



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE PELÍCULAS
HÍBRIDAS PARA EL CONTROL DE HONGOS
FITOPATÓGENOS

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MARIANA FLORES HERNÁNDEZ

DIRECTOR:

DR. NEMESIO RUANO VILLA

CO-DIRECTOR:

DRA. YESENIA PACHECO HERNÁNDEZ

2022



Quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Nemesio Villa Ruano, por guiarme en la realización de este trabajo, por cada uno de sus consejos, por su dedicación, por confiar en mí y apoyarme en todo momento para culminar esta tesis.

A mi cotutora la Dra. Yesenia Pacheco Hernández, gracias.

A Wendy Coyotl, por brindarme su ayuda con asesorías y sugerencias que ayudaron a enriquecer esta tesis.

Agradezco la confianza y el apoyo incondicional que me dieron mis padres, José Víctor Flores Gil y Luz María Hernández Borboa, muchos de mis logros se los debo a ustedes incluyendo este.

A mi abuela, por creer en mí y siempre apoyarme en todo momento.

De igual manera quiero agradecer a mis amigos del bachiller, por apoyarme desde que aplique el examen para entrar a la universidad hasta esta etapa final de la carrera. Por confiar en mí y alentarme siempre para seguir adelante.

Y para finalizar quiero agradecer a mis amigos que hice durante toda mi etapa universitaria, ya que gracias a ellos mis días fueron más amenos y siempre estuvieron en todo momento para apoyarme.

ÍNDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
HIPOTESIS.....	13
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
METODOLOGÍA	14
Material vegetal.....	14
Pruebas de patogenicidad.....	14
Microscopia	15
Identificación molecular de cepas fitopatógenas	15
Obtención de aceites esenciales	15
Caracterización química de los aceites esenciales	15
Pruebas antifúngicas <i>in vitro</i>	16
Elaboración de películas híbridas.....	16
Pruebas antifúngicas <i>in situ</i>	17
Caracterización físico-química de las películas.....	17
Análisis de firmeza.....	18
RESULTADOS.....	18
Aislamiento y microscopia de las cepas	18
Identificación molecular de los hongos aislados.	21
Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)	23
Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	24
Pruebas antifúngicas <i>in situ</i> con películas híbridas conteniendo aceites esenciales.....	29
Firmeza en tomates tratados con películas híbridas	33
Efecto fungistático <i>per se</i> de las películas híbridas	34
Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	36
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	40
Transmitancia de luz y opacidad	43
DISCUSIÓN.....	45

CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	64
Abreviaturas	64
Secuenciación del ITS	64

RESUMEN

El control de enfermedades poscosecha en tomate verde (*Physalis philadelphica*) mediante películas híbridas de quitosano adicionando aceites esenciales representa una alternativa eficiente para la protección de los cultivos, lo que permitiría sustituir con éxito a los agroquímicos sintéticos y de este modo, evitar pérdidas económicas en la cadena de producción. Este proyecto se realizó el diseño, caracterización y aplicación *in situ* de películas híbridas que contienen quitosano combinado con el aceite esencial del falso laurel (*Litsea glaucescens*; AELg) y de canela (*Cinnamomum verum*; AECv). Se reportan además los resultados de la identificación y aislamiento de los hongos *Fusarium concentricum* y *Clonostachys rosea* provenientes del tomate verde mediante técnicas moleculares. El aceite esencial del falso laurel fue capaz de inhibir el crecimiento hifal de *Fusarium concentricum* mientras que el aceite esencial de canela fue útil para inhibir el crecimiento hifal de *Clonostachys rosea*. Ambos aceites fueron evaluados mediante el método de microdilución en caldo con resazurina. Se prepararon seis películas híbridas a partir de quitosano al 1 % combinado con diferentes cantidades de AECv y AELg (0.7 ,1 y 1.9 % p/v) para generar seis películas híbridas denominadas FC1, FC2, FC3 (conteniendo AECv) y FL1, y FL2, FL3 (conteniendo AELg). Los ensayos *in situ* de estas películas sobre los frutos de tomate previamente inoculados con *Fusarium concentricum* y *Clonostachys rosea*, demostraron la conservación de la calidad del fruto durante 21 días, lo cual fue observado en los niveles de firmeza. De acuerdo con los datos observados sobre la capacidad antifúngica, así como con las propiedades espectroscópicas (FT-IR), de textura (SEM) así como transmitancia y opacidad, las películas FC3 y FL3 mostraron las mejores propiedades fisicoquímicas y antifúngicas *in situ* para evitar el desarrollo conidial y micelial de *Fusarium concentricum* y *Clonostachys* respectivamente.

INTRODUCCIÓN

El tomate verde (*Physalis philadelphica* Lam.) también conocido como tomate de cascara o miltomate (“milli”, milpa, sembrado, y “tomatl”, tomate) es una especie botánica originaria de México, perteneciente a la familia de las Solanáceas (Magos et al., 2017). Se trata de una planta herbácea anual con flores hermafroditas y de tonalidad amarilla. El tallo de la planta es estriado y sus hojas son glabras. El fruto es pequeño, esférico y verde, rodeado por una envoltura papirácea, la cual está conformada por el cáliz cuando el fruto madura rompe el envoltorio adyacente, el cual es de color marrón (Vargas-Ponce, 2015).

El tomate verde es de gran importancia económica en México ya que es ampliamente utilizado en la alimentación de la población mexicana. En la actualidad dicha hortaliza se ubica entre las cinco principales especies hortícolas cultivadas en el país ya que su importancia económica se ha extendido a otros países para fines alimenticios y/o comerciales. Asimismo, en la medicina tradicional desde épocas remotas se ha utilizado la cáscara y el fruto de esta planta para tratar diversas enfermedades como la tosferina, problemas estomacales, dolor de oídos, presión arterial alta, entre otros (Bello, 2019).

En el 2016, la producción de tomate verde en México fue de 679 mil 910 toneladas, lo que refleja un incremento anual de 2.3%. Los principales estados productores de este fruto son Sinaloa, Zacatecas, Puebla, Michoacán y Jalisco. Por otra parte, los estados que reportaron mayor crecimiento en la producción de dicha hortaliza en 2016 fueron: Nuevo León 64.3%, Guanajuato 38.7%, Sonora, 36%, Veracruz 27.6%, Baja California Sur 26.5%, Colima 20.5%, Ciudad de México 18.1%; Hidalgo 16.1%; Baja California 16%, Guerrero 8.9% y Chihuahua 7.4%. La superficie destinada a este cultivo en el país es de 42 mil 639 hectáreas, distribuidas en 28 estados del país (SAGARPA, 2017).

La producción del tomate se ve afectada por diversos factores bióticos que causan grandes pérdidas económicas. Entre los cuales destaca el estrés biótico causado por hongos, bacterias, virus, nematodos y fitoplasmas. De esta manera, las

enfermedades ocasionadas por dichos patógenos representan uno de los factores de mayor riesgo para la producción de diversos cultivos, por lo cual es importante implementar estrategias para su protección ante el ataque de fitopatógenos. Esto considerando que en los últimos años las enfermedades virales y bacterianas han ocasionado grandes pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos (Pérez-Moreno et al., 2004).

Hongos fitopatógenos

Se considera que existen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (Agrios 1988). Los hongos pueden atacar a todas las partes de la planta, y los síntomas pueden ser clorosis (pérdida de color verde), necrosis (muerte de tejido, manifestada de diversas maneras como lesiones discretas, tizón y pudrición) marchitez y alteraciones del crecimiento (Cavallini, 1998).

Se ha reportado que, para una invasión exitosa de los órganos de las plantas, el desarrollo de los hongos fitopatógenos está estrechamente regulado por la formación de estructuras especializadas de infección. Además, para la colonización, los patógenos despliegan un conjunto de factores de virulencia. Con base en esto, los hongos fitopatógenos pueden clasificarse como necrótrofos, biótrofos y hemibiótrofos (Doehlemann et al., 2016) Los hongos necrótrofos son aquellos que secretan toxinas y enzimas que causan la muerte de la célula huésped de la que toman sus nutrientes, por su parte, los hongos biótrofos establecen una estrecha asociación con el huésped mediante el desarrollo de hifas especializadas llamadas haustorios, los cuales penetran la célula vegetal viva. Durante este proceso, los hongos biótrofos secretan moléculas efectoras que suprimen a la planta y manipulan su metabolismo a favor del patógeno. De esta forma, el hongo puede colonizar y obtener sus nutrientes causando la muerte del huésped (Koeck et al., 2011) Por último, los hongos hemibiótrofos combinan las estrategias de necrotrofismo y biotrofismo. En la fase biotrófica inicial el sistema inmune y la muerte celular del

huésped son suprimidos, lo que permite la invasión de las hifas a lo largo del tejido infectado de la planta. Esta etapa es seguida por una fase necrotrófica durante la cual el patógeno se secretan toxinas induciendo la muerte celular del huésped. (Cabrera et al., 2019)

Uso de películas como fungicidas

Dentro de las principales estrategias para el control de los hongos fitopatógenos se encuentra el uso de fungicidas y pesticidas, los cuales resultan tóxicos para los humanos y también provocan contaminación de suelos agrícolas, así como otros efectos negativos (Mesa et al.,2019). Debido a la situación anterior, se han implementado nuevas técnicas para el control de plagas y enfermedades tal y como es el caso de extractos vegetales de distinta polaridad, así como su anclaje en películas de quitosano. Recientemente, la adición de aceites esenciales en matrices de quitosano ha mostrado ser muy efectiva para el control de hongos filamentosos en condiciones *in situ* en distintos frutos de importancia agrícola (Pacheco-Hernández et al., 2021; Morales-Rabanales et al., 2022). La aplicación de estos componentes y materiales derivados permite conservar las propiedades nutricionales y nutracéuticas de estos frutos. Dado esto, su uso a gran escala resulta promisorio, debido a su elevada efectividad, bajo costo y a su baja toxicidad para el consumo humano y al medio ambiente. Paulatinamente, este tipo de tecnologías reemplazarían con éxito a los agroquímicos sintéticos usados de manera rutinaria (Hafsa et al., 2016)

El quitosano es un derivado de la quitina obtenido por desacetilación en presencia de una base alcalina. Es un polímero que consiste en unidades β -(1-4)-2-acetamidoglucosa y β -(1-4)-2-amino – glucosa, siendo este último el monómero más abundante con más del 80%. La importancia de este biopolímero está en sus propiedades antimicrobianas en conjunto con sus propiedades para formar películas (Fernandez-Saiz et al., 2009). Dentro de sus características principales se conoce que es hidrofílico, biocompatible y biodegradable.

A diferencia de los polímeros sintéticos, este polímero no presenta limitaciones en cuanto a la biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad, además de ser

naturalmente abundante y renovable. El quitosano puede considerarse como un nuevo tipo de material polimérico biofuncional que mejoran la funcionalidad de los materiales de empaque (Kurita et al., 2000).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen a las compuestas, labiadas, lauráceas, mirtáceas, pináceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas entre otras (Martínez, 1996). Los aceites esenciales son líquidos viscosos semivolátiles, aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (brotes, flores, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutos y raíces). Se caracterizan por tener un olor fuerte y son sintetizados por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios (Bakkali et al., 2008).

Los aceites esenciales han demostrado poseer propiedades antimicrobianas que no sólo se limitan al efecto antibacterial, sino que incluyen características antivirales, antimicóticas, antiparasitarias e incluso insecticidas (Burt, 2004). Estas propiedades están relacionadas con la naturaleza de los AE ya que forman parte del arsenal químico de las plantas que utilizan como defensa. Los principales metabolitos secundarios disueltos en un AE son los compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Sin embargo, los más abundantes son por lo general terpenos y alcoholes fenólicos que han sido reportados como inhibidores de hongos poscosecha (Tripathi y Dubey, 2004). Dentro de algunos componentes secundarios que son extraídos de las plantas se encuentran principalmente los terpenos. Sin embargo, los constituyentes aromáticos (fenilpropanoides) y alifáticos (derivados de ácidos grasos) se encuentran con gran frecuencia como componentes bioactivos (Pichersky et al., 2006). Estos compuestos les otorgan relevantes propiedades a los extractos y especialmente a un AE. Dentro de los que se pueden citar su actividad anti-apetitiva, antiviral, antimicrobiana y repelente que permiten su uso para proteger los cultivos y aumentar la calidad y su producción alimentaria. Es importante debido a que presentan menores efectos tóxicos para el ser humano y el ambiente, así como son biodegradables (Rodríguez et al., 2000).

Aunque, la actividad antimicrobiana de un AE se atribuye principalmente a sus principales compuestos, el efecto sinérgico de varios compuestos debe considerarse. Cada uno de los componentes del AE tiene su propia actividad biológica. Los aceites esenciales como agentes antimicrobianos presentan dos características principales. La primera es su origen natural que se traduce en mayor seguridad para las personas y el medio ambiente, mientras que la segunda es que son de bajo riesgo para el desarrollo de resistencia por microorganismos patógenos (Daferera et al., 2003)

En cuanto a su composición química, los aceites esenciales contienen una buena porción de hidrocarburos y compuestos oxigenados, tales como cetonas, alcoholes, acetatos, 1,3-benzodioxoles y furanocumarinas, los cuales prevalecen en las partes aéreas de las plantas, mientras que los hidrocarburos se concentran básicamente en las raíces. Sin embargo, su concentración presenta variaciones, ya que en ocasiones se transformación en otros compuestos dependerá de la parte de la planta, así como del estado fenológico en el que se encuentre la planta (Vargas y Bottia, 2008).

La canela (*Cinnamomum verum* J.Presl.) perteneciente a la familia Lauraceae y es un árbol perenne, que puede llegar a medir hasta 15 metros. Su corteza marrón grisácea de consistencia leñosa es la parte más importante desde el punto de vista comercial. Este órgano tiene un aroma particular debido al AE aromático que constituye un 0,5-2,5% (p/p) de su estructura (Cañigueral et al., 1998).

La composición química del aceite de canela está constituida por 38 fitoquímicos, de los cuales el compuesto más prominente es el cinamaldehído (70-80%), seguido del eugenol (4-10%), limoneno (2.42%), acetato de cinamilo (2.03%), linalol (1.16%) y α -terpineol (0.87%). Los compuestos químicos restantes están presentes en cantidades trazas (menos de 0.5%). El cinamaldehído es una de las moléculas de mayor interés para el desarrollo como agente antimicrobiano alimentario debido a su amplio espectro contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Erosa Rivera et al., 2021).

El falso laurel (*Litsea glaucescens*) pertenece a la familia Lauraceae y es un árbol que crece hasta 6 m. Posee hojas alternas a opuestas con una constricción en el ápice que es de color verde fuerte en el haz y verde más claro en el envés. Tiene un aroma particular debido al AE aromático que se encuentra en su estructura (Luna, 2003). La composición química del aceite del falso laurel se basa en la presencia de 1,8-cineol (22%), sabineno (13%), terpinen-4-ol (10%), γ -terpineno (9%), acetato de α -terpinilo (7%), acetato de nerilo (7%), α -pineno (5%) y β -pineno (4%) (Tapia et al., 2014).

Antecedentes

Ghaouth et al. (1994), observaron cambios ultraestructurales y bioquímicos en la interacción quitosano con el hongo *Botrytis cinerea* el cual afecta al pimiento morrón (*Capsicum annuum* cv. Bellboy), hallando que las hifas tratadas con quitosano presentaban varios grados de desorganización celular que se manifestaban desde perder la consistencia de la célula hasta la degradación del protoplasma, mientras que en los tratamientos donde no se aplicó este biopolímero las hifas conservaron su apariencia normal.

Hernández et al. (2011), evaluaron *in vitro* e *in situ* el efecto antifúngico del quitosano y AE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y dicloran sobre el hongo *Rhizopus stolonifer* el cual es el agente causal de la pudrición blanda del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Los tratamientos más efectivos para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* fueron obtenidos con quitosano y aceites esenciales mientras que los experimentos *in situ* mostraron que el tratamiento individual con quitosano fue el mejor para reducir el porcentaje de infección de los frutos del tomate. Estos resultados demuestran que el uso de estos componentes es una alternativa natural para controlar la pudrición blanda en frutos de tomate.

Gutiérrez et al. (2012), evaluaron calidad microbiológica de los cubos de mango (*Mangifera indica*). Estos fueron tratados con recubrimientos de quitosano adicionado con pequeñas concentraciones de AE de naranja y limón, encontrando

una reducción significativa en la presencia de coliformes, psicrófilos, hongos y levaduras.

Hafsa et al. (2016), elaboraron una película de quitosano reforzada con AE de *Eucalyptus globulus* logrando disminuir la humedad de la película, de igual manera, observaron un aumento significativo en su propiedad antioxidante. El incremento en la concentración del AE que se le colocó y posteriormente demostraron una mejora en su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, concluyendo que debido sus efectos y siendo un material sustentable podría actuar como película comestible.

Xoc-Orozco et al. (2017), realizaron un análisis del transcriptoma de la interacción aguacate-*Colletotrichum*-quitosano, donde se demostró que el quitosano induce la expresión de genes relacionados en la biosíntesis de compuestos fenólicos y regula un gran número de procesos metabólicos que previenen la proliferación del fitopatógeno.

Li et al. (2019), desarrollaron películas de quitosano con aceite esencial de cúrcuma, las cuales demostraron actividad antifúngica en presencia del hongo *Aspergillus flavus*. Los autores determinaron que este tipo de AE incorporado en quitosano forma una película con propiedades de barrera y anti-aflatoxigénicas que podría ser utilizada como material para envasado de alimentos o cultivos.

Anaya-Esparza et al. (2020), encontraron que al incorporar AE de canela, naranja y limón a recubrimientos a base de quitosano se prolongó la vida de anaquel de fresas (7-15 días), pepinos (21 días), jujube (20 días), pimiento morrón (35 días a) y mango (11 días a). Los frutos tratados con los recubrimientos funcionalizados con AE disminuyen su tasa de respiración, mantienen su firmeza y calidad. Además, reducen la incidencia y aparición de signos de enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en la fresa, *Penicillium citrinum* en frutos de jujube y por el *Phytophthora drechsleri* en pepino. Además, este recubrimiento provee protección contra la proliferación de bacterias.

HIPOTESIS.

Películas híbridas a base de quitosano y AE de del falso laurel (*Litsea glaucescens*) y canela (*Cinnamomum verum*), serán efectivos para controlar algunos hongos fitopatógenos que atacan al tomate verde.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de películas híbridas conteniendo los AE del falso laurel (*Litsea glaucescens*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre tomate verde (*Physalis philadelphica*) infectado con hongos fitopatógenos poscosecha.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar y aislar hongos fitopatógenos poscosecha en tomate verde comercializado en Puebla, México.

Evaluar la actividad antifúngica in vitro de los AE de falso laurel y canela sobre los hongos fitopatógenos poscosecha identificados.

Elaborar y aplicar películas híbridas sobre base de quitosano y AE del falso laurel (*Litsea glaucescens*) y canela (*Cinnamomum verum*) como agentes fungistáticos en frutos de tomate verde previamente inoculados con los hongos fitopatógenos identificados.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Frutos de tomate verde (*Physalis philadelphica* Lam.) con signos de pudrición poscosecha fueron obtenidos del mercado de Santa Margarita, ciudad de Puebla, que se encuentra localizado entre los paralelos 19°03'02"N 98°07'15" W. Muestras de frutos sanos fueron certificados en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM donde muestras fueron depositadas con el número de voucher 158364.

Los frutos fueron sanitizados por sumersión en una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 24 horas. Los frutos enfermos fueron secados en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar y trozos de tejido enfermo de 0.5 cm² fueron depositados en medio Agar Dextrosa Papa (PDA) durante 7 días. Al término de este tiempo, las morfologías fueron separadas, purificadas y mantenidas en el mismo medio.

Pruebas de patogenicidad

Discos hifales de las morfologías fúngicas obtenidas (de cultivos de 10 días), fueron inoculados en frutos sanos de tomate para ser depositados en cámara húmeda durante 7 días a 28 °C y 80% de humedad relativa. Los síntomas de pudrición o signos de infección fueron monitoreados durante un periodo de 10 días. Para pruebas de patogenicidad definitivas, solo se usaron las morfologías con virulencia mientras que las demás fueron desechadas. Los postulados de Koch fueron realizados por la inoculación de 1000 conidios en frutos sanos, obtenidos de cultivos en PDA incubados por 10 días. Los conidios fueron recuperados de cultivos estresados con luz solar (4 días) y periodos de 4 °C (2 días) con solución salina estéril y fueron ajustados a una concentración de 1×10^5 conidios mL⁻¹ usando un cámara de Neubauer. Los frutos infectados se mantuvieron en cámara húmeda como ya se ha mencionado con anterioridad.

Microscopia

Las estructuras reproductivas fueron teñidas azul de algodón para su posterior observación en un microscopio Binocular Primo Star Carl Zeiss.

Identificación molecular de cepas fitopatógenas

El DNA genómico de los hongos determinados como fitopatógenos fue obtenido con el kit DNAzol de ThermoFisher Scientific de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La secuenciación estuvo basada en la amplificación secuenciación de las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS) usando los oligonucléotidos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) usando las condiciones de PCR reportadas por Molnár et al. (2015). Los amplicones fueron secuenciados utilizando los servicios de la compañía Macrogen, Inc. Seoul, South Korea. Las secuencias fueron comparadas con aquellas depositadas en el NCBI y MycoBank.

Obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales de canela y laurel fueron obtenidos a partir de material adquirido de manera comercial en la central de abastos de la ciudad de Puebla. Cinco kilos de hoja de laurel (*Litsea glaucescens*) y 5 kilos de canela (*Cinnamomum verum*) fueron procesados mediante hidroddestilación usando un equipo Clevenger de 5 litros de capacidad. Los aceites esenciales fueron recuperados con hexano grado analítico y la humedad fue retirada por su incubación en un desecador de vidrio adicionado con sulfato de sodio anhídrido.

Caracterización química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales obtenido por hidroddestilación fueron analizados en un cromatógrafo de gases marca Varian CP3800 equipado con una columna capilar Factor Four VF-5ms (30 m x 0.25 mm I.D, 25 μ m of 5:95 fenil-PDMS) acoplada a un cuadrupolo sencillo marca Varian modelo 320MS. La fase móvil será helio a un flujo de 1 mL min⁻¹. La identidad de los componentes de los aceites se determinó de

acuerdo con sus espectros de masas (70 eV) en comparación con la base de datos de referencia estándar NIST 2.0, con la literatura y mediante la inyección conjunta de estándares auténticos disponibles en el laboratorio. Los índices de retención de Kovats (RI) se obtuvieron en comparación con los tiempos de retención de una mezcla estándar de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) en las mismas condiciones analíticas

Pruebas antifúngicas *in vitro*

Los análisis antifúngicos se realizaron por el método de microdilución en caldo usando el indicador de viabilidad resazurina (Sigma-Aldrich Co.). Discos hifales de 4 mm de diámetro fueron extraídos a partir de cultivos en PDA de 10 días para ser depositados en 300 µL de medio PDB, en microplacas de Elisa de 96 pozos durante un periodo de 40 horas a 28 °C en agitación moderada (50 rpm). Curvas de dosis respuesta (10-500 µg/ mL) fueron efectuadas con los aceites esenciales previamente emulsificados en etanol absoluto. La concentración del aceite fue determinada de acuerdo a su densidad, la cual fue calculada mediante su masa. La conversión de resazurina en resorufina fue monitoreada a 630 nm usando un lector de microplacas de Elisa. Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron estimadas por quintuplicado.

Elaboración de películas híbridas

Las películas se prepararon de acuerdo con Morales-Rabanales et al. (2022). Se preparó una solución de quitosano (1% p/v) en ácido acético al 1% (v/v). Luego, la solución (100 mL) se mantuvo en agitación continua a 50 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se añadieron a la solución diferentes cantidades de los aceites esenciales para obtener películas que contuvieron 0.7, 1 y 1,3% (p/v) de cada aceite esencial. Para preparar las películas, se vertieron 20 mL de cada composición en cajas de Petri de vidrio (90 mm de diámetro) y se secaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 72 horas. Finalmente, las películas se retiraron de las cajas de Petri para su posterior análisis y evaluación biológica. Se utilizaron películas elaboradas con quitosano puro (Ch) como controles para análisis fisicoquímicos y pruebas biológicas. Los materiales se prepararon por quintuplicado.

Pruebas antifúngicas *in situ*

Tomates frescos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 20 % durante 20 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Los frutos se secaron en cabina de flujo laminar y se inocularon 1000 conidios de cada fitopatógeno (previamente resuspendidos en solución salina estéril) por penetración directa utilizando una micropipeta de 200 μ L de capacidad. El número de conidios se estimó utilizando una cámara de Neubauer. Los tratamientos experimentales consistieron en tomates (n=25) que fueron cubiertos con las películas obtenidas. Los tomates inoculados con conidios se consideraron como controles de infección, mientras que los aguacates sanos sin película se consideraron como controles no infectados. Los frutos fueron procesados en cámara de humedad a 28 °C y 70% de humedad relativa bajo un fotoperíodo estándar (12 h luz y 12 h oscuridad). Se siguió la aparición de síntomas como pérdida de turgencia y/o proliferación micelial todos los días durante 10 días.

Caracterización físico-química de las películas

Los datos espectrales de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de las películas obtenidas se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Vertex 70 (Billerica, Estados Unidos) a 400-4000 cm^{-1} . Estos análisis se realizaron por triplicado (n=3). La microscopía electrónica de barrido de las películas se realizó utilizando cuadrados de 1 cm^2 cubiertos con una fina capa de oro al vacío para su posterior examen en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6610 (Akishima, Japón). Estos análisis se realizaron por triplicado (n=3). El espesor de las películas se midió utilizando un micrómetro digital de alta precisión (iGaging, precisión 0,001 mm). Se realizaron diez mediciones (n=10) a partir de cortes transversales de las películas. Las propiedades ópticas se determinaron en un espectrofotómetro UV-1600PC VWR (Radnor, Estados Unidos) a 190-800 nm. Se usó una cubeta vacía como blanco. La transmitancia de la película se determinó a partir de muestras de 1 a 5 cm de longitud que se colocaron dentro de la cubeta en orientación perpendicular a la fuente de luz. La opacidad de la película se determinó

midiendo la absorbancia a 600 nm y se calculó de acuerdo con Morales-Rabanales et al., 2022. Estos análisis se realizaron por triplicado (n=3).

Análisis de firmeza

La firmeza se obtuvo en unidades kg/cm² con un penetrómetro marca VTSYIQI, modelo GY-3 en quintuplicado. Se utilizó el programa GraphPad Prism 9, para realizar las pruebas estadística ANOVA y Tukey a un nivel de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Aislamiento y microscopia de las cepas

Dos hongos fitopatógenos fueron aislados y purificados de las muestras de tomate verde mostrando síntomas de pudrición blanda. Estos fueron designados como MA4 y MA5.

La Figura 1 muestra las características morfológicas principales del hongo MA4. La colonia presenta una coloración blanquecina en su anverso y en su reverso una coloración rojiza. Su crecimiento es rápido porque dura de 1 – 3 días, su borde es regular, la consistencia es suave, tiene textura algodonosa, su forma es circular y su relieve es liso. El hongo mostró ser de tipo hialino, con hifas septadas del cual emergen los conidióforos ramificados que a su vez presentan fiálides con abundantes microconidios. Los microconidios son redondos o globosos, delgados sin curvatura, no son lunados, que miden de largo de 6.15 μm a 9.28 μm . Presenta monofialides con microconidios en masa.

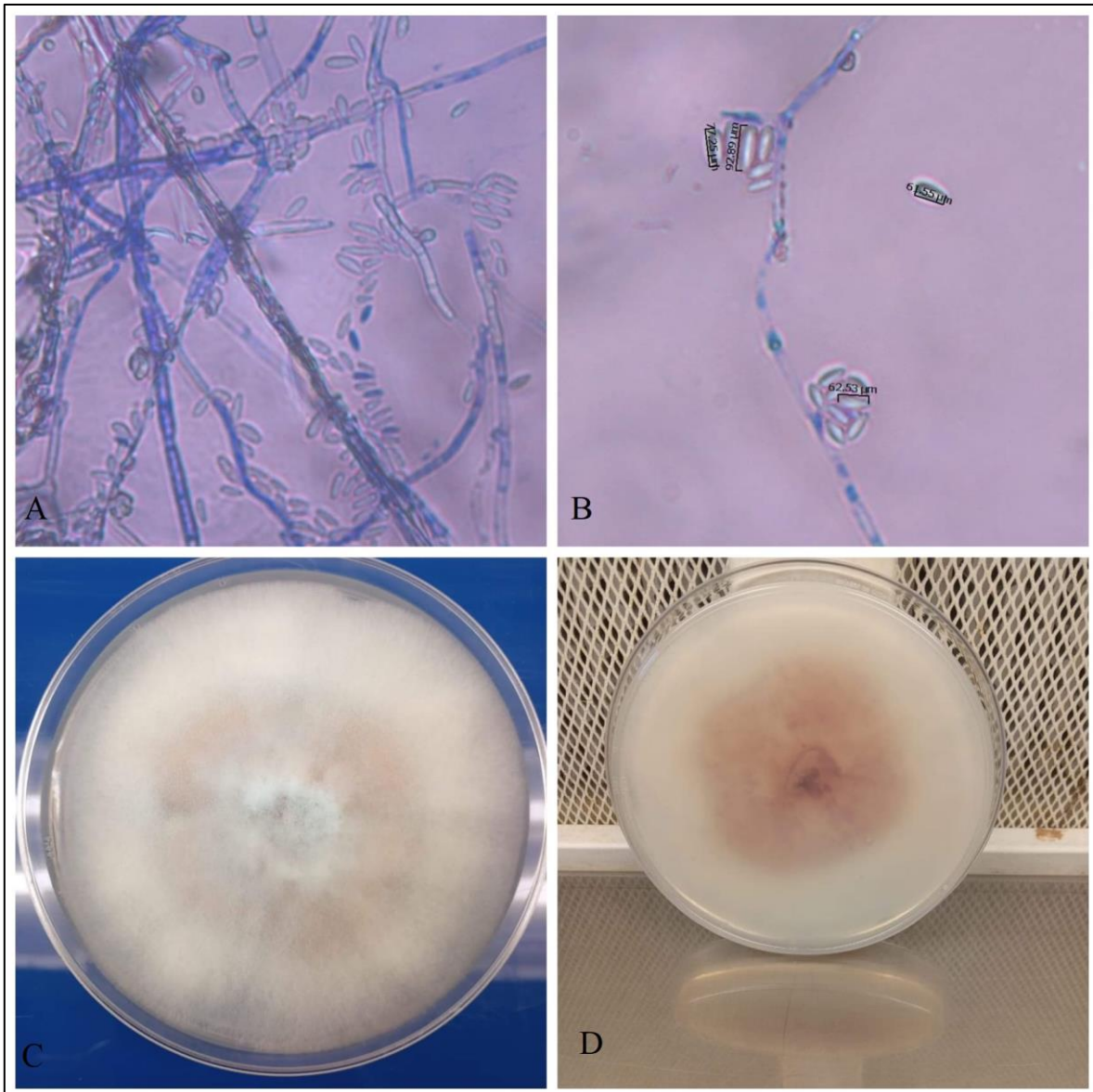


Figura 1. Estructuras microscópicas y macroscópicas del aislado M4 aislado del tomate verde comercializado en Puebla, México. A y B, micrografías de las estructuras reproductivas de la cepa M4, teñidas con azul de lactofenol. C, micelio de la muestra mostrando una coloración blanquecina. D, reverso de la muestra presentando una coloración rojiza.

Como se muestra en la Figura 2, la morfología MA5 presentó micelio hialino algodonoso-blanco y una coloración amarilla al reverso. Presentó un borde irregular, de forma filamentosa de consistencia suave y un crecimiento moderado (7-9 días). Los bordes mostraron un borde ondulado y con un relieve liso mientras que las hifas

fueron septadas con presencia de clamidiosporas y conidióforos ramificados peniciliados. Los microconidios tuvieron una forma ovalada y lisa, de igual manera presentaron fiálides verticiladas. La medida de los conidios fue de 6.1 μm a 8.2 μm de largo y de ancho 3.1 μm a 41.1 μm .

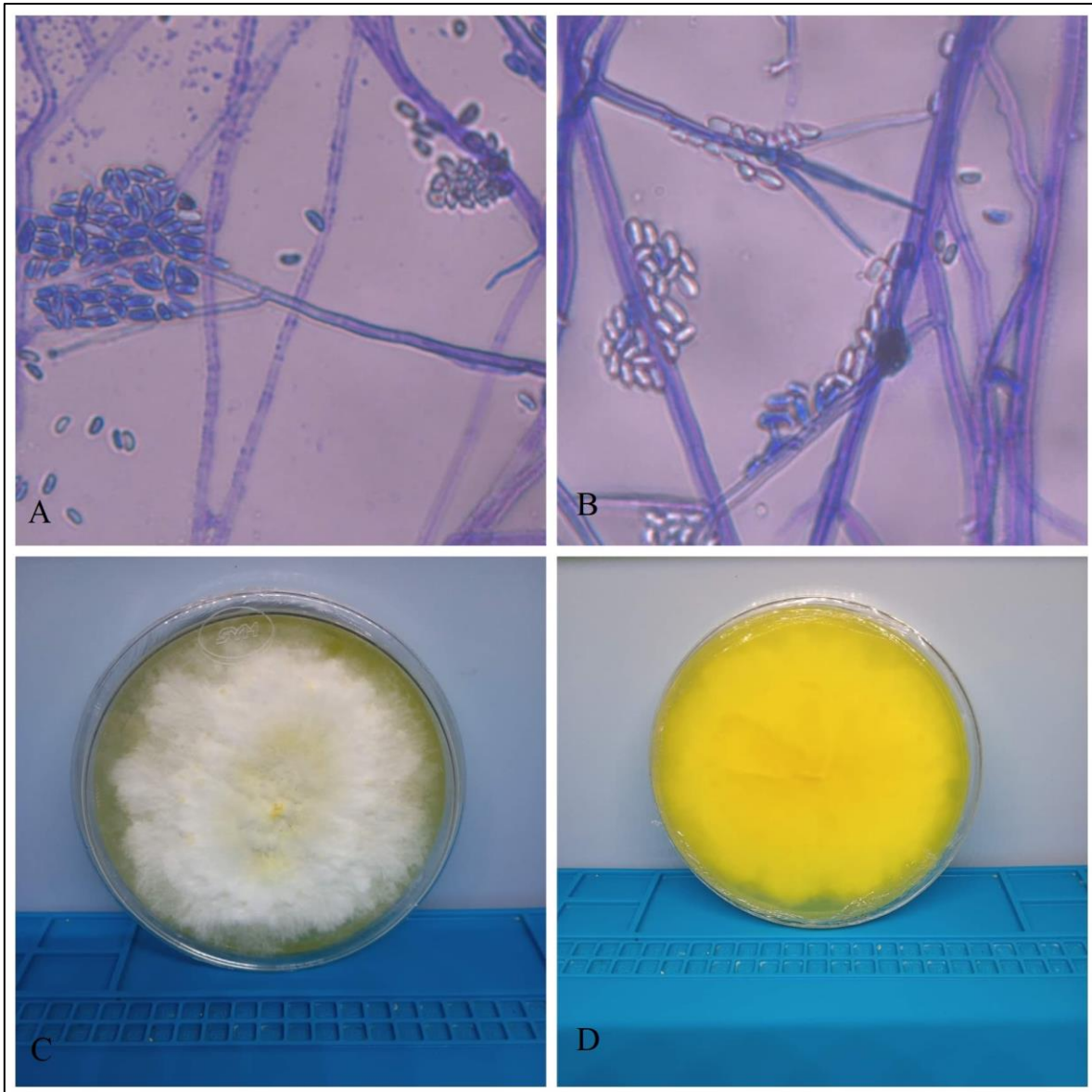


Figura 2. Estructuras microscópicas y macroscópicas del aislado M5 aislado del tomate verde comercializado en Puebla, México. A y B, micrografías de las estructuras reproductivas de la cepa M5. C, micelio de la muestra presentando una coloración blanquecina y textura algodonosa. D, reverso de la muestra presenta una coloración amarillenta.

Identificación molecular de los hongos aislados.

Para el caso del aislado M4, las secuencias de nucleótidos obtenidas con los marcadores ITS mostraron una homología del 100% con el hongo, *Fusarium concentricum*. La homología más alta, fue con la secuencia MG489962.1

***Fusarium concentricum* strain SC26a small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.**

Sequence ID: [MG489962.1](#) Length: 530 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 523 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
941 bits(509)	0.0	509/509(100%)	0/509(0%)	Plus/Minus
Query 5	TTTCTACCTGATCCGAGGTCACATT	CAGAAAGTTGGGGGTTTAAACGGCTTGGCCGCCCGC	64	
Sbjct 523	TTTCTACCTGATCCGAGGTCACATT	CAGAAAGTTGGGGGTTTAAACGGCTTGGCCGCCCGC	464	
Query 65	GTACCAAGTTGCGAGGGTTTTACTACTACGCAATGGAAGCTGCAGCGAGACCGCCACTAGA	124		
Sbjct 463	GTACCAAGTTGCGAGGGTTTTACTACTACGCAATGGAAGCTGCAGCGAGACCGCCACTAGA	404		
Query 125	TTTCGGGGCCGGCTTGCCGCAAGGGCTCGCCGATCCCAACACCAAAACCCGAGGGCTTGA	184		
Sbjct 403	TTTCGGGGCCGGCTTGCCGCAAGGGCTCGCCGATCCCAACACCAAAACCCGAGGGCTTGA	344		
Query 185	GGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGT	244		
Sbjct 343	GGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGT	284		
Query 245	TCAAAGATTCGATGATTCACACTGAATCTGCAATTCACATTAATTCGCAATTTGCTGCG	304		
Sbjct 283	TCAAAGATTCGATGATTCACACTGAATCTGCAATTCACATTAATTCGCAATTTGCTGCG	224		
Query 305	TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGATTATTATGGTT	364		
Sbjct 223	TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGATTATTATGGTT	164		
Query 365	TACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCCTTT	424		
Sbjct 163	TACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCCTTT	104		
Query 425	TACCGGGAGCGGGCTGATCCGCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGT	484		
Sbjct 103	TACCGGGAGCGGGCTGATCCGCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGT	44		
Query 485	TGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGG	513		
Sbjct 43	TGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGG	15		

Figura 3. Resultados del alineamiento BLAST para la secuencia de ITS del aislado MA4 obteniéndose 100% de identidad con *Fusarium concentricum*.

Para el caso del aislado MA5 (Figura 4), el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida con el marcador ITS reveló una coincidencia de 99% con *Clonostachys rosea*. La homología más alta se encontró con la secuencia JQ411383.1.

Clonostachys rosea isolate B1a027A7ASNA2CC940 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Sequence ID: [JQ411383.1](#) Length: 1050 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 520 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
948 bits(513)	0.0	516/517(99%)	1/517(0%)	Plus/Plus
Query 17	CCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCGCCCTCGTGT	76		
Sbjct 4	CCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCGCCCTCGTGT	63		
Query 77	GCCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAAACTTAACTCTTGTTTATTTTGGAACTCTTCTGA	136		
Sbjct 64	GCCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAAACTTAACTCTTGTTTATTTTGGAACTCTTCTGA	123		
Query 137	GTAGTTTTTACAAATAAAATAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTTGGCATCGATG	196		
Sbjct 124	GTAGTTTTTACAAATAAAATAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTTGGCATCGATG	183		
Query 197	AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATC	256		
Sbjct 184	AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATC	243		
Query 257	TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTCTGCTGAGCGTCATTTCT	316		
Sbjct 244	TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTCTGCTGAGCGTCATTTCT	303		
Query 317	AACCCCTCATGCCCTAGGGCGTGTGTTGGGGATCGGCCAAAAGCCCCGCGAGGGACGGCCG	376		
Sbjct 304	AACCCCTCATGCCCTAGGGCGTGTGTTGGGGATCGGCCAAAAGCCCCGCGAGGGACGGCCG	363		
Query 377	GCCCCATAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCCTCCCTGGCGAAGTAGTGATATTCGGCA	436		
Sbjct 364	GCCCCATAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCCTCCCTGGCGAAGTAGTGATATTCGGCA	423		
Query 437	TCGGAGAGCGACGAGCCCTGCCGTTAAAKCCCCAACCTTTCAGAGTTGACCTCAGATCA	496		
Sbjct 424	TCGGAGAGCGACGAGCCCTGCCGTTAAAKCCCCAACCTTTCAGAGTTGACCTCAGATCA	483		
Query 497	GGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA-AAG	532		
Sbjct 484	GGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAG	520		

Figura 4. Resultados del alineamiento BLAST para la secuencia de ITS del aislado MA5, obteniéndose 100% de identidad con *Clonostachys rosea*

Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)

Una vez aislados, purificados e identificados los dos hongos fitopatógenos, las estructuras reproductivas de estos fueron inoculadas en frutos sanos de tomate verde y se monitoreó el avance de la infección por 9 días.

Fusarium concentricum (MA4) presentó un crecimiento rápido y denso del micelio, cubriendo casi por completo al tomate al día 9 post-inoculación (Figura 5). Por otro lado, el tratamiento hecho con el hongo MA5 (*Clonostachys rosea*) mostró la aparición de una pequeña biomasa concentrado solamente en la zona de inoculación, mientras que los síntomas se volvieron notorios hasta el término del monitoreo. Sin embargo, al día 9 se observó una pérdida sustancial de turgencia. De ambos hongos *F. concentricum* mostro tener una mayor actividad fitopatogénica *in situ*.

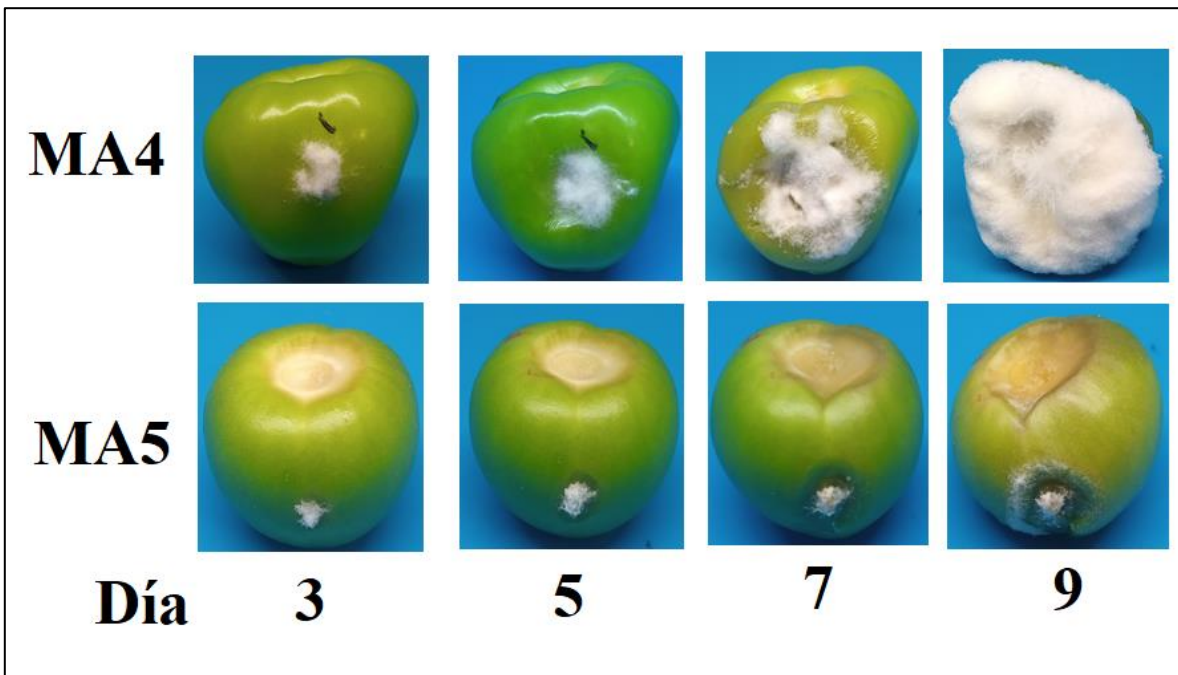


Figura 5. Cinética del crecimiento *in situ* de los aislados MA4 (*Fusarium concentricum*) y MA5 (*Clonostachys rosea*) durante un periodo de 9 días.

Actividad antifúngica *in vitro*

Las pruebas realizadas con resazurina permitieron determinar la actividad redox de las células fúngicas con las que entra en contacto. Bajo esta premisa, la transformación de la resazurina en resorufina depende de la actividad de enzimas antioxidantes que produce la célula cuando se encuentra metabólicamente activa. Por tanto, la falta de actividad redox se traduce en muerte celular. De esta manera, el cambio en la coloración azul de la resazurina hacia una tonalidad rosácea (resorufina), determino la viabilidad de la célula fúngicas ensayadas.

Inicialmente, se probaron varios AE para determinar la capacidad antifúngica de los mismos, sobre los dos hongos fitopatógenos aislados. Sin embargo, los aceites esenciales de azomite (*Barkleyanthus salicifolius*), menta y falso laurel (*Litsea glaucescens*), fueron probados para observar la presión que estos ejercían sobre la viabilidad hifal de *Fusarium concentricum* (Figura 6). Los AE de azomite y menta no lograron inhibir por completo en el crecimiento de *Fusarium concentricum*. No obstante, el AE del falso laurel logro una concentración mínima inhibitoria (MIC) en el crecimiento de *Fusarium concentricum* siendo de alrededor de 1.g mg mL⁻¹.

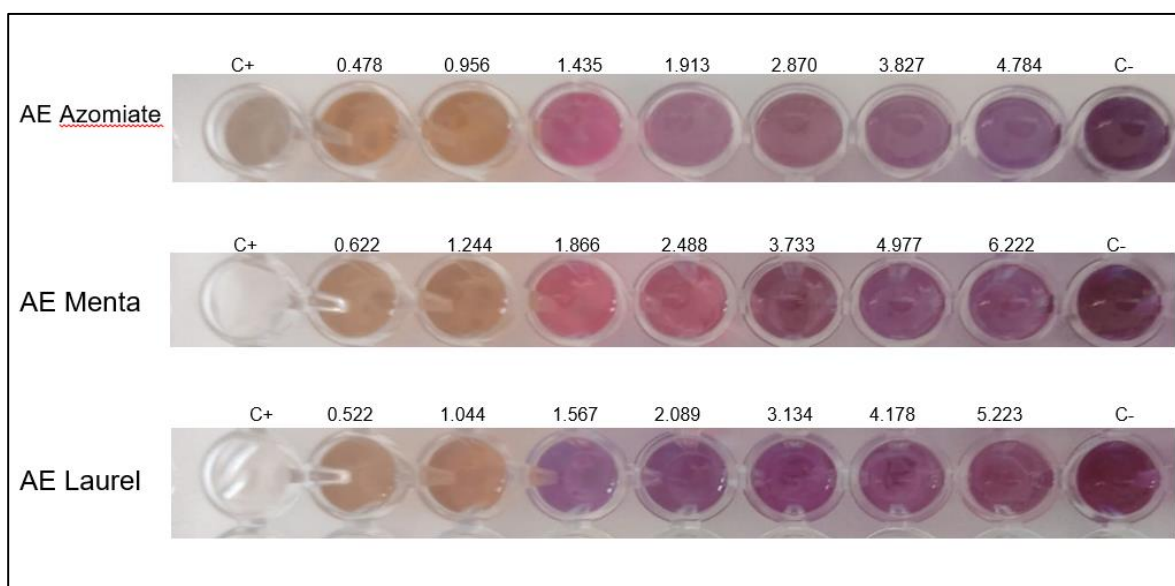


Figura 6. Curvas de dosis-respuesta usando los AE de azomite, menta y laurel, sobre *Fusarium concentricum*.

De acuerdo con los resultados de GC-MS, se identificaron 28 compuestos (Tabla 1) que conformaron al AE del falso Laurel. Dentro de los 28 compuestos identificados, 4 resaltaron por su abundancia, los cuales fueron: 1,8-cineol (46%), dihydrocarveol (23.8%), alfa-pineno (5.1%) y beta-pineno (3.1%)

Tabla 1. Identificación de compuestos pertenecientes al AE del falso laurel (*Litsea glaucescens*) a través de GC-MS

Número	Compuesto	IR	Abundancia (%)
1	Alfa-Pineno	939	5.1
2	Canfeno	954	2.6
3	Beta-Pineno	979	3.1
4	1,8-Cineol	1026	44.6
5	Gamma-Terpineno	1054	2.4
6	Terpinoleno	1086	0.3
7	Linalool	1095	0.5
8	1-Terpineol	1130	1.4
9	Terpinen-4-ol	1177	2.5
10	Dihidrocarveol	1193	23.8
11	Carvona	1243	0.9
12	Bornil acetato	1254	1.3
13	Trans-Carvone oxido	1276	0.3
14	neo-Isopulegyl acetato	1277	0.4
15	Allyl octanoate	1280	0.3
16	Safrol	1287	0.5
17	Trans-dihydro-alfa-Terpinyl acetato	1300	0.7
18	Cis-Pinocarvyl acetato	1311	1.2
19	Geranil acetato	1379	0.9
20	Beta-Cariofileno	1408	0.9
21	Alfa -Humuleno	1452	0.3

22	Isobornil n-butanoato	1473	0.5
23	Alfa-Muuroleno	1500	0.4
24	(Z)-Nerolidol	1531	0.4
25	Carifileno oxido	1582	0.4
26	Sesquithuriferol	1604	0.3
27	(Z)-Lanceol	1760	0.5
28	Butil dodecanoato	1786	0.6
	Total		97.1

En la Figura 7 se muestra el perfil de elución (cromatograma) de cada uno de los volátiles disueltos en el AE del falso laurel.

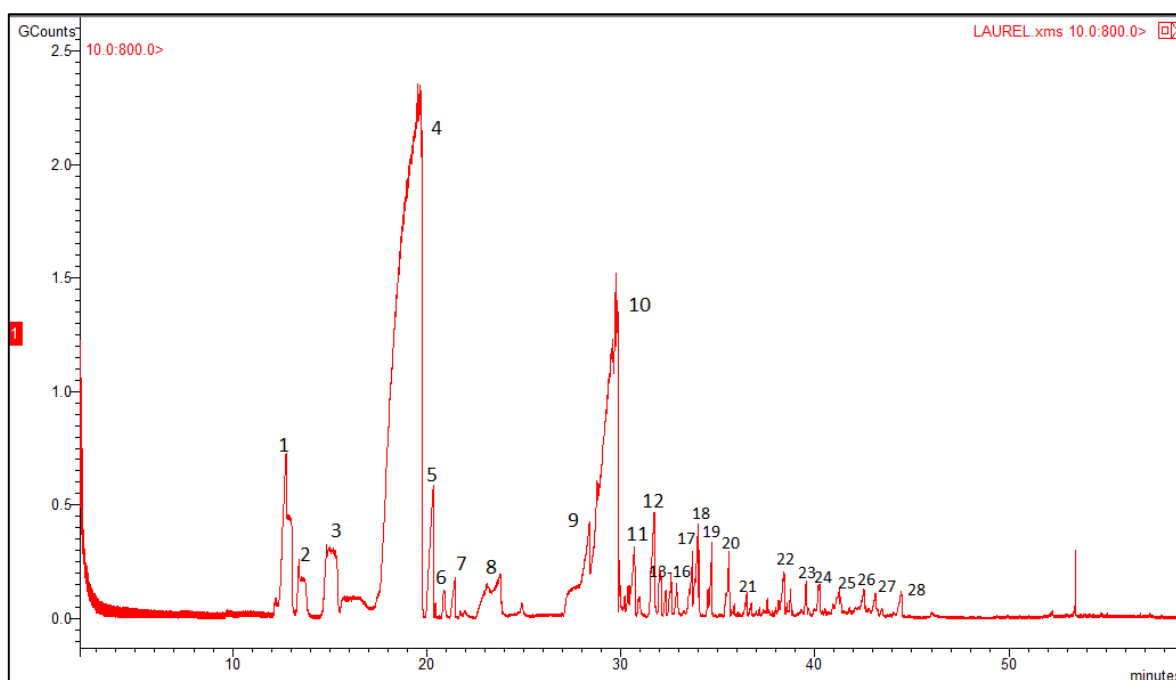


Fig. 7. Cromatograma de GC-MS para los volátiles del AE del falso laurel (*Litsea glaucescens*).

Por otro lado, los AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) y canela (*Cinnamomum verum*) fueron probados para observar la presión que estos ejercían sobre la viabilidad hifal de *Clonostachys rosea* (Figura 8). De acuerdo con los resultados, AE de canela tuvo un grado de inhibición sobre el hongo *Clonostachys rosea* en concentraciones más bajas, mientras que el AE de Tomillo necesitó de mayor concentración de AE para poder inhibir el crecimiento de *Clonostachys rosea*. De este modo la MIC del AE de canela fue de 0.95 mg mL⁻¹.

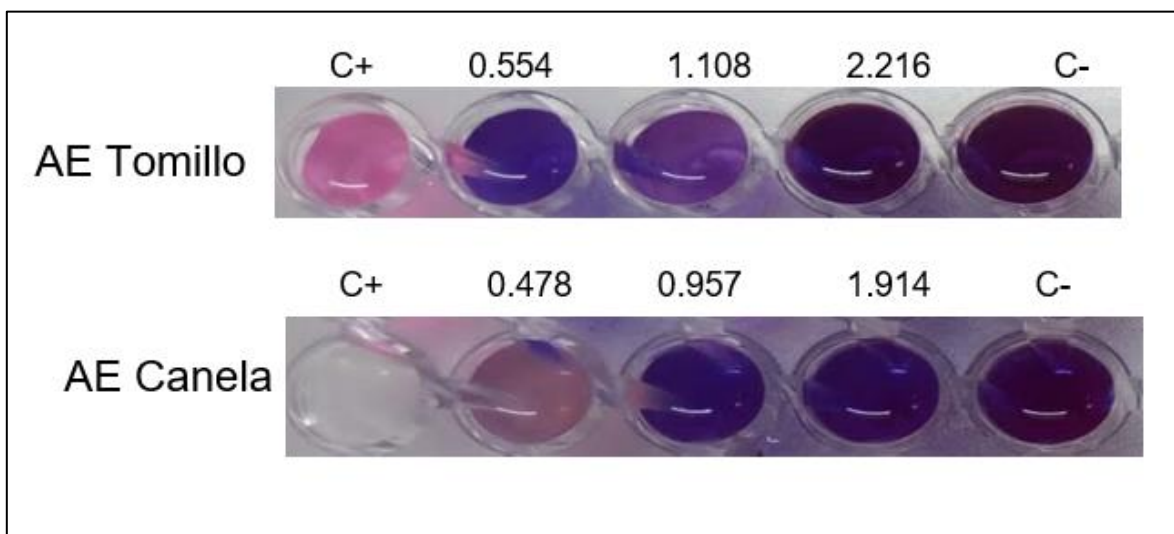


Figura 8. Curvas de dosis respuesta usando los AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) y canela (*Cinnamomum verum*) sobre *Clonostachys rosea*.

De acuerdo con los resultados de GC-MS, se identificaron 14 compuestos (Tabla 2) que conformaron al AE de canela (*Cinnamomum verum*). Dentro de los 14 compuestos identificados, 4 resaltaron por su abundancia el, (E)-cinamaldehído (45.9%), eugenol (5.5%), linalool(6.8%) 1,3,8-p-menthatrieno (7.9%)

Tabla 2. Identificación de compuestos pertenecientes al aceite esencial de Canela (*Cinnamomum verum*) a través de GC-MS

Número	Compuesto	IR	Abundancia (%)
1	Alfa-Pineno	939	3.5
2	Canfeno	954	2.9
3	Beta-Pineno	979	1.7
4	Alfa-Phellandreno	1002	4.1
5	Alfa-Terpineno	1017	3.5
6	Linalool	1095	6.8
7	1,3,8-p-Menthatrieno	1110	7.9
8	Terpinen-4-ol	1174	1.6
9	Alfa-Terpineol	1186	2.3
10	(E)-Cinnamaldehido	1267	45.9
11	Eugenol	1356	5.5
12	(Z)-Cinnamil acetato	1389	3.6
13	Beta-Caryophilleno	1436	4.7
14	Benzyl Benzoato	1760	1.8
	Total		95.8

La Figura 9, muestra el perfil de elución de los volátiles en el AE de la canela.

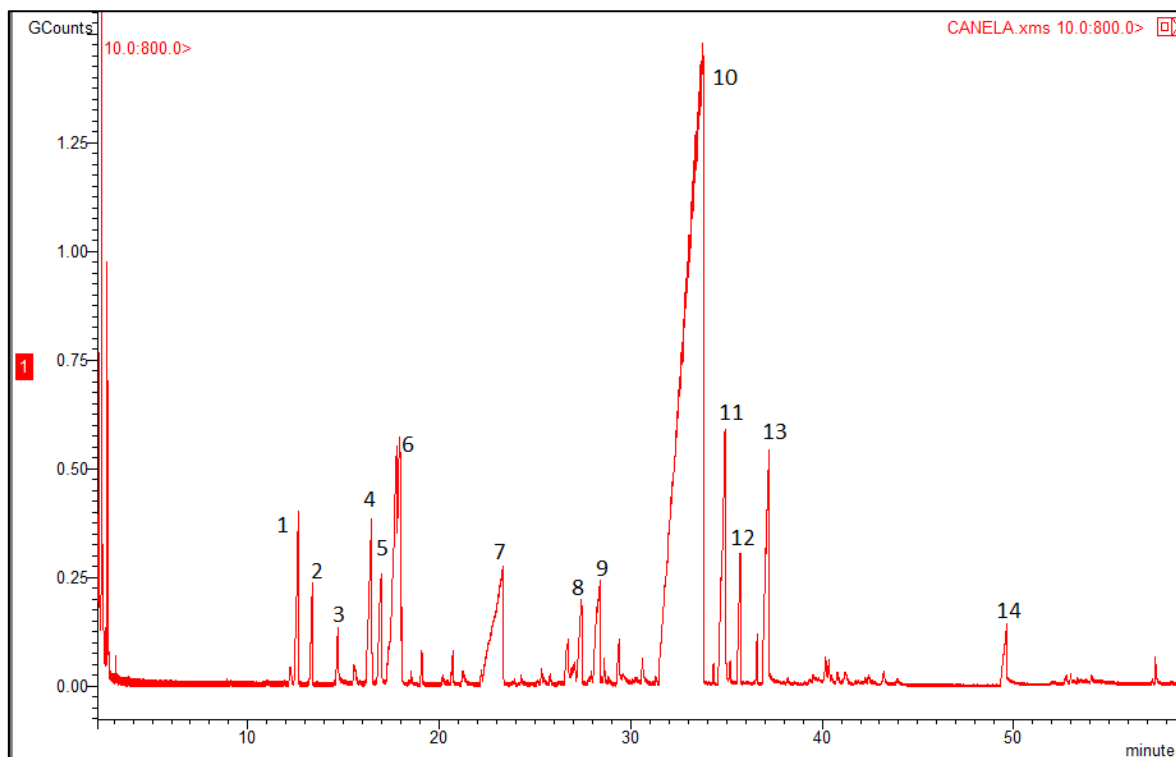


Fig. 9. Cromatograma de GC-MS para los volátiles del AE canela (*Cinnamomum verum*).

Pruebas antifúngicas *in situ* con películas híbridas conteniendo aceites esenciales

La efectividad de los AE sobre los hongos fitopatógenos del tomate verde fue documentada con el objetivo de mostrar su impacto antifúngico en las muestras del tejido vegetal del tomate. El monitoreo de las pruebas consistió en un grupo control y los tratamientos hechos con los AE de *Litsea glaucescens* (AELg) y *Cinnamomum verum* (AECv) durante un periodo de 17 días, por cada tratamiento.

El grupo control de *Fusarium concentricum* (Figura 10) presentó efectos en la superficie del tomate a los 2 días. Una vez llegado al día 5 este presentaba los primeros efectos de la pérdida de la turgencia y para el día 11 los tomates verdes mostraron una pérdida total de firmeza.

Las películas de quitosano puro presentaron un efecto protector hasta el día 5, teniendo un efecto inhibitorio pobre sobre el crecimiento de *Fusarium concentricum*. Sin embargo, la aplicación de las películas de quitosano conteniendo AELg en diferentes concentraciones (0.7, 1 y 1,3%) mostró resultados alentadores en cuanto al retraso de la aparición de síntomas.

Se observó que las películas de quitosano con AELg una concentración de 0.7 % (FL1) ejercieron una inhibición del hongo menor ya que a los 5 días se observaron síntomas de patogenicidad provocadas por el hongo. Estos aumentaron considerablemente al día 17, mientras que la concentración de 1 % (FL2) inhibió el crecimiento hifal hasta el día 11. Sin embargo, las películas conteniendo la concentración más elevada de AELg (1.3%; FL3) ejercieron una inhibición total del hongo ya que el tomate no presentó síntomas durante los 17 días de estudio manteniendo su firmeza con ligeros cambios en la coloración.

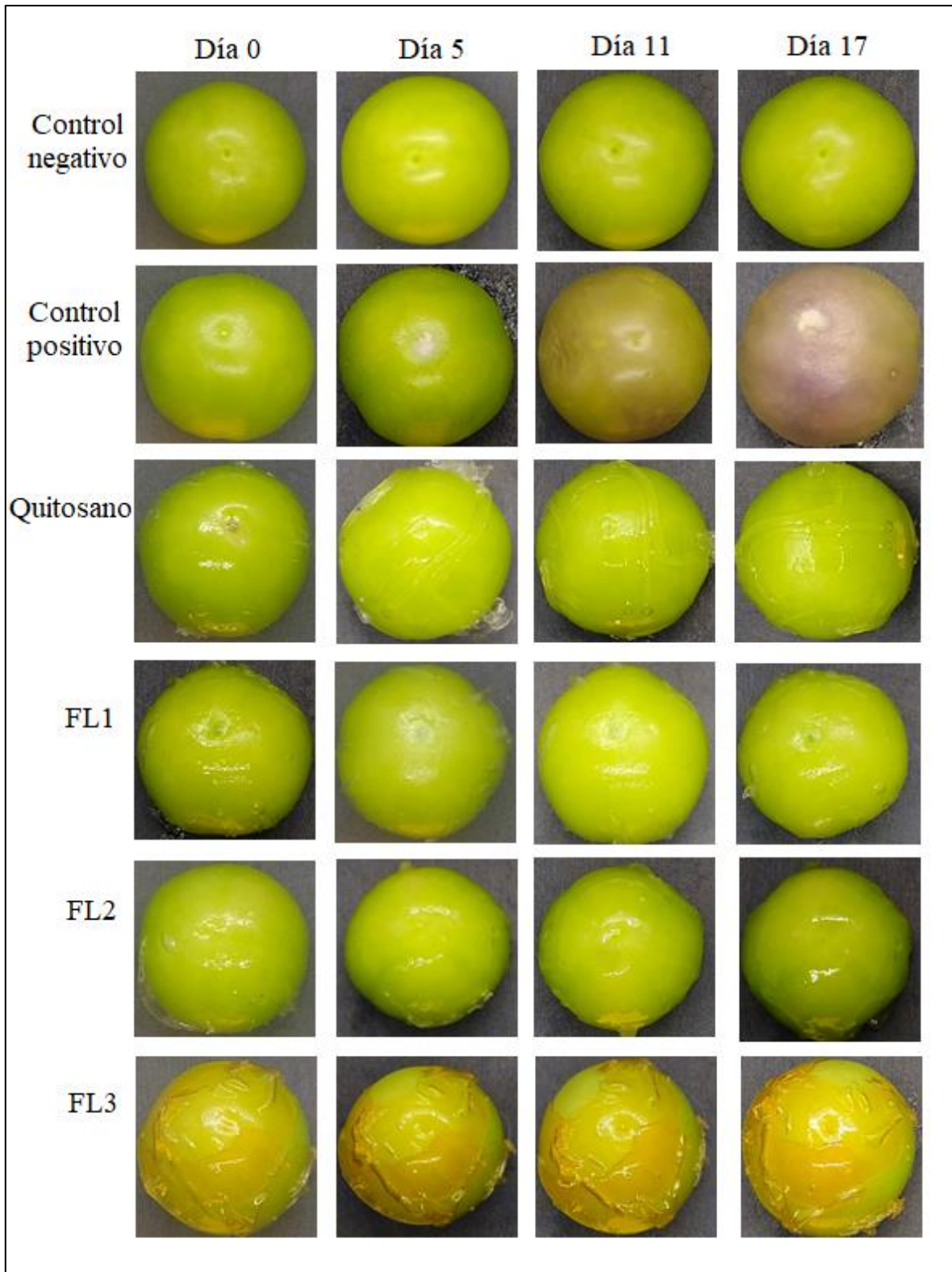


Figura 10. Cinética comparativa del tomate verde inoculado con *Fusarium concentricum* (control) y de tomate verde inoculado con el mismo hongo bajo el efecto las películas híbridas FL1 (0.7%), FL2 (1%) y FL3 (1.3%) conteniendo AELg.

En otro contexto, grupo control de tomates infectados con *Clonostachys rosea* (Figura 11) sin tratamiento previo, presento síntomas de infección en la superficie del tomate a los 5 días, una vez llegado el día 11 este presentaba los primeros efectos de la pérdida de la turgencia y para el día 17 los tomates verdes mostraron una pérdida total de firmeza.

Contrariamente, los tomates cubiertos con una película de quitosano puro presentaron un efecto protector hasta el día 5. La aplicación de películas híbridas conteniendo AECv en diferentes concentraciones demostró resultados positivos en cuanto a su capacidad de retardar la emergencia de síntomas de pudrición blanda.

Se observó que la película FC1 que contuvo quitosano y AECv a una concentración de 0.7% mostró una ligera inhibición del hongo, ya que a los 3 días presentaba síntomas de patogenicidad provocadas por el hongo, los cuales fueron aumentando hasta el día 17. Por otro lado, la película FC2 con concentración de 1%, inhibió el crecimiento hifal *in situ* hasta el día 11. Como en el caso de las películas de AELg, las películas conteniendo 1.3% (FC3) de AECv produjeron una inhibición completa del crecimiento *in situ* de *C. rosea* durante 17 días manteniendo su firmeza. Remarcablemente, las películas conteniendo las concentraciones más elevadas de AECv (FC2-FC3) produjeron una decoloración de los tomates.

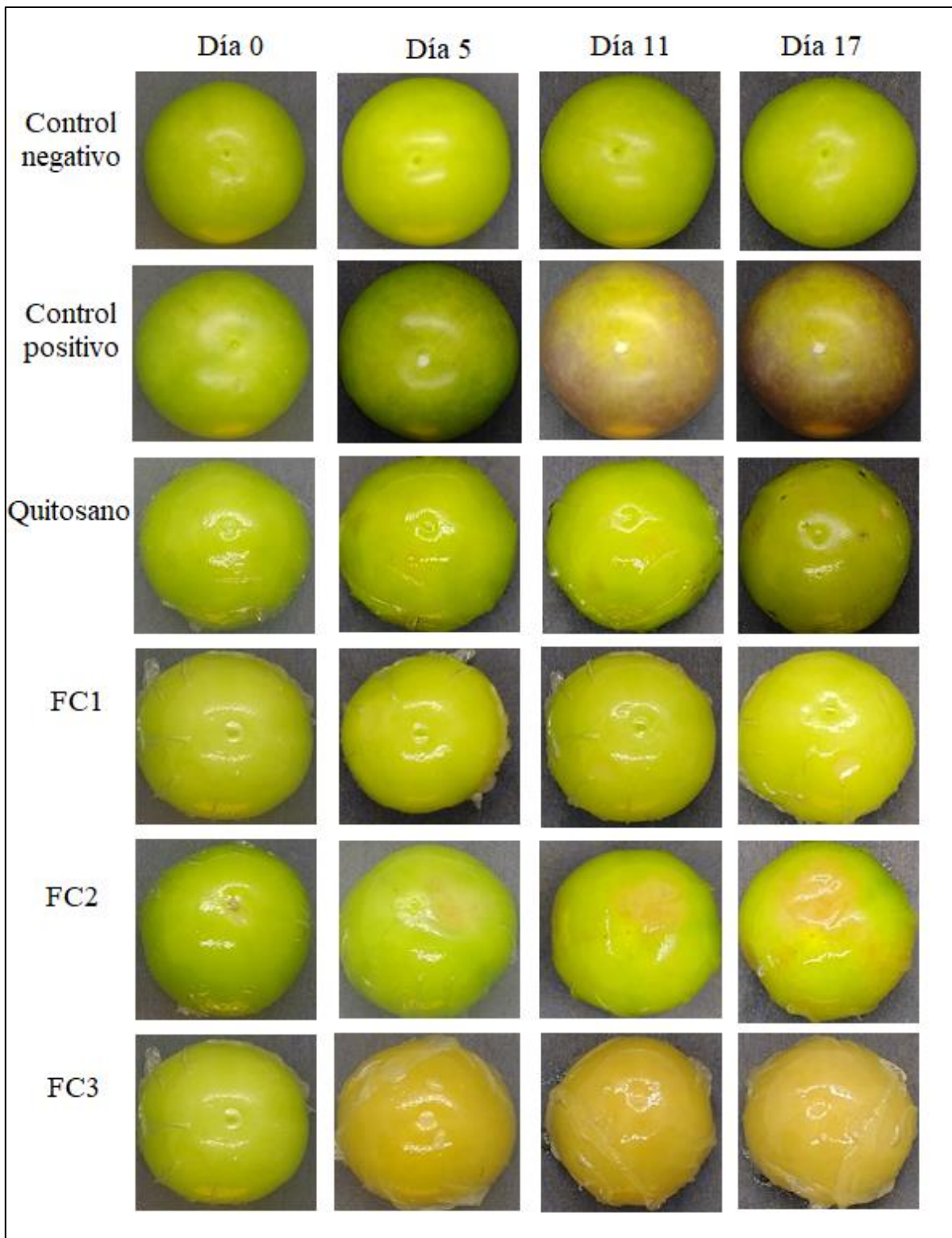


Figura 11. Cinética comparativa del tomate verde inoculado con *Clonostachys rosea* (control) y de tomate verde inoculado con el mismo hongo bajo el efecto de las películas FC1 (0.7%), FC2 (1%) y FC3 (1.3%) conteniendo AECv.

Firmeza en tomates tratados con películas híbridas

De acuerdo con la Figura 12, los tomates infectados con *F. concentricum* mostraron una pérdida de la firmeza del 20 % al día 11 post-inoculación, lo que fue estadísticamente significativo en comparación con los frutos sanos ($p < 0,05$). Para el día 17 los tomates tratados con las películas FL1, FL2, FL3, mostraron una mayor firmeza comparada a la de los frutos sanos. Las películas FL1 ($3,12 \pm 2,2 \text{ kg/cm}^2$), FL2 ($3,77 \pm 2,6 \text{ kg/cm}^2$), FL3 ($4,15 \pm 2,9 \text{ kg/cm}^2$) conservaron significativamente la firmeza de los tomates ($p < 0,05$) en comparación con los frutos enfermos.

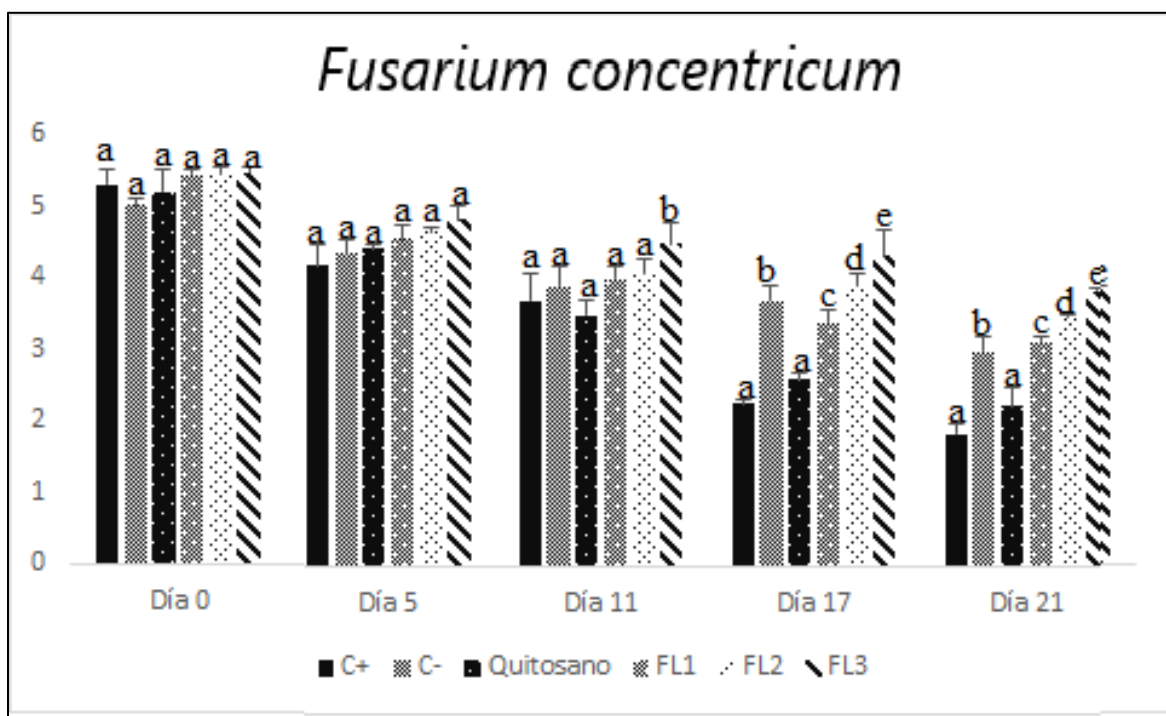


Figura 12. Firmeza de tomates tratados con películas híbridas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) según ANOVA-Tukey-Test.

De acuerdo con la Figura 13, los tomates infectados y aquellos tratados con las películas de quitosano puro mostraron una pérdida de la firmeza del 25 % al día 11 post-inoculación. Los datos de firmeza obtenidos a partir de estos grupos experimentales fueron substancialmente diferentes a aquellos obtenidos a partir de la aplicación de las películas híbridas conteniendo AECv ($p < 0,05$). Para los días

17 y 21 los tratamientos FC1 ($3,12 \pm 0.12 \text{ kg/cm}^2$), FC2 ($4,1 \pm 0.16 \text{ kg/cm}^2$), FC3 ($4,5 \pm 0.17 \text{ kg/cm}^2$) conservaron significativamente la firmeza de los tomates ($p < 0.05$) en comparación con los frutos enfermos.

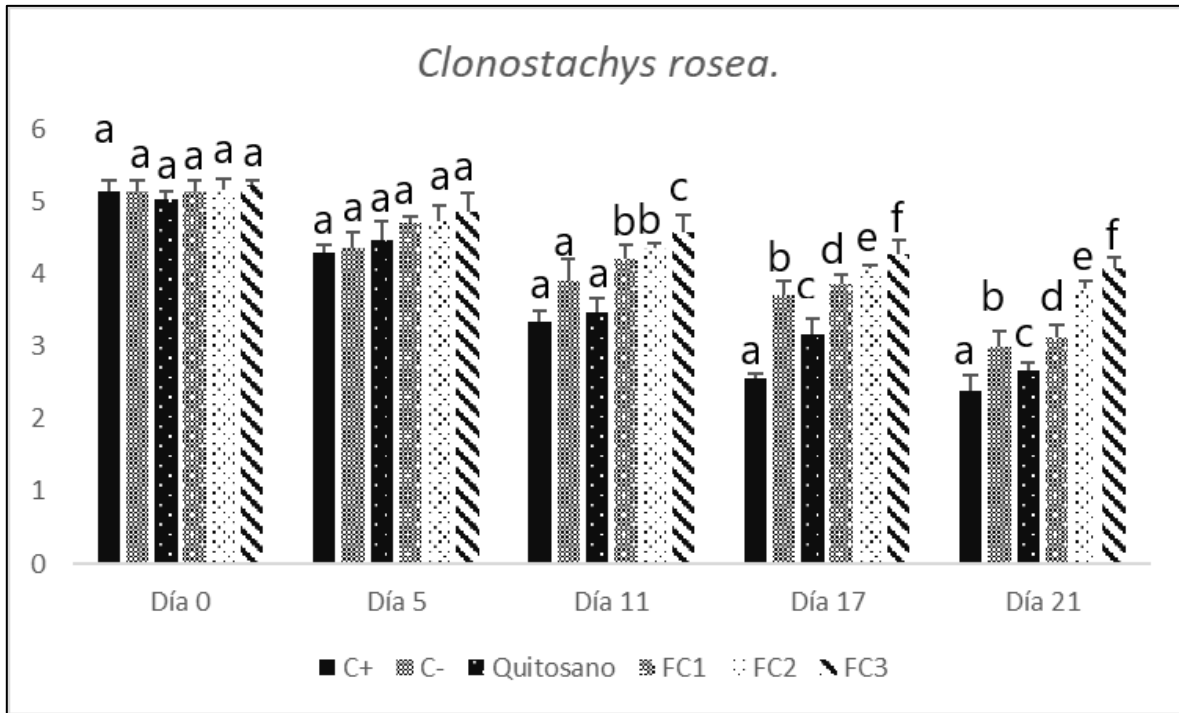


Figura 13. Firmeza de tomates tratados con películas híbridas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Efecto fungistático *per se* de las películas híbridas

Con el objetivo de demostrar el efecto fungistático de las películas sobre la emergencia de los dos hongos fitopatógenos, se realizó la inoculación directa de las estructuras reproductivas de cada hongo sobre la superficie de las películas híbridas. La Figura 14 muestra germinación normal de conidios de *Clonostachys rosea* en medio PDA (grupo control). Por otro lado, se puede apreciar que en las películas de quitosano puro la germinación de las estructuras reproductivas presentó una menor emergencia y proliferación. Interesantemente, las películas con diferentes concentraciones de AECv como son FC1 (7%), FC2 (1%) y FC3 (1.3%) ejercieron un efecto fungistático total sobre la germinación de las estructuras

reproductivas. Este resultado indicó que la presión del AECV y sus volátiles principales produjeron un colapso generalizado de dichas estructuras.

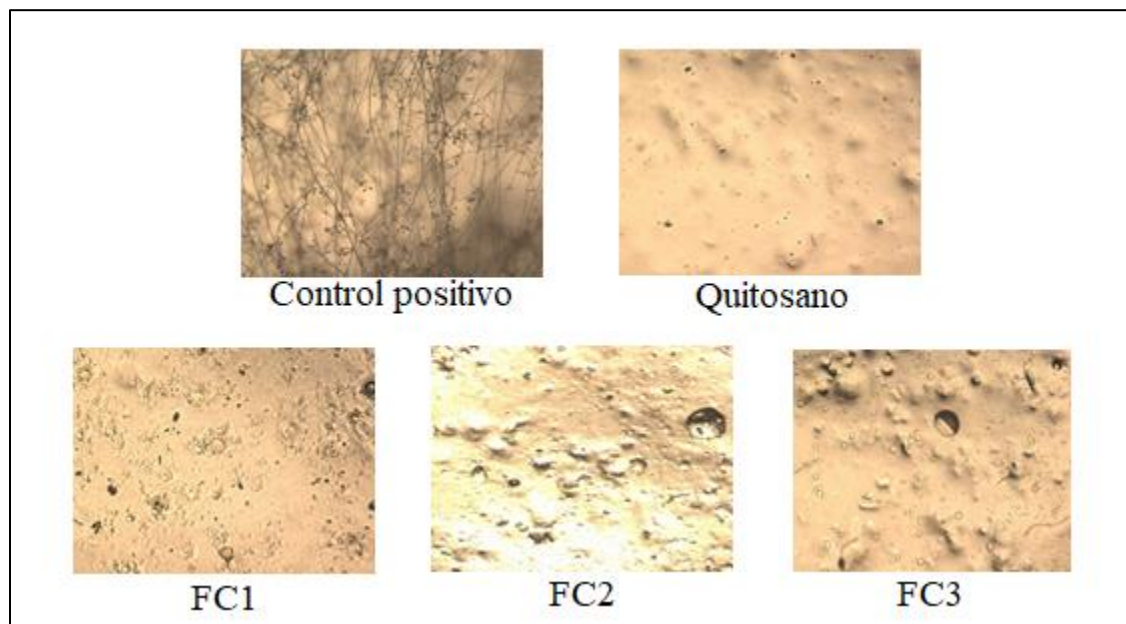


Figura 14. Germinación de conidios de *Clonostachys rosea* en películas de quitosano puro y películas híbridas adicionadas con AECV. El control positivo refiere a la germinación de conidios en PDA. Vistas obtenidas a 20x.

Un comportamiento similar se observó para las películas híbridas conteniendo AELg sobre *Fusarium concentricum* (Figura 15). Las estructuras reproductivas germinaron normalmente en PDA mientras que existió una menor incidencia de germinación en películas hechas a base de quitosano puro. Las películas de quitosano con AELg a diferentes concentraciones como son FL1 (0.7%) FL2 (1%) y FL3 (1.3%) tuvieron un claro efecto inhibitorio en el crecimiento de las estructuras reproductivas del hongo, siendo más efectivas que aquellas hechas a base de quitosano puro.

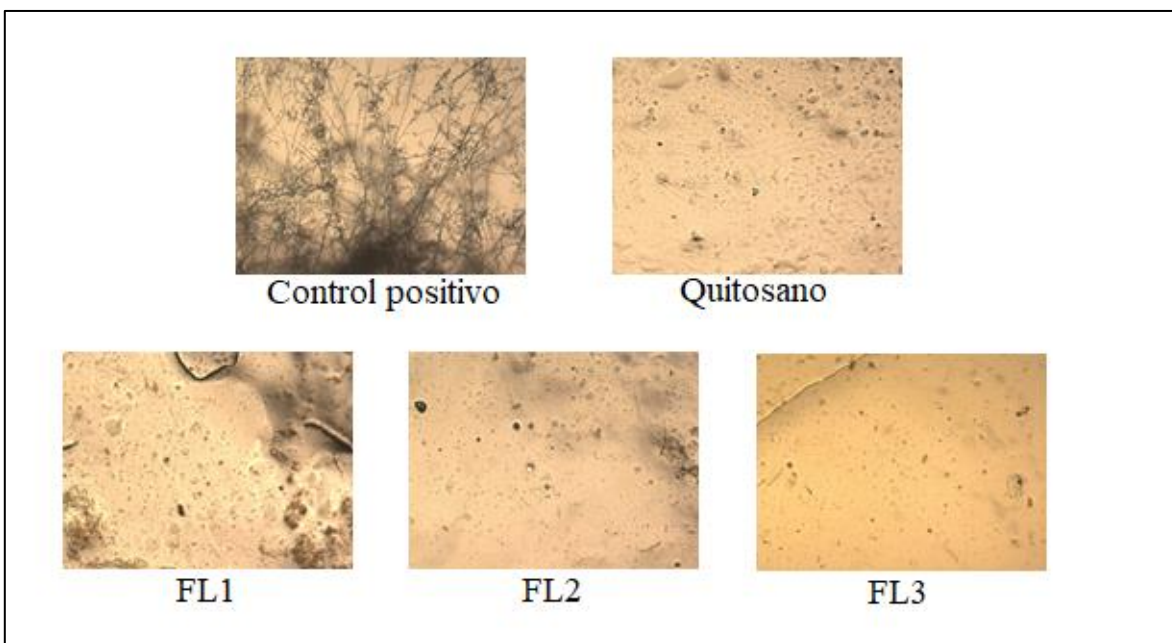


Figura 15. Germinación de conidios de *Fusarium concentricum* en películas de quitosano puro y películas híbridas adicionadas con AELg. El control positivo refiere a la germinación de conidios en PDA. Vistas obtenidas a 20X.

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro obtenido por el FT-IR del AE del laurel (Figura 16 A) mostró una banda a 3419 cm^{-1} con una vibración simétrica del grupo OH presente en los compuestos de dihydrocarveol y terpinen-4-ol.

Las bandas a 2966 cm^{-1} y 2878 cm^{-1} pueden ser destinadas a señales de estiramiento simétricas y asimétricas del grupo CH_3 , mientras que la banda a 2927 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico del grupo CH_3 .

La señal en 1647 cm^{-1} está asociada a la vibración de estiramiento de los enlaces $\text{C}=\text{C}$ correspondiente al canfeno que es el quinto componente mayoritario del AELg (Pradhita et al., 2015) La banda a 1690 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del grupo vinilo terminal del dihydrocarveol y la banda observada en 1456 cm^{-1} está asociada con la flexión simétrica en el plano de los enlaces CH. Asimismo, la banda observada a 1415 cm^{-1} es atribuida a la vibración simétrica y asimétrica de los grupos C-O-H respectivamente. Otra banda característica

correspondiente a la deformación del grupo CH_3 es encontrada en 1374 cm^{-1} (García et al., 2017). Una banda de absorción a 985 cm^{-1} corresponde a una vibración simétrica del grupo CH_2 (Pradhita et al., 2015). Por otra parte, la señal en 981 cm^{-1} se asocia a la vibración del enlace CH y CH_2 característico del compuesto 1,8 cineol. Las señales características de alfa - pineno se encuentran en 886 cm^{-1} y 652 cm^{-1} lo cual concuerda con lo reportado con Schulz et al. (2005). La señal en 756 cm^{-1} corresponde a la vibración del estiramiento del enlace de $\text{C}=\text{C}$, la cual es característica del gamma- terpineno (Moisa et al., 2019).

El espectro obtenido para las películas híbridas a base de AELg y quitosano (Figura 14 B) muestran una banda de 3281 cm^{-1} característica del polímero (quitosano). Esto se puede cotejar en la señal en 1640 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de $\text{H}-\text{O}-\text{H}$. La señal en 1648 cm^{-1} corresponde a la vibración de flexión de tijera del enlace $\text{N}-\text{H}_2$, siendo la señal detectada a 1558 cm^{-1} asociada al doblamiento del enlace $\text{N}-\text{H}$ (Brugperotto, 2001; Shen y Pascal, 2015).

La señal de 1150 cm^{-1} corresponde a la vibración asimétrica del enlace de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, asociado con la estructura del quitosano puro, la cual también está presente en las películas de quitosano con aceite esencial. Las señales en 2935 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento asimétrico del $\text{C}-\text{H}$ de los grupos metileno (Morales et al. 2022). Las señales en 2335 cm^{-1} y 2365 cm^{-1} corresponden a la presencia del terpinen-4-ol, mientras que aquella observa a 1558 cm^{-1} corresponde a la vibración $-\text{N}-\text{H}$. La banda detectada en 1401 cm^{-1} hace referencia a la vibración del enlace $\text{C}-\text{O}$ (Bonilla et al., 2019). La señal de 1154 cm^{-1} es característica de la tensión antisimétrica del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{O}$. La banda en 1037 cm^{-1} hace referencia a la banda de absorción de la glicerina por las vibraciones de los enlaces $\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}-\text{O}$ (Leceta et al., 2013). Las bandas de 994 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} , 1157 cm^{-1} , corresponden a las señales de las vibraciones de estiramiento de las cadenas $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Las señales mostradas en 852 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento de $\text{C}-\text{C}$ de la cadena

del polímero. La banda detectada a 1230 cm^{-1} corresponde a la vibración de los grupos OH y CH en anillos aromáticos (Barragán et al., 2016).

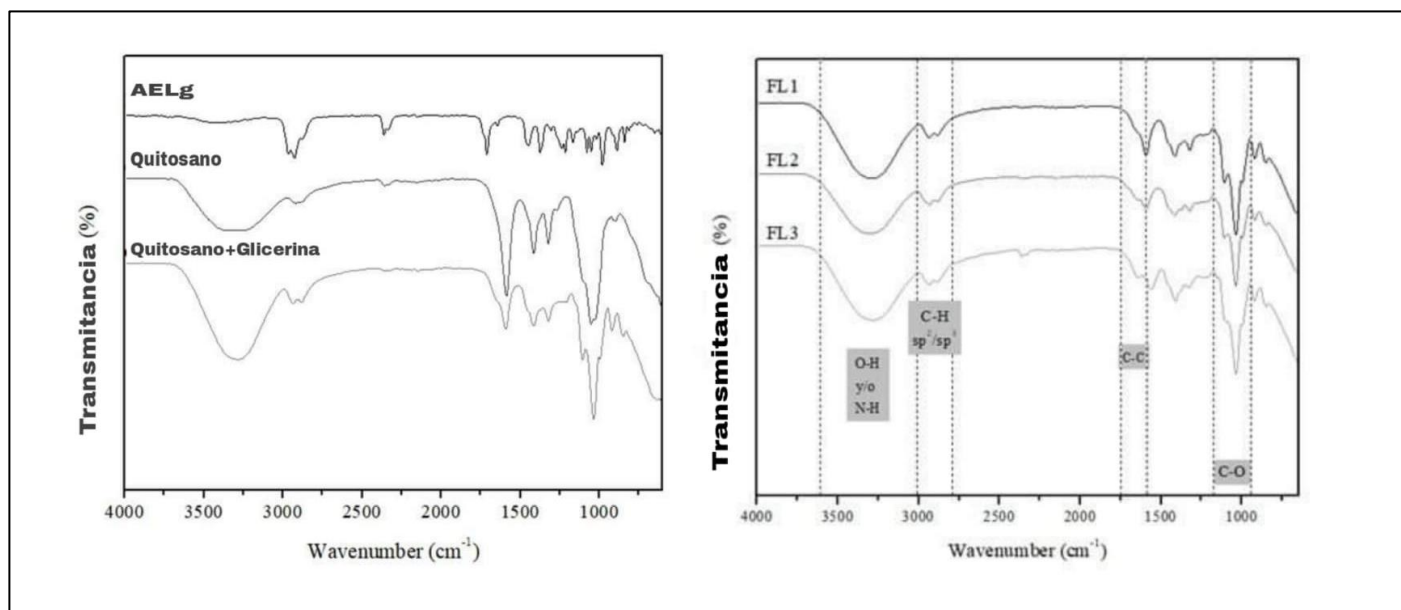


Figura 16. A) Espectros FT-IR del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (AELg) y películas hechas con quitosano puro. B) Espectros FT-IR de películas que contienen diferentes proporciones de quitosano y AELg.

En el espectro FT-IR del AECv (Figura.15 A) se observaron bandas de absorción ubicadas a 3509 cm^{-1} que corresponden al estiramiento del grupo hidroxilo (OH-). Entre las señales 1615 cm^{-1} y 1734 cm^{-1} se encuentran los grupos aldehídos. Se observó la señal -OH del grupo fenol a 3486 cm^{-1} , mientras que el pico a 3063 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-H del anillo aromático del (E)-cinamaldeído. Las bandas encontradas en 2961 cm^{-1} y 2926 cm^{-1} están asociadas al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos CH_2 y CH_3 , respectivamente. La banda de 2810 cm^{-1} se vinculó al grupo (E)-cinamaldeído. Gende et al. (2008), reportaron bandas características similares a las reportadas en este trabajo para los rangos 1690 cm^{-1} y 1760 cm^{-1} característicos de los grupos aldehídos y la similitud del espectro infrarrojo para el cinamaldeído entre los rangos 500 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} . La señal observados a 1732 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del doble enlace del grupo carbonilo (Canales et al., 2019).

El espectro FT-IR de las diferentes películas con AE (Figura 17 B) mostró bandas características correspondientes a enlaces CH aromáticos, entre 3000 cm^{-1} y 3100 cm^{-1} de (E)-cinamaldehído y eugenol respectivamente. La señal a 1562 cm^{-1} asociada con la vibración del grupo NH y la señal a 1040 cm^{-1} con el grupo C=O.

Las señales observadas a 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} se asociaron con la simetría y vibración de los grupos metilo y metileno. Otros picos a 1450 cm^{-1} , 1379 cm^{-1} y 748 cm^{-1} , se asociaron con la inflexión de los mismos grupos (Medvecká et al., 2020). La señal del grupo NH se detectó a 3297 cm^{-1} , mientras que los picos observados a 2941 cm^{-1} y 2877 cm^{-1} se asociaron con el estiramiento de CH_3 del quitosano. Señales a 1400 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} ; 1300 cm^{-1} -1385 cm^{-1} mostraron el estiramiento del grupo metilo.

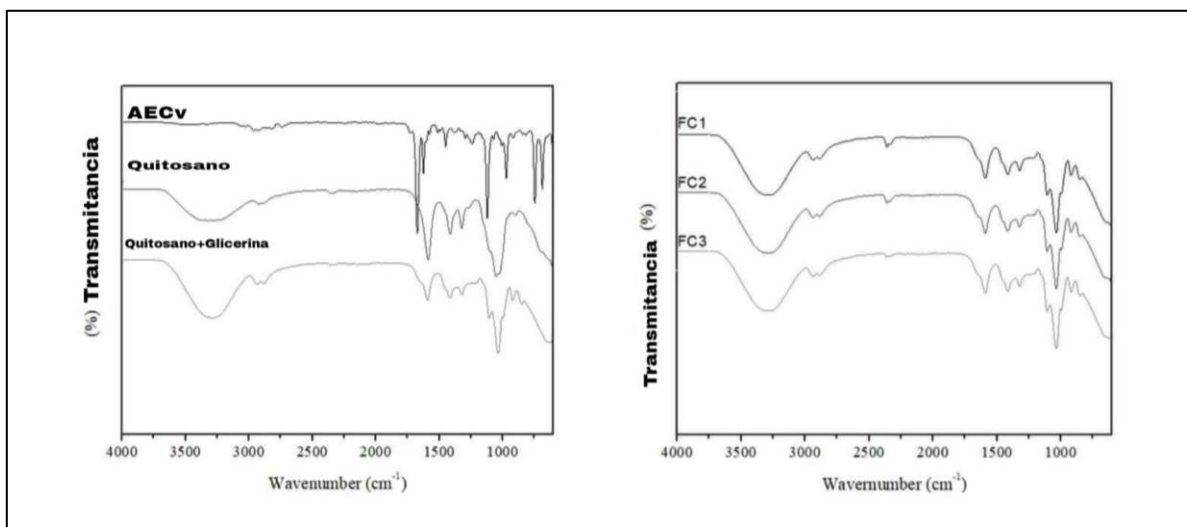


Figura 17. espectros FT-IR del aceite esencial de *Cinnamomum verum* (AECv) y películas hechas con quitosano puro. B, espectros FT-IR de películas que contienen diferentes proporciones de quitosano y AECv

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para la observación de la morfología de las películas de quitosano y películas híbridas conteniendo aceite esencial. Las micrografías SEM de la vista de la superficie y la parte transversal se presentan en las Figuras 16 y 17, respectivamente. Para el caso de películas híbridas conteniendo AECv

se observó que la superficie de quitosano puro presentó una estructura homogénea. Sin embargo, las películas con AECv presentaron burbujas de AE, las cuales aumentan al incrementar la concentración del aceite. Esto indicó que a mayor concentración del aceite ensayado existe menos biocompatibilidad con la matriz de quitosano. A diferencia de lo anterior, las películas con AELg presentaron una mayor heterogeneidad en la estructura de la película, ya que en el corte transversal no se observaron burbujas. Curiosamente, en la micrografía del corte transversal de la película FL2 se observa un poro en su estructura. A pesar de esto, la incidencia de estas irregularidades es menor lo que indica una alta compatibilidad del AELg en quitosano (Shen y Pascal, 2015).

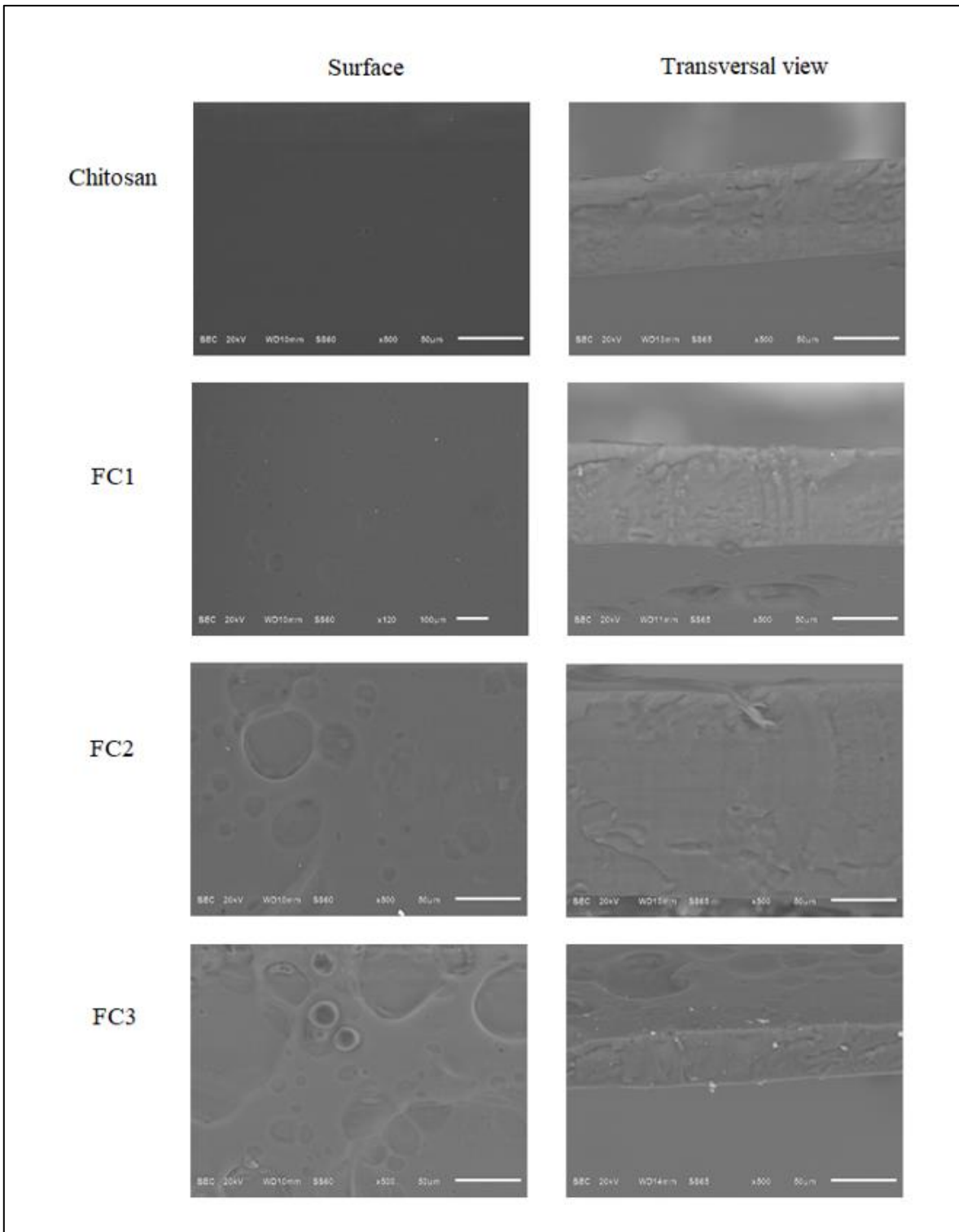


Figura 18. Micrografía SEM de la superficie y parte transversal de las películas de quitosano y las películas con quitosano con diferentes concentraciones de AECv. La barra de medición blanca equivale a 50 micrómetros.

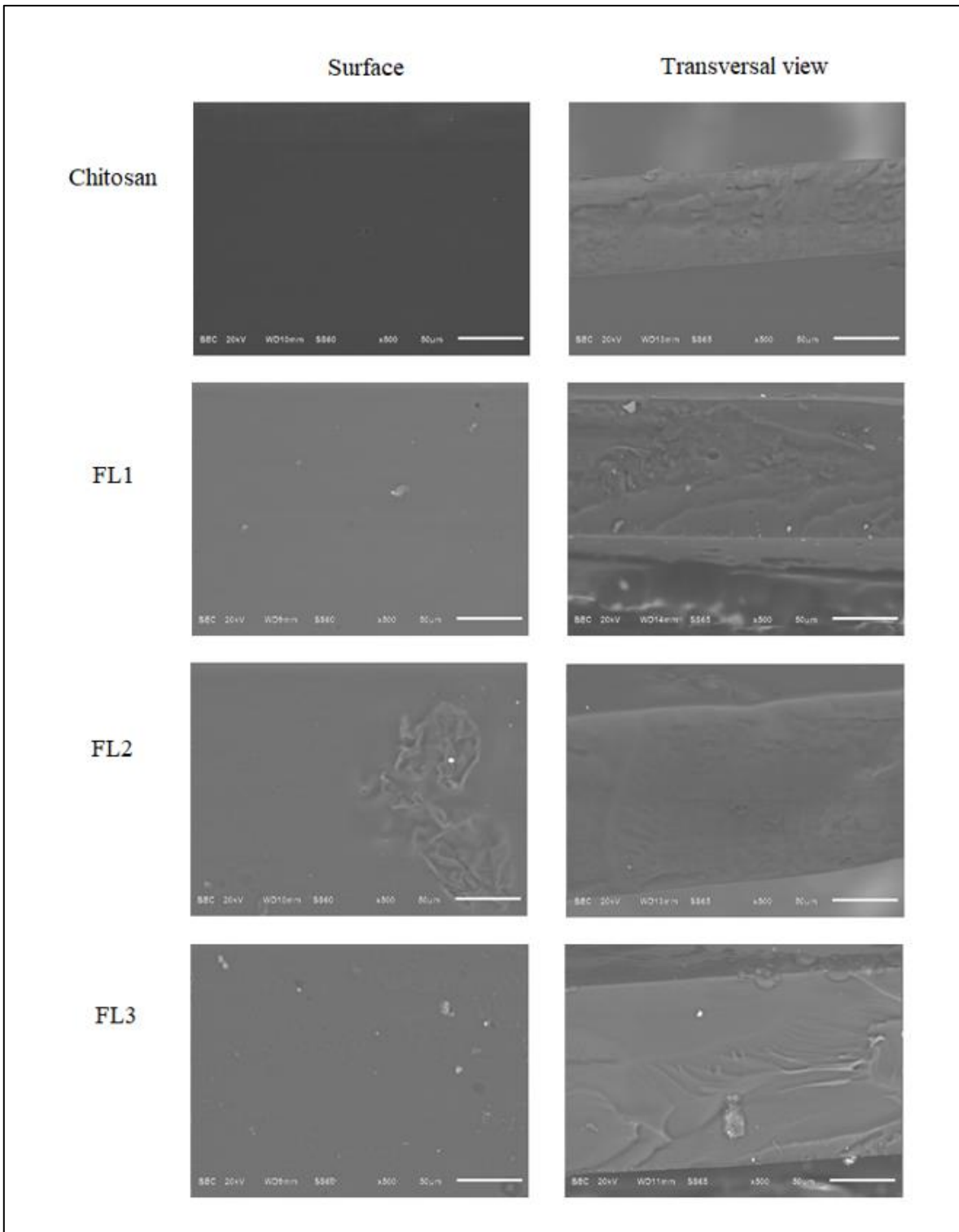


Figura 19. Micrografía SEM de la superficie y parte transversal de las películas de quitosano y las películas con quitosano con diferentes concentraciones de AELg. La barra de medición blanca equivale a 50 micrómetros.

Transmitancia de luz y opacidad

Los resultados de transmitancia (UV-Vis) para películas de quitosano que contienen diferentes cantidades de AECv de canela se muestran en la Figura 18 A. La transmitancia UV (190–390 nm) y luz visible (400–900 nm) fue más baja en las películas que contenían las concentraciones de 0.7 y 1% de AECv (FC1–FC2) en comparación con las de quitosano puro. Se observó una reducción de la transmitancia >70% a 500 nm en las películas que contienen la concentración mayor de AECv. Esto indicó que las películas que contienen el AECv tienen un mejor efecto barrera en comparación a las películas de quitosano puro. Por consiguiente, las películas que contienen mayor concentración de AE mejoraran la eficacia del material para evitar la degradación del fruto al disminuir el contacto con la luz ultravioleta.

Los resultados de opacidad de las películas de quitosano y quitosano con AECv (Figura 20) muestran que la película de quitosano puro presentaba una opacidad menor comparada con los demás tratamientos

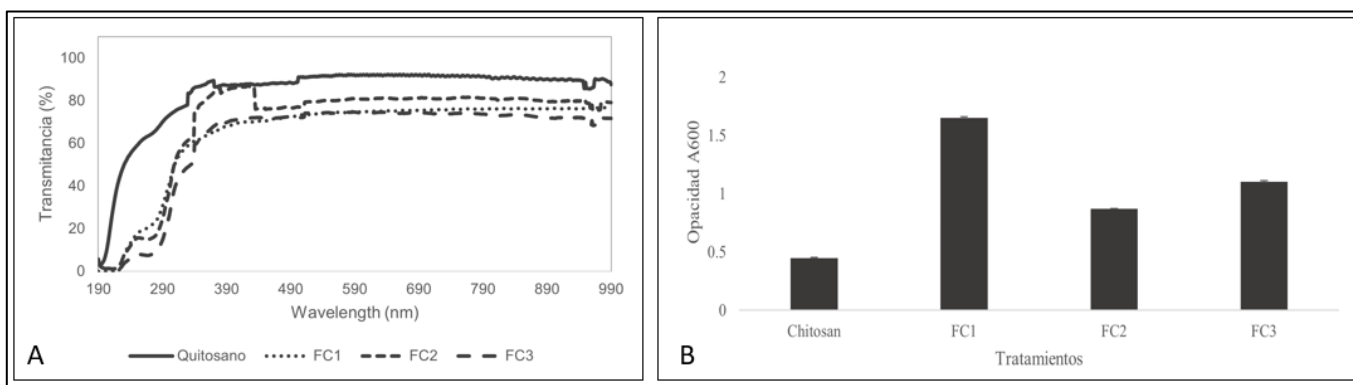


Figura 20. Propiedades ópticas de las películas de quitosano puro y películas conteniendo diferentes concentraciones de AECv (FC1-FC3). A, transmitancia de luz con longitud de onda. B) opacidad de películas hechas con quitosano puro y películas con quitosano combinado con diferentes concentraciones de AECv (FC1-FC3) a 600 nm.

Los resultados de opacidad de las películas de quitosano y quitosano con AELg (Figura 21) mostraron resultados similares a aquellas elaboradas con AECv. Las películas de quitosano puro presentaron una opacidad menor comparada con los demás tratamientos. Sin embargo, los tratamientos de FL1 (0.7%) y FC2 (1%) presentaron una opacidad mayor comparada con el tratamiento de FC3 (1.3%) que es el que presenta una mayor concentración de aceite esencial.

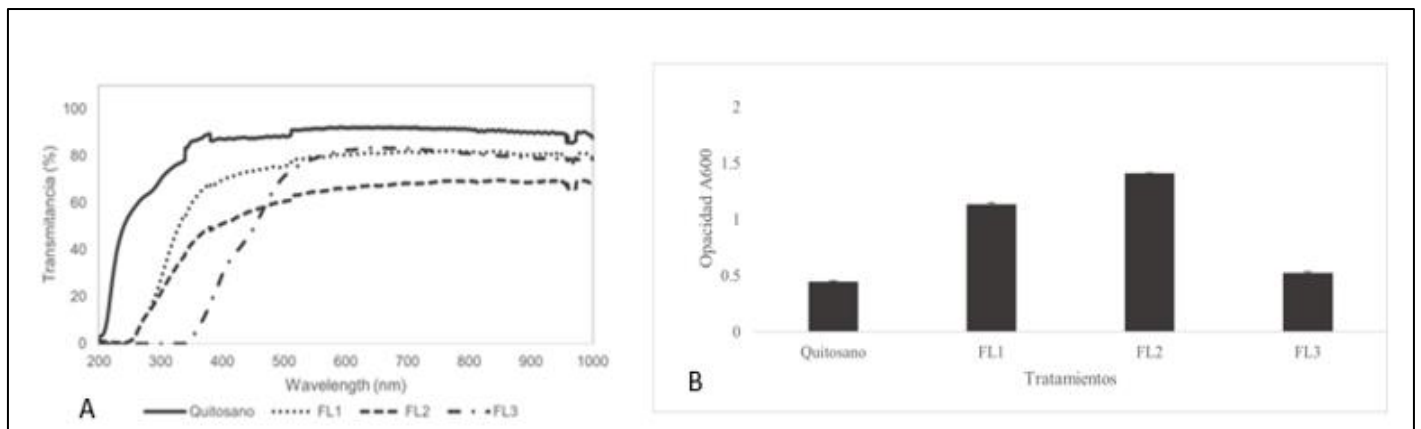


Figura 21. Propiedades ópticas de las películas de quitosano puro y películas conteniendo diferentes concentraciones de AELg (FL1-FL3). A, transmitancia de luz con longitud de onda. B) opacidad de películas hechas con quitosano puro y películas con quitosano combinado con diferentes concentraciones de AELg (FL1-FL3) a 600 nm.

DISCUSIÓN

Para mejorar la apariencia y evitar el deterioro fisiológico de los frutos durante poscosecha es posible la aplicación de diversas técnicas. Para fines de esta investigación se utilizaron recubrimientos de quitosano puro y quitosano con base de aceites esenciales de *Litsea glaucescens* y *Cinnamomum verum* sobre hongos fitopatógenos nativos del tomate verde.

Las películas de quitosano puro en este proyecto demostraron tener eficacia inhibitoria sobre el crecimiento de estructuras reproductivas de los hongos patógenos encontrados en frutos de *Physalis philadelphica*. Sin embargo, Tsai et al. (2002) describen resultados diferentes, debido a que la actividad antimicrobiana del quitosano y su concentración mínima inhibitoria puede variar considerablemente con el tipo de quitosano (α , β -quitosano), grado de desacetilación peso molecular y las condiciones del medio en el que se aplica. Pero también existen trabajos como el de Valenzuela (2012), donde ha reportado que el quitosano también disminuye las reacciones de deterioro de los alimentos cárnicos y lácteos.

El aceite esencial de *Cinnamomum verum* contiene sustancias hidrofóbicas, reconocidas como seguras que poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes, con un potencial alto como conservador natural en la industria alimentaria (Sacchetti et al., 2005). En este proyecto se encontraron los componentes químicos del aceite esencial de canela. Estos fueron el (E)-cinamaldehído (45.9%), eugenol (5.5%), linalool (6.8%) 1,3,8-p-mentatriene (7.9). De igual manera, Rivera et al. (2021), estudiaron los componentes principales del aceite esencial de canela siendo el cinamaldehído (70-80%), seguido del eugenol (4-10%), limoneno (2.42%), acetato de cinamilo (2.03%), linalol (1.16%) y α -terpineol (0.87%) los más abundantes.

En las investigaciones de Singh et al. (2007) y Sanla-Ead et al. (2012) se reporta la evaluación del cinamaldehído que es el componente mayoritario presente en el aceite esencial de canela. Se demostró que posee actividad inhibitoria contra varias especies de hongos y bacterias, incluyendo muchas de relevancia en la industria de alimentos tales como *Salmonella spp*, *Escherichia coli* O157H7,

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus spp.*

La presente investigación demuestra los efectos inhibitorios de *Cinnamomum verum* sobre *Fusarium concentricum*. Montero-Recalde et al. (2017), realizaron un estudio antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*, donde aplicaron un diseño con cinco tratamientos (10, 30, 50, 70, 90% de aceite de canela) y cinco repeticiones. Asimismo, Hernández-López et al. (2018), realizaron un estudio que tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicótico de películas formuladas con quitosano y quitosano combinadas con cera de abeja, ácido oleico y aceites esenciales de tomillo, canela y clavo. Estas fueron evaluadas primeramente como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium digitatum*. Se demostró que las películas a base de quitosano, cera de abeja/ácido oleico y aceites esenciales de canela y clavo adicionadas con concentraciones de 0,1, 0,25 y 0,5 % inhibieron completamente el crecimiento micelial de los cinco hongos. De igual manera Caballero et al. (2016) demostraron que los aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum*) a concentraciones de 0.05 µL, 0.10 µL y 0.20 µL inhiben el crecimiento de microorganismos fúngicos como *Aspergillus flavus*.

De acuerdo a nuestros resultados, el falso laurel (*Litsea glaucescens*), contuvo 1,8-Cineol (46%), dihydrocarveol (23.8%), alfa-pineno (5.1%) y beta-pineno (3.1%). El trabajo de Guzmán Gutiérrez et al. 2012, reporta los componentes principales del aceite esencial encontrando o-cimeno (25,86%), limoneno (8,66%), tepinen-4-ol (5,08%), α-pineno (3,86%), linalool (3,64%), γ-terpineno (2,83 %), β-pineno (2,34 %), (S)-(+)-carvona (1,85 %) y acetato de nerilo (1,35 %) y carveol (1,35 %) como los más abundantes.

En aceite esencial de *Litsea glaucescens* en comparación de *Cinnamomum verum*, no cuenta con trabajos que demuestren su efectividad ante hongos fitopatógenos. Una aproximación es descrita en la investigación de Tapia et al. (2014), en donde

se mencionan dos técnicas histoquímicas para localizar la presencia de compuestos fenólicos como lignina y taninos, así como lípidos y carbohidratos no estructurales en cortes de hoja y de madera de *Litsea glaucescens*. De igual manera, Dávila et al. (2011), nos habla de los usos tradicionales y su potencial de aprovechamiento. Por lo tanto, es importante seguir investigando sobre la importancia antifúngica que tiene *Litsea glaucescens*.

Fusarium concentricum presentó mayor agresividad sobre el tomate verde en comparación a *Clonostachys rosea*. En la investigación de Leslie y Summerell, (2006), se describe que las especies de *Fusarium* se encuentran entre los patógenos de plantas más comunes y extendidos en el mundo y son de gran importancia económica. En cuanto a lo reportado por Ma et al. (2013), las enfermedades causadas por *Fusarium* incluyen marchitez, tizón, pudrición y chancros de muchos cultivos hortícolas, de campo, cultivos ornamentales y forestales en ecosistemas agrícolas y naturales. Muchas especies de plantas se ven afectadas con al menos una enfermedad ocasionada por *Fusarium* spp. (Nelson et al., 1981; Leslie y Summerell, 2006). La American Phytopathological Society informó que 81 de 101 plantas de importancia económica tienen al menos una enfermedad causada por *Fusarium* (APS, 2014).

Los síntomas que presentaron los tomates verdes que fueron inoculados con *Fusarium concentricum*, fue la pérdida de turgencia, crecimiento de micelio hasta cubrir el tomate por completo y pérdida de la firmeza. En el trabajo Huda-Shakirah et al. (2020), se demuestra que *Hibiscus sabdariffa* puede ser colonizado con *Fusarium concentricum* presentando lesiones necróticas irregulares de color marrón en los puntos de la herida. A medida que avanza la enfermedad, las lesiones se hunden, aumentando de tamaño y se tornaron de un color marrón más oscuro, lo que provocaba la aparición de síntomas de manchas y formación de micelio blanco.

Para el caso de *Clonostachys rosea* sobre el tomate verde, este originó pérdida de turgencia en este fruto confirmando su patogenicidad. La investigación realizada por Cota et al. (2018) muestra que *Clonostachys rosea* tiene actividad fungicida contra la producción de moho gris sobre la fresa. De igual manera Flores et al. (2015)

evaluaron la capacidad antagónica de *Clonostachys rosea* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. La actividad antagónica de *C. rosea* se basa en un rápido crecimiento y una rápida colonización del sustrato, degradando paredes celulares del patógeno probablemente por la secreción de numerosos enzimas líticas. De acuerdo a nuestra investigación bibliográfica, nuestra investigación es el primer trabajo en donde se considera a *C. rosea* como potencial patógeno del tomate.

Los resultados de opacidad mostraron que las películas de quitosano puro son menos opacas que las otras películas híbridas. Sin embargo, nuestras películas híbridas con aceite esencial a menor concentración mostraron mayor opacidad en comparación a las películas con mayor concentración de aceite esencial. En comparación al trabajo de Santacruz et al. (2015) en películas comestibles a base de almidón y quitosano mostró que las películas con menor concentración de almidón mostraban valores menores de opacidad en comparación con películas de almidón cuyo valor de opacidad fue mayor. De igual manera en el trabajo de Morales et al. (2022) demostraron que sus películas híbridas que contienen concentraciones más altas de aceite esencial de *Schinus molle*, son más opacas en comparación a las películas que contienen menor concentración de AE.

Los resultados reportados en las pruebas de SEM sugieren que la inclusión de AECv y AELg causa una separación de fases en las soluciones poliméricas que corresponden a la aparición de burbujas o poros en las películas. Bohórquez et al. (2016), realizaron pruebas de microscopía electrónica de barrido (SEM) con películas de quitosano puro y películas con aceite esencial. Los autores encontraron resultados similares en donde las películas de quitosano puro no mostraron irregularidades, mientras que las películas de quitosano con inclusión de AE de tomillo presentaron burbujas y poros en las películas. Li et al. (2019), realizaron pruebas de microscopía electrónica de barrido (SEM) con películas de quitosano puro y películas con aceite esencial demostrando que la estructura transversal de la película de quitosano puro es continua, compacta y uniforme. Sin embargo, la sección transversal de la película de quitosano con aceite esencial de cúrcuma

muestra una heteroestructura en la que las gotas de aceite quedan atrapadas en una red continua de carbohidratos con mayor rugosidad y aparición de cavidades y grietas. La investigación de Altiok et al (2010), coincide en el hecho de que el tamaño y la cantidad de poros también aumenta con el incremento de la concentración de los AE incluidos en las películas de quitosano puro.

Los tratamientos FC3 (1.3% AECv) y FL3 (1.3% AELg) que contenían una mayor concentración de AE, mostraron un claro efecto inhibitorio en el crecimiento de las estructuras reproductivas sobre los hongos *Clonostachys rosea* y *Fusarium concentricum*. Alzate et al. (2009), evaluaron la actividad antifúngica de los AE de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y sus componentes mayoritarios, timol y citral a diferentes concentraciones contra la especie *C. acutatum*. Los resultados revelaron que el timol a 125 mg/L y el citral a 300 mg/L inhiben completamente el crecimiento micelial. De igual manera, Scalvenzi et al. (2016) evaluaron el efecto de los AE de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus*, sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora sp*, donde las concentraciones de AE eran de 10, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{L/mL}$. El aceite de *C. citratus* mostró una significativa actividad antifúngica a la concentración máxima (500 $\mu\text{L/mL}$), mostrando un comportamiento similar que *Citrus limon* que mostro actividad antifúngica con la concentración máxima (500 $\mu\text{L/mL}$). Resultados similares reportados por Taborda et al. (2015), donde evaluaron el efecto fungistático de extractos y AE de *Lippia origanoides* y *Thymus vulgaris* (a concentraciones de 128, 256 y 500 mg/L) sobre el hongo patógeno *Botrytis cinerea*, donde ambos, AE mostraron tener inhibición del crecimiento micelial del hongo a la concentración máxima de 500 $\mu\text{L/mL}$.

Las enfermedades causadas por hongos pueden provocar pérdidas importantes en el rendimiento y la calidad de los frutos y adicionalmente, pueden disminuir la vida útil de las plantas. Dependiendo de la incidencia y severidad, éstos pueden transformarse en factores limitantes para la producción y comercialización de los productos agrícolas, provocando pérdidas económicas a productores y

comerciantes (Redagricola, 2021). Los hongos fitopatógenos de mayor relevancia varían según las prioridades científicas y económicas de una región geográfica. Sin embargo, algunos representan altos riesgos para la seguridad alimentaria y son modelos de estudio en temas relacionados a la inmunología, factores epidemiológicos y genética en plantas (Dean et al., 2012)

Para combatir a los hongos patógenos u otros factores que afecten a las cosechas muchos de los agricultores aplican pesticidas por la necesidad de proteger a sus cultivos, sin tomar en cuenta la toxicidad del producto. Esto conlleva a la contaminación por residuos químicos a los cultivos, lo cual repercute en el suelo, aire y agua. Puerto et al. (2014) mencionan las principales problemáticas de los ocasionados por los pesticidas en el medio ambiente siendo que estos contaminan directamente el medio que lo rodea como son suelos agrícolas, canales de regadío, animales, poblaciones rurales, entre otros. En consecuencia, esto provoca la desaparición de especies nativas de la zona y la destrucción de insectos benéficos, alterando los ecosistemas, lo cual repercute en el clima.

En los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de pesticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana en sustitución de los productos sintéticos. Numerosos componentes del reino vegetal han demostrado ser agentes de control contra un amplio espectro de insectos y microorganismos, lo que puede ser aprovechado para el control de estos (Palacios et al., 2010). Adekambi et al. (2010), reporta que muchos productos naturales con pueden ejercer una actividad de control sobre fitopatógenos con una eficacia y una acción cada vez mayor y más rápida, lo que está causando que estas prácticas sean gradualmente más adoptadas ante un rango de condiciones ambientales.

Lo que se pretendió con este trabajo fue encontrar una alternativa menos dañina al medio ambiente con el uso de extractos naturales que presentan actividad fungistática o fungicida sobre patógenos que afecten a las cosechas de tomate verde. De igual manera los recubrimientos y fungicidas naturales representan un área de investigación importante para buscar alternativas para el control de hongos fitopatógenos. Como un posible beneficio se mantiene la calidad de las cosechas para que se pueda comercializar el producto y que llegue en buen estado a los

clientes finales respetando las normas ecológicas y remplazando agentes tóxicos para el ser humano y el medio ambiente.

Adebayo et al. (2013) sostiene que los fungicidas naturales a partir de aceites esenciales que son una fuente rica en productos químicos bioactivos que tienen diversas propiedades antifúngicas. Por lo general estos productos químicos son útiles contra un número limitado de especies, y a veces son específicos para alguna especie. Además, los aceites esenciales son biodegradables y no tóxicos.

Mesa et al. (2019) Clasificaron el potencial fúngico de extractos vegetales como un punto de partida en el desarrollo de productos cuyo principio activo es un agente natural y que podría contribuir a aminorar los costos de producción para los agricultores. Debido a que se biodegradan rápidamente, no contaminan el ambiente y presentan un bajo costo. De esta manera el desarrollo de biofungicidas requiere equipos multidisciplinarios para optimizar la producción, la eficacia, el almacenamiento y la estabilidad de un producto para que esta tecnología pueda evolucionar y satisfacer las demandas agrícolas de hoy en día.

CONCLUSIONES

- El uso de películas híbridas de quitosano con aceite esencial de *Litsea glaucescens* y *Cinnamomum verum* demostraron tener un efecto fungicida sobre los patógenos dos patógenos de frutos de *Physalis philadelphica* comercializados en Puebla, México.
- Se demuestra por primera vez el efecto antifúngico del AE de *Litsea glaucescens*.
- Se identificó por primera vez a *Clonostachys rosea* como fitopatógeno del tomate verde.
- Las películas con el AE de *Cinnamomum verum* y aquellas conteniendo las concentraciones más elevadas inhibieron el crecimiento de *Clonostachys rosea*, sin embargo, estos materiales redujeron un cambio de color del tomate.
- Las películas con el AE de *Litsea glaucescens* y aquellas conteniendo las concentraciones más elevadas inhibieron el crecimiento de *Clonostachys rosea*.
- El uso de fungicidas naturales es importante para la conservación de los suelos, para prolongar la vida útil de los frutos en el periodo poscosecha y además, representa una opción más económica y segura para consumo humano.

BIBLIOGRAFÍA.

- Agrios GN. Plant pathology/by. En: Agrios GN, editor. Libro. Academic Press; 1988.
- Adekambi S, Adegbola P, Arouna A. Farmers' perception and agricultural technology adoption. The case of botanical extracts and bio-pesticides in vegetable production in Benin. Contributed paper presented at the joint 3rd African Association of Agricultural Economists (AAAE) and 48th Agricultural Economists Association of South Africa (AEASA) conference. 2010.
- Alzate O, Diego A, Mier M GI, Lucía AK, Diego L, García P &. Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. Vol. 16. Vitae; 2009.
- Adebayo O, Dang T, Bélanger A, Khanizadeh S. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. J Food Res. 2013, 217. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v2n1p217>
- Anaya-Esparza LM, Pérez-Larios A, Ruvalcaba-Gómez JM, Sánchez-Burgos JA, Romero-Toledo R, Montalvo-González E. Funcionalización de los recubrimientos a base de quitosano para la conservación postcosecha de frutas y hortalizas. TIP.2020. <http://dx.doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.241>
- American Phytopathological Society. American Phytopathological Society.(citado el 10 de marzo de 2022). <https://www.apsnet.org/search/Pages/results.aspx?k=fusarium>
- Barragán CR, Fornué ED, Ortega JA. Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. Journal Coloquio de Investigación Multidisciplinaria. 2016,769–76.

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. Food and chemical toxicology. 2008,446–75.
- Bello M. Monografía del cultivo de *Physalis philadelphica* Lam. México. 2019,324–8.
- Bohórquez NV, Enciso NAA, Hernández WA. Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero. Matér (Rio Jan). 2016,141–56. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620160001.0013>
- Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea W. Argüelles-Monal; Desbrières. J & Rinaudo, M Polym. 2001.
- Burt; S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int J Food Microbiol. 2004,223–53.
- Caballero C, Villacorta L, Pretell C. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morada. Pueblo Continente. 2016,123–32.
- Cabrera R, Palafox S, Valenzuela AI. Estrategias para el control del hongo fitopatógeno *fusarium* en el sector agrícola: del control químico al control biológico. Frontera Biotecnológica. 2019,20–3.
- Canales D, Montoille L, Rivas LM, Ortiz JA, Yañez-S M, Rabagliati FM, et al. Fungicides films of low-density polyethylene (LDPE)/inclusion complexes (carvacrol and cinnamaldehyde) against *Botrytis cinerea*. Coatings. 2019;9(12):795. <http://dx.doi.org/10.3390/coatings9120795>
- Cañigueral S, Vila R, Wichtl M. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales Para Infusión y Tisana. 1 edición Española. (Traducción de Edición Original:

Teerdrogen: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage).
Española Milán. 1998;606.

- Cavallini LFA. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 1998
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biol Control. 2008;46(3):515–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.023>
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Prot. 2003;39–44. [http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194\(02\)00095-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194(02)00095-9)
- Figueroa D, Flores Tena CA, Morales Domínguez FJ, Clark Tapia F, Pérez Molphe R, Balch E. Estatus poblacional y niveles de aprovechamiento del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) en Aguascalientes. Revista mexicana de ciencias forestales. 2011;47–59.
- Dean R. The Top 10 fungal pathogens. Molecular Plant Pathology. 2012, 414–30. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783>
- Doehlemann G, Ökmen B, Zhu W, Sharon A. Plant pathogenic fungi. Microbiol Spectr . 2017;5(1). <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016>
- El Ghaouth A, Arul J, Wilson C, Benhamou N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. Physiol Mol Plant Pathol. 1994, 417–32. [http://dx.doi.org/10.1016/s0885-5765\(05\)80098-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0885-5765(05)80098-0)
- Rivera MAE, Morales JMJ, Saucedo JO, Sulvarán NJM. Efecto bactericida del aceite esencial de canela contra *Salmonella spp.* RD-ICUAP. 2021 (citado

el 11 de febrero de 2022);7,64–78. <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/505>

- Fernandez-Saiz P, Lagarón JM, Ocio MJ. Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. J Agric Food Chem. 2009, 3298–307. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8037709>
- Flores W, Chico J, Cerna L. Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea*. REBIOL. 2015, 34–42.
- García C, Montero G, Coronado MA, Valdez B, Stoytcheva M, Rosas N, et al. Valorization of eucalyptus leaves by essential oil extraction as an added value product in Mexico. Waste Biomass Valorization. 2017,1187–97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-016-9695-x>
- Gende BL, Floris I, Fritz R, Eguaras MJ. Antimicrobial activity of cinnamon (*cinnamomun zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus* larvae from Argentine. Bulletin of Insectology. 2008;61(1):1–4.
- Gutiérrez C, Consuelo DM. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales en la calidad microbiológica de mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente procesado. Vol. 19. Vitae; 2012.
- Guzmán-Gutiérrez SL, Gómez-Cansino R, García-Zebadúa JC, Jiménez-Pérez NC, Reyes-Chilpa R. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. J Ethnopharmacol.2012,673–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.026>
- Hafsa J, Smach MA, Ben Khedher MR, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H, et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. Lebenson Wiss Technol. 2016, 356–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.050>

- Hernández-López M, Guillén-Sánchez J, Bautista-Baños S, Guillén-Sánchez D. Evaluation of biodegradable films for postharvest control of fungi in papaya. *Cultivos Tropicales*. 2018,52–60.
- Hernández-Ochoa L, Gonzales-Gonzales A, Gutiérrez-Mendez N, Muñoz-Castellanos LN, Quintero-Ramos A. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista mexicana de ingeniería química*. 2011,455–63.
- Inecol.mx. (citado el 09 de marzo de 2022). <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1320-activando-fungicidas-naturales-usando-luz-sola>
- Koeck M, Hardham AR, Dodds PN. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection: Effectors of biotrophic fungi. *Cell Microbiol*. 2011,1849–57. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01665.x>
- Kurita K, Kaji Y, Mori T, Nishiyama Y. Enzymatic degradation of beta-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation". *Carbohydrate Polymers*. 2000,19–21
- Huda-Shakirah AR, Nur-Salsabila K, Mohd MH. First report of *Fusarium concentricum* causing fruit blotch on roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Australas Plant Dis Notes*.2020: <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-020-00385-w>
- Leceta I, Guerrero P, Ibarburu I, Dueñas MT, de la Caba K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *J Food Eng*. 2013, 889–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual*. Vol. 387. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2006.

- Li Z, Lin S, An S, Liu L, Hu Y, Wan L. Preparation, characterization and anti-aflatoxigenic activity of chitosan packaging films incorporated with turmeric essential oil. *Int J Biol Macromol.* 2019,420–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.169>
- Luna-Vega MI. *Litsea glaucescens*. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana. Herbario FCME, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. 2003,1–5
- Ma L-J, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol.* 2013,399–416. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem* 2005;91,621–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Stashenko EE, Martínez JR, Durán DC, Córdoba Y, Caballero D. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat.* 2014,89. <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.156>
- Magos C. Cáscaras del tomate verde tienen varias propiedades. *Agromarketing.mx.* 2019 (citado el 11 de marzo de 2022). <https://www.agromarketing.mx/sectores/cascaras-del-tomate-verde-tienen-varias-propiedades/>
- Mesa VAM, Marín P, Ocampo O, Calle J, Monsalve Z. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *RIA Revista de investigaciones agropecuarias.* 2019,23–30.

- Medvecká, V., Mošovská, S., Mikulajová, A., Valík, L., & Zahoranová, A. (2020). Cold atmospheric pressure plasma decontamination of allspice berries and effect on qualitative characteristics. *European Food Research and Technology*, 246, 2215–2223. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03566-0>
- Moisa C, Lupitu A, Pop G, Chambre DR, Copolovici L, Cioca G, et al. Variation of the chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oils by phenological stages. *Rev chim.*2019,633–7. <http://dx.doi.org/10.37358/rc.19.2.6973>
- Molnár O, Bartók T, Szécsi Á. Occurrence of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium musae* on banana fruits marketed in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2015, 109–19. <http://dx.doi.org/10.1556/030.62.2015.2.2>
- Montero-Recalde M, Revelo I. J, Avilés-Esquivel D, Valle V. E, Guevara-Freire D. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de *Salmonella*. *Rev Investig Vet Peru.* 2017;28(4):987–93. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13890>
- Morales-Rabanales QN, Coyotl-Pérez WA, Rubio-Rosas E, Cortes-Ramírez GS, Sánchez Ramírez JF, Villa-Ruano N. Antifungal properties of hybrid films containing the essential oil of *Schinus molle*: Protective effect against postharvest rot of tomato. *Food Control.* 2022;134(108766):108766. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108766>
- Neish GA, Nelson PE, Toussoun TA, Clark RJ. *Fusarium*: Diseases, biology, and taxonomy. *Mycologia.* 1983,190. <http://dx.doi.org/10.2307/3792947>
- Pacheco-Hernández Y, Santamaría-Juárez JD, Hernández-Silva N, Cruz-Durán R, Mosso-González C, Villa-Ruano N. Essential oil of *Lepidium virginicum*: Protective activity on anthracnose disease and preservation effect on the nutraceutical content of tamarillo fruit (*Solanum betaceum*). *Chem Biodivers.* 2021, e2000941. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202000941>

- Palacios SM, Carpinella MC, Bertoni AO, Díaz Napal G, Rossi Y, Ruiz GM, et al. Búsqueda de pesticidas naturales aplicables a la producción orgánica: Aislamiento e identificación de principios insecticidas y herbicidas en *Flourensia oolepis* y *Dolichandra cynanchoides* y desarrollo de un insecticida natural contra moscas. 2010.
- Pradhita M, Masruri M, Rahmana MF. Study catalytic oxidation of α -pinene using hydrogen peroxide-iron (iii) chloride. En: Proceedings of the Conference of ICPESS Indonesia. 2015. p. 20–2.
- Pérez-Moreno L, Rico-Jaramillo E, Sánchez-Pale JR, Ascencioibáñez JT, Díaz-Plaza R, Rivera-Bustamante RF. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 2004.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. Science. 2006;808–11. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1118510>
- Puerto Rodríguez AM, Suárez Tamayo S, Palacios Estrada DE. Efecto de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y epidemiología. 2014.
- Enfermedades causadas por hongos y su manejo - Redagrícola Chile. Redagrícola Chile. 2017 (citado el 5 de febrero de 2022). <https://www.redagricola.com/cl/enfermedades-causadas-hongos-manejo/>
- Rodríguez AT, Morales D, Ramírez MA. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. Cultivos tropicales. 2000;79–82.

- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Gob.mx. (citado el 07 de marzo de 2022). <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/crecen-exportacionesinternacionales-de-tomate-verde-hecho-en-mexico>.
- Sanla-Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, Suppakul P. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films: Aactivity cinnamaldehy de & eugenol. Packag Technol Sci.2012,7–17. <http://dx.doi.org/10.1002/pts.952>
- Santacruz S, Rivadeneira C, Castro M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. Food Hydrocoll. 2015,89–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.019>
- El portal único del gobierno. Gob.mx. [citado el 11 de marzo de 2022]. <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/tomate-verde-ingrediente-esencial-de-la-comidamexicana?idiom=es>
- Scalvenzi L, Camacho BY, Guerrini A, Radice M, Chiurato M. Efectos de los aceites esenciales amazónicos de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. Revista Amazónica Ciencia y Tecnología. 2016,206–17.
- Schulz H, Özkan G, Baranska M, Krüger H, Özcan M. Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. Vib Spectrosc.2005,249–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.04.009>
- Shen Z, Kamdem DP. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. Int J Biol Macromol .2015,289–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>
- Singh G, Maurya S, De Lampasona MP, Catalan CAN. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark

volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol.* 2007,1650–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.031>

- Tapia-Torres NA, De la Paz-Pérez-Olvera C, Román-Guerrero A, Quintanar-Isaías A, García-Márquez E, Cruz-Sosa F. Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hoja y de madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). *Madera bosques.* 2014,125–37. <http://dx.doi.org/10.21829/myb.2014.203157>
- Taborda Andrade LA, Sanchez Orozco MS, Bonilla Correa CR, Huertas Davey C. Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia organoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. *Acta Agron.* 2014,93–9. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n1.35773>
- Tripathi P, Dubey NK. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol Technol.* 2004,235–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005>
- Tsai G-J, Su W-H, Chen H-C, Pan C-L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish Sci.*2002,170–7. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00404.x>
- Valenzuela C, Arias JI. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. En: *Avances en ciencias veterinarias.* 2012.
- Vargas A, Bottia E. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies Vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el Peñón - Santander, Colombia; 2008.

- Vargas-Ponce O. Potencial alimenticio de los tomates de cáscara (*Physalis spp.*) de México. Agro Productividad. 2015.
- Xoca-Orozco L-Á, Cuellar-Torres EA, González-Morales S, Gutiérrez-Martínez P, López-García U, Herrera-Estrella L, et al. Transcriptomic analysis of avocado Hass (*Persea americana* mill) in the interaction system fruit-chitosan-Colletotrichum. Front Plant Sci. 2017,956. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00956>

ANEXOS

Abreviaturas

AE= Aceite esencial

AECv= Aceite esencial de *Cinnamomum verum*

AELg= Aceite esencial de *Litsea glaucescens*

FT-IR= Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Secuenciación del ITS

ID	Identificado como	Total, de bases comparadas	Query coverage %	Maxima identidad %	Secuencia
MG489 962.1	<i>Fusarium concentricum</i>	941	72%	100%	>H220207-057_I21_10_ITS4.ab1 700 CGGATTTCTACCTGATCCGA GGTCACATTCAGAAGTTGGG GGTTTAACGG CTTGGCCGCGCCGCGTACC AGTTGCGAGGGTTTTACTAC TACGCAATGGA AGCTGCAGCGAGACCGCCA CTAGATTTTCGGGGCCGGCT TGCCGCAAGGGC TCGCCGATCCCCAACACCAA ACCCGAGGGCTTGAGGGTT GAAATGACGCT CGAACAGGCATGCCCGCCA GAATACTGGCGGGCGCAAT GTGCGTTCAAAG ATTCGATGATTCACTGAATT CTGCAATTCACATTACTTATC GCATTTTGC TGCGTTCTTCATCGATGCCA GAACCAAGAGATCCGTTGTT GAAAGTTTTG ATTTATTTATGGTTTTACTCA GAAGTTACATATAGAAACAG AGTTTAGGG GTCTCTGGCGGGCCGTCC CGTTTTACCGGGAGCGGGC TGATCCGCCGAG

					GCAACAATTGGTATGTTAC AGGGGTTTGGGAGTTGTAAA CTCGGTAATG ATCCCTCCGCAGGCACCCT ACGGAAACTCAGTTGATCGT TGCTACTCCCA ACCCATACGAACATCACACG TCAACGGGGCTTCATGAGG TTTGACAAGAG AAATGGGCAATCCCGCCGC AAGCCCTTTACATTTTCCT GTTTACGAGTT GTTCTGCCAAAATAAGATTC GACAATGATCCTTCCTCACG TTTAGGCTAC
--	--	--	--	--	--

ID	Identificado como	Total , de bases comparadas	Query coverage %	Maxima identidad %	Secuencia
JQ4 113 81.1	Clonostachys rosea	948	94%	99.81%	>H220207- 057_M21_12 ITS4.ab1 700 CGTAAATCTACCTGATCTGAG GTCACCTTGGAAGTTGGGGG TTTAACGGC AGGGGCTCGTCGCTCTCCGA TGCGGAATATCACTACTTCGC AGGGGAGGC CACGACGGGTCCGCCACTAG ATTTAGGGGCCGGCCGTCCC TCGCGGGCTT TGGCCGATCCCCAACACCAC GCCCTAGGGGCATGAGGGTT GAAATGACGC TCAGACAGGCATGCCCGCCA GAATACTGGCGGGCGCAATG TGC GTTCAA GATTCGATGATTCACTGAATT CTGCAATTCACACTTATC GCATTTTCG CTGCGTTCTTCATCGATGCCA GAACCAAGAGATCCGTTGTTG AAAGTTTT TATTTATTTGTAAAACTACTC AGAAGATTCCAAAATAAAACA AGAGTTA

					AGTTTCCTAGGCGGGCGCCT GATCCGGGGCACACGAGGCG CCCGGGGCAA TCCCGCCGAAGCAACAGTAG GTATGTTACATGGGTTTGGG AGTTGTAAA CTCGGTAATGATCCCTCCGCA GGCCCCCCCCTACGGGGAGG ATCATTACC GAGCTTACAACCTCCGATACCC ATGTGAACATACCTGCGTTGC TCGGCGGT TGCCCCGGGCGCCCCGGTGC CCCGGACAGCGCCGCTGGAA CTAAATTGTT TTATTGGAATCTCTAGTAGTTT TTACAATATAAACTTTCGACAC GACTTG
--	--	--	--	--	--