan productos sanos y seguros, libres de compuestos que puedan dañar la salud, por lo que es cada vez más la necesidad de buscar alternativas.

Con base a lo expuesto, en el presente trabajo se exploró el potencial de algunos compuestos naturales (aceites esenciales) en el control de la pudrición poscosecha de papaya causada por tres hongos. El trabajo se organizó en tres etapas:

La primera etapa consistió en un estudio *in vitro*. Se obtuvieron cepas puras de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium sp.*, a partir de papayas infectadas y se determinó la concentración mínima de los aceites esenciales de (tomillo, limón y mandarina) que produjo la inhibición del crecimiento micelial de los hongos mencionados.

Segunda etapa. Con base en los resultados de la etapa anterior, se hizo un estudio *in situ*. Los aceites esenciales de tomillo y limón, se seleccionaron por su acción fungistática y fungicida en concentraciones de (0, 8, 10, 12 y 14 μ l/12 ml de PDA v/v) equivalentes a 0, 0.06, 0.083, 0.1 y 0.116 % para *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*. Se evaluó la incidencia y severidad de las pudriciones causadas por hongos fitopatógenos durante el almacenamiento de frutos de papaya (*Carica papaya* L.).

Tercera etapa. El estudio se realizó *in situ*. Se incorporaron los aceites esenciales de tomillo y limón en formulaciones de películas comestibles en concentraciones de (0.05 y 0.075 gr/200gr de mezcla w/v), equivalentes al 0, 0.093, 0.113 y 0.133 % para *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*. Se evaluó el efecto de las películas

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

antimicrobianas en la conservación de papaya (*Carica papaya* L); además se realizó la caracterización de los aceites esenciales de tomillo y limón.

2.- JUSTIFICACIÓN

Se han reportado numerosos estudios en los que se ha evaluado el potencial antimicrobiano *in vitro* de aceites esenciales y/o extractos de tomillo, romero, cilantro, canela, mostaza, clavo, lima, limón, mandarina etc., (Ayala-Zavala F. J. y col., 2005) y son pocas las investigaciones en las que se ha determinado el efecto directo protector en alimentos, como por ejemplo en champiñones, uva y jitomate (Padgett, 1998).

Las pérdidas en frutas y hortalizas debidas al ataque de microorganismos patógenos durante la maduración postcosecha son muy severas, generando consecuentemente grandes pérdidas económicas. Por otro lado las continuas restricciones para el uso de fungicidas sintéticos como medida de control para reducir el ataque microbiano en pre y postcosecha de los productos agrícolas ha motivado y justifica el interés de orientar las investigaciones en este campo hacia la búsqueda de alternativas, entre las que se encuentran la evaluación de productos antimicrobianos naturales Jenny Jobling 2000.

Cabe señalar también, que una tecnología que está ganando importancia para prolongar la conservación de la calidad en fresco de frutas y hortalizas es la aplicación de películas o recubrimientos comestibles, porque no solo constituyen barreras para la transferencia de masa con lo que se reduce la velocidad de los procesos vitales de estos productos, sino que además, son un excelente vehículo para la incorporación de agentes antimicrobianos sintéticos o naturales garantizando la seguridad alimenticia sin contribuir a la contaminación ambiental.

La presente propuesta se justifica ya que hasta el momento existen reportes de estudios realizados *in vitro* y son escasas las investigaciones relacionadas con estudios *in situ*, como por ejemplo el uso de aceites esenciales de tomillo rojo, clavo y canela fueron usados contra patógenos desarrollados en la etapa postcosecha de uvas, y aceite de eucalipto para la conservación de champiñones (Jenny Jobling 2000), sin embargo no se ha reportado el potencial de aceites esenciales para el control de antracnosis en frutos de papaya y esto representa una contribución al conocimiento en este campo de estudio.

3.- ANTECEDENTES

La necesidad de encontrar métodos alternativos a los procedimientos habituales de control pre y postcosecha de plagas y enfermedades en productos vegetales se hace cada vez más apremiante ya que se reporta que se han encontrado residuos de agentes químicos en los alimentos asociados a un aumento en la incidencia de cáncer en los humanos, y además con un impacto negativo para el ambiente (Wilson, 1997).

Por esta razón actualmente se están utilizando tecnologías emergentes para el bio-control de enfermedades frutícolas en etapa post-cosecha, en las que se incluyen a los microorganismos antagonistas, compuestos antimicrobianos de origen natural y productos desinfectantes (Mari et al, 2003)

La aplicación de productos desinfectantes como el hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, dióxido de cloro y ácido para-acético, se utilizan como medidas preventivas en el lavado de las frutas y hortalizas. Aunque, cabe señalar que deben incluirse estrategias integradas, esto es, prácticas apropiadas como métodos de recolección y manejo cuidadoso de los productos vegetales que minimicen la contaminación y aparición de heridas; métodos de desinfección superficial que impidan o reduzcan la contaminación cruzada de las frutas y hortalizas en la línea de empaquetado y el uso de sustancias naturales que propicien la acción de los microorganismos antagonistas (Mari et al, 2003)

MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS

Los microorganismos antagonistas más utilizados en la actualidad son a partir de bacterias (*Bacillus Amyloliquefaciens*), levaduras (*Candida halofila*, *Pseudomonas syringae*) y hongos filamentosos (los cuales ofrecen una alternativa atractiva por sus diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran la producción de antibióticos, la competencia por nutrientes o espacio, el parasitismo y la inducción de resistencia del huésped. (Sportts, 1984)

Los microorganismos antagonistas colonizan efectivamente el sitio de infección siempre que se introduzcan previamente o en conjunto con el patógeno, compitiendo con él por las fuentes de nutrientes limitantes (la fuente de nitrógeno en general) y el espacio. En algunos casos la presencia del patógeno en el sitio de infección, induce a que el antagonista produzca enzimas capaces de degradar las paredes del patógeno como las quitinasas o gluconasas. Por otro lado es importante destacar que en todos los casos la protección de frutos se da solamente con estrategias preventivas y no curativas (Mari et al, 2003).

PRODUCTOS ANTIMICROBIANOS NATURALES

Entre los productos naturales se encuentran los aceites esenciales (compuestos aromáticos producidos por varios géneros de plantas que poseen actividad biológica) y/o extractos de vegetales con actividad antifúngica (contienen compuestos que son sintetizados por las plantas como mecanismo de defensa contra algunos microorganismos). Montes-Belmont, 1996; 200; Hernández et al., 2005).

De los anteriores, cabe señalar que los aceites esenciales están adquiriendo gran importancia ya que se ha reportado un efecto en el control de contaminaciones microbianas en diferentes tipos de alimentos: pan, carne, queso y frutas y hortalizas frescas (Martínez 2005).

Los aceites esenciales son considerados metabolitos secundarios producidos en alguna parte de la planta (hojas, flores, cáscaras, etc.), que pueden contener, dependiendo de la parte y tipo de planta utilizada, algunos de los siguientes compuestos: monoterpenos, α -pineno, limoneno y timol, entre muchos otros; su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma de la membrana de los patógenos, su modo de acción parece estar estrechamente relacionada con la solubilidad de cada compuesto. Mari et al, 2003). Los compuestos volátiles de plantas pueden inhibir o estimular el crecimiento del hongo y/o la formación y germinación de las esporas. (Caccioni et al., 1994)

Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas. Las esencias son mezclas complejas en cuya composición se encuentran los hidrocarburos como terpenos con fórmula $(C_5H_8)_n$, (monoterpenos, $n=2$; sesquiterpenos, $n=3$; diterpenos, $n=4$; etc.) junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos y compuestos fenólicos) y que son los responsables del aroma que caracteriza a los aceites esenciales (Templeton, 1969).

Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos, porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella ni mancha grasosa.

Los aceites esenciales se encuentran muy difundidos en el reino vegetal, se pueden localizar en diferentes partes de la planta, por ejemplo: en las hojas (albahaca, mejorana, menta, romero, salvia, etc.), en las raíces (cálamo, valeriana, etc.), en la corteza (canela, cedro, sándalo, etc.), en las flores (jazmín, rosa, etc.), en la cáscara del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en los frutos (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, etc.). La cantidad y composición del aceite varía de una especie a otra, y dentro de los mismos géneros de la planta.

Actualmente se conocen más de doscientos aceites esenciales de apreciado valor comercial a los cuales se les ha podido identificar alrededor de cuatrocientos componentes químicos como el grupo de los terpenos, en donde se encuentran compuestos oxigenados como alcoholes libres (borneol, geraniol, linalool, nerol, mentol, terpineol, etc.) o en forma de ésteres, aldehídos (cinámico, benzaldehído, neral (citral, geranial), citronelal, salicílico, etc.), cetonas (alcanfor, carvona, fenchona, mentona, tuyona, etc.), fenoles (carvacrol, eugenol, isoeugenol, timol, etc.), ácidos libres (acético, benzoico, cianhídrico, cinámico, propiónico, valeriánico, etc.) en pequeñas cantidades o en forma de ésteres o éteres. (Gil-Sáez, 2005).

MECANISMO DE ACCIÓN.

En la tabla 1 se incluye información relativa a lo que se ha reportado sobre la acción antimicrobiana y los posibles mecanismos de acción de los aceites esenciales.

Al parecer existe una relación entre las estructuras químicas de los compuestos más abundantes en los aceites esenciales utilizados y el efecto antimicrobiano. El grado de inhibición de los aceites puede atribuirse a la presencia de un núcleo aromático que contiene un grupo funcional polar. Aunque se piensa que también están involucrados otros factores como el balance hidrofílico/lipofílico; por ejemplo, los grupos fenólicos-OH que son muy reactivos y pueden fácilmente forman enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas.

El principal compuesto fenólico encontrados en el aceite esencial de tomillo es el Carvacrol, el cual puede penetrar la membrana del citoplasma, causando una desestabilización y, además, podría actuar como intercambiador de protones, reduciendo el gradiente de pH a lo largo de la membrana. (Guynot, et al, 2005)

Se encontró que los compuestos fenólicos más apolares (diterpenoides fenólicos) aparentemente eran responsables de la actividad antimicrobial de un extracto de romero. (Del Campo et. al., 2000).

}

Tabla 1

ACEITES ESENCIALES Y SUS DIVERSOS EFECTOS		
Aceite Esencial	Efectos	Referencia
Tomillo rojo	Inhibe a <i>Botrytis cinerea</i> , antioxidante, antiinflamatorio	Wilson, 1997
Naranja	Actividad antioxidante, uso en fragancia, de jabón, lociones etc.	Foster, 2006
Canela	Inhibe a <i>Botrytis cinerea</i>	Wilson, 1997
Clavo	Inhibe a <i>Botrytis cinerea</i>	Wilson, 1997
Ajo	Inhibe a <i>Botrytis cinerea</i>	Guynot, 2004
Limón	Inhibe <i>Aspergillus spp.</i> y <i>Penicillium</i> en alimentos de panadería	Guynot, 2004
Orégano	Inhibe <i>Aspergillus spp.</i> y <i>Penicillium</i> en alimentos de panadería, antibacterial	Guynot, 2004
Romero	Antioxidante, antimicrobiano, antibacterial	Wilson, 1997

4.- OBJETIVOS

4.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina como conservadores naturales incorporados en películas comestibles de formulación conocida, en la conservación de la calidad de papaya (*Carica papaya* L.).

4.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

1era Etapa

- **Determinar** la concentración mínima de aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina para inhibir el crecimiento micelial de *Rhizopus sp.*, *Fusarium, sp* y *Colletotrichum gloeosporioides*. (Pruebas *in vitro*).

2da Etapa

- **Determinar la** concentración adecuada de los aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina con actividad antimicrobiana en futas de papaya (*Carica papaya* L.) cv 'Maradol'. (Pruebas *in situ*).

3era etapa

- **Selección** e incorporación de los aceites esenciales en al menos una formulación de películas comestibles.
- **Evaluación** del efecto de las películas antimicrobianas en la conservación de papaya (*Carica papaya*. L.).
- Caracterización de aceites esenciales

5.- HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina, actúan como agentes antimicrobianos de los hongos, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus sp.* y *Fusarium sp.*, agentes causantes de pudriciones en frutas y hortalizas.

6.- MATERIALES Y METODOS

6.1.- Primera Etapa. Estudios *in vitro*

- **OBTENCIÓN DE LOS FRUTOS**

La papaya *cv* 'Maradol', se recolectó en el estado de Iguala, Guerrero, la cual se introdujo en una cámara de maduración hasta que presentó sintomatología de antracnosis.

- **OBTENCIÓN DE CEPAS de *Colletotrichum*, *Rhizopus*, y *Fusarium*.**

Para obtener las cepas puras de los hongos para el estudio, se consiguieron papayas que presentaban una sintomatología típica de antracnosis o pudrición blanda. Posteriormente, las frutas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se colocaron en una cámara húmeda durante 5 días para que se desarrollaran los hongos, al término de este período, se tomaron porciones del fruto infectado y se depositaron en cajas petri que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta la aparición del micelio y conidios principalmente (aproximadamente 7 días). Estos se identificaron con ayuda de microscopio compuesto (Marca Nikon, modelo Alphaphon-2) y de claves de identificación propuestas por Barnette y Hunter (1972).

Con la finalidad de conservar la patogenicidad de las cepas éstas se inocularon en su respectivo hospedero (papaya), volviéndose a sembrar en caja Petri con PDA, las cuales se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura.

OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites de tomillo, limón y mandarina fueron obtenidos mediante arrastre de vapor en condiciones de vacío estándar y proporcionados por la empresa INFOODS *In rerum natura*. (México, D. F.).

- **APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS**

Para cubrir el objetivo de la primera etapa, inicialmente se ensayaron las siguientes concentraciones de (0, 2, 4, y 6 $\mu\text{l}/12\text{ml}$ de PDA v/v) de cada uno de los aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina. También se ensayaron concentraciones de (0, 8, 10, 12 y 14 $\mu\text{l}/12\text{ml}$ de PDA v/v). Estas concentraciones se seleccionaron con base en estudios reportados para otros aceites esenciales similares (Guynot, 2005).

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

Cada una de las concentraciones de los aceites se mezclaron con el medio nutritivo PDA contenido en cajas petri de 5mm de diámetro en un ambiente estéril (campana de flujo laminar Marca Veco). De cada tratamiento se prepararon 4 repeticiones.

- Una vez que las cajas se enfriaron y se mezclaron perfectamente se procedió a sembrar un disco de 0.5mm de diámetro, del inóculo de los hongos *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Rhizopus*, en el centro de las cajas que contenían los aceites.
- Como Testigo se utilizaron cajas de PDA sembradas con los microorganismos a evaluar.

Las cajas se sellaron, etiquetaron y se incubaron a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta concluir la evaluación de crecimiento micelial.

PRIMER ENSAYO.

Factor	Niveles
Aceite esencial	3 (tomillo, limón y mandarina)
Concentración	4 (0, 2, 4 y 6 μl /12ml v/v)
Hongo inoculado	3 (<i>Colletotrichum g.</i> , <i>Rhizopus sp</i> y <i>Fusarium sp</i>)
Repeticiones	4 Por cada concentración, hongo y aceite

Total de tratamientos realizados $3 \times 4 \times 3 = 36$

Siendo la UE= unidad experimental 4 cajas petri/concentración/hongo/aceite

SEGUNDO ENSAYO.

Este ensayo se realizó en concentraciones de aceite mayores al primero porque en el anterior no se obtuvo ninguna concentración de aceite esencial que inhibiera el crecimiento micelial de los hongos utilizados.

Factor	Niveles
Aceite esencial	3 (tomillo, limón y mandarina)
Concentración	5 (0, 8, 10, 12, y 14 μl)/12 ml

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

Hongo inoculado	3 (<i>Colletotrichum g.</i> , <i>Rhizopus sp</i> y <i>Fusarium sp</i>)
Repeticiones	4 Por cada concentración, hongo y aceite

Total de tratamientos realizados $3 \times 5 \times 3 = 45$.

Siendo la UE= unidad experimental 4 cajas petri/concentración/hongo/aceite

- **PARÁMETROS DE EVALUACIÓN**

Crecimiento micelial.

Se determinó midiendo diariamente el crecimiento del micelio en mm desde el centro de la caja al borde exterior con ayuda de un vernier, esto se realizó hasta que el micelio del hongo llegara a la orilla de las cajas petri. Se realizaron 4 repeticiones por cada tipo de aceite y concentración.

Efecto en la esporulación.

Se obtuvo una solución de esporas adicionando 12 ml de agua desionizada de cada caja petri utilizada en la evaluación del crecimiento micelial, y se rasparon con una aguja de disección estéril. La solución se filtró a través de un embudo de filtración rápida y una gasa estéril en un frasco gotero color ámbar. Con el fin de detener la germinación de los conidios se le agregó a la solución de esporas unas gotas de safranino-lactofenol (Anexo)

Se realizó un conteo de esporas tomando 0.5 ml de la suspensión depositándola en una cámara de Neubauer, se contaron 5 campos del cuadro central de la cámara con la ayuda de un microscopio compuesto con el objetivo de 40X para este conteo se tomaron 4 cajas por tratamiento y se realizaron lecturas dobles.

Análisis estadístico.

Se obtuvo la media y la desviación estándar de las réplicas de los datos obtenidos y se realizó un análisis de Varianza con un $\alpha = 0.05$ en el cual los experimentos tuvieron un arreglo completamente al azar. Los datos se analizaron en el programa STATGRAPHICS Plus versión 5.

6.2.- Segunda Etapa. Estudios *in situ*

- **Obtención de los frutos**

En esta etapa se utilizaron únicamente los aceites esenciales de tomillo y limón porque fueron con los que se inhibió el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp.*, utilizados en la primera etapa del proyecto.

Se emplearon un total de 280 frutos de papayas *cv 'Maradol'* de la Central de Abasto de la Ciudad de México, provenientes de Huatulco Oaxaca con las siguientes características 8.73° Brix y 12.62 Newtons de firmeza en estado de madurez fisiológica; es decir, cuando el color de la fruta cambia de color verde a color amarillo.

Una actividad comúnmente utilizada en la Central de abasto antes de la comercialización de las papayas, es tratarlas con gas etileno para acelerar su maduración y así poder venderlas al consumidor por este motivo en el ensayo se utilizaron 240 frutos en estas condiciones para poder analizar la sensibilidad de los resultados debido a un cambio en la madurez del fruto, además se realizó un tratamiento adicional con 48 papayas sin tratamiento previo de etileno inoculando al hongo (*Colletotrichum gloeosporioides*) puesto que es de los patógenos que provoca mayor incidencia en las pérdidas postcosecha.

- **Obtención de aceites esenciales**

Aceites esenciales: Los aceites de tomillo y limón fueron obtenidos por hidrodestilación al vacío y proporcionados por la empresa INFOODS *In rerum natura*. (México, D. F.)

- **Obtención de cepas de *Colletotrichum* y *Rhizopus sp.***

Las cepas puras de los hongos que se utilizaron para esta etapa, fueron las que se obtuvieron del estudio *in vitro*.

TRATAMIENTOS PARA FRUTOS CON TRATAMIENTO PREVIO DE ETILENO

Factor	Niveles
Aceite esencial	2 (tomillo, limón)
Concentración	4 (0, 14, 17 y 20 µl/200 ml de agua destilada)
Hongo inoculado	2 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Rhizopus sp</i>)
Forma de aplicación	3 Aceite de tomillo y/o limón

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

Aceite de tomillo y/o limón+suspensión. esporas

Suspensión de esporas+aceite de tomillo y/o limón.

Lo que da un total de $2 \times 4 \times 2 \times 3 = 48$ tratamientos

Frutos **Sin** tratamiento previo de etileno

TRATAMIENTOS PARA FRUTOS SIN ADICIÓN PREVIO DE ETILENO

Factor	Niveles
Aceite esencial	2 (tomillo y limón)
Concentración	4 (0, 14, 17 y 20 μ l/200 ml de agua destilada)
Hongo inoculado	1 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)
Forma de aplicación	3 Aceite de tomillo Aceite de tomillo y/o limón+suspensión esporas Suspensión de esporas+aceite de tomillo y/o limón.

Total de $2 \times 4 \times 1 \times 3 = 24$ tratamientos

Metodología

• **Preparación de las frutas**

Las frutas se transportaron al laboratorio de Fisiología y Tecnología Postcosecha de Frutas y Hortalizas de la UAM-I. Se seleccionaron de acuerdo al peso promedio 1.5kg se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada, y se secaron con papel secante.

• **Preparación de suspensión de aceites (tomillo y limón)**

Se prepararon 6 diferentes suspensiones de aceite esencial de tomillo y limón en concentraciones de (0, 14, 17 y 20 μ l /200 ml de agua destilada w/v) equivalentes a (0, 0.0933, 0.1133, 0.1333 %) respectivamente.

• **Preparación de suspensión de esporas de (*Colletotrichum* y *Rhizopus*).**

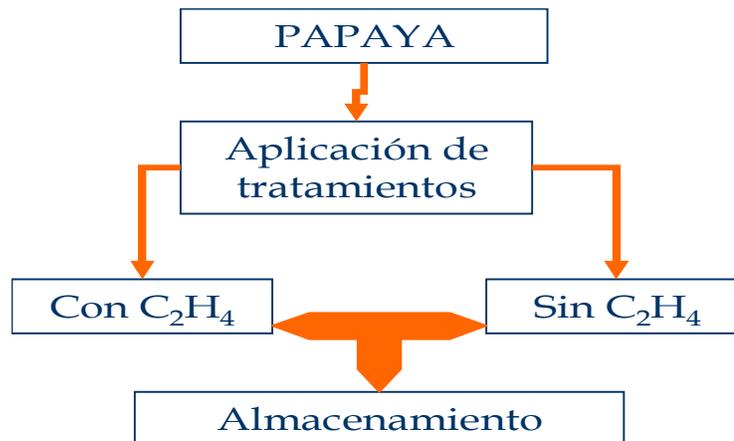
La solución de esporas se obtuvo realizando un raspado de las cajas Petri que contenían las cepas puras, con una concentración de 1×10^6 esporas /litro.

• **Aplicación de tratamientos**

Para la aplicación de tratamientos se consideró como unidad experimental a una papaya y cinco repeticiones por cada tratamiento.

Metodología

Los frutos se dividieron en 2 lotes: los tratados con etileno y los que no se trataron con etileno.



Una vez que las papayas estuvieron secas, se procedió a la aplicación de la solución de aceite de tomillo de cada una de las concentraciones (0, 14, 17 y 20 μ l) asperjándose directamente en cada uno de los frutos dejándose en un recipiente cerrado por 15 minutos. Terminado este tiempo, las papayas se retiraron del recipiente y se dejaron secar a temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Las frutas se almacenaron en una cámara de maduración a temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80 % de humedad relativa. Por un período de cinco días para los frutos con previo tratamiento de etileno y 9 días para los frutos sin tratamiento de etileno, realizándose un muestreo diario del aspecto físico de la papaya hasta que el control mostró un porcentaje de infección mayor al 75%

- **Parámetros de evaluación**

Porcentaje de infección

Al término del periodo de almacenamiento (cinco días para los frutos con previo tratamiento de etileno y 9 días para los frutos sin tratamiento de etileno) se revisaron los frutos de cada tratamiento, dividiendo el número de frutos infectados entre el total para obtener el porcentaje de infección.

Índice de severidad

Para facilitar la evaluación de este parámetro se consideró la superficie total del fruto como el 100 %, y se dividió longitudinalmente en cuatro partes iguales. Para el daño visual se estableció un escala arbitraria con cuatro categorías en función del porcentaje de la superficie infectada exhibida por el fruto, esto es: 0=sin daño; 1=1-5 % daño ligero; 2=6-15 % daño moderado; 3=16% daño severo.

El índice de severidad se determinó mediante la ecuación descrita por Pérez y col., (1995).

$$\text{Índice de severidad} = \frac{(Xi(1) + Xi(2) + Xi(3) + Xi(4) + Xi(5))}{N}$$

Donde:

Xi = Número de frutos enfermos por cada grado de daño

1, 2, 3, 4 y 5 = Grados de daño en la escala utilizada.

N = Total de frutos por unidad experimental

Análisis Estadístico

Los experimentos tuvieron un arreglo completamente al azar. Los datos se analizaron con el programa STATGRAPHICS Plus, versión 5. Se realizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%.

6.3.- Tercera Etapa. Estudios *in situ* con película comestible

- Selección e incorporación de los aceites esenciales en películas comestibles.
- Evaluación del efecto de las películas antimicrobianas en la conservación de papaya (*Carica papaya* L.)
- Caracterización de aceites esenciales

Obtención de los frutos

120 papayas *cv* 'Maradol', procedentes de Oaxaca, tratadas con etileno: obtenidas en la Central de Abasto de la Ciudad de México. Con 8.6° Brix y 12.06 Newtons de firmeza en estado de madurez fisiológica; es decir, cuando el color de la fruta cambia de color verde a color amarillo

Obtención de aceites esenciales

Aceites esenciales: Los aceites de tomillo y limón fueron obtenidos por hidrodestilación al vacío y proporcionados por la empresa INFOODS *In rerum natura*. (México, D. F.).

Obtención de cepas de *Colletotrichum* y *Rhizopus*.

Las cepas puras de los hongos para esta etapa se obtuvieron del estudio *in vitro*.

TRATAMIENTOS PARA LOS FRUTOS (PAPAYA)

Frutos con tratamiento previo de etileno

Factor	Niveles
Aceite esencial	2 (tomillo, limón)
Concentración	2 (0.05 y 0.075 g/ 200g de mezcla)
Hongo inoculado	2 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Rhizopus sp</i>)
Forma de aplicación	3 control (ningún tratamiento) Película comestible con tratamiento aceite de tomillo y/o limón más suspensión de esporas. Suspensión de esporas+película comestible con tratamiento de aceite de tomillo y/o limón.

Total de $2 \times 2 \times 2 \times 3 = 24$ tratamientos

CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para caracterizar e identificar los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales de tomillo y limón se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, acoplado a masas, 5890 serie II.

Metodología

- **Preparación de los frutos**

Las frutas se transportaron al laboratorio de Fisiología Postcosecha de Frutas y Verduras de la UAM-I. Se seleccionaron de acuerdo al peso 1.5 kg, se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada, y se secaron con papel secante.

- **Preparación de película comestible de goma de mezquite**

Se preparó la emulsión sencilla de la formulación de la película comestible a base de goma de mezquite y material hidrofóbico en una proporción de 2:1 (cera de candelilla y aceite mineral) según lo reportado (Bosquez y col., 2003) en la que se incorporó el aceite esencial de tomillo y/o limón considerando una concentración de 0.1% con la finalidad de garantizar el efecto antimicrobiano obtenido en las etapas anteriores del estudio.

Goma de Mezquite	10%	
Material hidrofobito	17.5 %	
Glicerol	2 %	
Agua	70.5 %	
Aceite esencial de limón/tomillo	0.1 %	(conservador natural)

Preparación de la suspensión de esporas de (*C. gloeosporioides* y *Rhizopus*).

La solución de esporas se obtuvo realizando un raspado de las cajas Petri que contenían las cepas puras, con una concentración de 1×10^6 esporas /litro.

Aplicación de tratamientos

Para la aplicación de tratamientos se consideró como unidad experimental a una papaya y cinco repeticiones por cada tratamiento.

Una vez que las papayas estuvieron completamente secas, se procedió a la aplicación de la película comestible de cada una con aceite de tomillo y/o limón en concentraciones de (0, 0.5 y 0.075 g/250 g de la emulsión total), equivalentes al (0, 0.016, 0.033 y 0.05 %), respectivamente.

En el primer tratamiento se cubrieron las papayas con la película comestible, dejándose secar por un período de una hora y pasado este tiempo se procedió a inocular el fruto con suspensión de esporas de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y/o *Rhizopus sp.*,

respectivamente. En un segundo tratamiento las papayas se inocularon con la suspensión de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* y/o *Rhizopus sp.*; una vez inoculado el fruto se dejó secar por un lapso de una hora y posteriormente se cubrieron totalmente con la película comestible.

Las frutas se almacenaron en una cámara de maduración a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80 % de humedad relativa. Por un periodo de diez días, realizando evaluaciones físicas tomando el número de papayas infectadas así el porcentaje de infección de cada uno de los frutos.

Parámetros de evaluación

En esta etapa se analizaron los mismos parámetros que en la etapa anterior.

Porcentaje de infección

Al término del periodo de almacenamiento de diez días, se revisaron los frutos de cada tratamiento, dividiendo el número de frutos infectados entre el total para obtener el porcentaje de infección.

Índice de severidad

Se determinó el índice de severidad de la misma forma que en la etapa anterior

Caracterización de aceites esenciales.

La caracterización de los aceites esenciales de tomillo y limón se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a masas 5890 serie II, utilizando helio como gas acarreador de alta pureza, y una columna capilar para compuestos polares de 50m de longitud y 0.320 mm de diámetro, las condiciones de operación fueron: temperatura de inyección de 200°C , temperatura del detector 280°C y temperatura inicial del horno 60°C y máxima de 250°C , con flujo constante de $1\mu\text{l}/\text{minuto}$.

Análisis Estadístico

Los experimentos tuvieron un arreglo completamente al azar. Los datos se analizaron con el programa STATGRAPHICS Plus, versión 5. Se realizó un análisis de Varianza ($p = 0.05$).

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.- Etapa I. Efecto de los aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina en el crecimiento micelial de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus sp.*, y *Fusarium sp.*

En esta parte del estudio *in vitro* se presentan los resultados referentes a la cinética de crecimiento micelial de tres diferentes hongos en presencia de aceites esenciales a diferentes concentraciones, donde se determinó si el tipo de aceite y la concentración utilizada, tuvo efecto sobre las cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*., *Rhizopus sp.*, y *Fusarium sp.*, aisladas a partir de papaya. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

En la figura 2 (A y B), se observan los resultados del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*., a diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo. Este aceite muestra actividad antimicrobiana a partir de 8 μl ya que inhibió el crecimiento micelial del hongo, sin embargo en concentraciones menores a 8 μl este efecto es fungistático.

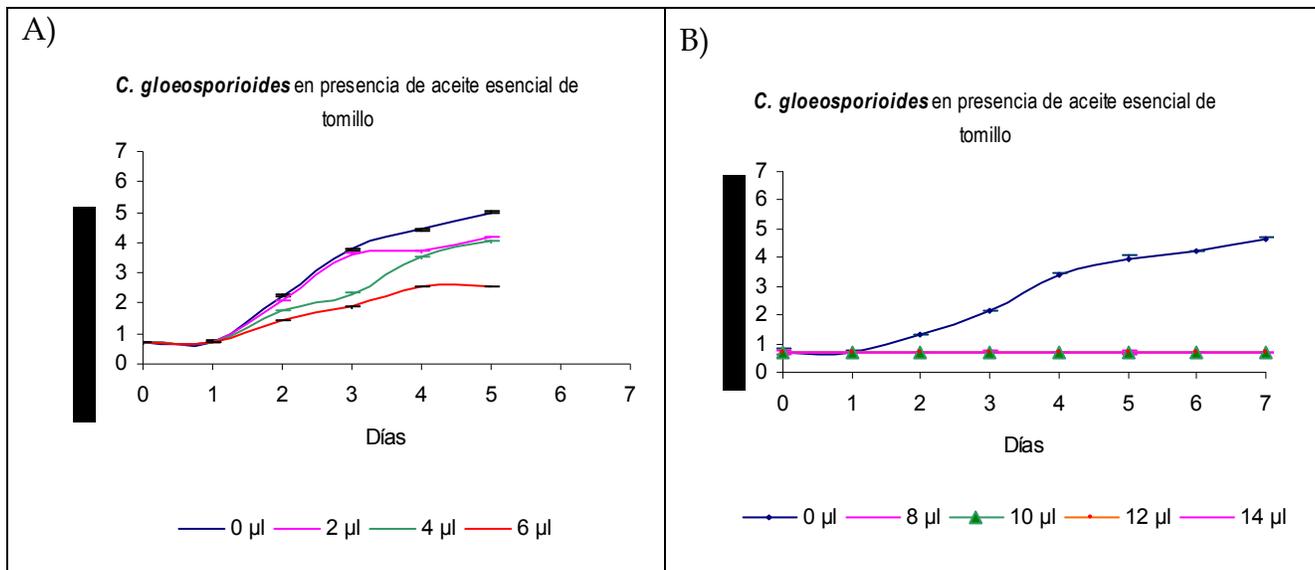


Figura 2. Cinética de crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*., en presencia de aceite esencial de tomillo, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 μl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 μl .

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la figura 3 (A y B), se comparan los resultados del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, a diferentes concentraciones de aceite esencial de limón. Aquí la actividad antimicrobiana sobre el crecimiento micelial se presentó a partir de una concentración de 12 μl observándose una inhibición total. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

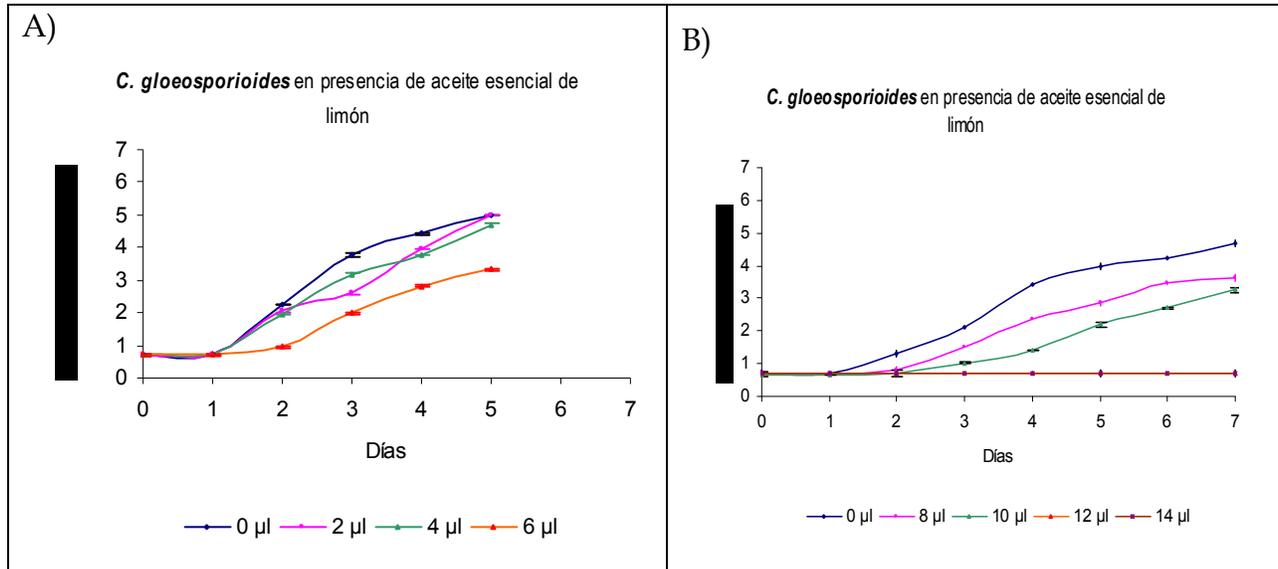


Figura 3. Cinética de crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, en presencia de aceite esencial de limón, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 μl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 μl .

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la figura 4 (A y B), se observa que en presencia de aceite esencial de mandarina el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, no fue inhibido en ninguna de las concentraciones utilizadas, la cinética de crecimiento se comportó de la misma forma que el testigo. Por otro lado la figura A muestra un comportamiento de crecimiento micelial no esperado ya hasta el segundo día el crecimiento es muy similar al control pero del segundo al tercer día se ve una clara disminución y posteriormente el comportamiento es igual al control. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

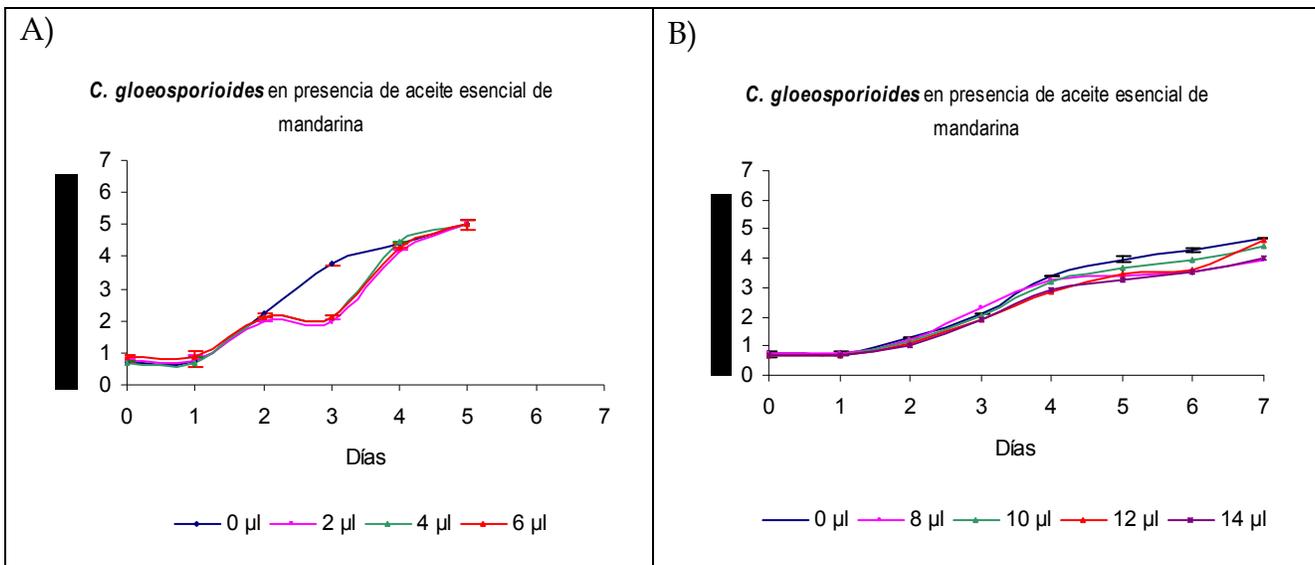


Figura 4. Cinética de crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, en presencia de aceite esencial de mandarina, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

En la figura 5 (A y B), se muestran los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano que tuvo el aceite esencial de tomillo sobre la cinética del crecimiento micelial de *Rhizopus sp.*, en los cuales se observa que a una concentración de 8 µl el hongo se inhibe completamente. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

A)	B)
----	----

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

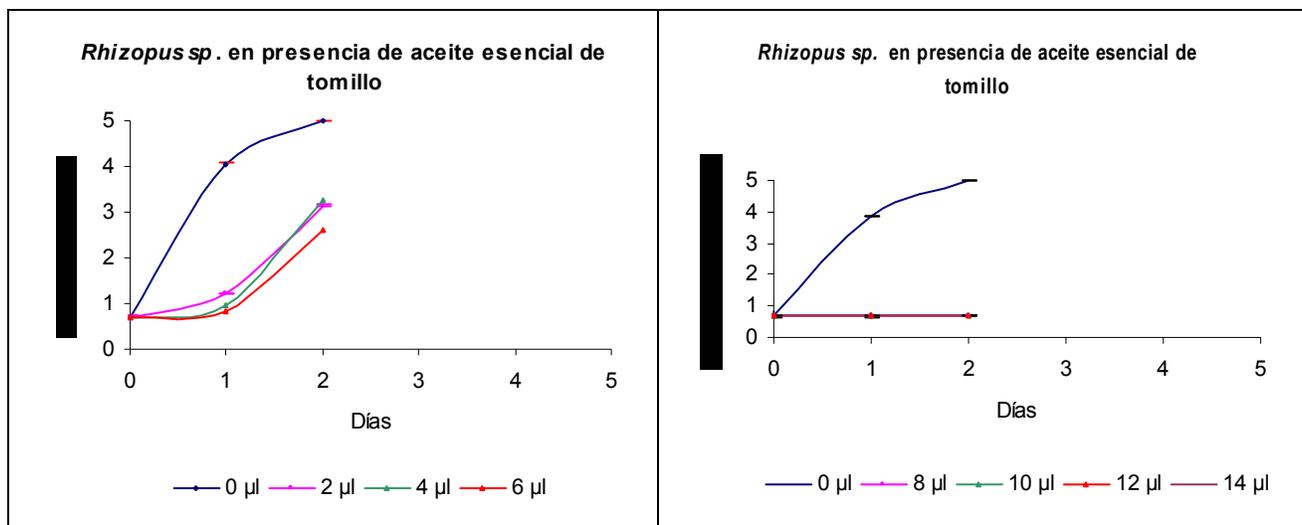


Figura 5. Cinética de crecimiento micelial de *Rhizopus sp.*, en presencia de aceite esencial de tomillo, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

En la figura 6 (A y B), se muestran los tratamientos aplicados en *Rhizopus sp.*, a diferentes concentraciones de aceite esencial de limón en donde se observa la actividad antimicrobiana de este aceite en concentración mayor de 10 µl mientras que a una concentración menor de 12 µl el efecto es fungistático. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

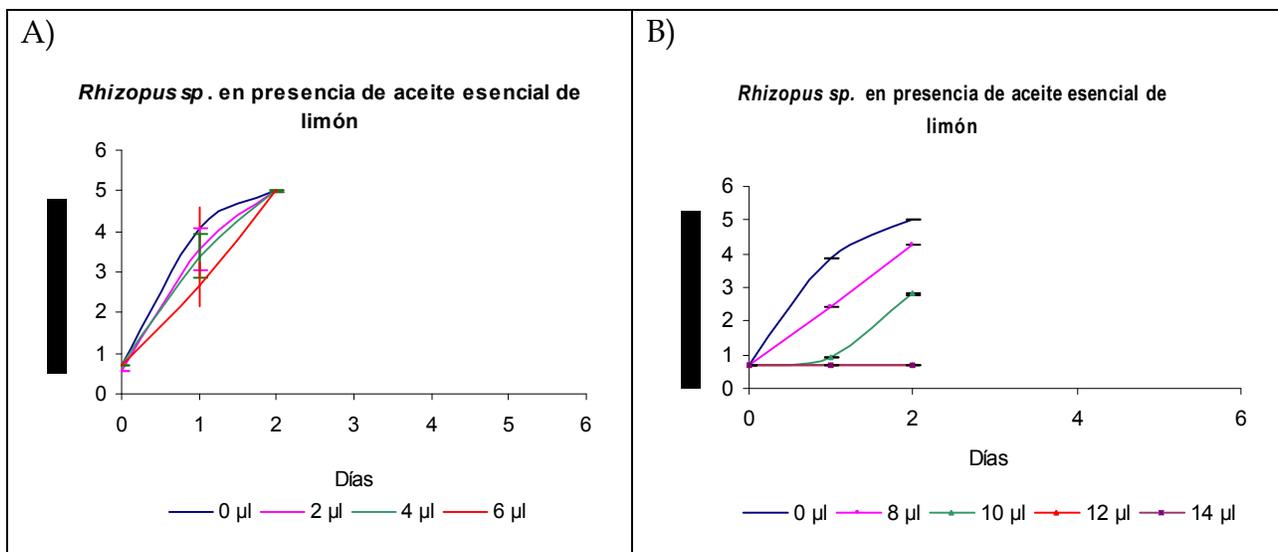


Figura 6. Cinética de crecimiento micelial de *Rhizopus sp.*, en presencia de aceite esencial de limón, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

En la figura 7 (A y B), se observa que las diferentes concentraciones utilizadas de aceite esencial de mandarina, sobre las cepas de *Rhizopus sp.*, no tuvieron efecto sobre el crecimiento micelial del hongo. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

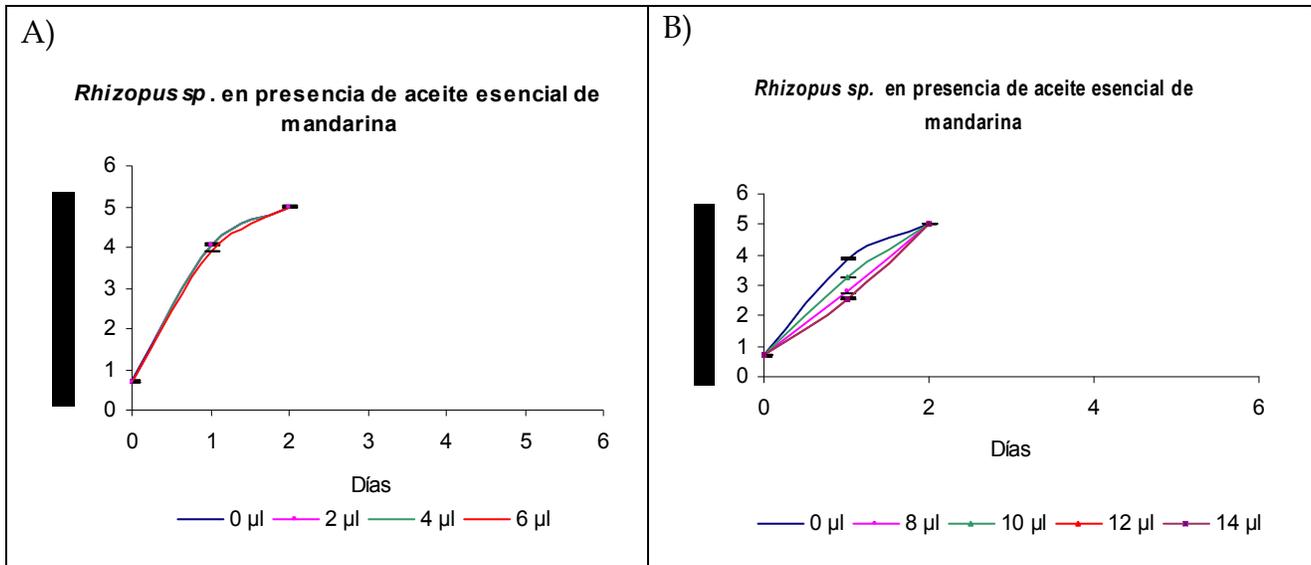


Figura 7. Cinética de crecimiento micelial de *Rhizopus sp.*, en presencia de aceite esencial de mandarina, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

En la figura 8 (A y B), se presentan los resultados del tratamiento utilizado con aceite esencial de tomillo sobre las cepas de *Fusarium sp.*, en los cuales se observa que el efecto antimicrobiano no fue inhibitorio en ninguna de las concentraciones utilizadas, sin embargo a partir de 14 µl se observó un efecto fungistático. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

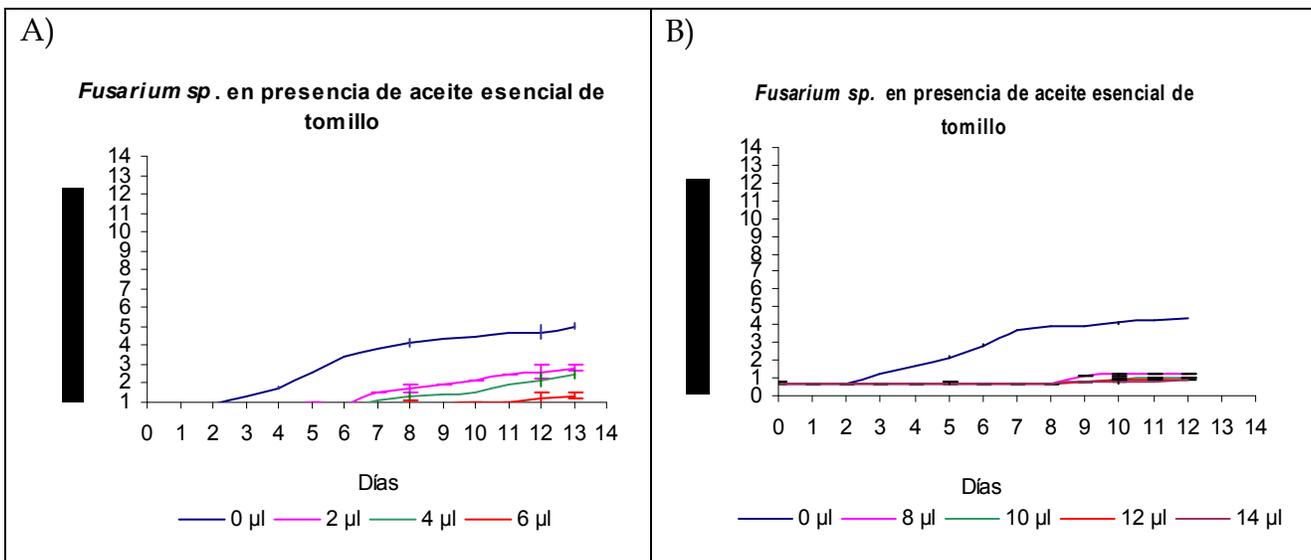


Figura 8. Cinética de crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, en presencia de aceite esencial de tomillo, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

En la figura 9 (A y B), se presentan los resultados de los dos ensayos realizados con aceite esencial de limón a diferentes concentraciones sobre *Fusarium sp.*, en donde se

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

observa que el comportamiento del crecimiento micelial es igual al control por lo tanto este aceite no presentó efecto alguno sobre este hongo. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

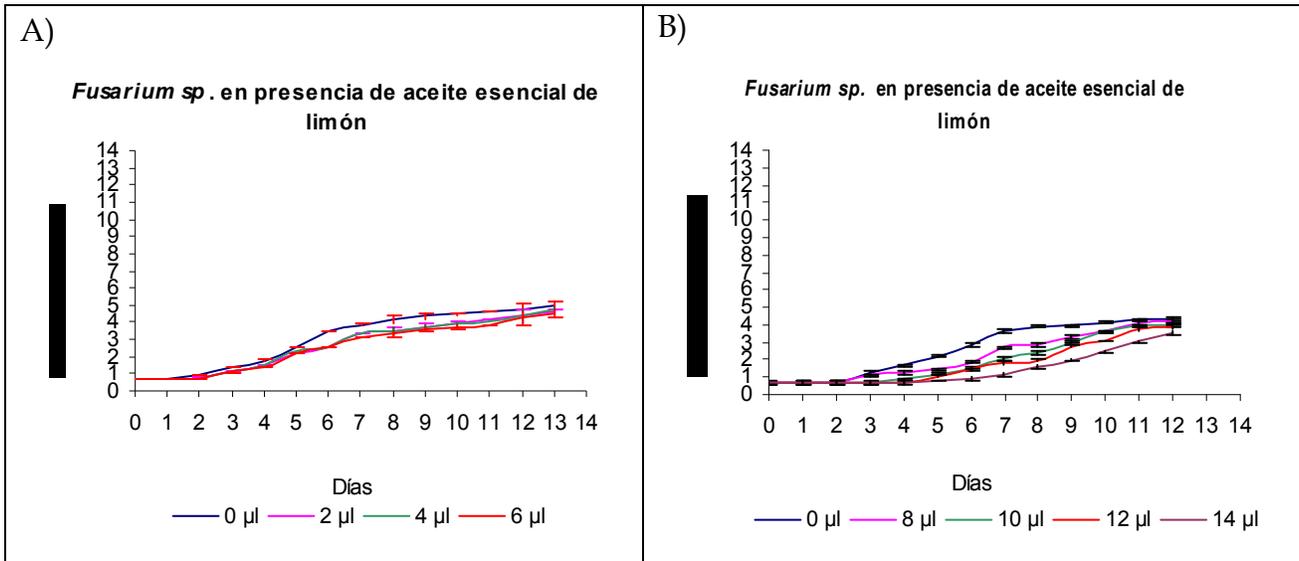


Figura 9. Cinética de crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, en presencia de aceite esencial de limón, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

En la figura 10 (A y B), se aprecia que el aceite de mandarina no tuvo efecto en la cinética de crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, en las concentraciones utilizadas. Las líneas horizontales indican la desviación estándar de cuatro repeticiones respectivamente.

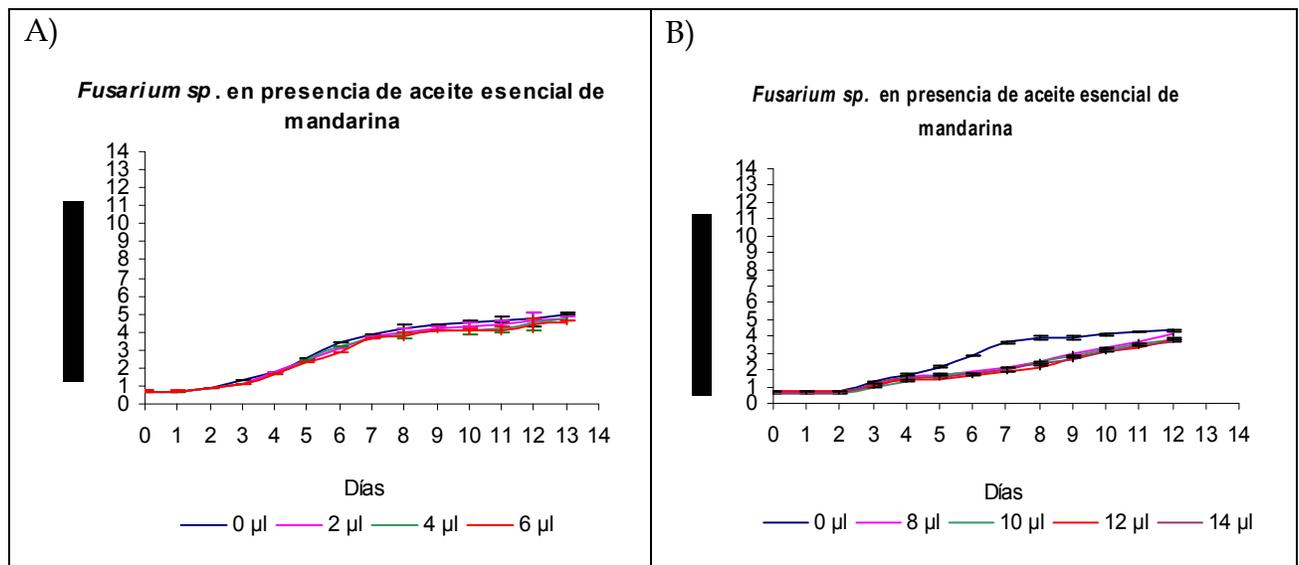


Figura 10. Cinética de crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, en presencia de aceite esencial de mandarina, (A) concentraciones de (0, 2, 4 y 6 µl) y (B) concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 µl.

CONCLUSIONES PARCIALES

En esta etapa se concluyó que el efecto antimicrobiano, en términos de inhibición del crecimiento micelial, fue significativamente diferente ($p= 0.05$) (Análisis estadístico en Anexo, tabla 1), de acuerdo con el tipo de aceite esencial y concentración ensayada, así como del tipo de hongo estudiado.

El mejor efecto fungicida observado en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp* se obtuvo con el aceite esencial de tomillo a concentraciones 8 μ l.

7.2.- Etapa IIa. Efecto de los aceite esenciales de tomillo y limón en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp.*, en frutas de papaya previamente tratadas con etileno.

En esta parte del estudio *in situ* se presentan los resultados referentes al aspecto físico que presentaron los frutos después de haberse aplicado diferentes tratamientos con aceites esenciales de tomillo y/o limón en donde se determinó el porcentaje de infección e índice de severidad.

En la tabla 3 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos aplicados en papaya, en donde se puede observar que con el aceite esencial de tomillo en concentración de 20 μ l, se obtiene el menor índice de severidad (1.6).

Por otro lado se observa que en el tratamiento en el cual primero se realiza la aplicación de aceite de tomillo y después se inocula el fruto con suspensión de esporas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, los porcentajes de infección disminuyeron en un 40% respecto al control.

Tabla 3. Efecto del aceite esencial de tomillo en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por en papaya.

Número de tratamientos	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad*
1	Control	5	100	3
2	Aceite tomillo 14 μ l	4	80	2.2
3	Aceite tomillo 17 μ l	4	80	2.4
4	Aceite tomillo 20 μ l	3	60	1.6
5	Aceite tomillo 14 μ l + solución de esporas	3	60	1.8
6	Aceite tomillo 17 μ l + solución de esporas	3	60	1.8
7	Aceite tomillo 20 μ l + solución de esporas	3	60	1.8
8	Solución de esporas + aceite tomillo 14 μ l	4	80	2.4
9	Solución de esporas + aceite tomillo 17 μ l	5	100	3
10	Solución de esporas + aceite tomillo 20 μ l	4	80	2.2

* Severidad de la enfermedad en los frutos de papaya: 0=sin daño, 1=1-5% daño ligero, 2=6-15% daño moderado, 3=16% daño severo.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro e in situ*.

En la tabla 4 se observa que la aplicación con aceite de limón solo, en las diferentes concentraciones aplicadas no fue suficiente para controlar la pudrición debida a *Colletotrichum gloeosporioides* ya que el porcentaje de infección resultó ser del 100% al igual que el control; aunque no en términos del índice de severidad.

Por otro lado se puede ver que si se aplica en el fruto aceite de limón en concentraciones entre 17 y 20 μl y después se inocula el mismo tipo de hongo el porcentaje de infección disminuye hasta un 40% respecto del control con un índice de severidad de 0.8 además de obtenerse el menor número de papayas infectadas (3).

Tabla 4. Efecto del aceite esencial de limón en el en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya.

Número de tratamientos	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad
1	Control	5	100	3
2	Aceite limón 14 μl	5	100	2.4
3	Aceite limón 17 μl	5	100	2.2
4	Aceite limón 20 μl	5	100	2.2
5	Aceite limón 14 μl + solución de esporas	5	100	1.8
6	Aceite limón 17 μl + solución de esporas	5	100	2
7	Aceite limón 20 μl + solución de esporas	3	60	0.8
8	Solución de esporas + aceite limón 14 μl .	4	80	1.2
9	Solución de esporas + aceite limón 17 μl .	5	100	1.4
10	Solución de esporas + aceite limón 20 μl .	5	100	1.8

*Severidad de la enfermedad en los frutos de papaya: 0=sin daño, 1=1-5% daño ligero, 2=6-15% daño moderado, 3=16% daño severo.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la tabla 5 se muestran los resultados en donde encontramos el menor Índice de severidad (0.2) y menor número de frutos infectados (1) que fueron obtenidos con la aplicación de aceite esencial de tomillo solo en concentración de 20 µl.

Cabe mencionar que también se observó un efecto antimicrobiano en los tratamientos en los cuales se aplicó primero solución de esporas *Rhizopus sp* + aceite esencial de tomillo en concentración de 14 µl, obteniéndose un índice de severidad de 0.6 y 40% de infección.

Tabla 5. Efecto del aceite esencial de tomillo en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Rhizopus sp* en papaya.

Número de tratamientos	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad
1	Control	4	80	2.4
2	Aceite tomillo 14 µl	1	100	0.4
3	Aceite tomillo 17 µl	2	20	0.6
4	Aceite tomillo 20 µl	1	20	0.2
5	Aceite tomillo 14 µl + solución de esporas	3	60	1
6	Aceite tomillo 17 µl + solución de esporas	4	80	1.4
7	Aceite tomillo 20 µl + solución de esporas	3	60	1
8	Solución de esporas + aceite tomillo 14 µl	2	40	0.6
9	Solución de esporas + aceite tomillo 17 µl	4	80	1.8
10	Solución de esporas + aceite tomillo 20 µl	3	60	1

*Severidad de la enfermedad en los frutos de papaya: 0=sin daño, 1=1-5% daño ligero, 2=6-15% daño moderado, 3=16% daño severo

Con los resultados de la tabla 6 no se puede concluir que hubo un efecto antimicrobiano de los tratamientos aplicados en los frutos, porque el porcentaje de infección e índice de severidad son muy variables; sin embargo podemos observar que el menor porcentaje

de infección fue de 60% e índice de severidad 0.6 cuando se utilizó únicamente aceite esencial de limón en concentración de 17 μ l.

Tabla 6. Efecto del aceite esencial de limón en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Rhizopus sp.* en papaya.

Número de tratamientos	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad
1	Control	5	100	2.4
2	Aceite limón 14 μ l	5	100	1.4
3	Aceite limón 17 μ l	3	60	0.6
4	Aceite limón 20 μ l	4	80	1.2
5	Aceite limón 14 μ l + solución de esporas	4	80	1.6
6	Aceite limón 17 μ l + solución de esporas	4	80	2
7	Aceite limón 20 μ l + solución de esporas	5	100	1.6
8	Solución de esporas + aceite limón 14 μ l	5	100	2.4
9	Solución de esporas + aceite limón 17 μ l	4	80	1.4
10	Solución de esporas + aceite limón 20 μ l	5	100	2.2

*Severidad de la enfermedad en los frutos de papaya: 0=sin daño, 1=1-5% daño ligero, 2=6-15% daño moderado, 3=16% daño severo.

7.3.- Etapa II.b Efecto de los aceite esenciales de tomillo y limón en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp.*, en papaya sin tratamiento de etileno.

Se realizó un experimento adicional con frutos que no fueron tratados con etileno en la Central de Abasto de la Ciudad de México, para observar si se presentaba algún efecto debido al proceso de maduración de los frutos después de la aplicación de los mismos tratamientos realizados en papayas tratadas previamente con etileno.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la tabla 7 se ve claramente que usando aceite esencial de tomillo en concentración de 20 μ l se obtuvo el menor porcentaje de infección e índice de severidad, así como el menor número de papayas infectadas (0) por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Por otro lado también se observa que los tratamientos en los cuales primero se inoculó el hongo y después se procedió a la aplicación del aceite esencial de tomillo en concentración de 20 μ l el efecto inhibitorio del aceite fue igual que en el anterior tratamiento.

Tabla 7. Efecto del aceite esencial de tomillo en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya.

Número de tratamientos	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad
1	Control	2	100	3
2	Aceite limón 14 μ l	2	100	1.5
3	Aceite limón 17 μ l	2	100	2
4	Aceite limón 20 μ l	0	0	0
5	Aceite limón 14 μ l + solución de esporas	2	100	1
6	Aceite limón 17 μ l + solución de esporas	2	100	3
7	Aceite limón 20 μ l + solución de esporas	1	50	1
8	Solución de esporas + aceite limón 14 μ l	1	50	1
9	Solución de esporas + aceite limón 17 μ l	2	100	2
10	Solución de esporas + aceite limón 20 μ l	0	0	0

*Severidad de la enfermedad en los frutos de papaya: 0=sin daño, 1=1-5% daño ligero, 2=6-15% daño moderado, 3=16% daño severo.

Se observa en la tabla 8 que al aplicar el tratamiento de aceite de limón solo, directamente en el fruto, se obtuvo el menor índice de severidad, número de papayas infectadas y porcentaje de infección (0).

Tabla 8. Efecto del aceite esencial de limón en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya.

Número de tratamientos	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad
1	Control	2	100	3
2	Aceite limón 14 µl	1	50	0.5
3	Aceite limón 17 µl	2	100	2
4	Aceite limón 20 µl	0	0	0
5	Aceite limón 14 µl + solución de esporas	1	50	1
6	Aceite limón 17 µl + solución de esporas	2	100	4
7	Aceite limón 20 µl + solución de esporas	2	100	4
8	Solución de esporas + aceite limón 14 µl.	2	100	3
9	Solución de esporas + aceite limón 17 µl.	1	50	3
10	Solución de esporas + aceite limón 20 µl.	2	100	3

*Severidad de la enfermedad en los frutos de papaya: 0=sin daño, 1=1-5% daño ligero, 2=6-15% daño moderado, 3=16% daño severo.

CONCLUSIONES PARCIALES

- En esta etapa se concluyó que existe una diferencia significativamente ($\rho= 0.05$) (Análisis estadístico en Anexo tabla 2), en términos del índice de severidad, tratamiento aplicado y concentración de aceite ensayada.
- El mejor tratamiento observado fue cuando se aplicó primero aceite esencial de tomillo y/o limón en concentración de 20 µl.
- Los frutos sin tratamiento previo de etileno presentaron el mismo comportamiento en términos del índice de severidad y número de papayas

infectadas, sin embargo los frutos presentaron una vida de anaquel de 10 días respecto de los frutos que fueron tratados con etileno (5 días).

7.4.- Etapa 3. Efecto de los aceites esenciales de tomillo y limón incorporadas en una película comestible, en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp.*

En esta etapa del estudio se procedió a la incorporación de los aceites esenciales de tomillo y limón en una formulación de cubierta comestible a diferentes concentraciones, y se aplicó directamente en el fruto determinándose los mismos parámetros que en la etapa anterior.

En la siguiente tabla se aprecia, que al aplicar la cubierta comestible con aceite de limón en concentración de 0.05g se obtuvieron los menores índices de severidad, porcentaje de infección y número de papayas infectadas (0). Mientras que con el aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.05 y 0.075 se obtuvieron los mismos índices de severidad, porcentajes de infección y frutos infectados 2 y 20% respectivamente en las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para el control del hongo *Rhizopus sp.*, Se encontró que utilizando aceite esencial de tomillo en concentración de 0.05 ó 0.075 no hubo ninguna variación en cuanto al índice de severidad y porcentaje de infección 40 y 0.4% respectivamente.

Tabla 10. Efecto del aceite esencial de tomillo y limón en el porcentaje de infección e índice de severidad de las pudriciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya.

Número de tratamientos	Hongo	Tratamientos	Número de papayas infectadas	Infección (%)	Índice de severidad
1		Control	5	3	100
2	<i>Colletotrichum</i>	Película comestible 0.05g aceite tomillo	1	0.2	20
3		Película comestible 0.075g aceite tomillo	1	0.2	10
4		Película comestible 0.05g aceite limón	0	0	0
5		Película comestible 0.075g aceite limon	2	0.2	40
6	<i>Rhizopus</i>	Película comestible 0.05g aceite tomillo	2	0.4	40
7		Película comestible 0.075g aceite tomillo	2	0.4	40
8		Película comestible 0.05g limón	2	0.6	40
9		Película comestible 0.075g aceite limón	2	0.4	40

CONCLUSIONES PARCIALES

- En esta etapa se concluyó que la mejor película comestible fue la que se aplicó en los frutos con aceite esencial de limón en concentración de 0.05g, porque se obtuvo el menor número de papayas infectadas, porcentaje de infección e índice de severidad (0) respectivamente.
- Por otro lado también se concluye que la cubierta comestible con aplicación de aceite de tomillo y/o limón disminuyen en general los porcentajes de infección, índices de severidad y número de papayas infectadas.

7.5.- Caracterización de los aceites esenciales de tomillo y limón

De acuerdo a la caracterización realizada de los aceites esenciales de tomillo y limón se obtuvieron los compuestos en mayor abundancia:

ACEITE TOMILLO	COMPUESTO	ÁREA DE RETENCIÓN %
	1-metil-3-(1-metiletil, Benceno)	34.58
	1-metil-4-(1-4-ciclo hexadieno)	21.27
	Timol	15.13
	3,7-dimetil-1,6-Octadien-3-ol	5.96
	4-metil-1-(Biciclo (3.1.0) hexano)	3.50
	Beta-miriceno	2.48
	Eucaliptol	2.38
	1-Octen-3-ol	2.15
	1-metil-4-(1-1,3-ciclohexadieno)	2.12

ACEITE LIMÓN	COMPUESTO	ÁREA DE RETENCIÓN %
	Limoneno	58.72
	1-metil-4-(1-4-ciclo hexadieno)	13.01
	Beta-mirceno	6.09
	3,7-dimetil-1,6-Octadien-3-ol	4.80
	(+) -2-Careno	4.41
	Alfa-Pineno	3.47
	1-metil-4-(1-3-ciclo hexadieno)	2.41

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la figura 11 se muestran las estructuras químicas de algunos de los compuestos volátiles que se pueden encontrar en mayor concentración en aceite de tomillo y/o aceite de limón.

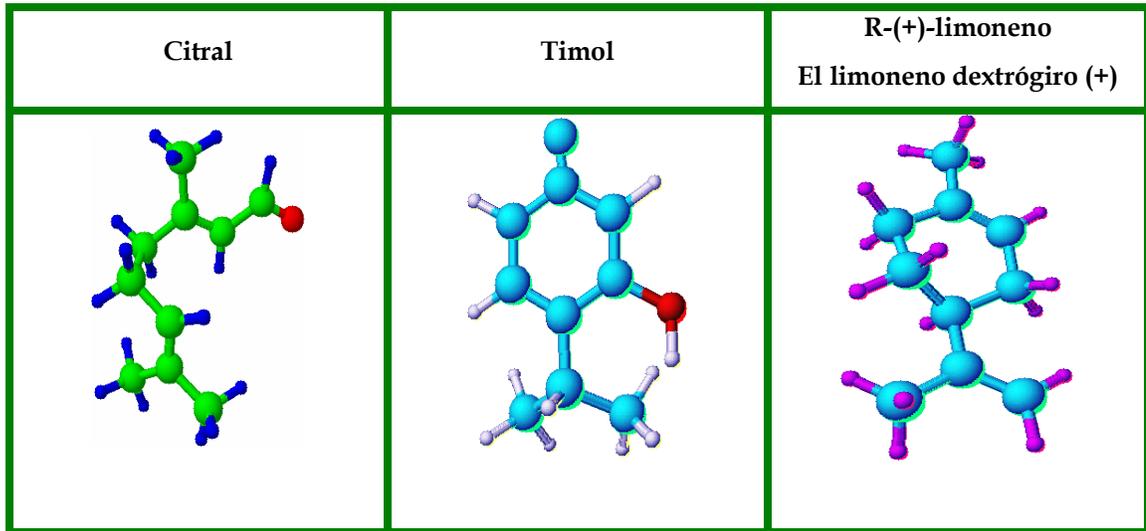


Figura 1: estructura química de aceites esenciales
(Templeton, 1969, Voda, 2003)

8.- CONCLUSIONES

Se concluye que de acuerdo a la concentración y forma de aplicación los aceites esenciales de tomillo y limón tienen un efecto antimicrobiano sobre las cepas de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp.*

El aceite esencial de mandarina no tuvo efecto antimicrobiano sobre las cepas de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus sp.*

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg, J.E., Forster, H y Sommer N.F., 2002. Principles of Postharvest Pathology and Management of Decays of Edible Horticultural Crops. En: Postharvest Technology of Horticultural Crops. Kader, A. A. (Ed.) University of California Agriculture and Natural Resources, Publication 3311. 539 pp.
- Agrios, George. N., 2005. Fitopatología, Segunda Edición, Limusa, México, D. F., 183-236, pp.
- Ayala Zavala JF y col., 2005. Compuestos Volátiles de Origen Natural. Nueva Alternativa para la conservación en Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados, Capítulo 14, Editado por CIAD, A.C., México.
- Bósquez, M. E., 1999. Situación de las Medidas de Control de las Enfermedades Postcosecha en las Frutas y Hortalizas. Memorias, First International Congress and Exhibition of Horticulture MexpoHort, Pp. 79-83.
- Bosquez, M. E., Guerrero, L.I, and Vernon-Carter, J. 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. International Food Research 36 (9-10):885-893.
- Caccioni, D. and Guizzardi, M. (1994) Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. of Essential Oil Research* 6, 173-179.
- Campo et al., 2000. citado por Guynot M. E., S. Marín, L. Setó, V. Sanchis y A.J. Ramos 2005. Screening for Antifungal Activity of Some Essential Oils Against Common Spoilage Fungi of Bakery Products, *Food Technology*, 11 (1):025-8
- Cano M.P. y col, 2005. Procesado Mínimo y Valor Nutricional en Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados, Capítulo 7. Editado por CIAD, A.C., México
- Cagri Arzu, y col., 2004. "Antimicrobial Edible Films and Coatings". *J. Food Protect*, Vol. 67, No. 4, pp. 833-848.
- Díaz-Sobac et al., Emulsions coatings to extend postharvest life of mango (*Mangifera indica* L. Cv. Manila). *J. Food Process* 1996.
- Draughon, F. Ann. 2004. Botanicals as Biopreservatives. *Food Technology* 58 (2): 19-28.
- Gil, P. E., y SÁEZ V. A. 2005. Evaluación A Escala De Planta Piloto Del Proceso Industrial Para La Obtención De Aceite Esencial De Cardamomo, Bajo La Filosofía "Cero Emisiones", por el Grupo De Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos (GIPABR) UNIVERSIDAD EAFIT, Colombia, Medellín.
- Greener I., Donhowe, y O. Fennema. 1994. Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and Testing Methods. En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Krochta, John M. et al., ,(Eds.) Technomic Publishing Company, USA,

Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D. and Serrano, M. 2005. The Use of Natural Aromatic Essential Oils Helps to Maintain PostHarvest Quality of "Crimson" Proc. 5th Int. Postharvest Symp., Acta Hort., 682, ISHS.

M. E. Guynot, S. Marín, L. Setó V. Sanchis and A.J. Ramos 2005. Screening for Antifungal Activity of Some Essential Oils Against Common Spoilage Fungi of Bakery Products, Food Tecnology Department, Lleida University, UTPV-CeRTA, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

Mendoza, Z.C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma de Chapingo Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, México, 82pp

Padgett, T., I. Y. Han, y P. L. Dawson. 1998. Incorporation of Food-Grade Antimicrobial Compounds into Biodegradable Packaging Films. J. Food Proyect. 61, (10):1330-1335.

Singh G., Murya S., De lampasona M.P, y Catalan C, 2005. Chemical Constituents, Antimicrobial Investigations, and Antioxidative Potentials of Anethum graveolens L. Essential Oil and Acetone Extract, Journal of Food Cience, Part 52, Vol. 70, Nr. 4,— M215.

Snowdon, A., L., A, 1990, Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, Vol. 1, Wolfe Scientific, Spain, 291pp.

Spotts, R.A. (1984) Environmental modification for control of post-harvest decay. In postharvest Pathology of Fruits and Vegetables: Postharvest Losses in Perishable Crops ed. Moline, H.E. pp 67-72 Berkeley: Universiti of California Bulletin 1914.

Templeton W., 1969. An Introduction to the Chemistry of The Terpenoids and Steroids. London Butterworths, 277pp.

Voda K., Boh B., Vrta-cnik, M, y Pohleven F., 2003, Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*, International Biodeterioration & Biodegradation 51, 51 – 59.

Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A. y Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis.81:204-210.

You/Jin y col., 2002. Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 5167-5178.

10.- ANEXO

En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis de varianza, de los tratamientos evaluados con las diferentes concentraciones de aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina (sobre el crecimiento de inhibición micelial de los hongos).

En el caso de los tratamientos *Colletotrichum* Tomillo y *Rhizopus* Tomillo, la inhibición del crecimiento micelial se observó a partir de la concentración mínima del 0.06%, por lo que no se pudo realizar un análisis de varianza, al no haber variabilidad de los resultados.

En los tratamientos *Colletotrichum* Limón, *Rhizopus* Limón y *Fusarium* Limón, la inhibición del crecimiento micelial se observó a partir de una concentración del 0.1%.

De acuerdo al análisis de varianza en concentraciones inferiores de (0.06 y 0.1%), existe una diferencia significativa entre los tratamientos utilizados, con un nivel de confianza de ($\rho = 005$). El efecto de cada concentración aplicada es diferente en cada caso, es decir, a mayor concentración mayor efecto.

Para los tratamientos *Colletotrichum* Mandarina, *Rhizopus* Mandarina, *Fusarium* Tomillo y *Fusarium* Mandarina, ninguna de las concentraciones utilizadas logro inhibir el crecimiento micelial., por lo tanto podemos decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las cuatro variables medidas (concentraciones) con un nivel de confianza de ($\rho = 005$).

Tabla 1. Efecto de los aceites esenciales de tomillo, limón y mandarina en el crecimiento micelial de los hongos *Colletotrichum*, *Rhizopus* y *Fusarium*..

Tratamiento	Concentración (μ l) donde el efecto es significativo	ANOVA (0.05)	
		F	Valor P
<i>Colletotrichum</i> Tomillo	8*	-	-
<i>Colletotrichum</i> Limón	12	11.29	0.0072
<i>Colletotrichum</i> Mandarina	-	1.18	0.3441
<i>Rhizopus</i> Tomillo	8*	-	-
<i>Rhizopus</i> Limón	12	8.96	0.0402
<i>Rhizopus</i> Mandarina	-	0.08	0.9656
<i>Fusarium</i> Tomillo	-	1.30	0.2869
<i>Fusarium</i> Limón	12	3.01	0.0414
<i>Fusarium</i> Mandarina	-	0.49	0.6933

*Al no haber variabilidad entre los datos, no se pudo realizar el análisis de varianza. La concentración mínima de aceite fue del 0.06% en todos los casos, por lo que el porcentaje de inhibición fue de 100% en todos los casos.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la Tabla 2, se presentan los resultados del análisis de varianza para Índice de severidad correspondiente a diferentes tratamientos de aceite de tomillo y limón para *colletotrichum* y *rhizopus*.

El signo de los coeficientes estimados es el esperado (negativo), que indica que a mayor concentración, menor Índice de severidad.

En los tratamientos de Aceite tomillo+suspensión de esporas, Aceite limón y Aceite tomillo solos existe una relación estadísticamente significativa entre las variables concentración e Índice de Severidad, con un nivel de confianza de 95%.

En todos los demás casos, no existe una correlación estadísticamente significativa entre la concentración del tratamiento y el Índice de severidad resultante.

Tabla 2. Efecto de los aceites esenciales de tomillo y limón en el índice de severidad con diferentes tratamientos aplicados en *Colletotrichum* y *Rhizopus*

Tratamientos	Indice de Severidad (IS)	Coeficiente	R ²	ANOVA (0.05)	
				Estadístico F	Valor P
Aceite tomillo	2.3000	-0.0584	0.79953	7.9766	0.1058
Aceite tomillo + suspensión de esporas	2.1000	-0.0652	0.92332	24.0833	0.0391
Suspensión de esporas + aceite tomillo	2.2000	-0.0279	0.35835	1.1170	0.4014
Aceite limón	2.2000	-0.0424	0.98078	102.0644	0.0097
Aceite limón + suspensión de esporas	2.2000	-0.0924	0.82210	9.2422	0.0933
Suspensión de esporas + aceite limón	2.1750	-0.0756	0.68827	4.4157	0.1704
Aceite tomillo	2.1938	-0.1112	0.94216	32.5782	0.0294
Aceite tomillo + suspensión de esporas	2.1922	-0.0688	0.84814	11.1701	0.0791
Suspensión de esporas + aceite tomillo	2.1902	-0.0637	0.48825	1.9082	0.3013
Aceite limón	2.1878	-0.0750	0.78544	7.3212	0.1138
Aceite limón + suspensión de esporas	2.1910	-0.0362	0.69949	4.6553	0.1636
Suspensión de esporas + aceite limón	2.1903	-0.0243	0.20353	0.5111	0.5489

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

En la Tabla 3, se presentan los resultados del análisis de varianza para Índice de severidad correspondiente a diferentes tratamientos de aceite de tomillo y limón para *colletotrichum* y *rhizopus*.

El signo de los coeficientes estimados es el esperado (negativo), que indica que a mayor concentración, menor Índice de severidad.

Los valores de R² indican que la concentración de aceite esencial utilizada explica en más del 85% el valor del Índice de severidad en todos los casos.

Sin embargo, los valores P de la prueba F resultaron mayores a 0.05 en los cuatro casos, por lo que, con los datos disponibles (n=3 en cada caso), en ninguno de los tratamientos se observa una relación estadísticamente significativa (con 95% de confianza) entre concentración e Índice de severidad

Tabla 3. Efecto de las películas antimicrobianas en el Índice de severidad causado por *Colletotrichum* Y *Rhizopus* en papaya

Tratamiento	Índice de Severidad (IS)	Coeficiente	R ²	ANOVA (0.05)	
				Estadístico F	Valor P
Película comestible 0.05g aceite tomillo	1.1333	-40.00	0.893	8.33	0.212
Película comestible 0.075g aceite tomillo	1.0667	-40.57	0.853	5.81	0.250
Película comestible 0.05g aceite limón	1.2667	-37.14	0.893	8.33	0.212
Película comestible 0.075g aceite limón	1.3333	-36.57	0.932	13.65	0.168



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN CBS
UNIDAD IZTAPALAPA

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO
DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON ACEITES
ESENCIALES *in vitro* e *in situ*.

PRESENTA

ING. EN ALIMENTOS: ELBA RONQUILLO DE JESÚS

ASESORA: DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA

LECTORA: DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS

LABORATORIO: FISIOLÓGIA POSTCOSECHA DE FRUTAS Y
HORTALIZAS, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

México, D. F., Septiembre de 2007