



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Películas antifúngicas para la conservación de los nutraceuticos del
limón persa (*Citrus latifolia*) producido en el estado de Puebla.

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JUAN DANIEL EVANGELISTA CASTRO

DIRECTOR:

Dr. Nemesio Villa Ruano

Codirectora:

Dra. Yesenia Pacheco Hernández

Puebla, Pue, 8 de Junio del 2023



DIRECTOR: _____

DR. NEMESIO VILLA RUANO

CODIRECTORA: _____

DRA. YESENIA PACHECO HERNÁNDEZ

Puebla, Pue, 8 de Junio del 2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindarme mi formación académica y a todos mis profesores que tuve en la carrera, que me dejaron una gran experiencia.

Le agradezco al Dr. Nemesio Villa Ruano por ser mi director de tesis por el apoyo que me ha dado para la realización de este trabajo por dirigirme y por confiar en mí.

También agradezco al CUVyTT-BUAP por abrirme las puertas y permitirme hacer mi tesis en sus instalaciones.

A mis familiares y amigos de universidad que me apoyaron en este transcurso de la carrera, que eran los que me daban palabras de aliento cuanto las situaciones se ponían de color gris.

A la M.C Wendy Abril Coyotl Pérez por ser una de las personas que me compartió su conocimiento y por tenerme paciencia conmigo en el aprendizaje.

Al Ingeniero Juan Manuel Mendoza Reyes por su ayuda en la recolección de las muestras en el municipio de Ayotoxco de Guerrero en Puebla.

Dedicatoria

Le quiero dedicar este trabajo a mi segunda mamá †Agustina Hernández Ángel que hace poco partió de esta vida, ella fue la que vio por mí desde que era pequeño y siempre motivándome a tomar las decisiones, sin tener miedo.

Le dedico este trabajo a mi madre Felipa Castro Hernández por creer en mí y tener su apoyo en todo momento y sin ella no podría estar cumpliendo este sueño.

También quisiera dedicarle este trabajo a mi hermana Faviola Evangelista Castro que me estuvo apoyando en la carrera motivándome a seguir adelante con mis estudios.

ÍNDICE

	RESUMEN.....	10
1.	INTRODUCCIÓN.....	11
2.	ANTECEDENTES.....	13
2.1	Características del limón persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	13
3.2	Taxonomía de limón persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	12
2.3	Ciclo biológico del limón persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	14
2.4	Contenido nutricional	14
2.5	Importancia.....	15
2.6	Producción de limón persa en México.....	16
2.7	Pérdidas postcosecha.....	17
2.8	Los principales hongos patógenos postcosecha de los cítricos	18
2.9	Moho verde por <i>Penicillium digitatum</i> Pers	19
2.10	Antracnosis por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz	20
2.11	Aceites esenciales.....	20
2.12	Hidrodestilación.....	21
2.13	<i>Litsea glaucescens</i> Kunth.....	21
2.14	Quitano.....	23
2.15	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	23
2.16	Microscopios Electrónicos de Barrido (SEM).....	24
2.17	Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FT-IR)	24
2.18	Transmitancia y Opacidad.....	24
3.	JUSTIFICACIÓN	25
4.	HIPÓTESIS	26
5.	OBJETIVO.....	27
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	27
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	28

6.1	Sitio de muestreo.....	28
6.2	Recuperación y aislamiento de hongos de los Limones Persa.....	28
6.3	Cámara húmeda.....	29
6.4	Aislamiento y purificación de hongos en medio de cultivo.....	29
6.5	Preparación de medios.....	29
6.6	Pruebas antifúngicas <i>in vitro</i>	30
6.7	Pruebas antifúngicas <i>in situ</i>	30
6.8	Parámetro de calidad (Firmeza).....	31
6.9	Preparación de microcultivos.....	31
6.10	Microscopia.....	31
6.11	Identificación molecular de cepas fitopatógenas.....	31
6.12	Obtención de aceites esenciales.....	32
6.13	Caracterización química del aceite esencial	32
6.14	Elaboración de películas híbridas	32
6.15	Caracterización FT-IR, SEM de las películas	33
6.16	Evaluación de Opacidad y Transmitancia.....	33
6.17	Análisis estadístico	33
7.	RESULTADOS.....	34
7.1	Recuperación y aislamiento de hongos de los limones persa.....	34
7.2	Pruebas de patogenicidad.....	35
7.3	Pruebas de identificación físicas y moleculares de cepas fitopatógenas.....	38
7.4	Extracción de aceites esenciales.....	42
7.5	Caracterización química GC-MS.....	43
7.6	Elaboración de Películas híbridas.....	45
7.7	Caracterización por FT-IR y SEM.....	46
7.8	Evaluación de transmitancia y opacidad.....	49
7.9	Evaluación de materiales <i>in situ</i>	50
7.10	Pruebas antifúngicas <i>in vitro</i>	53

7.11	Parámetro de calidad	54
8.	DISCUSIÓN	56
9.	CONCLUSIÓN.....	61
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
11.	ANEXOS.....	72
12.1	Abreviaturas.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Taxonomía del limón persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) Fuente: IPNI (2022)...	13
Tabla 2.	Composición química del limón (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) Fuente: Vanegas (2002).....	15
Tabla 3.	Producción de limón persa en el 2021. Fuente: SIAP (2021)	16
Tabla 4.	Enfermedades por hongos fitopatógenos de cítricos Fuente: Álvarez (1981); Besoain et al. (1994); Brown y Miller (1999), Timmer et al. (2000).....	18
Tabla 5.	Taxonomía <i>Litsea glaucescens</i> Kunth Fuente: Tropicos (2023).....	22
Tabla 6.	Composición química de <i>Litsea glaucescens</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico del limón persa. Fuente: Elaboración propia JD Evangelista....	14
Figura 2.	Limones persas afectados por <i>Penicillium digitatum</i> . Fotografía: Propia JD Evangelista.....	19
Figura 3.	limón persa afectados por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Fotografía: Propia JD Evangelista.....	20
Figura 4.	Planta de <i>Litsea glaucescens</i> Kunth. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	22
Figura 5.	Ubicación del sitio de colecta del limón persa en el Municipio de Ayotoxco de Guerrero en el estado de Puebla. Fuente: Elaboración propia JD Evangelista.....	28
Figura 6.	Cultivo de limón persa en el municipio de Ayotoxco de Guerrero, Puebla. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	29
Figura 7.	Cámara húmeda con tejido vegetal del limón persa reservados en el recipiente de plástico. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	34

Figura 8.	Morfología de las 8 cepas de hongos, obtenidas en limones enfermos. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	35
Figura 9.	Pruebas de patogenicidad de 8 cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de limón persa. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	36
Figura 10.	Segundas pruebas de patogenicidad con 2 cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de limón persa. Fotografía: Propia JD Evangelista..	37
Figura 11.	Microscopio Binocular marca Primo Star Carl Zeiss.A1. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	38
Figura 12.	Alineamientos de <i>Penicillium digitatum</i> ITS. A) Resultados de alineamiento de <i>Penicillium digitatum</i> con ITS y B) tubulina. Fuente: (NCBI) Elaboración propia. JD Evangelista.....	39
Figura 13.	A) Cepa de <i>Penicillium digitatum</i> en PDA. B) Conidios en microcultivos teñidos con azul de algodón a 50X. C) Conidios a 100x: Fotografía: Propia JD Evangelista.....	40
Figura 14.	A) Alineamientos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> con ITS y B) beta-Tubulina. Fuente: (NCBI) Elaboración propia. JD Evangelista.....	41
Figura 15.	A) Cepa de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . B) Hifas y conidióforos observados a 50X. C) Conidióforos con conidios liberados observados a 100X. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	42
Figura 16.	A) Hojas de <i>Litsea glaucescens</i> Kunt. B) Extracción de aceite esencial. C) hidrodestilación por arrastre de vapor en un equipo Clevenger de 5L. Fotografía: Propia JD Evangelista.	43
Figura 17.	Cromatograma de GC-MS del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> . Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.....	43
Figura 18.	Figura 18. A) Película de quitosano sin aceite esencial. B) Película híbrida compuesta por quitosano y AE al 0.7%. C) Película híbrida compuesta por quitosano y AE al 1%. D) Película híbrida compuesta por quitosano y AE al 1.3%. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	46

Figura 19.	A) FT-IR del aceite esencial del falso laurel, quitosano y quitosano más glicerina. B) FT-IR de las películas híbridas de quitosano y aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> . Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.....	47
Figura 20.	Micrografías A) Vista superficial de las películas B) Vista transversal de las películas. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	48
Figura 21.	A) Transmitancia de las películas de quitosano y películas híbridas elaboradas con quitosano y AE de <i>Litsea glaucescens</i> (FL1-FL3). B) Opacidad de las películas de quitosano puro y películas híbridas con quitosano y AE de <i>Litsea glaucescens</i> (FL1-FL3) Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.....	49
Figura 22.	Evaluación de películas de quitosano y en combinación con aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> FL1 (0.7%), FL2 (1%) y FL3 (1.3%) contra <i>Penicillium digitatum</i> Fotografía: Propia JD Evangelista.....	51
Figura 23.	Evaluación de películas de quitosano y en combinación con aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> FL1 (0.7%), FL2 (1%) y FL3 (1.3%) contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Fotografía: Propia JD Evangelista.....	52
Figura 24.	Concentración inhibitoria mínima (MIC) de aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> en discos de hifas de <i>Penicillium digitatum</i> (L1) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (L4) obtenidos por el método de microdilución en caldo utilizando resazurina como control de viabilidad celular. Fotografía: Propia JD Evangelista.....	53
Figura 25.	Evaluación de firmeza en limones infectados con <i>Penicillium digitatum</i> vs limones cubiertos con películas de quitosano con aceite esencial de falso laurel (<i>Litsea glaucescens</i>) Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.....	55
Figura 26.	Evaluación de firmeza en limones infectados con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> vs limones cubiertos con películas de quitosano con aceite esencial de falso laurel (<i>Litsea glaucescens</i>) Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.....	56

RESUMEN

México se caracteriza por poseer una gran diversidad de climas lo que le permite cultivar una serie de alimentos, los cuales exporta beneficiando a la economía del país. Nuestro país se destaca por la producción del limón persa que tiene una gran demanda de consumo siendo representativo en la gastronomía mexicana. Su comercialización destaca en el mercado interno, pero también en el exterior como Holanda, Alemania, Italia, Austria, Suiza y EUA. Sin embargo, como todo producto agrícola su calidad tiende a decrecer por el ataque de agentes infecciosos como los hongos esto durante el periodo postcosecha. Estos pueden provocar un problema económico severo, pues generan entre el 30% y 40% de pérdidas en su producción. En el presente trabajo se identificaron 2 hongos fitopatógenos por secuenciación de ADN que están asociados a la pérdida de calidad del fruto del limón persa los cuales fueron recolectados en parcelas de Ayotoxco de Guerrero, en el estado de Puebla, México. De acuerdo con estas pruebas moleculares, los agentes causales fueron *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Dichos fitopatógenos mostraron sensibilidad al aceite esencial de *Litsea glaucescens* a una concentración mínima inhibitoria (MIC) que va desde 1.52 mg/mL a 6.08 mg/mL. Con este aceite, se elaboraron 4 películas híbridas hechas de quitosano puro al 1% y quitosano conteniendo 0.7% (FL1), 1.0 (FL2) y 1.3 % (FL3) p/v de del aceite esencial de *L. glaucescens*. Estos materiales fueron caracterizados por distintas técnicas analíticas como FT-IR, SEM y UV-VIS para determinar su consistencia, grosor, opacidad y transmitancia. Como resultado final se observó que las películas FL2 y FL3 ejercieron un potente efecto fungistático en limones inoculados con ambos fitopatógenos de manera diferencial. Para el caso de *Penicillium digitatum* se observó una protección de hasta 6 días post-inoculación, mientras que para *Colletotrichum gloeosporioides* no se observó emergencia de síntoma alguno después de 10 días post-inoculación. Se concluye que estos materiales biodegradables pueden extender de manera significativa la vida de anaquel del limón persa infectado con dos fitopatógenos más comunes.

PALABRAS CLAVE: limón persa, hongos fitopatógenos, *Litsea glaucescens*, aceite esencial, películas híbridas, vida de anaquel.

I INTRODUCCIÓN

Debido a su vasto territorio, México cuenta con una amplia gama de climas que le otorgan una riqueza biológica diversa, lo que lo convierte en un productor agrícola con una gran variedad de cultivos, tanto para el consumo interno como para la exportación a otros países. En la actualidad, México se ha destacado como uno de los principales exportadores de cítricos a nivel mundial, ya que la demanda de estos frutos ha ido en aumento en los últimos años (Ruiz *et al.*, 2017).

El limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) es el cultivo más importante dentro de las limas y limones en México. Los principales estados productores de limón persa son Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Yucatán y Puebla. El estado de Puebla tiene como producción al año 50 mil toneladas de limón pues se estima que de las 5 mil hectáreas que están sembradas, por cada una hectárea se obtiene un total de 12 y 15 toneladas aproximadamente, esto en la Sierra Norte y Nororiente del estado, los principales municipios en producción del limón persa son Ayotoxco de Guerrero, Tenampulco, Hueytamalco, San José Acateno, en la Sierra Nororiental, Francisco Venustiano Carranza y Xicotepec (SAGARPA, 2019).

En el año 2008, México destacó como uno de los principales países exportadores de frutas, incluyendo algunas muy populares como aguacate, mango, papaya y limones persa (*Citrus latifolia*). De estas, los Limones persas representaban el 70% del mercado mundial y aportaban el 9.7% del valor total de las exportaciones frutales, mientras que el limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm) contribuía con solo el 1.16% de las exportaciones totales de frutas. Es importante destacar que estos dos tipos de limones tenían como objetivo principal ser comercializados en Estados Unidos y Japón, debido a que estos países son grandes consumidores de limones (FAO, 2009). Actualmente, México ocupa el segundo lugar en términos de exportaciones con un 12.29%. Esta actividad tiene un importante impacto en la economía nacional, ya que el PIB agrícola de México es del 2.78%, y el PIB del limón representa el 1.5% de este total. Por lo tanto, se puede concluir que la producción y exportación de limones sigue siendo una actividad económica importante para México (SAGARPA, 2017).

Regularmente los frutos pasan por un estado de postcosecha en el cual se pueden generar enfermedades esto afectando al producto. Hay 2 tipos de enfermedades, las no infecciosas o abióticas (fisiogénicas), estas enfermedades se desarrollan por los factores que presenta el ambiente, como la humedad y temperatura. Y por otra parte están las enfermedades infecciosa o biótica (patogénicas) las cuales son causadas por organismos patógenos como los hongos, bacterias, virus, viroides, fitoplasmas y nemátodos (Mangione, 2016). Diversos estudios realizados demuestran que los hongos llegan a reducir el periodo de vida de los cítricos, los principales hongos que se han encontrado son *Penicillium digitatum* Pers, *Penicillium italicum* Wehmer, *Alternaria citrib* Ellis & N, *Alternaria alternata* Fries, *Botrytis cinérea* Pers, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Geotrichum candidum* Link, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb, *Rhizopus oryzae* Went & Prins y *Phytophthora citrophthora* R.E. Sm. & E.H. Sm (Palou, 2007).

Esto hace que se encuentre un interés en estos hongos, debido a que son los responsables de que se pierdan toneladas de cítricos, ya que se estima que del 100% de cosecha en todo el mundo un 40% son desechos de producto que se echa a perder (Lezama *et al.*, 2018). Los fungicidas sintéticos son los más usados convencionalmente por los productores para controlar patologías postcosecha. Dichos productos han resultado ser ineficientes inmediatamente pues favorecen el desarrollo de patógenos resistentes, teniendo efectos negativos extras en la salud humana, animal y ambiental (Bokschi *et al.*, 2007).

Los aceites esenciales que presentan las plantas poseen la característica de atraer a insectos y animales, esto para la polinización, pero también sirven para ahuyentar a los depredadores y parásitos que les puedan causar enfermedades, esta cualidad resulta ser interesante para la industria alimenticia, pues algunos de estos aceites tienen la capacidad de combatir contra bacterias, hongos y virus (Günther, 1948). Es necesario explorar nuevas alternativas para reducir los niveles de uso de químicos sintéticos en la agricultura y reemplazarlos por opciones más naturales. Una de estas alternativas son los aceites esenciales, los cuales han demostrado resultados prometedores en estudios previos contra hongos fitopatógenos (Necha y Barrera, 2008).

II ANTECEDENTES

2.1 Características del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka)

El limón persa (*Citrus latifolia*) se caracteriza por no poseer semillas y no tener un sabor tan agrio. Es de un árbol perenne, es un híbrido el cual se obtuvo con la combinación de *Citrus medica* Linneo x *Citrus aurantium* Linneo, estos árboles llegan a tener alturas de hasta 7m pero en la producción pasan por procesos de podas para reducir los tamaños para que el fruto pueda ser recolectado fácilmente. Este fruto tiene un porcentaje mayor de vitamina C a comparación que el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). El árbol presenta espinas en las ramas llegando a medir de 6 a 10 mm (Gómez *et al.*, 2005).

C. latifolia posee hojas unifoliadas en forma elíptica, son peciolada y alternas, las ramas jóvenes tienen hojas con un color verde claro y pasan a un color verde oscuro cuando ya son maduras. El limón que presentan va desde los 7 a los 13 cm de largo y de ancho va desde los 4 a 6 cm. El Limón persa en estado de desarrollo presenta un color verde oscuro y este color lo mantiene hasta el lapso de la cosecha, con el tiempo cambia de color y pasa de un verde oscuro a un amarillo claro (Vanegas, 2002).

2.2 Taxonomía de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka)

Tabla 1. Taxonomía del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) Fuente: IPNI (2022).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	<i>Citrus</i>
Especie	<i>Citrus latifolia</i> Tanaka (Kwaju Bunruigaku 1951).

2.3 Ciclo biológico del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka)

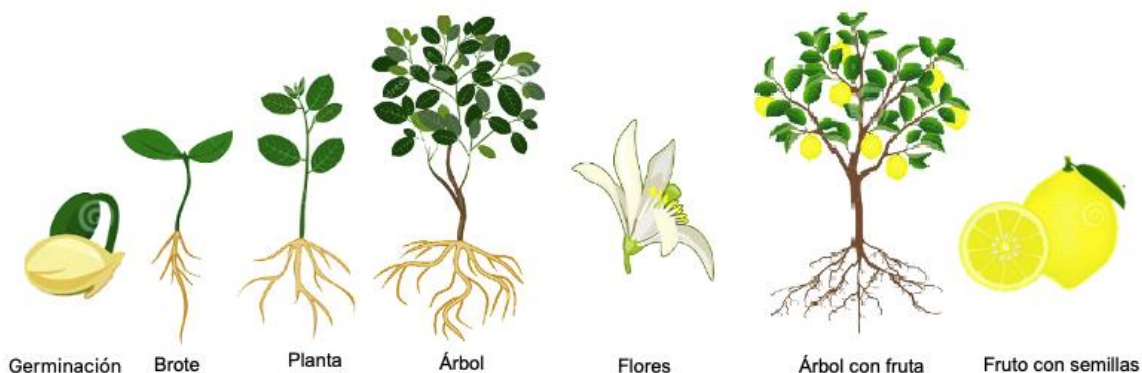


Figura 1. Ciclo biológico del limón persa. Fuente: Elaboración propia JD Evangelista.

Hoy en día se busca que las plantas de limón tengan un proceso de certificación debido a que esté libre de posibles enfermedades como el Huanglongbing (Dragón amarillo) o el virus de la tristeza de los cítricos. Por eso se recomienda que las plantas de limón sean trasplantadas con una altura de 30 cm (Medina-Urrutia *et al.*, 2001).

Los suelos donde se recomienda sembrar este cultivo son franco-arenosos con gran cantidad de materia orgánica con pendiente. También se sugiere no utilizar suelos salinos debido a que las plantas no pueden aprovechar el Hierro, zinc, Magnesio y Manganeso, esto afecta el crecimiento de la planta al igual que la producción del fruto. Es deseable sembrar este cultivo en la época de lluvias pues resulta algo más económico, pero si hay disponibilidad de horas de riego no importa la fecha en la que se siembre Figura 1 (Ariza *et al.*, 2009).

2.4 Contenido nutricional

El limón posee un alto nivel de vitamina C, y Fósforo. Esta vitamina inhibe las pérdidas de vitamina por oxidación. Cabe mencionar que también tiene minerales entre ellos el potasio y sodio como se muestra en la Tabla 2. Su consumo se considera una alternativa para las personas que padecen enfermedades del corazón y del sistema circulatorio, pues deben tener una dieta saludable libre de sal común (NaCl) y es por eso que el limón tiene un papel importante como sustituto alimenticio (Venegas, 2002).

Tabla 2. Composición química del limón (*Citrus latifolia* Tanaka) Fuente: Vanegas (2002).

Composición	En cada 100 grs	
	limón	Jugo de limón
Agua %	87.3	97.5
Energía kcal.	37	26
Proteínas gr	0.8	0.4
Lípidos gr	0.6	0.2
Glúcidos gr	9.6	7.6
Celulosa gr	1.2	0
Calcio mg	16	7
Fósforo mg	13	9
Hierro mg	0.2	0.1
Potasio mg	120	100
Azufre mg	0	9
Sodio mg	0	2
Cloro mg	0	4
Magnesio mg	0	9
Vitamina B ¹	0	0.04
Vitamina C mg	49-90	45

2.5 Importancia

La producción del limón persa tiene una gran demanda de consumo, pues es representativo en la gastronomía mexicana, esto hablando del mercado interno, pero también para el mercado exterior. En la actualidad hay empacadoras nacionales que se dedican a la compra y venta de limón persa con destino a Holanda, Alemania, Italia, Austria, Suiza y los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2019).

El limón persa aparte de que tiene un alto valor nutricional también tiene propiedades medicinales, ya que de acuerdo con Turner & Burri (2013) contiene carotenoides que benefician al ser humano como antioxidantes que fortalecen el

sistema inmunológico y ayudan a la formación de hueso y al mantenimiento de la salud ocular disminuyendo el riesgo de padecer cáncer.

2.6 Producción de limón persa en México

Comúnmente los cítricos más representativos que se llegan a cultivar en México son el limón mexicano y el limón persa, los principales estados en producción son Veracruz, Puebla, Tamaulipas, Zacatecas, Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Sinaloa, Chihuahua y Sonora (Tabla 3). Estas regiones se caracterizan por poseer un clima tropical o subtropical y se estima que más de medio millón de hectáreas están distribuidas en los 32 estados de la república mexicana. Dentro de las cuales, Veracruz es el estado más productivo con ganancias de 44,806,288.48 pesos mexicanos (SIAP, 2021).

Tabla 3. Producción de limón persa en el 2021. Fuente: SIAP (2021)

	Entidad	Superficie (ha)		Valor Producción
		Sembrada	Cosechada	
1	Veracruz	1,458,504.35	1,369,758.80	44,806,288.48
2	Tamaulipas	1,354,205.55	985,567.91	19,758,463.97
3	Chiapas	1,230,660.41	1,208,129.86	17,947,306.33
4	Zacatecas	1,230,527.76	1,226,273.11	22,920,196.21
5	Jalisco	1,183,484.64	1,108,858.91	77,551,498.55
6	Michoacán	1,028,396.24	996,090.54	85,349,249.08
7	Sinaloa	995,139.91	986,961.29	69,539,987.25
8	Chihuahua	985,682.90	960,241.89	52,580,558.50
9	Guanajuato	919,983.36	897,495.06	42,279,076.30
10	Oaxaca	880,786.41	844,243.64	16,602,436.81
11	Puebla	862,572.66	830,147.69	19,690,719.79
12	Guerrero	752,296.05	738,879.80	16,079,145.67
13	San Luis Potosí	699,619.50	615,676.59	19,661,959.45
14	México	686,471.58	683,146.40	25,704,329.48
15	Durango	646,738.37	640,132.07	11,732,089.73
16	Sonora	521,238.15	513,351.16	48,814,147.63
17	Hidalgo	459,934.26	444,552.46	7,683,049.42
18	Campeche	303,672.50	301,720.90	6,214,417.19
19	Nayarit	277,484.34	254,973.34	11,309,840.36

20	Tlaxcala	221,815.20	221,669.20	3,121,891.92
21	Tabasco	218,815.49	214,674.42	7,076,646.90
22	Coahuila	161,136.27	155,069.34	8,021,064.44
23	Yucatán	152,418.10	144,689.08	2,928,852.09
24	Querétaro	139,768.28	129,727.28	4,784,064.75
25	Aguascalientes	136,708.37	136,245.02	4,199,359.13
26	Baja California	136,509.41	133,783.03	14,636,652.56
27	Morelos	130,933.30	128,104.80	8,495,647.55
28	Nuevo León	117,456.65	106,041.50	3,838,641.29
29	Quintana Roo	111,641.49	110,286.59	3,325,894.01
30	Colima	93,872.89	93,290.00	7,849,133.49
31	Baja California Sur	38,230.10	35,544.82	6,848,039.22
32	Ciudad de México	14,330.42	14,290.07	1,477,916.52
Total		18,151,034.91	17,229,616.57	692,828,564.09

2.7 Pérdidas postcosecha

Los cítricos provienen de árboles con espinas y algunos presentan cáscara delgada, esto genera diversos problemas que afectan en su calidad durante el periodo postcosecha. No hay una especialización en la colecta del fruto y esto a veces llega a provocar daños durante el transporte a las empacadoras y por último en el trayecto a los mercados. Por lo regular el fruto sufre pequeñas fisuras lo que la infección por patógenos oportunistas incluyendo hongos y bacterias es latente (Prusky y Lichter, 2008).

La probabilidad de que el fruto se enferme es mayor a medida que el limón esté más maduro. El daño es principalmente provocado por distintas especies de hongos, lo que llega a ser preocupante debido al riesgo de comercialización. Se llega a estimar que, aunque la fruta sea tratada con ceras y fungicidas el 30% de la producción se pierde por estos factores y tan sólo el 70% pueden ser comercializada (Ismail y Zhang, 2004).

Los limones se empacan a temperaturas de 13°C y con una humedad mayor al 90%, por lo tanto, se incrementa el riesgo de aparición de mohos o distintas especies de

hongos (Smilanick y Mansour, 2008). En México, las pérdidas por hongos llegan a generar hasta un 40% de la producción total (Ochoa *et al.*, 2007).

2.8 Los principales hongos patógenos postcosecha de los cítricos

Se estima que hay 12 especies de hongos que están descritas que afectan globalmente al limón (Tabla 4). Existen al menos 10 hongos que se consideran patógenos muy relevantes en los cítricos tales como *Alternaria citri*, *A. limicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum* (Álvarez, 1981; Besoain *et al.*, 1994; Brown & Miller, 1999; Timmer *et al.*, 2000).

Tabla 4. Enfermedades por hongos fitopatógenos de cítricos Fuente: Álvarez (1981); Besoain *et al.* (1994); Brown y Miller (1999), Timmer *et al.* (2000).

Patógeno	Enfermedad	Importancia Mundial	Limón mexicano
<i>Alternaria citri</i> , <i>A. limicola</i>	Pudrición	+++	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	+++	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición algodonosa	+	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Pudrición	+	-
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	+++	-
<i>Penicillium italicum</i>	Moho azul	+++	-
<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	+++	+
<i>Penicillium ulaiense</i>	Moho velloso	+	-
<i>Pleospora herbarum</i>	Pudrición	+	-
<i>Phomopsis citri</i>	Pudrición	+++	-
<i>Trichoderma viride</i>	Pudrición	+++	-

-Ausente, + Poco importante, +++ Muy importante

Existe un hongo llamado *Elsinoe fawcetti* Bitancourt y Jenkins, el cual se caracteriza por ser el causante de la enfermedad de la roña en los cítricos, esta enfermedad daña tanto a las hojas como al fruto provocando lesiones que se presentan en forma de protuberancias que contiene una acumulación de hongos (Castle *et al.*, 1993).

2.9 Moho verde por *Penicillium digitatum* Pers

Los agricultores de cítricos llegan a tener problemas en la postcosecha debido a *Penicillium digitatum* también conocido como hongo verde. Este hongo se reproduce mediante esporas que están suspendidas en el aire y que germinan en frutas sanas. Su mecanismo para reproducirse es incidente en frutas que han sufrido golpes o heridas ocasionadas en su recolección y en la transportación del cítrico. Este hongo genera aparición de manchas en la cáscara del limón que posteriormente cambia a un color blanquecino y una subsiguiente esporulación de color verde o azul, dependiendo la especie de *Penicillium* Figura 2. En consecuencia, el cítrico pierde su consistencia desprendiendo un olor fuerte que no es apto para el consumo humano. Dicho hongo se desarrolla en condiciones de humedad alta y una temperatura que va desde los 20 a 25°C. *Penicillium digitatum* crece más rápidamente que *P. italicum* (AGRIOS, 2005).



Figura 2. Limones persas afectados por *Penicillium digitatum*. Fotografía: Propia JD Evangelista.

2.10 Antracnosis por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz

Una de las enfermedades más recurrentes es la antracnosis la cual es ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Este hongo se considera un fitopatógeno recurrente debido a que daña a frutos y plantas de zonas tropicales (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Los productores de cítricos que padecen esta enfermedad tienen pérdidas de un 20% en el tiempo de postcosecha. Los limones que llegan a presentar este hongo tienen el síntoma de presencia de manchas color oscuro, regularmente estas lesiones son circulares y elipsoidales como se muestra en la Figura 3.

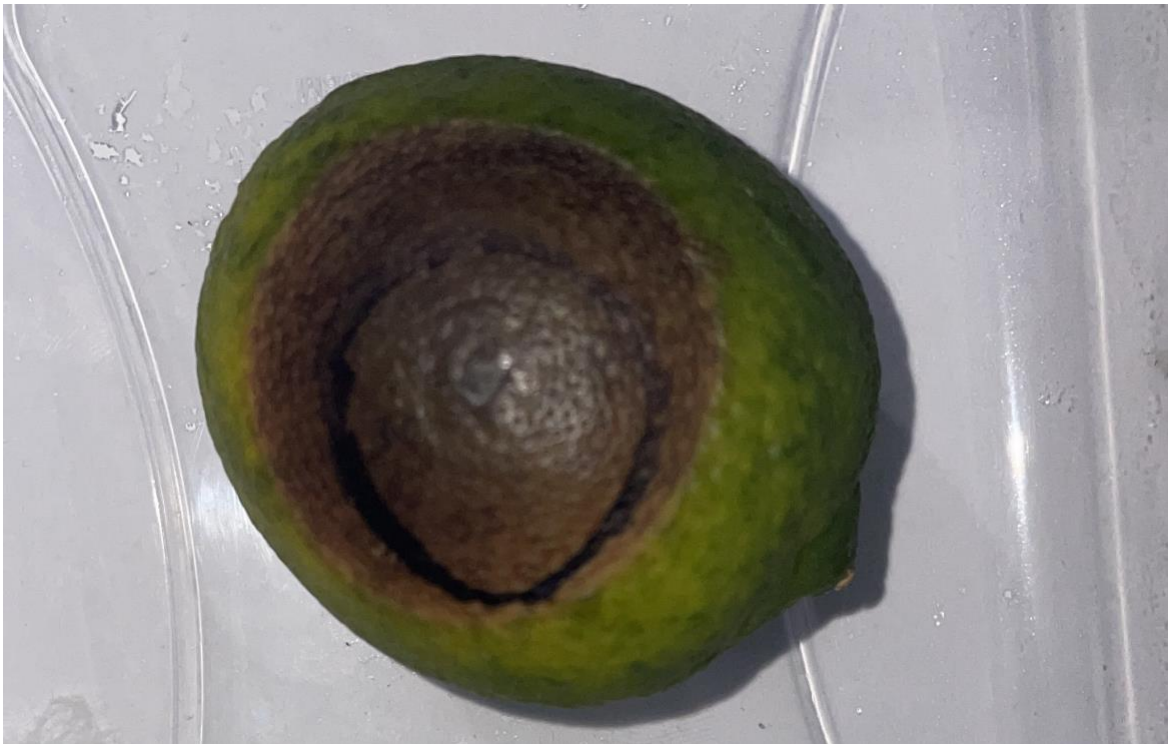


Figura 3. Limón persa afectados por *Colletotrichum gloeosporioides*. Fotografía: Propia JD Evangelista.

2.11 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son muy complejos, tiene más de 100 compuestos químicos entre ellos están los terpenos, compuestos oxigenados, aldehídos, cetonas y ácidos libres. Estas moléculas son volátiles que se encuentran en las plantas con aroma que se pueden extraer de las distintas partes de una planta como las flores, hojas, frutos, semillas y tallos. Existen diversos métodos para obtener un

AE como son mediante presión, fermentación o por destilación por vapor (Burt, 2004). En la actualidad los aceites esenciales tienen un alto valor económico, pues son utilizados como antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas, sin embargo, aún en la actualidad se siguen utilizando fungicidas sintéticos para el control de hongos que se desarrollan en la postcosecha, su uso provoca efectos secundarios al ser humano e impacta en el ambiente (Bakkali *et al.*, 2008). La técnica de destilación por arrastre de vapor es una opción viable para la extracción de aceites esenciales, ya que implica una inversión baja en costos en comparación con otros métodos Souza *et al.*, (2020).

2.12 Hidrodestilación

Este método de extracción de aceites esenciales a través de la hidrodestilación puede producir aceites con notas aromáticas intensas y una coloración más oscura en comparación con otros métodos. Es importante destacar que este método es ampliamente utilizado en la industria debido a su eficacia en la extracción de los aceites. El tiempo de ebullición necesario para obtener el aceite esencial dependerá de los componentes presentes en el mismo. Si los compuestos del aceite esencial tienen un alto punto de ebullición, se requerirá un tiempo de ebullición más prolongado. (Villamizar y Aular, 2022).

La técnica consiste en el calentamiento óhmico, se produce la electroporación o electro permeabilización de las membranas celulares, lo que aumenta su permeabilidad por encima de lo normal debido a la exposición a temperaturas elevadas. Esto causa una ampliación en la difusión a través de las paredes celulares, lo que incrementa la conductividad eléctrica de las membranas celulares y, a su vez, facilita la permeabilidad. Esto conduce a la liberación del aceite esencial del compartimiento celular (Gadi, 2016).

2.13 *Litsea glaucescens* Kunth

En México, el género está representado sólo por *Litsea glaucescens* Kunth (Tabla 5). Se trata de un árbol o arbusto de 3 a 12 m de elevación, con hojas alternas a opuestas, penninervadas y flores unisexuadas Figura 4. Vive en los bosques

húmedos de encino y de encino-pino, así como de los bosques mesófilos de montaña, por lo regular se halla en cañadas o a la orilla de arroyos. Crece entre los 800 y 2,830 msnm y se distribuye del norte de México hasta Costa Rica. La especie tiene varios nombres como son aureli (tarahumara), canelillo, chico, ecpatli de chietla (náhuatl), laurel chico, laurelillo, sufricalla y zitzuch (Hernández, 2002).

Tabla 5. Taxonomía *Litsea glaucescens* Kunth Fuente: Tropicos (2023).

Reino:	Plantae
Filo	Tracheophyta
Subfilo	Angiospermae
Clase:	Magnoliopsida
subclase	Magnoliidae
superorden	Magnolianae
Orden:	Laurales
Familia:	Lauraceae
Género:	<i>Litsea</i>
Especie:	<i>Litsea glaucescens</i> Kunth



Figura 4. Planta de *Litsea glaucescens* Kunth. Fotografía: Propia JD Evangelista.

2.14 Quitosano

El quitosano es el segundo polisacárido más abundante debido a que se puede encontrar en la naturaleza. Este polisacárido tiene propiedades que lo destacan pues permite la formación de películas o fibras, se considera que es un recurso renovable debido a que no llega a contaminar como residuo (Chávez *et al.*, 2012). Este polisacárido se puede combinar con ingredientes tales como antioxidantes, colorantes y sustancias antimicrobianas que contrarresten la presencia de microorganismos patógenos con la finalidad de brindar un efecto protector. Debido a esto se considera biodegradable, no son tóxicos, sin efectos secundarios en los humanos y biocompatibles con el medio ambiente (Bautista-Baños *et al.*, 2017). Este material tiene propiedades bactericidas, fúngicas y antivirales. También sirve como matriz para la liberación controlada de agroquímicos y fármacos, en el tratamiento de aguas, en la industria cosmética y del papel. Es además biodegradable y biocompatible, lo cual lo hace muy atractivo para su estudio en aplicaciones biomédicas (Hernández, 2004).

2.15 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica que se implementa para examinar compuestos volátiles, con esta técnica las mezclas son separadas en etapa gaseosa básicamente por las propiedades térmicas de los compuestos a identificar. La cromatografía de gases está restringida a la división de compuestos con un peso molecular menor a 1000 a una temperatura máxima de 400 °C. Dichos parámetros incluyen a compuestos que tienen una igualdad térmica dentro de una misma muestra. Para hacer una separación por medio de cromatografía de gases, se inyecta una pequeña proporción de la muestra en una corriente de un gas inerte a alta temperatura. Esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separa los elementos de la mezcla mediante un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en varios casos, mediante una mezcla de los dos. Los elementos separados, eluyen de la columna a intervalos discretos y pasarán por medio de cualquier sistema de detección conveniente, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recolección.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) es una técnica analítica dedicada a la división, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles (Bouafif *et al.*, 2018)

2.16 Microscopio Electrónicos de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido también llamado (SEM por sus siglas en inglés) tiene un emisor de electrones, cuenta con una columna y una gran diversidad de lentes electromagnéticas. Este aparato proyecta un haz de electrones con aceleraciones que van desde 200v y 30 keV que viajan por una cámara vacía (10⁻⁴ Pa). Posteriormente, el haz de electrones pasa entre las diferentes lentes electromagnéticas y posteriormente, por un sistema de deflexión que le permite hacer un barrido superficial de la muestra. Con este equipo podemos obtener información morfológica y de composición química superficial de la muestra cuando se aplica la técnica de energía dispersiva de rayos X (Delgado y Peña, 2017).

2.17 Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FT-IR)

La espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier por sus siglas en inglés (FTIR) es un método que está implementado para saber las estructuras de moléculas que poseen absorción de la radiación infrarroja según su vibración molecular, esto debido a los enlaces químicos y estructurales de las moléculas lo cual nos permite saber la estructura específica de biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Mantsch *et al.*, 1986).

2.18 Transmitancia y Opacidad

Los materiales que están hechos por polímeros como envases para los alimentos tienen propiedades ópticas (transmitancia y opacidad) lo cual determina la conservación del producto empacado, esto se debe a la radiación que hace que haya cambios oxidativos y auto oxidativos tenemos ejemplos como las grasas, aceite, modificación de proteínas y degradación de vitaminas, como la vitamina C (Bossett *et al.*, 1994). Este tipo de material no cede componentes de este hacia el producto esto hace que el alimento pierda algún componente mayoritario, como los aromas, sabor o color (Klopffer y Flaconneche, 2001; Méndez y Cárdenas, 2010).

III JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales tienen hoy en día un valor importante en el ámbito económico esto debido a que les dan uso de agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. En la actualidad se buscan nuevas alternativas que puedan inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos en los frutos durante el periodo de postcosecha. Por eso es que se requiere que haya más estudios de aceites esenciales que presenten mayor eficacia contra hongos fitopatógenos pues a un en la actualidad los agricultores siguen utilizando agroquímicos convencionales que pueden llegar a ser perjudiciales al ser humano a largo plazo, al medio ambiente y sin olvidar que causan resistencia en los microorganismos patogénicos. Se presenta una alternativa con los aceites esenciales como antifúngicos que puede llegar hacer muy eficaces. El limón persa presenta daños debido al crecimiento de hongos que provocan pérdidas económicas severas. Teniendo esta problemática en mente, el presente estudio se enfocó en valorar el aceite esencial del falso laurel (*Litsea glaucescens*) sobre el control del crecimiento fúngico de dos fitopatógenos nativos, a través de la generación y evaluación de películas híbridas de quitosano como materiales protectores del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) proveniente de las parcelas de Ayotoxco de Guerrero, Puebla.

IV HIPÓTESIS

La generación de películas de quitosano con aceite esencial del falso laurel (*Litsea glaucescens*) usadas como recubrimientos en la superficie del limón persa (*Citrus latifolia*) retardará la aparición de síntomas y signos de infección de dos hongos fitopatógenos y también evitará cambios drásticos en la calidad del fruto.

V OBJETIVO

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antifúngica *in situ* de películas híbridas hechas a base de quitosano y aceite esencial de *Litsea glaucescens* frente a hongos fitopatógenos del limón persa cultivado en las parcelas de Ayotoxco de Guerrero, Puebla.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Identificar y aislar especies de hongos fitopatógenos presentes en frutos de limón persa en parcelas de Ayotoxco de Guerrero, Puebla.

-Determinar la actividad antifúngica *in vitro e in situ* del aceite esencial de *Litsea glaucescens* sobre hongos fitopatógenos del limón persa.

-Elaborar películas de quitosano en combinación con aceite esencial de *Litsea glaucescens* para el control de hongos fitopatógenos del limón persa.

-Evaluar y Caracterizar las películas de quitosano en combinación aceite esencial de *Litsea glaucescens* con la técnica SEM y FT-IR.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sitio de muestreo

Las muestras de limones persa (*Citrus latifolia* Tanaka) se recolectaron en parcelas pertenecientes al municipio de Ayotoxco de Guerrero 20°06'N 97°24'O 284 MSNM, perteneciente a la Sierra Norte de Puebla Figura 5.

Municipio de Ayotoxco de Guerrero Puebla

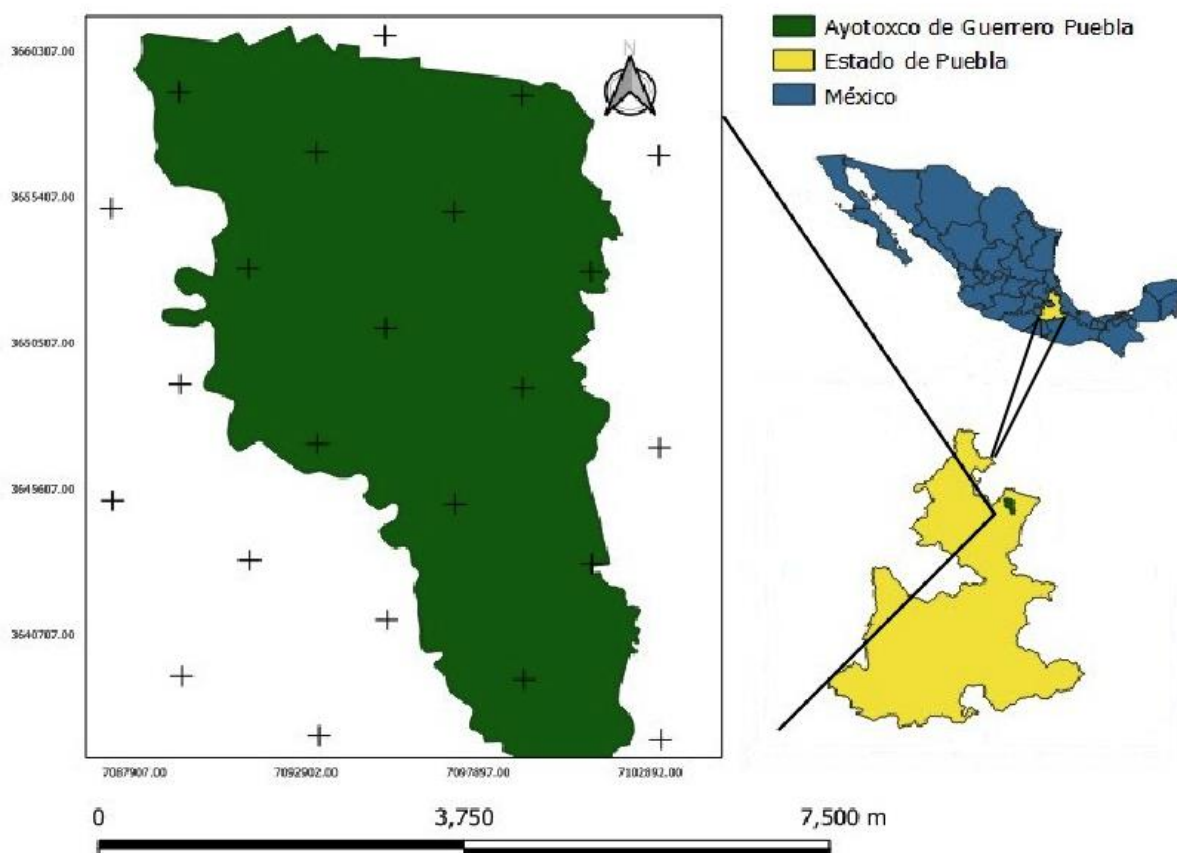


Figura 5. Ubicación del sitio de colecta del limón persa en el Municipio de Ayotoxco de Guerrero en el estado de Puebla. Fuente: Elaboración propia JD Evangelista.

6.2 Recuperación y aislamiento de hongos de los Limones Persa

Se seleccionaron frutos que presentaron síntomas de enfermedad como son clorosis, necrosis y síntomas de pudrición Figura 6. Las muestras obtenidas fueron trasladadas al laboratorio para el aislamiento de hongos.



Figura 6. Cultivo de limón persa en el municipio de Ayotoxco de Guerrero, Puebla.
Fotografía: Propia JD Evangelista.

6.3 Cámara húmeda

Los frutos fueron lavados con hipoclorito de sodio al 20% durante 20 min y continuó con un segundo lavado el cual fue con agua y etanol a una proporción de 20:80 por (20 min). Por último, se hizo un lavado con agua destilada estéril esto durante un tiempo de 30 minutos, todo en campana de flujo laminar. Muestras de tejido con sintomatología, se colocaron en cámaras húmedas las cuales contenían de 4 a 5 limones y colocando de 1 a 2 torundas de algodón humedecidas con agua estéril en un recipiente de plástico desinfectado. El contenedor fue sellado y se incubó por un periodo de 10 días a 25 °C y 70 % de humedad relativa (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022).

6.4 Aislamiento y purificación de hongos en medio de cultivo

Posteriormente a la incubación se aislaron las morfologías resultantes en agar dextrosa y papa (PDA). Se hizo la purificación de hongos con varias repeticiones, esto con el fin de tener la certeza de que el hongo estaba puro, por último, las morfologías fueron conservadas para experimentos posteriores (Krug, 2019).

6.5 Preparación de medios

Una vez que crecieron los hongos se pasaron a un medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) el cual la preparación consistió en (200 g/L de papa; 20 g/L de agar bacteriológico y 20 g/L de dextrosa) posteriormente ya preparado el medio se pasó a esterilizar en una autoclave 30X60CM, 40L marca Evar, el medio de cultivo se

dejo en el auto clave 15 min a una temperatura 121 °C y como paso final se vetio en una campana de flujo (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022)

6.6 Pruebas antifúngicas *in vitro*

Para evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales, se empleó el método de microdilución en caldo, utilizando resazurina como indicador de viabilidad (Sigma-Aldrich Co.). Para esto, se obtuvieron discos hifales de 4 mm de diámetro de cultivos de 10 días en PDA, los cuales se depositaron en 300 µl de medio PDB en microplacas de Elisa de 96 pozos y se incubaron durante 40 horas a 28°C con agitación moderada (50 rpm). Se realizaron curvas de dosis respuesta (10-500 µg/ml) con los aceites esenciales previamente emulsificados en etanol absoluto, y se determinó la concentración del aceite a partir de su densidad, calculada mediante una balanza analítica. La conversión de resazurina en resorufina se monitoreó a 630nm con un lector de microplacas de Elisa, y las concentraciones mínimas inhibitorias se estimaron por quintuplicado. Este método permite obtener resultados precisos y confiables para evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de manera efectiva (Chadha & Kale, 2015).

6.7 Pruebas de patogenicidad *in situ*

Los limones persas utilizados en la experimentación fueron adquiridos en el mercado de San Isidro en Puebla, México. Antes de su uso, los frutos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos y posteriormente enjuagados con agua destilada estéril. Luego de secarlos en una cabina de flujo laminar, se inocularon con 1000 conidios de cada fitopatógeno por penetración directa utilizando una micropipeta de 200 µL de capacidad, previamente resuspendidos en agua estéril. La cantidad de conidios se estimó utilizando una cámara de Neubauer. Los limones (n=10) cubiertos con las películas obtenidas se consideraron como el grupo experimental, mientras que los limones inoculados con conidios se consideraron como el grupo de control de infección. Los frutos fueron procesados en una cámara de humedad a una temperatura constante de 28°C y una humedad relativa del 70% bajo un fotoperiodo estándar de 12 horas de luz y 12

horas de oscuridad. Los síntomas como la pérdida de turgencia y/o la proliferación micelial se registraron diariamente durante 8 días. (Duque-Bautista *et al.*, 2017)

6.8 Parámetro de calidad (Firmeza)

Para la obtención de la firmeza, se obtuvo en unidades kg/cm² y se utilizó un penetrómetro Modelo RN-GY-3. Este procedimiento estuvo en monitoreo por 15 días, de los 6 grupos se realizó la replicación de 10 veces una vez finalizado se volvió a tomar la firmeza y se procedió a colectar el jugo para análisis posteriores.

6.9 Preparación de microcultivos

Se elaboraron microcultivos para obtener imágenes de las estructuras reproductivas presentes en los hongos fitopatógenos aislados. Estos microcultivos se obtuvieron a partir de cultivos que se habían desarrollado en placa Petri durante 7 días, siguiendo el método descrito por Quintana-Obregón *et al.*, 2013.

6.10 Microscopia

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

6.11 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 con 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) y la proteína beta-tubulina BT1a (TTCCCCGTCTCCACTTCTTCATG) y Bt1b (GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC) usando las condiciones de PCR reportadas por Coyotl-Pérez *et al.* (2022). 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.

6.12 Obtención de aceites esenciales

EL aceite esencial del falso laurel fue obtenido a partir de material adquirido en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología. Cinco kilos de hojas de *Litsea glaucescens* fueron procesados mediante hidrodestilación usando un equipo Clevenger de 5 litros de capacidad. El aceite esencial fue recuperado con hexano grado analítico y la humedad fue retirada por su incubación en un desecador de vidrio adicionado con sulfato de sodio anhídrido.

6.13 Caracterización química del aceite esencial

Se utilizó un cromatógrafo de gases de marca Varian CP3800 para analizar el aceite esencial obtenido por hidrodestilación. Este equipo estaba equipado con una columna capilar Factor Four VF-5ms y un cuadrupolo sencillo de marca Varian modelo 320MS. La fase móvil fue helio a un flujo de 1 mL min⁻¹. La identidad de los componentes del aceite se determinó comparando sus espectros de masas (70 eV) con la base de datos de referencia estándar NIST 2.0, la literatura y estándares auténticos disponibles en el laboratorio. Se obtuvieron los índices de retención de Kovats (RI) al comparar los tiempos de retención con los de una mezcla estándar de n-alcanos (C₈-C₂₀) en las mismas condiciones analíticas (Adams, 2007).

6.14 Elaboración de películas híbridas

Las películas híbridas 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) y también se vertieron 2.50 mL de glicerina, la solución (100 mL) se mantuvo en agitación continua a 50 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se añadieron a la solución diferentes cantidades del aceite esencial para obtener películas que contenían 0.7% , 1% y 1.3% (p/v) del aceite esencial de *Litsea glaucescens*. Estas fueron asignadas como **FL1** para 0.7%, **FL2** 1% y **FL3** con 1.3%, respectivamente. 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.

6.15 Caracterización FT-IR, SEM de las películas

Se obtuvieron datos de las películas mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) utilizando un espectrómetro Bruker Vertex 70. Los análisis se realizaron en tres ocasiones. También se realizó una microscopía electrónica de barrido de las películas utilizando una capa de oro y un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6610. Estos análisis también se realizaron en tres ocasiones. Para medir el espesor de las películas, se utilizó un micrómetro digital de alta precisión (iGaging) y se realizaron diez mediciones a partir de cortes transversales de las películas (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022).

6.16 Evaluación de Opacidad y Transmitancia

Se utilizó el método de Gutierrez y Alvarez (2017) para determinar las propiedades ópticas de la película. Se empleó un espectrofotómetro UV-1600PC VWR (Radnor, Estados Unidos) para medir la transmitancia de la película a 190-800 nm utilizando una cubeta vacía como referencia. Las muestras de película de 1 a 5 cm de longitud se colocaron perpendicularmente a la fuente de luz en la cubeta. La opacidad de la película se midió midiendo la absorbancia a 600 nm y se calculó según Morales-Rabanales *et al.*, (2022). Se realizaron tres repeticiones (n=3) de cada análisis.

6.17 Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando diez repeticiones por tratamiento. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar como análisis estadístico. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó una prueba de Tukey ($P < 0.05$) para la comparación de medias, empleando el programa STATGRAPHICS (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022).

XII RESULTADOS

7. 1 Recuperación y aislamiento de hongos de los limones persa

En la Figura 7 se muestra los limones que fueron recolectados en la sierra nororiental de Puebla con presencia de hongos. Algunos de los frutos presentaron antracnosis, los limones estuvieron en incubación a temperatura ambiente y en oscuridad.



Figura 7. Cámara húmeda con tejido vegetal del limón persa reservados en el recipiente de plástico. Fotografía: Propia JD Evangelista.

Posteriormente, los hongos que emergieron de los limones fueron aislados en placas de medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA). Estas muestras se mantuvieron en un periodo de 6 días, a temperatura ambiente y en oscuridad. De esta forma, se obtuvieron colonias puras de cada hongo.

Se aislaron un total de ocho cepas, las cuales se les asignó con una la letra **L** y se les asignó un número del **1** al **8** de acuerdo con el número total de cepas encontradas, tal como se puede observar en la Figura 8.

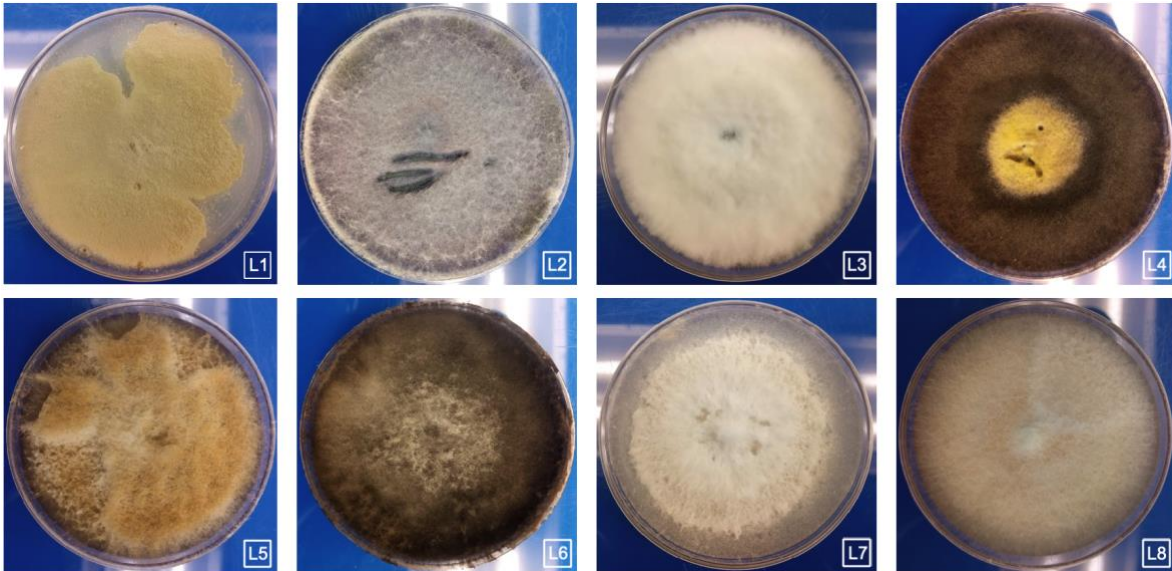


Figura 8. Morfología de las 8 cepas de hongos, obtenidas en limones enfermos. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.2 Pruebas de patogenicidad

Estas pruebas se documentaron mediante imágenes capturadas que fueron tomadas cada 24 horas durante 6 días. Se observó que los limones sanos inoculados con la cepa L1 presentaron síntomas de enfermedad a las 24 horas después de la inoculación en comparación con los otros hongos. En vista de esto se seleccionó para hacer unas segundas pruebas de patogenicidad dado que se detectó que el hongo era muy agresivo. Así mismo, se observó que la cepa L4 generó síntomas de enfermedad al día 3 por lo que también fue catalogada como agresiva. Al día 6 el daño en el fruto fue mucho más evidente (Figura 9). Estas dos cepas causan un daño significativo en comparación con el grupo control.

En cambio, las cepas L3, L5, L6 y L8 no ejercieron ningún daño en el limón por lo cual fueron descartadas como fitopatógenas. Mientras que, las cepas L2 y L7, aunque generaron un ligero crecimiento en el fruto estas no presentaron ningún daño al día 6.

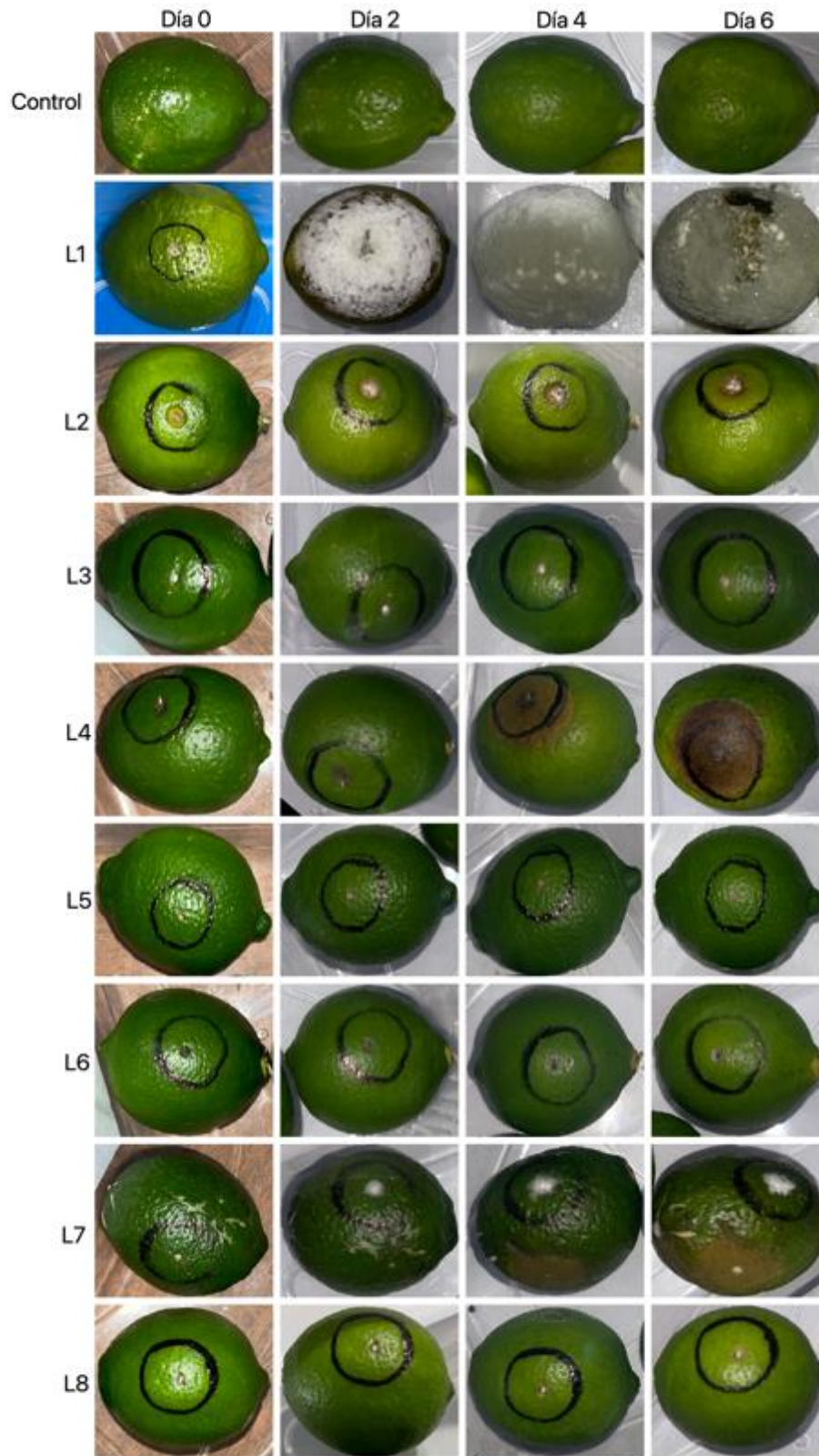


Figura 9. Pruebas de patogenicidad de 8 cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de limón persa. Fotografía: Propia JD Evangelista.

En la Figura 10 se observan los resultados de las segundas pruebas de patogenicidad con las cepas que presentaron mayor daño sobre el fruto, así como un control de referencia. Cabe resaltar que esta cinética se postergó por dos días más para observar el comportamiento del hongo L4. Las cepas L1 y L4 mostraron el mismo comportamiento en el fruto como en las primeras pruebas concluyéndose un daño agresivo sobre el limón. En base a esto, se reafirma su actividad Fito patogénica por repetir el mismo patrón de infección.

Finalmente, se decidió continuar con estas dos cepas de hongos para seguir con la identificación molecular y hallar el método para poder controlar su crecimiento en limones.

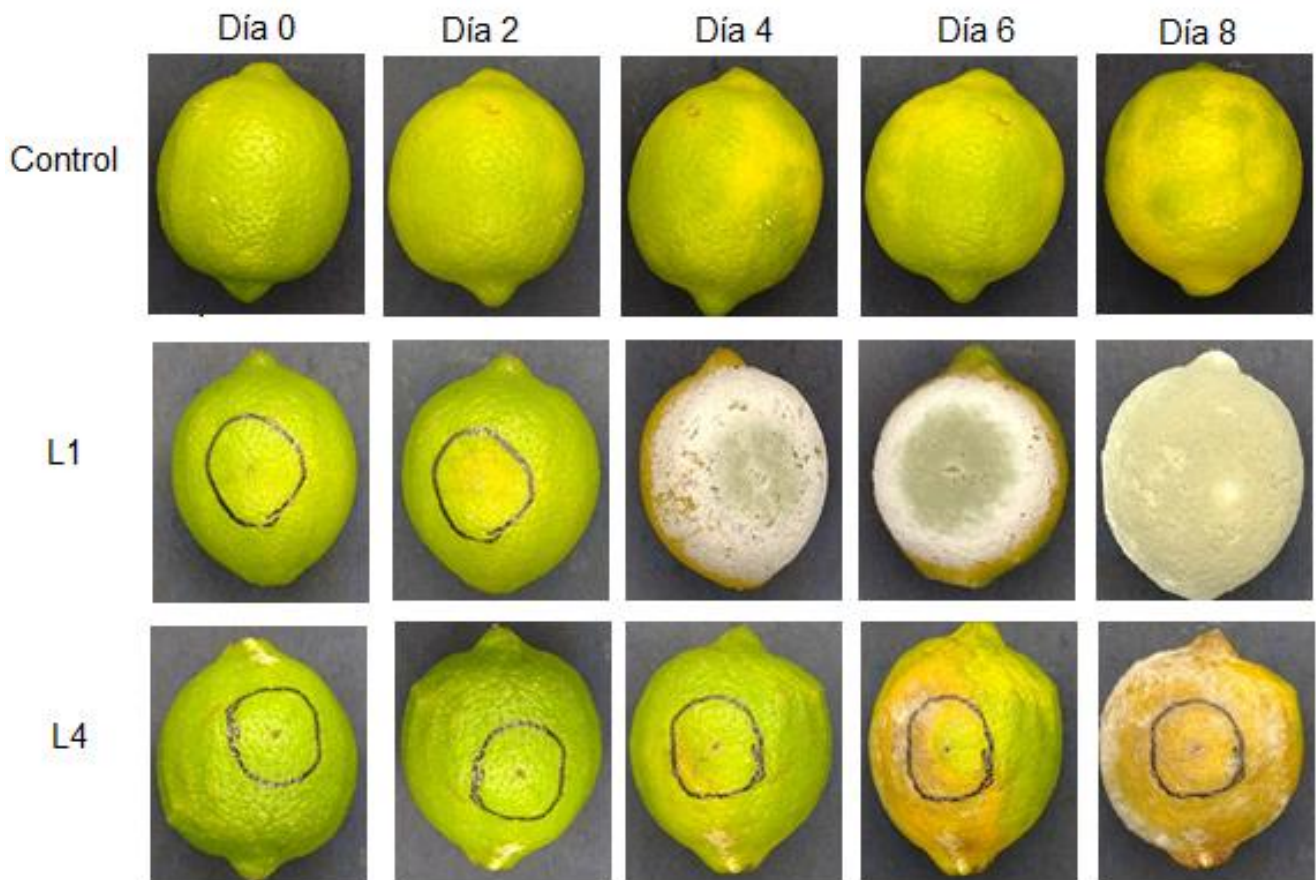


Figura 10. Segundas pruebas de patogenicidad con 2 cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de limón persa. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.3 Pruebas de identificación físicas y moleculares de cepas fitopatógenas

A los microcultivos se les dejó reposar por 8 días con condiciones de oscuridad a 28°C, posteriormente se observaron las estructuras reproductivas en microscopio Figura 11.



Figura 11. Microscopio Binocular marca Primo Star Carl Zeiss.A1. Fotografía: Propia JD Evangelista.

Por otra parte, para la identificación molecular de los hongos se usó la técnica de secuenciación de regiones génicas conservadas. De acuerdo con Rojo-Báez *et al.* (2017) los ITS y beta tubulina son regiones conservadas del genoma de eucariontes. Las amplificaciones posteriormente fueron enviadas a Macrogen Inc. en Corea del Sur para su secuenciación y de esta forma saber que especies de hongos fitopatógenos eran.

Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas del National Center for Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés). Se encontró que el hongo L1 corresponde a *Penicillium digitatum* pues coincidía con un parentesco del 100% con *Penicillium digitatum* cepa Y34 espaciador interno transcrito 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosomal 5.8S y espaciador interno transcrito 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosomal de subunidad grande, secuencia parcial (ID: Mk793211.1) (Figura 12A).

Por otra parte, con la secuencias de beta tubulina se obtuvo un 98% de similitud por parentesco con *Penicillium digitatum* Pd1 tubulina beta, ARNm Putativo (Figura 12B). Esto permitió reafirmar que se trabajó con el hongo *Penicillium digitatum* que es uno de los más comunes en provocar enfermedades en cítricos.

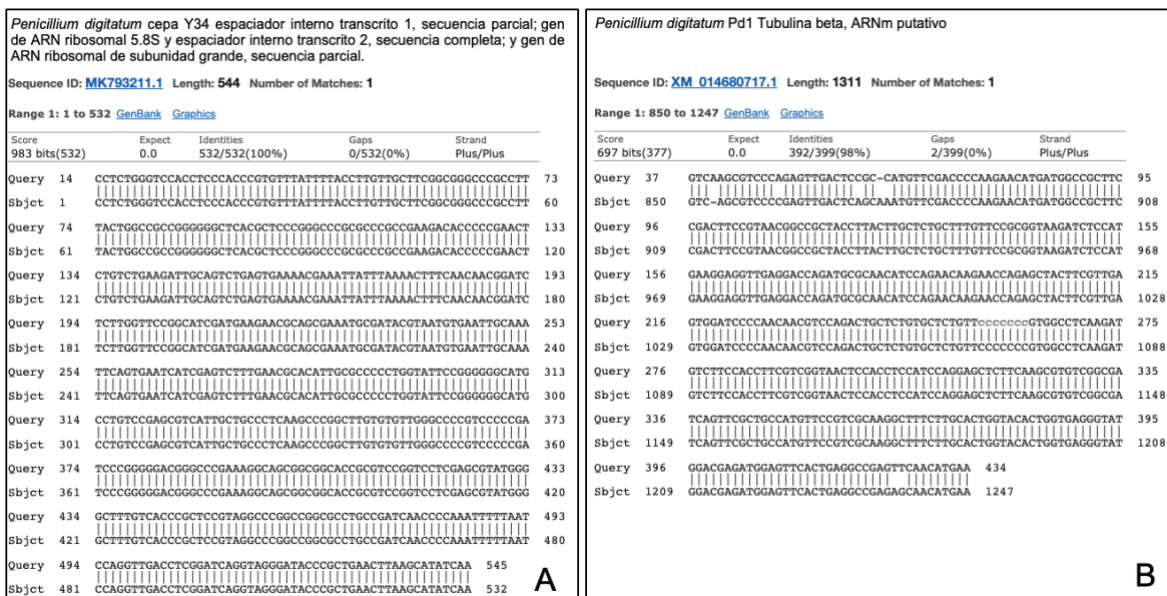


Figura 12. Alineamientos de *Penicillium digitatum* ITS. A) Resultados de alineamiento de *Penicillium digitatum* con ITS y B) tubulina. Fuente: (NCBI) Elaboración propia. JD Evangelista.

La cepa L1 de la Figura 13A que corresponde a *Penicillium digitatum*, tuvo presencia de un color verdoso con una alta esporulación. Esta cepa tuvo una apariencia que se parecía a polvo. Dentro de su morfología microscópica tiene como característica más representativa que el conidióforo en forma de pincel o de mano. Estos conidios están presentes en forma de cadena y parten de una célula especializada que se le

denomina fiálide. En el conidióforo se une al micelio mediante el estípote, comúnmente entre el conidióforo y las fiálides llega a presentar diferentes células. Los puntos de ramificación llegan hacer en la fiálide esta misma, es la que se encarga del soporte y se le llama métula. Las ramas que presenta este hongo parten de la estirpe en las esporas (conidios) se producen en cadenas secas de las extremidades de las fiálides, las esporas más jóvenes en la base de la cadena (Figura 13B). La ramificación es una característica importante para identificar especies del género *Penicillium*. Hay excepciones en la que estos hongos no son ramificados y llevan simplemente un racimo de fiálides en la tapa del estípote. Otros pueden tener un racimo de ramas, cada cojinete un racimo de fiálides (AGRIOS, 2005).

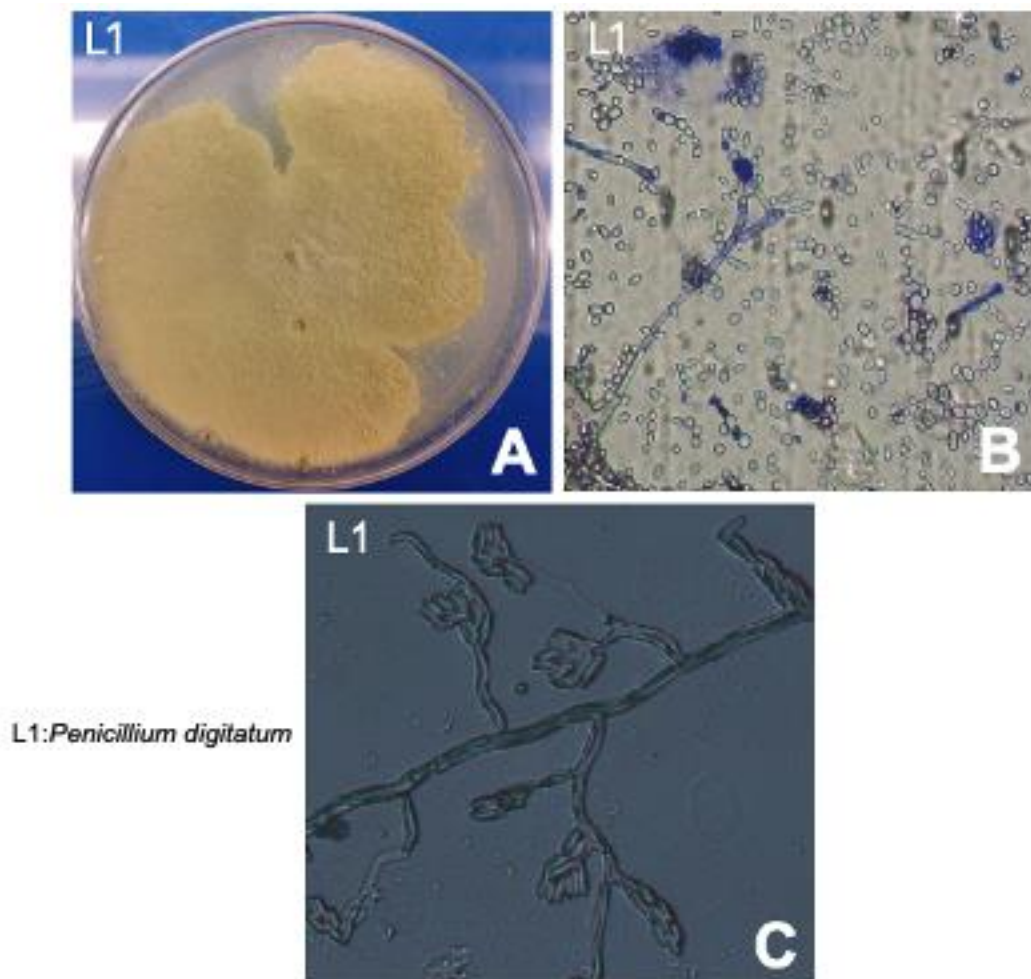


Figura 13. A) Cepa de *Penicillium digitatum* en PDA. B) Conidios en microcultivos teñidos con azul de algodón a 50X. C) Conidios a 100x: Fotografía: Propia JD Evangelista.

Por otra parte, los datos obtenidos de la secuenciación de las regiones ITS del hongo L4 sugirieron su correspondencia con *Colletotrichum gloeosporioides* ya que tuvo una homología del 99% con *Colletotrichum gloeosporioides* aislado C16 18S gen de ARN ribosomal, secuencia parcial; espaciador interno transcrito 1, gen de ARN ribosomal 5.8S y espaciador interno transcrito 2, secuencia completa y gen de ARN ribosomal 28S, secuencia parcial (ID: KC010547,1) (Figura 14A). Mientras tanto la secuencia de beta-tubulina para este hongo tuvo un 96% de similitud por parentesco con *Colletotrichum gloeosporioides* aislado mz-1 gen beta-tubulina2 (TUB2), secuencia parcial (ID: HQ187622.1) (Figura 15B). Se sabe que *Colletotrichum gloeosporioides* es de importancia en el país pues es uno de los hongos que causa mayor problema en los limones.

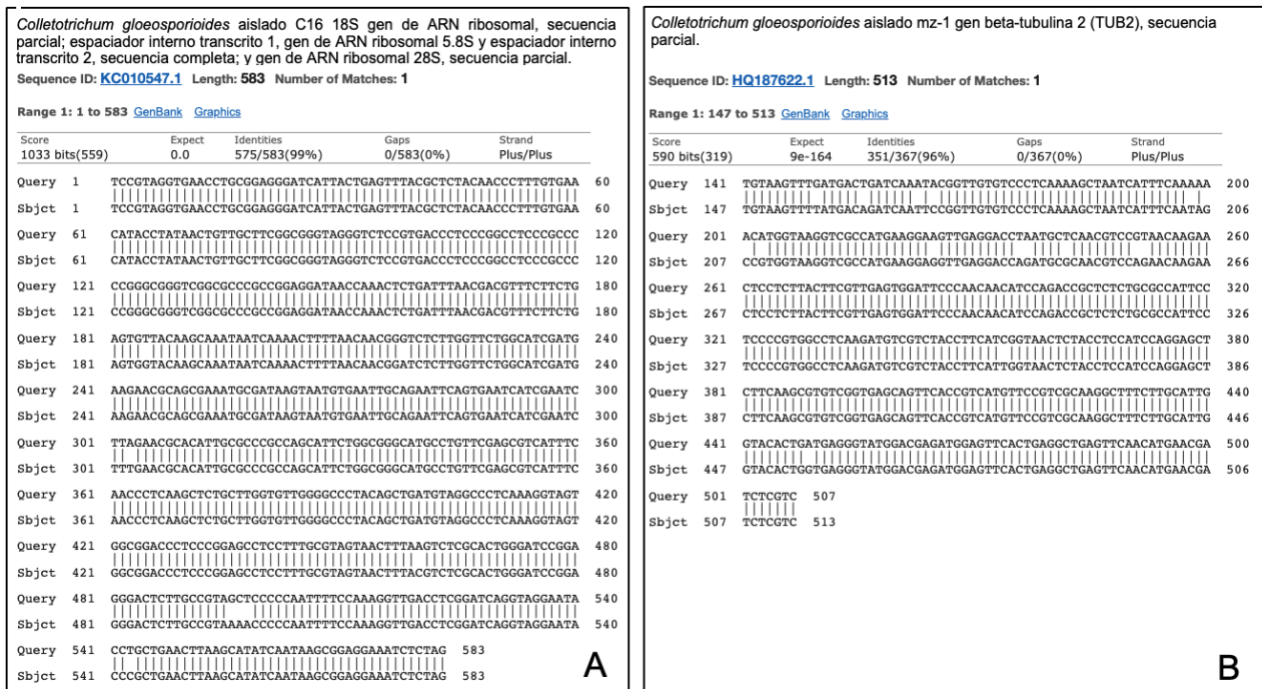


Figura 14. A) Alineamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* con ITS y B) beta-Tubulina. Fuente: (NCBI) Elaboración propia. JD Evangelista.

La cepa L4 (Figura 15A) presenta un crecimiento lento debido a que tarda más de siete días en desarrollarse. En su anverso presenta una coloración negra en el borde y en el centro color amarilla. Mientras que en su reverso presenta la misma coloración. Su forma es circular, borde entero, consistencia suave y textura

algodonosa. Por otra parte, en su morfología microscópica se observa que es un hongo hialino con hifas septadas Figura 15B. Algunas hifas son más gruesas que otras y después de 8 días comienzan a tornarse de color marrón a negro esto dependiendo el estado de maduración de los conidios.

Presentan conidios que miden en promedio 1.07 μm de ancho y 1.44 μm de largo, tienen una pared rugosa de los cuales emergen macroconidios (Figura 15C).

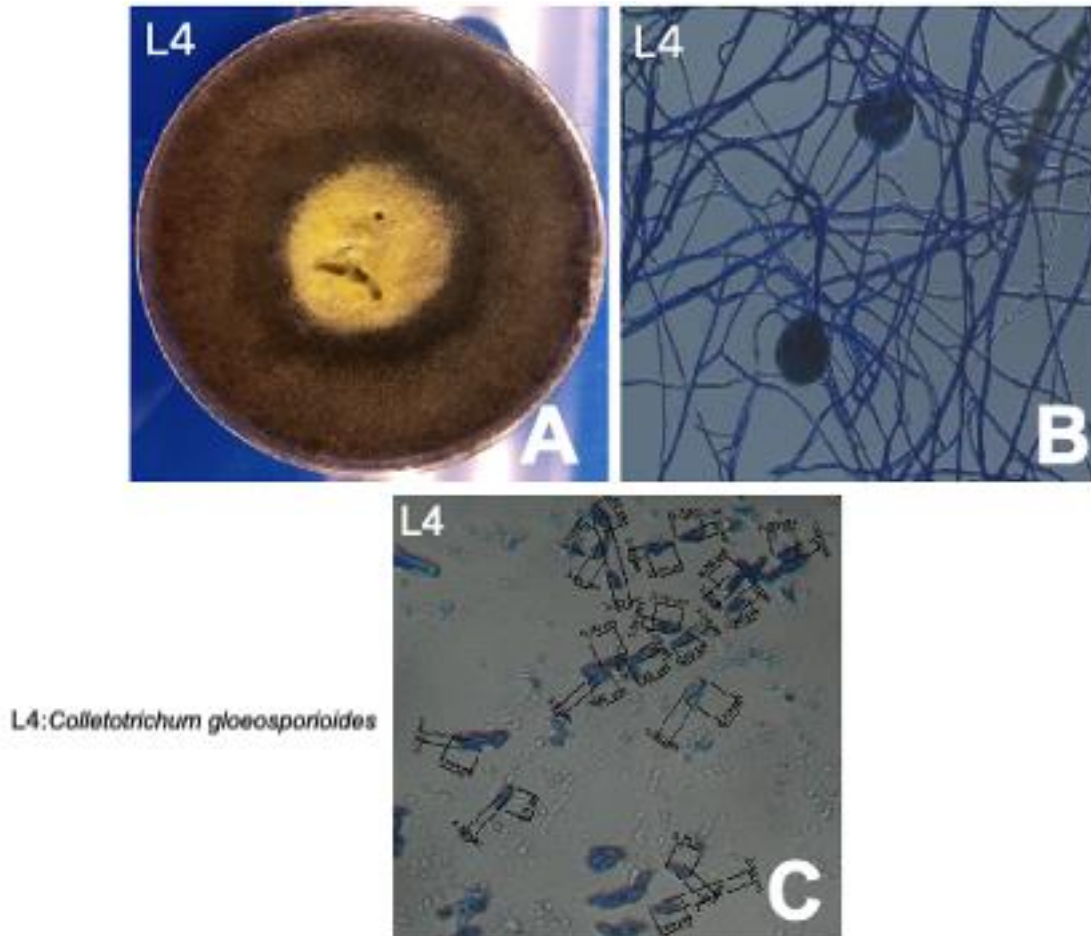


Figura 15. A) Cepa de *Colletotrichum gloeosporioides*. B) Hifas y conidióforos observados a 50X. C) Conidióforos con conidios liberados observados a 100X. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.4 Extracción de aceites esenciales

La extracción de aceite esencial es la que se muestra en la Figura 16. Para extraer el aceite esencial de *Litsea glaucescens* Kunth se realizó una hidrodestilación en la cual se necesitaron 100 g de material vegetal (hojas).

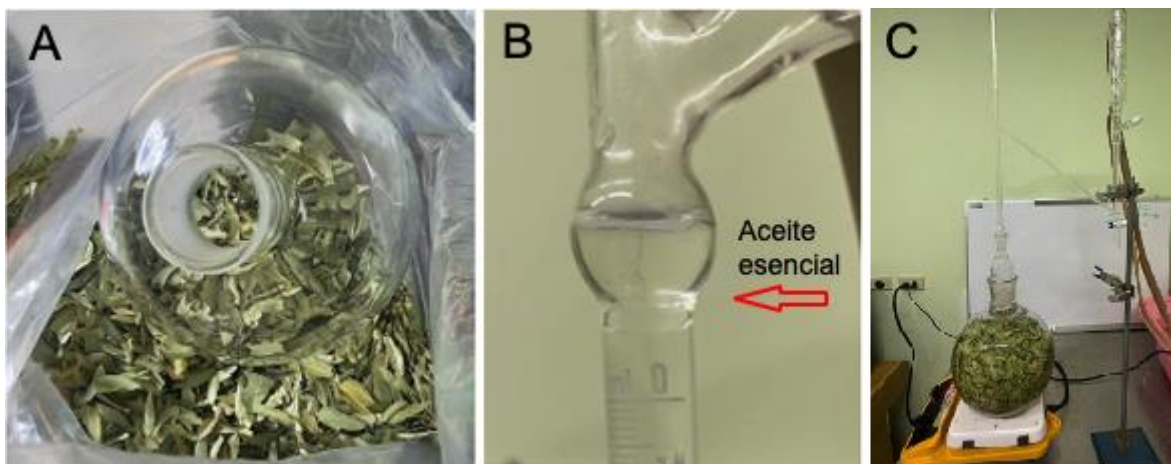


Figura 16. A) Hojas de *Litsea glaucescens* Kunt. B) Extracción de aceite esencial. C) hidrodestilación por arrastre de vapor en un equipo Clevenger de 5L. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.5 Caracterización química GC-MS

El rendimiento que obtuvo el aceite esencial de *Litsea glaucescens* arrojó que por cada 100 g de planta destilada se obtiene 0.588 g de aceite esencial. De modo que su porcentaje de rendimiento fue de 0.42%. En la Figura 17 se muestra el cromatograma obtenido por GC-MS de la composición química de aceite esencial de *Litsea glaucescens*.

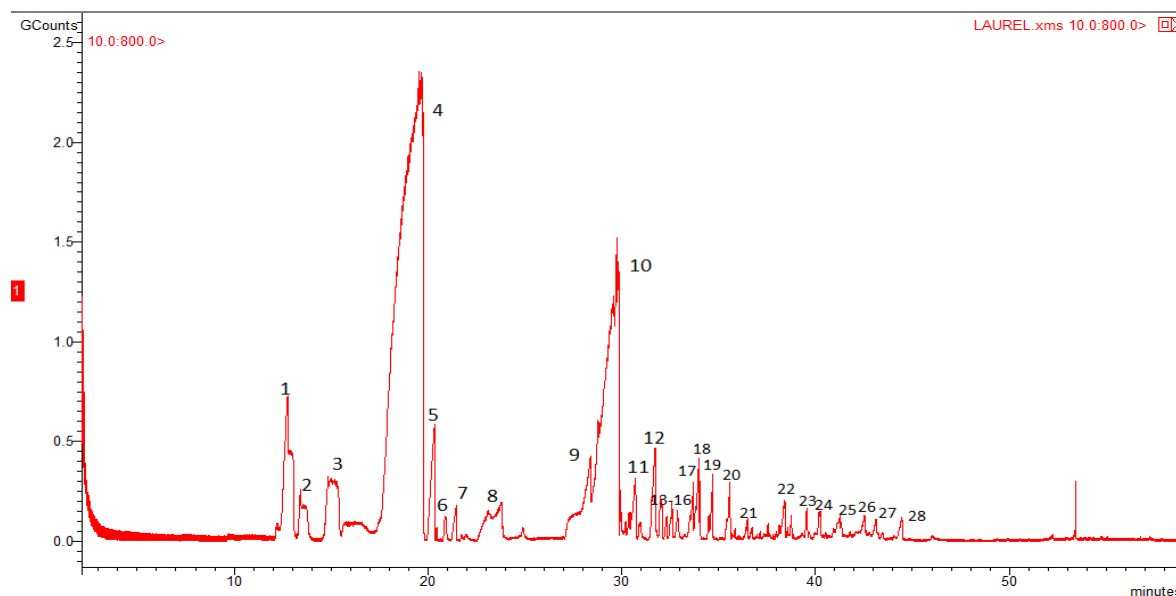


Figura 17. Cromatograma de GC-MS del aceite esencial de *Litsea glaucescens*. Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.

Este aceite esencial cuenta con 28 componentes químicos Tabla 6. dentro de los cuales destacan los siguientes volátiles 1,8-cineol (eucaliptol) como componente principal con 44.6% del total. Como segundo compuesto mayoritario se encuentra a dihidrocarveol con un 23.8% el cual se observa en el pico 10 detectado a los 29 minutos. Así mismo se encuentra el α -pineno (5.1%), canfeno (2.6), beta-pineno (3.1%), Gama-terpineno (2.4%), terpinoleno (0.3%), linalol (0.5%), 1-terpineol (1.4%), terpinen-4-ol (2.5%), carvona (0.9%), bornyl acetato (1.3%), trans-carvona oxido (0.3%), neo-Isopulegyl acetato (0.4%), Alil octanoato (0.3%), safrol (0.5%), trans-dihidro-alfa-terpinil acetato (0.7%), cis-pinocarvil acetato (1.2%), geranil acetato (0.9%), beta-cariofileno (0.9%) y alfa-humuleno (0.9%)

Tabla 6. Composición química de *Litsea glaucescens*.

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Alpha-Pineno	939	5.1
2	Canfeno	954	2.6
3	Beta-Pineno	979	3.1
4	1,8-Cineol	1026	44.6
5	Gama-Terpineno	1054	2.4
6	Terpinoleno	1086	0.3
7	Linalol	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	Bornyl acetato	1254	1.3
13	Trans-Carvona oxido	1276	0.3
14	neo-Isopulegyl acetato	1277	0.4
15	Alil octanoato	1280	0.3
16	Safrol	1287	0.5
17	Trans-dihidro-alfa-Terpinil acetato	1300	0.7

18	Cis-Pinocarvil 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	Cariofileno oxido	1582	0.4
26	Sesquiteriferol	1604	0.3
27	(Z)-Lanceol	1760	0.5
28	Butyl dodecanoato	1786	0.6
	TOTAL		97.1

7.6 Elaboración de Películas híbridas

Las películas de quitosano no presentaron coloración, mientras tanto las películas compuestas por aceite esencial de *Litsea glaucescens* FL1 al 0.7%, FL2 al 1% y FL3 1.3% presentaron un color amarillo tenue, debido a que el aceite posee un color amarillo como se observa en la Figura 18.

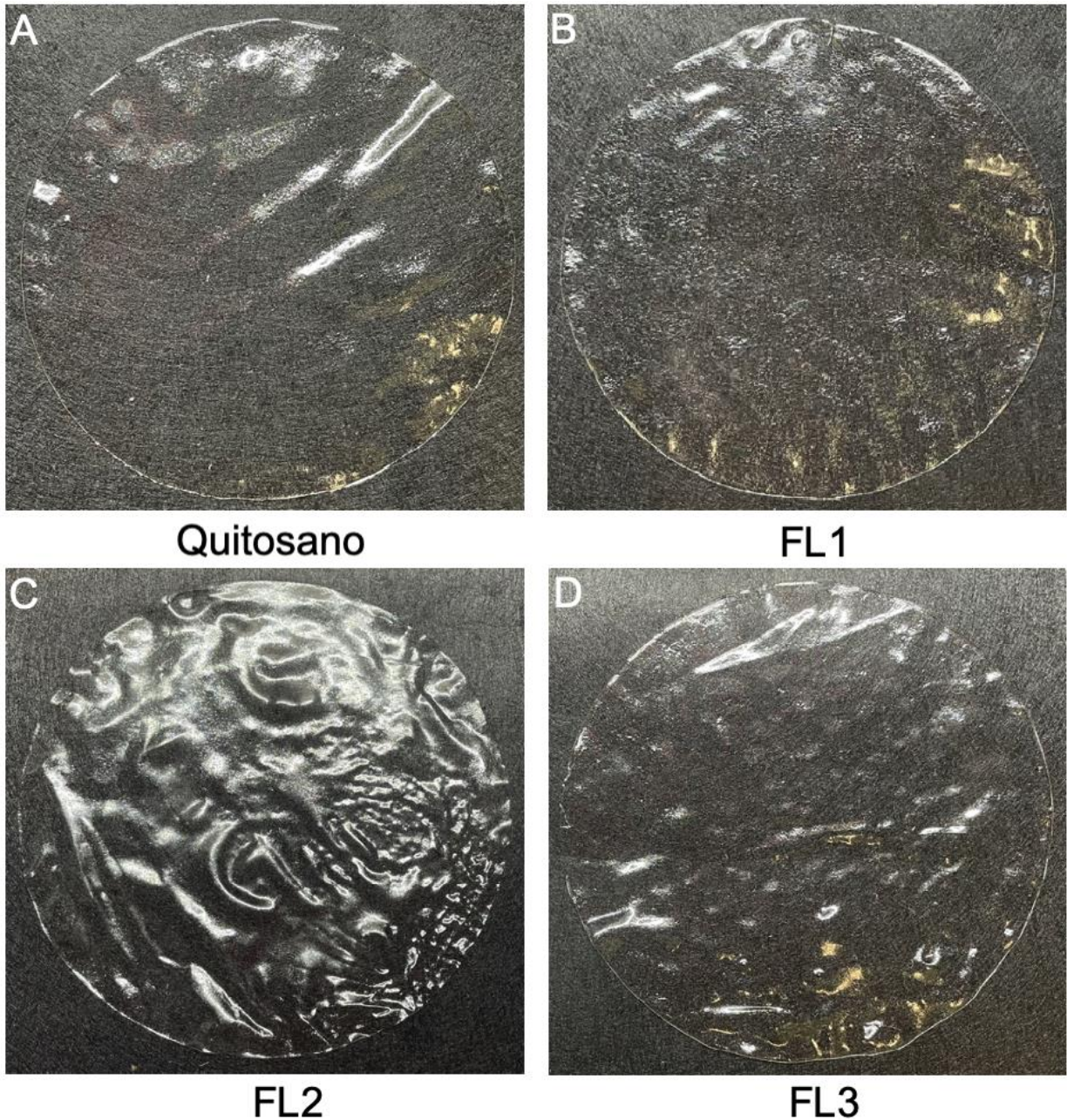


Figura 18. A) Película de quitosano sin aceite esencial. B) Película híbrida compuesta por quitosano y AE al 0.7%. C) Película híbrida compuesta por quitosano y AE al 1%. D) Película híbrida compuesta por quitosano y AE al 1.3%. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.7 Caracterización por FT-IR y SEM

El espectro del aceite esencial del falso laurel Figura 19 A mostró una banda a 3419 cm^{-1} correspondiente a la vibración simétrica del grupo OH que está presente en la estructura química del dihidrocarveol y terpinen-4-ol. Las señales a 2966 cm^{-1} y

2878 cm^{-1} son atribuidas a la vibración de estiramiento simétrico y asimétrico del grupo CH_3 . La señal en 1647 cm^{-1} indica la vibración de estiramiento de los enlaces $\text{C}=\text{C}$ característico del canfeno. 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 de los enlaces $\text{C}-\text{H}$. La señal emitida a 1415 cm^{-1} se presenta por la vibración simétrica y asimétrica de los grupos $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ respectivamente. El espectro obtenido para las películas híbridas a base de AELg y quitosano Figura 19 B muestran una banda de 3281 cm^{-1} atribuida a la presencia 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 $\text{N}-\text{H}$ (Shen & Pascal, 2015). Las bandas de 994 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} , 1157 cm^{-1} , corresponden a las señales de las vibraciones de estiramiento de las cadenas $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. La banda emitida en 852 cm^{-1} es atribuida a la vibración de estiramiento del enlace $\text{C}-\text{C}$ de la cadena del polímero.

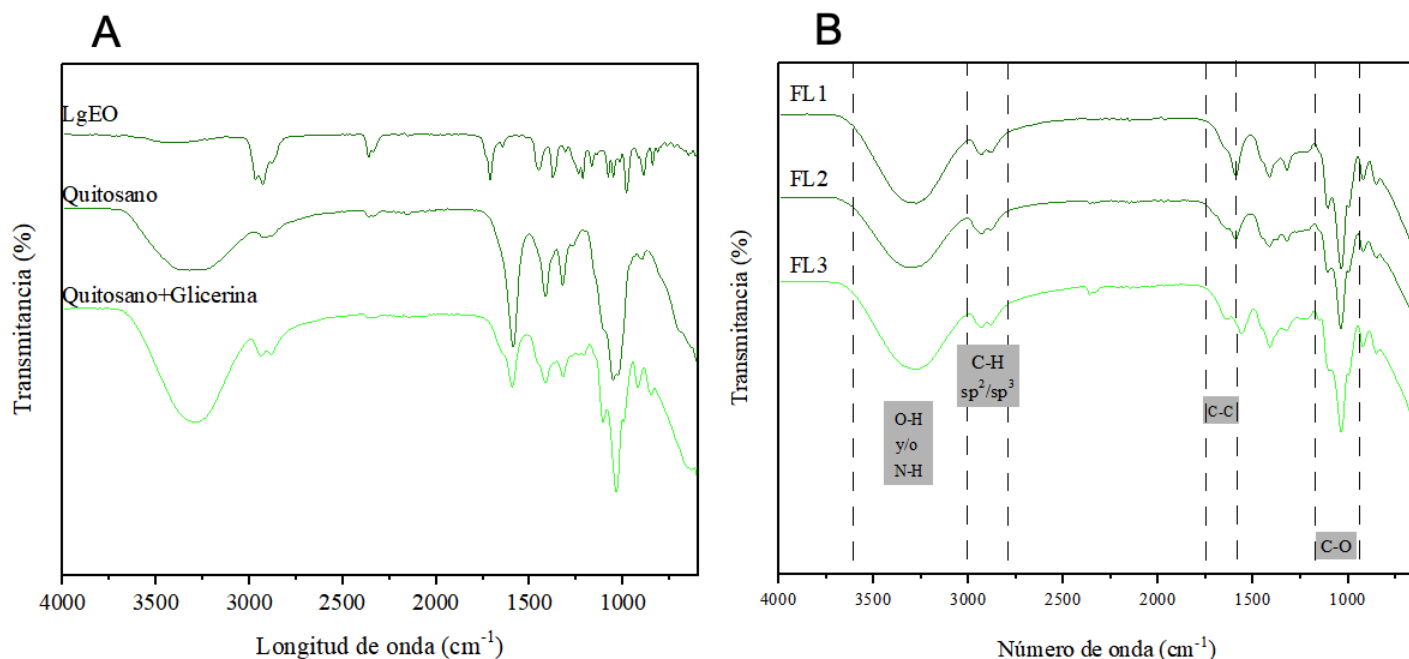


Figura 19. A) FT-IR del aceite esencial del falso laurel, quitosano y quitosano más glicerina. B) FT-IR de las películas híbridas de quitosano y aceite esencial de *Litsea glaucescens*. Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.

De acuerdo con las micrográficas de SEM Figura 20 se pudo observar que la superficie de la película de quitosano sin aceite esencial es homogénea y lisa en su mayoría. Sin embargo, se observan pequeños gránulos que se le atribuyen a partículas de polvo. Por otro lado, las micrográficas de las películas FL1 y FL3 presentan una superficie totalmente homogénea en comparación con la película FL2. Esta película FL2 presenta unos grumos debido a la presencia conglomerada de quitosano. Estas películas no presentan burbujas o agrietamiento en la superficie lo cual se ha mencionado que la matriz polimérica es una buena opción para incluir a los aceites esenciales en su composición.

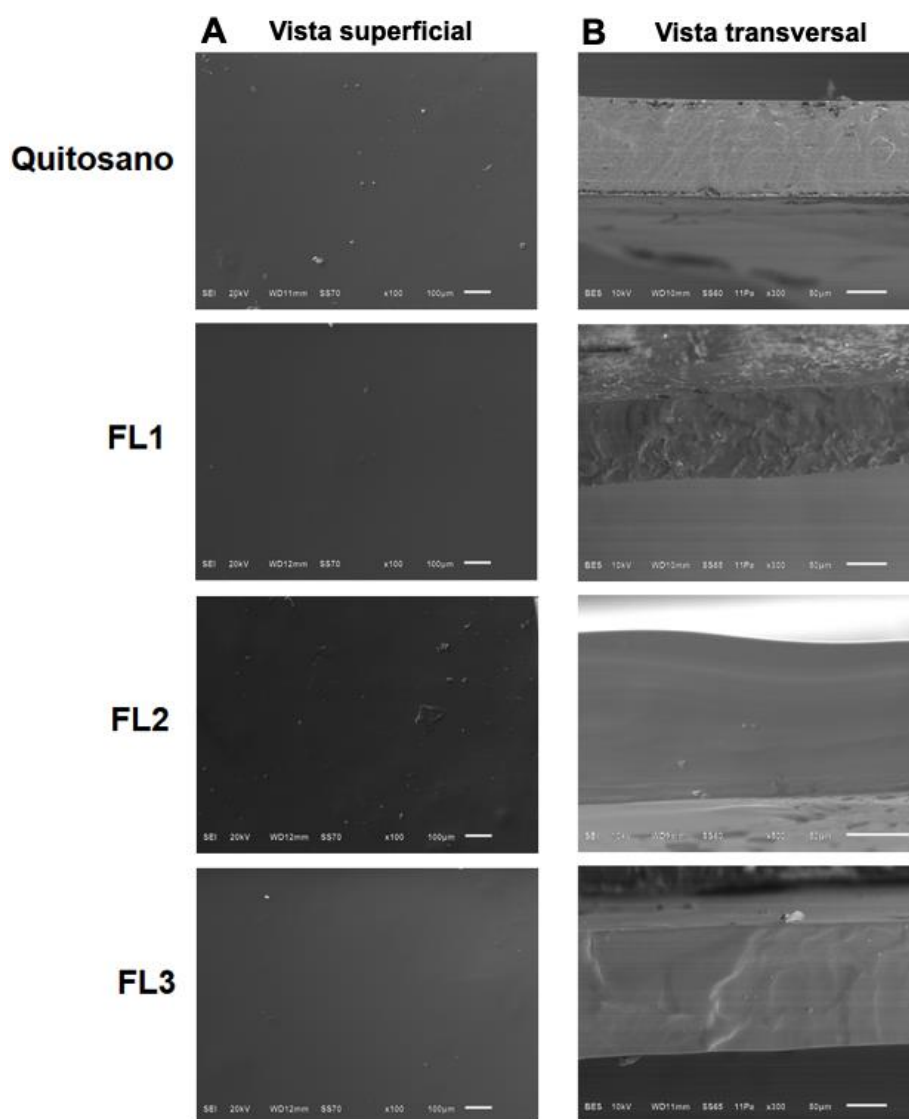


Figura 20. Micrográficas A)Vista superficial de las películas B)Vista transversal de las películas. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.8 Evaluación de transmitancia y opacidad

La importancia de estas dos técnicas brinda un entendimiento acerca de la protección que ofrece el material a los alimentos de los efectos de la luz especialmente de la radiación UV (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022).

En la Figura 21A se observan los resultados de la transmitancia (UV-Vis) a través de películas de quitosano que contienen diferentes cantidades de aceite esencial de *Litsea glaucescens*. Se observó que la transmitancia de las películas FL3 fue menor en comparación con la película de quitosano puro de 190-300 nm. Sin embargo, las tres películas que contenían aceite esencial muestran una tendencia similar a la misma longitud de onda.

Por otro lado, a partir de 450-900 nm el comportamiento en las películas de quitosano y FL1 con la menor concentración de aceite esencial presentan la misma transmitancia. Un caso contrario fue observado para las películas con 1.0% y 1.3% de aceite esencial. En los resultados de opacidad Figura 21B se muestra que la película de quitosano y la película FL1 la cual tiene 0.7% de AE de *Litsea glaucescens*, no hay diferencia, mientras que FL3 con el porcentaje de 1.3% de AE posee una opacidad mayor a los demás grupos brindando protección a los limones.

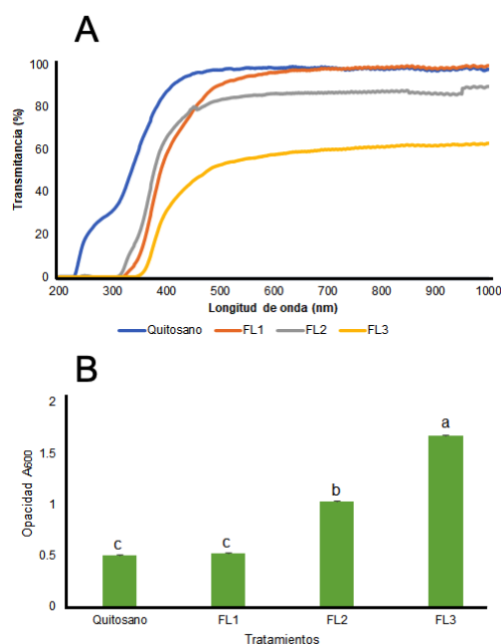


Figura 21. A) Transmitancia de las películas de quitosano y películas híbridas elaboradas con quitosano y AE de *Litsea glaucescens* (FL1-FL3). B) Opacidad de las películas de quitosano puro y películas híbridas con quitosano y AE de *Litsea glaucescens* (FL1-FL3) Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.

7.9 Evaluación de materiales *in situ*

El aceite esencial de *Litsea glaucescens* sobre el hongo fitopatógeno que se encontró en el limón persa, se le dio seguimiento de cómo es agresivo con el tejido vegetativo, para ello se establecieron 6 grupos el cual 5 grupos fueron infectados con *Penicillium digitatum* y dejando un grupo control, con un periodo de 6 días.

El grupo de fruto infectado sin ninguna película que lo recubriera comenzó a presentar sintomatología al segundo día, en el día 4 el limón ya presentaba coloración de color blanco recubriendo al limón, llegando al día 6 totalmente cubierto de hongo y perdiendo la turgencia del limón dando pauta a que el quitosano por sí mismo no elonga la vida de anaquel de los limones infectados. En el grupo donde los limones que solo fueron recubiertos por la película de quitosano puro, comenzó la presencia de color al día 4, teniendo como resultado un limón marrón al día 6 de la misma manera perdiendo la turgencia. Con el grupo FL1 que contenía a los limones recubiertos con la película híbrida de quitosano y con 0.7% aceite esencial de *Litsea glaucescens*, en el día 2 hubo presencia de coloración llegando al día 6 con un cambio total de coloración semejante al grupo de quitosano. Por último, los grupos FL2 película de quitosano y AE de *Litsea glaucescens* al 1% y FL3 película de quitosano y AE de *Litsea glaucescens* al 1.3% no presentaron síntomas de estar enfermos, pues no presentaron coloración alguna, de la misma manera que mantuvieron su turgencia, dando como posible empaque protector de la infección del hongo Figura 22.

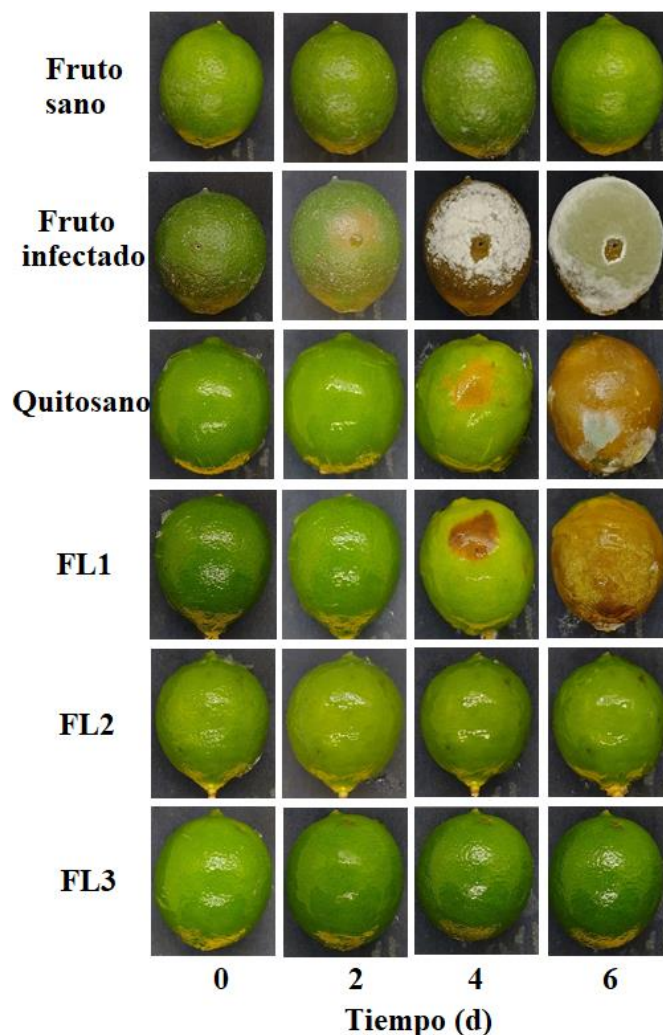


Figura 22. Evaluación de películas de quitosano y en combinación con aceite esencial de *Litsea glaucescens* FL1 (0.7%), FL2 (1%) y FL3 (1.3%) contra *Penicillium digitatum*. Fotografía: Propia JD Evangelista.

Los resultados de la evaluación de las películas contra *Colletotricum gloeosporioides* se les hizo igual un seguimiento el cual duró 10 días y se manejó con 6 grupos los cuales 5 de ellos fueron infectados con *Colletotricum gloeosporioides* y un grupo control.

Con el grupo infectado el cual no contaba con una película que lo recubriera comenzó a presentar cambios de coloración al día 6 y expandiéndose por completo el día 11 dando pauta a que el quitosano por sí mismo no alarga la vida de anaquel de los limones infectados, posteriormente en el grupo de las películas de quitosano puro, mantuvo su color hasta el día 6, siguiente al día 8 y 10 donde el limón ya

presentaba coloración marrón en formas elípticas características de la enfermedad producida por *Colletotricum gloeosporioides* y arrojaron que las más efectivas fueron aquellas cuyas concentraciones fueron de FL2, 1.0% y FL3, 1.3% dado que al día 10 no existió crecimiento de micelio en el fruto. Por el contrario, los limones infectados presentan crecimiento al día 6. Caso contrario a un limón sano que no presentó ningún crecimiento Figura 23.

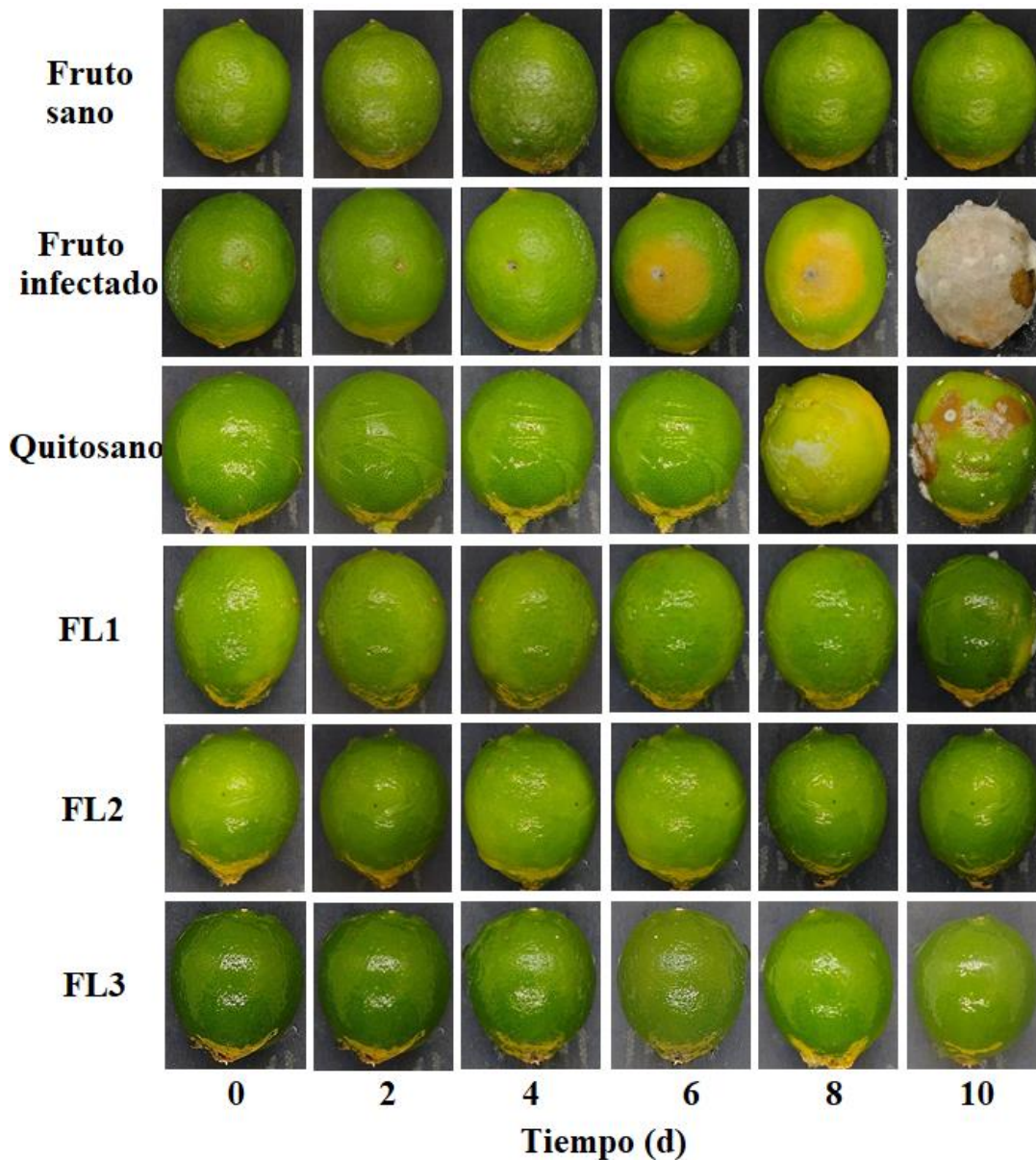


Figura 23. Evaluación de películas de quitosano y en combinación con aceite esencial de *Litsea glaucescens* FL1 (0.7%), FL2 (1%) y FL3 (1.3%) contra *Colletotricum gloeosporioides*. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.10 Pruebas antifúngicas *in vitro*

Se empleó resazurina para medir la actividad redox de las células fúngicas y determinar la viabilidad del aceite esencial, como se muestra en la Figura 24. Si el pozo se vuelve rosa, indica actividad metabólica activa, mientras que el color azul indica la ausencia de actividad y muerte celular. Los resultados de la concentración inhibitoria mínima (MIC) oscilan entre 1.52 mg mL⁻¹ y 6.08 mg mL⁻¹, lo que permite la inhibición de *Penicillium digitatum* (L1) y *Colletotrichum gloeosporioides* (L4).

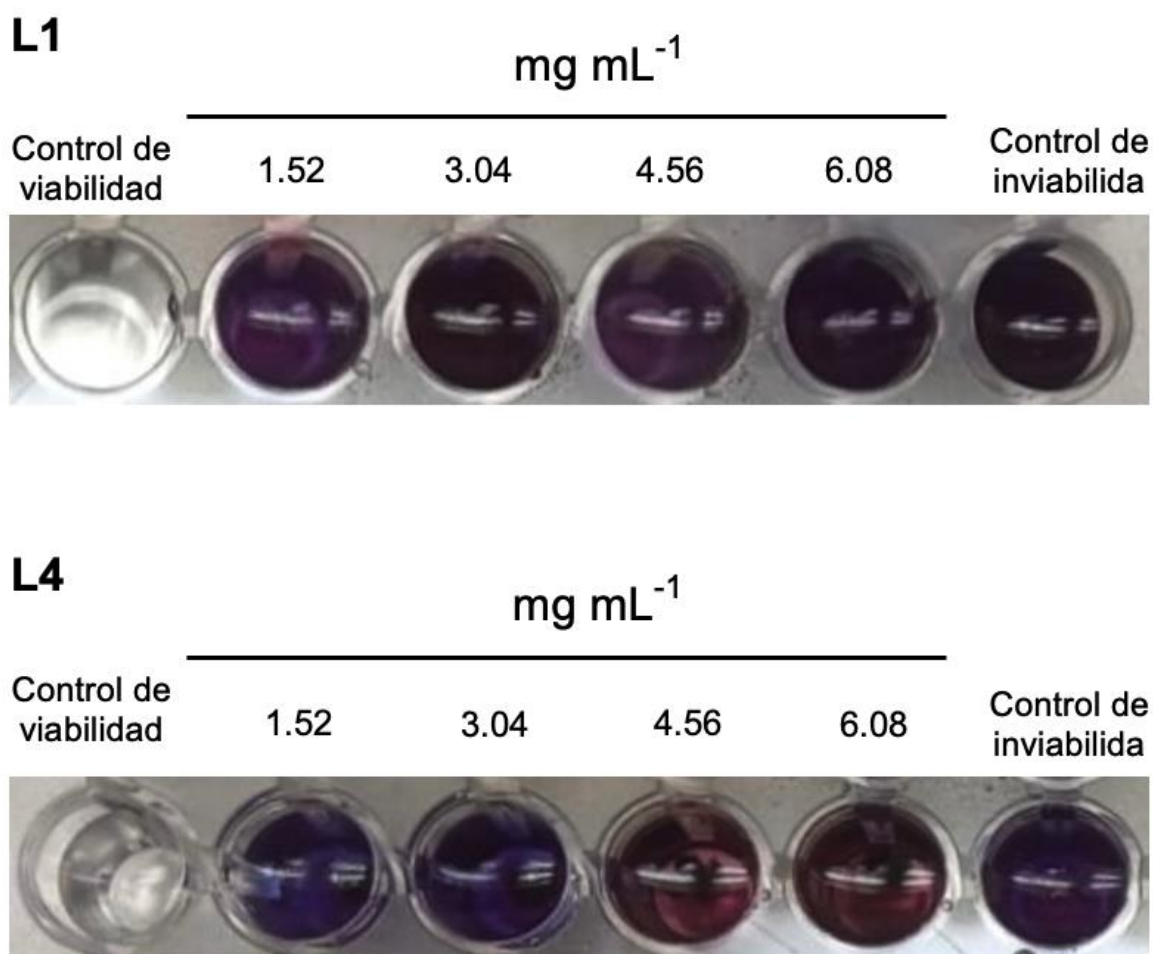


Figura 24. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de aceite esencial de *Litsea glaucescens* en discos de hifas de *Penicillium digitatum* (L1) *Colletotrichum gloeosporioides* (L4) obtenidos por el método de microdilución en caldo utilizando resazurina como control de viabilidad celular. Fotografía: Propia JD Evangelista.

7.11 Parámetro de calidad

Dentro de los parámetros que determinan la calidad de un fruto se encuentra la firmeza. La firmeza en limones tratados con películas a base de quitosano y quitosano con aceite esencial fueron comparadas con la firmeza de los limones sanos e infectados Figura 25. Para el caso de los frutos infectados (control positivo de infección), la firmeza fue evidentemente disminuida hasta un 96% al día 10 en comparación con los limones sanos. Ante esto, es evidente el daño excesivo que causa *Penicillium digitatum* sobre el limón persa. Así mismo, se pudo observar que la firmeza de los limones infectados (0.23 ± 0.05 kg/cm²) presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en comparación con los limones tratados con las películas al día 10. Por otro lado, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de un limón sano en comparación con el limón tratado con la película FL3 (8.33 ± 0.28 kg/cm²), lo cual indica que la película ayuda a preservar la integridad del fruto. Sin embargo, caso contrario ocurrió con las películas con 1.0% (FL2) de concentración de aceite esencial del falso laurel ya que no preserva la firmeza del fruto (5.26 ± 0.23 kg/cm²) en comparación con el limón sano. Además, se observó que el grupo de limones con película de quitosano puro (1.53 ± 0.23 kg/cm²) presenta diferencia estadística ($p < 0.05$) en comparación con la película de máxima concentración FL3 1.3% con aceite esencial e incluso con el grupo de los limones sanos.

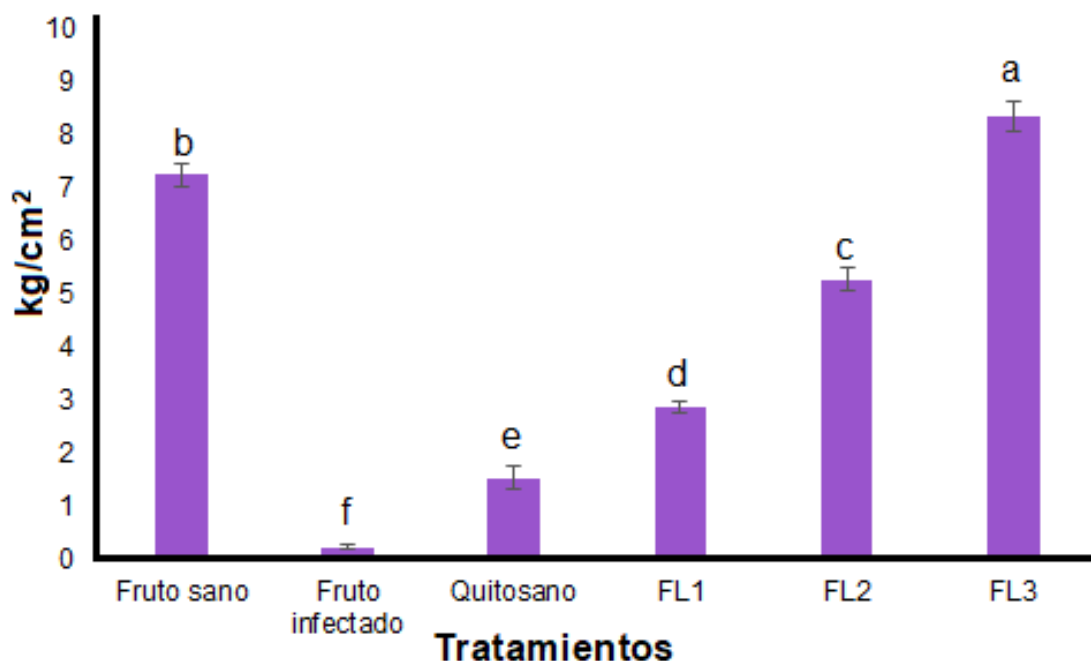


Figura 25. Evaluación de firmeza en limones infectados con *Penicillium digitatum* vs limones cubiertos con películas de quitosano con aceite esencial de falso laurel (*Litsea glaucescens*) Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.

Los resultados del análisis estadístico de las películas, los limones sanos y los limones infectados con *Colletotrichum gloeosporoides* se observan en la Figura 26. La firmeza de los frutos infectados con *Colletotrichum gloeosporoides* presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) contra el grupo de limones sanos (7.23 ± 0.23 kg/cm²) y aquellos que fueron tratados con películas con la máxima concentración de aceite esencial FL3 (9.09 ± 0.20 kg/cm²) al día 10. Los limones presentaron una pérdida de 82% y 86% en comparación con los limones sanos y tratados con las películas con 1.3% respectivamente. También se observó que el grupo de quitosano (1.5 ± 0.25 kg/cm²) y las películas FL1 (2.8 ± 0.22 kg/cm²) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con el grupo de los limones infectados con *C. gloeosporoides*. Sin embargo, se observó que la firmeza de los limones tratados con películas de quitosano y FL1 perdieron 42% y 25% respectivamente en comparación con los limones sanos. No obstante, el grupo de los limones tratados con la película FL2 (5.45 ± 0.20 kg/cm²) no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con el grupo de limones sanos

por lo cual la película puede inhibir el crecimiento del hongo, pero no ayuda a mantener su firmeza.

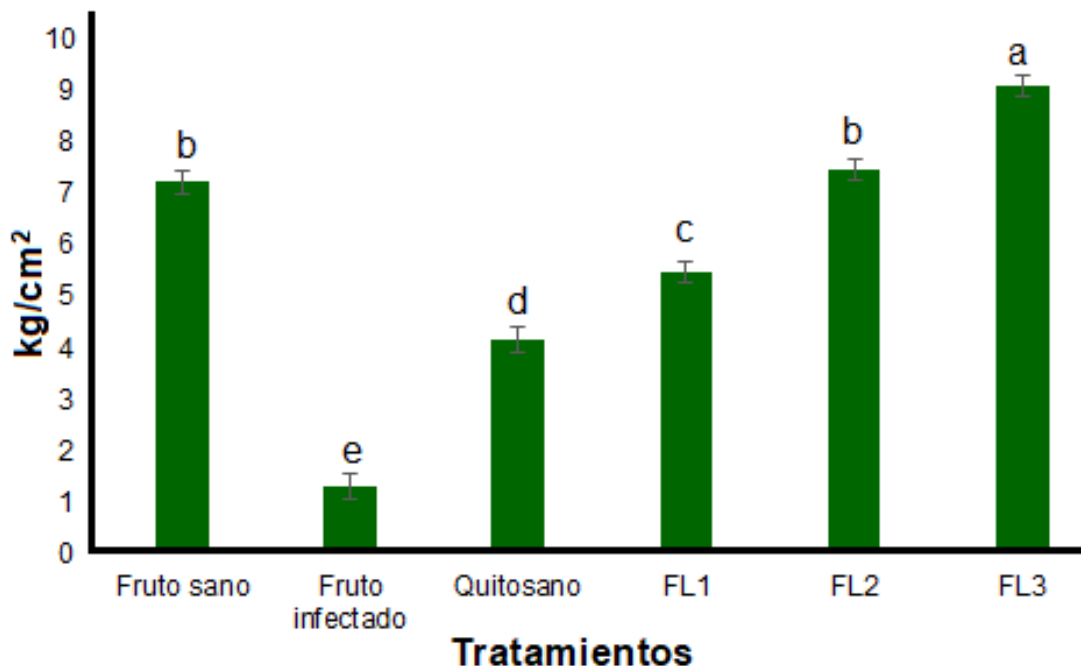


Figura 26. Evaluación de firmeza en limones infectados con *Colletotrichum gloeosporioides* vs limones cubiertos con películas de quitosano con aceite esencial de falso laurel (*Litsea glaucescens*) Fuente: Elaboración propia. JD Evangelista.

XIII DISCUSIÓN

Se hizo una implementación para mantener una buena apariencia y detener el deterioro físico del limón persa, en este trabajo de investigación se utilizó las películas de quitosano puro y quitosano en combinación con aceite esencial de *Litsea glaucescens* formando así las películas híbridas (FL1, FL2, y FL3), lo cual su función sería el recubrimiento de fruto contra los hongos fitopatógenos, *Penicillium digitatum* (L1) y *Colletotrichum gloeosporioides* (L4) los cuales afectan al limón persa.

Las películas que sólo se hicieron con quitosano mostraron poca eficacia inhibitoria contra los hongos estudiados. Según la investigación Tsai *et al.*, (2002) describe resultados similares, el quitosano que se extrajo de las garras de camarones mostró poca efectividad contra *B. cereus* y *Rhizopus sp.* Sin embargo, solo estuvieron inhibidos durante dos días, de manera similar a como se presentó en este trabajo.

Mientras que en el estudio de Guédez *et al.*, (2010) reportan que el quitosano llega a disminuir el desarrollo de hongos fitopatógenos en naranjas valencia (*Citrus sinensis*) donde igual sus principales hongos que le afectan son *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*.

En este proyecto de investigación se obtuvieron los componentes químicos del aceite esencial de *Litsea glaucescens*, Tabla 6 se obtuvo que el componente principal es 1,8-cineol (eucaliptol) pues lo contiene con 44.6% del total, el segundo compuesto mayoritario se encuentra a dihidrocarveol con un 23.8%, α -pineno (5.1%), canfeno (2.6), beta-pineno (3.1%), Gama-terpineno (2.4%), terpinoleno (0.3%), linalol (0.5%), 1-terpineol (1.4%), terpinen-4-ol (2.5%), carvona (0.9%), bornyl acetato (1.3%), trans-carvona oxido (0.3%), neo-Isopulegyl acetato (0.4%), Alil octanoato (0.3%), safrol (0.5%), trans-dihidro-alfa-terpinil acetato (0.7%), cis-pinocarvil acetato (1.2%), geranil acetato (0.9%), beta-cariofileno (0.9%) y alfa-humuleno (0.9%). Estos fueron los compuestos más abundantes y concuerda con el trabajo realizado con Lazcano-Torres *et al.*, (2019) pues mencionan que el eucaliptol es el componente mayoritario con 11.97% del total de la composición del aceite esencial. Seguido se encuentra el linalol (10.35%), γ -terpineno (10.04%), β -cimeno (9.40%), 2-norpineno (9.42%), (-)-terpinen-4-ol (8.42%) y el (-)- β -pineno (8.06%). Los resultados obtenidos en este trabajo también concuerdan con lo reportado con Jiménez-Pérez *et al.*, (2011) ya que dentro de los componentes se encuentran principalmente monoterpenos, presentando mayor contenido de eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol y α -terpineol; algunos otros terpenos minoritarios pueden considerarse diferenciales ya que no se encontraron en el presente trabajo.

Son pocos los estudios sobre el aceite esencial de *Litsea glaucescens* que demuestren su efectividad ante hongos fitopatógenos. Pero de acuerdo con Flores-Hernández (2022), el aceite esencial de *Litsea glaucescens* tiene presencia antifúngica contra el hongo *Fusarium concentricum* el cual es uno de los hongos fitopatógenos que afecta al tomate verde. En el estudio de Lazcano-Torres *et al.*,

(2019). demuestran que el AELg posee actividad antimicrobiana en alimentos, se sugiere que es un hallazgo pues podría ser empleado como aditivo antimicrobiano haciendo referencia a través de inclusión en matrices de biopolímeros comestibles para conservación de alimentos.

Penicillium digitatum es uno de los hongos que presentó mayor agresividad, esto debido a que su proliferación es muy rápida, pues en pocos días ya estaba recubierto el limón que posteriormente con el paso del tiempo, las vesículas de jugo son las más dañadas, haciendo que el limón tenga olor desagradable y perdiendo el jugo que posee (Papoutsis *et al.*, 2019) de acuerdo con la Figura 22, los limones que presentaron un menor daño por *Penicillium digitatum* son los que tienen mayor proporción de AELg las cuales van de proporciones de 1% a 1.3% como tales son niveles bajos, esto a comparación con el estudio realizado por Raigón & Cortell (2012), los cuales inhibieron el crecimiento en forma *in vitro* de *P. digitatum* con la característica que utilizaron aceite esencial de tomillo y Timol respectivamente al 2% de concentración.

Colletotrichum gloeosporioides este hongo que es uno de los más comunes en frutos, pues de acuerdo con Timmer *et al.*, (1994) este hongo a pesar de que afecta en la postcosecha también provoca la enfermedad de la caída de fruto causando la emergencia de manchas de color oscuro. En la Figura 23 vemos que el quitosano puro al 1% comienza con sintomatología al día 6 después de ser inoculado, siendo la mitad de lo que duró el experimento, dando un bajo porcentaje de efectividad esto a comparación con Ali *et al.*, (2013) la cual utilizaron el quitosano al 2% teniendo un control de la Antracnosis 80%-93 esto en el fruto de la pitaya, y teniendo resultados muy distintos con el estudio realizado por Berúmen-Varela *et al.*, (2015) el cual utilizaron el mismo porcentaje de quitosano al 1% y controlaron la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* mangos, dando pauta que el quitosano no siempre es efectivo y necesita de un componente adicional como un aceite esencial.

De acuerdo con las pruebas de SEM se obtuvo que la superficie de la película de quitosano sin aceite esencial es homogénea y lisa en su mayoría. Sin embargo, se llegan a ver pequeños gránulos que se les atribuyen a partículas de polvo. Mientras

que en las películas FL1 y FL3 presentan una superficie totalmente homogénea en comparación con la película FL2. En cambio, el corte transversal de la película de quitosano y la concentración menor de aceite esencial presenta una apariencia rugosa en comparación con las otras películas. En la vista transversal de la película FL2 se observa una apariencia lisa salvo la presencia de unas pequeñas burbujas en la parte inferior de la película coincidiendo con el estudio Morales-Rabanales *et al.*, (2022). Algunos autores como Sánchez *et al.*, (2014) mencionan que los poros que se observan son debido a la técnica de preparación de la película. Sin embargo, los poros que se encuentran en las películas de este estudio no atraviesan toda la película por lo que pudieran estar relacionados con la baja permeabilidad al vapor de agua de la película

Se identificaron las bandas de AE *Litsea glaucescens*, Quitosano y Glicerina con la prueba FT - IR los cuales son como huellas químicas que en cierta longitud se presenta tal grupo característico de compuestos. La banda de 3419 cm^{-1} está asociada con el grupo OH, indicando la presencia de terpinen-4-ol. Adicionalmente, se descubrieron bandas a 2966 cm^{-1} y 2878 cm^{-1} , que son características del grupo CH_3 , así como una banda a 647 cm^{-1} . El grupo de vinilo terminal de Dihydrocarveol está indicado por la banda en 1690 cm^{-1} , mientras que las bandas en 1456 cm^{-1} y 1415 cm^{-1} corresponden a los grupos C-H y C-O-H, respectivamente. Adicionalmente, se descubrió una banda de 1374 cm^{-1} que indica la deformación del grupo CH_3 y coincide con lo reportado por García *et al.*, (2017). La señal emitida a 985 cm^{-1} corresponde a una vibración simétrica del grupo CH_2 , la señal a 981 cm^{-1} se asocia a la vibración del enlace CH y CH_2 que pueden ser atribuidas al compuesto 1,8-cineol. Mientras que las señales emitidas a 886 cm^{-1} y 652 cm^{-1} corresponden a alfa - pineno lo cual concuerda con lo reportado con Schulz *et al.*, (2005). La banda en 756 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del enlace de C=C, la cual es característica del gamma- terpineno (Moisa *et al.*, 2019).

Para la identificación de compuestos en las películas híbridas elaboradas con quitosano y AE *Litsea glaucescens* se utilizó el método de FT – IR es para dar certeza que los componentes del aceite esencial están presentes en las películas

híbridas FL1, FL2 y FL3. El quitosano Figura 19B muestran una banda de 3281 cm^{-1} atribuida a la presencia del polímero (quitosano). Esto se puede cotejar en la señal en 1640 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de H-O-H. La señal en 1648 cm^{-1} corresponde a la vibración de flexión de tijera del enlace N-H₂, siendo la señal detectada a 1558 cm^{-1} asociada al doblamiento del enlace N-H (Shen & Pascal, 2015). Las señales en 2935 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento asimétrico del C-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 -N-H. La banda en 1037 cm^{-1} hace referencia a la banda de absorción de la glicerina por las vibraciones de los enlaces C-C y C-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 C-O, C-C, C-O-C. La banda emitida en 852 cm^{-1} es atribuida a la vibración de estiramiento del enlace C-C de la cadena del polímero, haciendo la inferencia que el aceite esencial está presente en la película híbrida.

En este trabajo, se exploró una nueva alternativa para proteger los frutos de los hongos que afectan su calidad y, al mismo tiempo, evitar la generación de residuos dañinos para el medio ambiente. Se encontró que los aceites esenciales tienen propiedades antifúngicas que los convierten en una opción interesante para la protección de frutas, como el limón persa. Además, se crearon películas híbridas con un alto rendimiento en la protección de los limones infectados con hongos, lo que brinda una nueva esperanza para mantener la calidad de la postcosecha y evitar pérdidas económicas para los productores sin dañar el medio ambiente. En definitiva, el uso de aceites esenciales y películas híbridas promete ser una alternativa natural y efectiva para controlar los hongos fitopatógenos y reducir el uso de químicos sintéticos en la agricultura. Con este proyecto, se espera contribuir al desarrollo de prácticas más sostenibles y responsables con el medio ambiente.

IX CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Litsea glaucescens* tiene un efecto antifúngico contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium digitatum* los cuales son hongos que mayor afecta a los cultivos de cítricos en México.
- Las películas híbridas elaboradas con quitosano y aceite esencial de *Litsea glaucescens* es muy eficiente para combatir hongos que se desarrollan en la cosecha del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka).
- Las películas híbridas dan resistencia de firmeza a los limones de la misma forma que mantienen el color del fruto, este estudio da pauta para que se siga investigando las propiedades del falso laurel *Litsea glaucescens* contra hongos fitopatógenos ya que en la actualidad es casi nula la información.
- La calidad del limón persa puede ser afectada por hongos como *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, el uso de películas híbridas que contienen concentraciones de aceite esencial de *Litsea glaucescens* (FL2 1.0% y FL3 1.3%) puede inhibir el crecimiento de estos hongos y prolongar la vida útil del limón después de la cosecha hasta más de 7 días. Dando una alternativa de empaque para el limón pues este material es biodegradable, evita la transpiración, no genera residuos y lo mejor no es tóxico.

X BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass, third ed. Allured Publishing Co., Illinois.
2. Agrios, G. (2005). Fitopatología. Segunda Edición. Grupo Noriega. México DF. 838p.
3. Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., Siddiqui, Y., Alderson, P. G., & Maqbool, M. (2013). Effectiveness of submicron chitosan dispersions in controlling anthracnose and maintaining quality of dragon fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 147-153. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.06.027
4. Álvarez, G.M. (1981). Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana. Editorial Limusa-Wiley., México. 93 p.
5. Ariza, R., Alia, I., Ambriz, R., & Lopez, V. (2009). Manejo agronómico para la producción de limón persa en el estado de Morelos. Folleto para productores Núm. 48. CEZACA. CIRPAS.
6. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
7. Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa Pacheco, Z., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 23(2), 103-121. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
8. Berúmen-Varela, G., Coronado-Partida, L. D., Ochoa-Jiménez, V. A., Chacón-López, M. A., & Gutiérrez-Martínez, P. (2015). Efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra *Colletotrichum* sp. en mango

- (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Investigación y Ciencia*, 23(66), 16-21. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67446014003>
9. Besoain, C.X., Gardiazabal, I.F., Opazao, M., & Pablo, G. (1994). Limonero (*Citrus limon* L.) cv. Eureka, Genova. *Boletín Micrológico*, 9, 109-113.
 10. Bokschi, A. I., S. C. Morris, and R. McConchie. (2007). Environmentally safe control of postharvest diseases of melons (*Cucumis melo*) by integrating heat treatment, safe chemicals, and systemic acquired resistance. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35(2), 179-186.
 11. Bosset, J., Gallmann, P. U., & Sieber, R. (1994). Influence of light transmittance of packaging materials on the shelf-life of milk and dairy products. A review. In M. Mathlouthi (Ed.), *Food Packaging and Preservation* (pp. 222-268). New York: Chapman & Hall Inc.
 12. Bouafif, C., Messaoud, C., Boussaid, M., & Langar, H. (2018). Fatty acid profile of *Cystoseira* C. Agardh (Phaeophyceae, Fucales) species from the Tunisian coast: Taxonomic and nutritional assessments. *Ciencias Marinas*, 44(3), 169–183. <https://doi.org/10.7773/cm.v44i3.2798>
 13. Brown, G.E, Miller, W.R. (1999). Maintaining fruit health after harvest. In: *Citrus Health Management*. Timmer, L.W., Duncan, L. W. (Eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA.
 14. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
 15. Castle, W., Tucker, D., Krezdorn, A., & Youtsey, C. (1993). *Rootstocks for Florida Citrus*. Florida: Rootstock Selection.

16. Chadha, S., & Kale, S. P. (2015). Simple fluorescence-based high throughput cell viability assay for filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 61(3), 238–244. <https://doi.org/10.1111/lam.12460>
17. Chávez, A., Valbuena, C., & Marinela, C. (2012). Obtención y caracterización de papel de quitosano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(2), 82-98.
18. Coyotl-Pérez, W.A.; Rubio-Rosas, E.; Morales-Rabanales, Q.N.; Ramírez-García, S.A.; Pacheco-Hernández, Y.; Pérez-España, V.H.; Romero-Arenas, O.; Villa-Ruano, N. (2022). Improving the Shelf Life of Avocado Fruit against *Clonostachys rosea* with Chitosan Hybrid Films Containing Thyme Essential Oil. *Polymers*, 14, 2050. <https://doi.org/10.3390/polym14102050>
19. Delgado, G.L, Peña, M,A, I (2017). Microscopios Electrónicos de Barrido (SEM). 2001, de 2001 Sitio web: http://www.linan-ipcicyt.mx/Microscopio_de_Barrido.html
20. Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez, G. G, Pacheco-Hernández, Y. & Villa-Ruano, N. (2017). Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An in vitro approach towards its biological control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2), 326-337. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1701-2>
21. FAO. (2009). FAOSTAT. Recuperado el 30 de abril de 2023, de <http://www.faostat.fao.org>
22. Flores-Hernández, M. (2022). Generación y evaluación de películas híbridas para el control de hongos fitopatógenos. Repositorio institucional.buap.mx. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16470>

23. Gadi, B., Abazari, A., Golberg, A., Yarmush, M. L., & Toner, M. (2016). Single-step electrical field strength screening to determine electroporation induced transmembrane transport parameters. Elsevier, 9.
24. García C, Montero G, Coronado MA, Valdez B, Stoytcheva M, Rosas N, et al. (2017). Valorization of eucalyptus leaves by essential oil extraction as an added value product in Mexico. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1187–1197. doi: 10.1007/s12649-016-9695-x
25. Gómez, Á., Barrera, A., Marín, V., & Olvera, J. (2005). Limón persa Tendencias en el Mercado Mexicano. Universidad Autónoma Chapingo Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (PIAI-CIESTAAM), 151.
26. Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., Olivar, R., & Maffei, M. (2010). Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 43-47.
27. Günther, E. (1948). *The Essential Oils - Vol 1: History - Origin in Plants - Production - Analysis*. New York: Nostrand Company.
28. Gutiérrez, T. J. & Alvarez, V. A. (2017). Eco-friendly films prepared from plantain flour/PLC blends under reactive extrusion conditions using zirconium octanoate as a catalyst. *Carbohydrate Polymers*, 178, 260-269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.026>
29. Hernández, I. (2004). La Quitosana: Un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 5-14.

30. IPNI (2022). Índice Internacional de Nombres de Plantas. Publicado en Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries y Australian National Botanic Gardens. [Consultado el 23 de agosto de 2022].
31. Ismail, M., & Zhang, J. Z. (2004). Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Management*, 15, 29-35.
32. Jiménez-Pérez, N. C., Lorea-Hernández, F. G., Jankowski, C. K. & Reyes-Chilpa, R. (2011). Essential oils in Mexican Bays (*Litsea* spp., Lauraceae): Taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Economic Botany*, 65(2), 178-189.
33. Klopffer, M. H., & Flaconnèche, B. (2001). Transport properties of gases in polymers: bibliographic review. *Oil & Gas Science and Technology. Revue d'IFP Energies Nouvelles*, 56, 14185-14190.
34. Krug, J.C. (2019). Moist chambers for the development of fungi. In: Mueller, G.M., Bills, G.F., & Foster, M.S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods* (pp. 589-593). Elsevier. ISBN: 0125095511.
35. Lazcano-Torres, C. I., Romero-López, M. R., Fuentes-Jiménez, L. & García-Zebadúa, J. C. (2019). Perfil aromático del aceite esencial de *Litsea glaucescens* y revisión de la capacidad antimicrobiana para conservación de alimentos. *REIA* 5:5-10.
36. Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., & de la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 118(4), 889-899. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>

37. Lezama, D., Flores, L., Manuel, N., Hernández, R., Ángel, T., Alva, M., & Jesús, C. (2018). Uso de fungicidas en el manejo postcosecha de Limón persa (*Citrus Latifolia*). *Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 6, 5.
38. Mangione, L. (2016). Postcosecha en Cítricos: Enfermedades y daños. *Sanidad Vegetal Laboratorio de Fitopatología*, 20.
39. Mantsch HH, Yang PW, Casal YL. (1986). Infrared spectrometry of living systems: Current trends and perspectives. *Journal of Molecular Structure*, 141, 237-242. DOI:10.1016/0022-2860(86)80328-3.
40. Medina-Urrutia, V. M., Robles G., M. M., Becerra R., S., Orozco S., J., Garza L., J. G., Ovando C., M. E., Chávez C., X., & Félix C., F. A. (2001). El cultivo del Limón Mexicano. Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA-INIFAP. 188 p.
41. Méndez, A. D. G., & Cárdenas, G. M. P. (2010). Influencia del cloruro de calcio y de un tipo de empaque sobre las propiedades fisicoquímicas y la textura de la fresa (*Fragaria x ananassa Duch*) durante el almacenamiento. *Revista Facultad Nacional Agraria- Medellín*, 63(1), 5417-5427.
42. Moisa C, Lupitu A, Pop G, Chambre DR, Copolovici L, Cioca G. (2019). Variation of the chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oils by phenological stages. *Rev chim.*, 633–7. <http://dx.doi.org/10.37358/rc.19.2.6973>
43. Morales-Rabanales, Q. N., Cóyotl Pérez, W. A., Rubio-Rosas, E., Cortes-Ramírez, G. S., Sánchez-Ramírez, J. F., & Villa-Ruano, N. (2022). Antifungal properties of hybrid films containing the essential oil of *Schinus molle*: protective effect against postharvest rot of tomato. *Food Control*, 134, 108766. doi: 10.1016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108766>

44. Necha, L. L., & Barrera, L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *UDO Agrícola*, 33.
45. Ochoa, J.L., Hernández-Montiel, L.G., Latisnere-Barragán, H., León de La Luz, J.L., Larralde-Corona, C.P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 352-359.
46. Palou, L. (2007). Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de Producción Integrada. Centre de Tecnologia Postcollita, Institut Valencià d'Investigacions Agràries, 12.
47. Papoutsis, K., Mathioudakis, M. M., Hasperué, J. H., & Ziogas, V. (2019). Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends in Food Science & Technology*, 86, 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053>
48. Peralta-Ruiz, Y., Grande Tovar, C., Sinning-Mangonez, A., Bermont, D., Pérez Cordero, A., Paparella, A., & Chaves-López, C. (2020). *Colletotrichum gloeosporioides* inhibition using chitosan-*Ruta graveolens* L essential oil coatings: Studies in vitro and in situ on *Carica papaya* fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020>
49. Prusky, D., & Lichter, A. (2008). Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 281-289.
50. Quintana-Obregón, E. A., Plascencia-Jatomea, M., Burgos-Hernández, A., Figueroa-Lopez, P., & Cortez-Rocha, M. O. (2013). Isolation and identification

of fungi from leaves infected with false mildew on safflower crops in the Yaqui Valley, Mexico. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 19-27.

51. Raigón, M. D., & Cortell-Moll, S. (2012). Efecto de la aplicación de extractos de tomillo en la conservación post-cosecha de frutos cítricos. In *Actas del X Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica*.
52. Rodríguez, C., & Mendoza, A. (2014). Una amenaza para la citricultura mexicana. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 4.
53. Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017). Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis, and control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 549-570. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>
54. Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1325-1332.
55. Ruiz, R., Vela, V., & Moreno, R. (2017). Exportación de cítricos mexicanos, alternativas para el mercado de exportación. *Horizontes de la Contaduría en las Ciencias Sociales*, 9.
56. SAGARPA. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2016-2030 p,23 https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257073/Potencial-C_tricos-parte_uno.pdf

57. SAGARPA. (2019). México, entre los líderes en producción de cítricos a nivel mundial. Retrieved from <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/mexico-entre-los-lideres-en-produccion-de-citricos-a-nivel-mundial-204648>.
58. Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H., & Özcan, M. (2005). Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 39(2), 249-256.
59. Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 289-296. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046
60. SIAP. (2021). Estadística de Producción agrícola por estado.
61. Smilanick, J.L., Mansour, M.F. (2008). Influence of temperature and humidity on survival of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. *Plant Disease*, 91, 990-996.
62. Souza, E. T., Siqueira, L. M., Almeida, R. N., Lucas, A. M., da Silva, C. G. F., Cassel, E., & Vargas, R. M. F. (2020). Comparación de Diferentes Técnicas de Extracción del Aceite Esencial de *Zingiber Officinale*. *Brasil. Arco. Biol. Tecnología*, 63.
63. Timmer, L.W., Agostini, J.P., Zitko, S.E., Zulfiqar, M. (1994). Postbloom Fruit Drop and Increasingly Prevalent Disease of Citrus in the America. *Plant Disease*, 78(4), 329-334.
64. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J. (2000). *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd Edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 92p.

65. Tropicos.org. Jardín Botánico de Misuri. (2023) <https://tropicos.org>
66. Tsai, G-J., Su, W-H., Chen, H-C., Pan, C-L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish Sci*, 68(1), 170–177. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00404.x
67. Turner, T., Burri, B.J. (2013). Potential Nutritional Benefits of Current Citrus Consumption. *Agriculture*.
68. Vanegas, M. J. (2002). Guía Técnica Cultivo del Limón Pérsico. Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1, 46.
69. Villamizar-Véliz, M., & Aular, Y. (2022). Métodos de extracción del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Ingeniería UC*, 29(1), 3–14. <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i1.90>

XI ANEXOS

12. 1 Abreviaturas

AE= Aceite esencial

AELg= Aceite esencial de *Litsea glaucescens*

FT-IR= Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

GC-MS= Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Ficha del herbario de la UNAM de la especies vegetal de la cual se extrajó el aceite esencial.



HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO

Folio: **177881**

Especie: *Litsea glaucescens* Kunth

Familia: Lauraceae

Localidad: Tepeaca, Puebla.

Altitud: 2840 m.

Tipo de vegetación:

Forma biológica: Arbusto

Color flor:

Nombre común: laurel

Tamaño: 0.3 m.

Fruto: No se colectó

Colector: Wendy Abril Coyotl Pérez

Usos: Medicinal

Determinó: R. Cruz Durán, 2021

Número de colecta: s.n.

Fecha colecta: 15/febrero/2021