



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Pablo Fernando Aparicio García, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022621, y que lleva por título **“Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

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

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

A t e n t a m e n t e

Dr.Dagoberto Guillen Sánchez
SINODAL PRESIDENTE .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

DAGOBERTO GUILLEN SANCHEZ | Fecha:2020-09-29 01:11:36 | Firmante

rI0mpD+4skcFqxLAD6ZJo4CLFwIAANLA0erk9xlwCe4na8WQQAX98F0uvTV+G+F6I2y79HZQkp5nSYpcyxVZ2I9in8aaHsRghBsNOMDm3FfeUxcmVsh7b8Mldb+v/LKW6CuzBIUI
dZqHgZqrAL27GPjWBvSNfakLXzptBptQ+AxSN562+bWtcBY1ooYQe6Yz0Q82b61ZUsWNsWV7fV307/rNs/9hEuRugF1Spd7zZUyws0NbCakbEa/5C74Mppj60oyloIHN8eN3c4Rju
Am4HdiYLDngc3F0s+ydr89yg1uX6E2uazVPsdiKAJI9KGpOMawPDVbr37JBLfrkFGg8tMQ==

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



[nhz9F2](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YAWQfTE9SArrGT5IjRQSILbSB1tKrj3P>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Pablo Fernando Aparicio García, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022621, y que lleva por título **“Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

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

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

A t e n t a m e n t e

Dr.Hector Sotelo Nava
SINODAL SECRETARIO .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

HECTOR SOTELO NAVA | Fecha:2020-09-16 12:02:18 | Firmante

rA6WQxA6lJWmyNsMumu2J7zxqbb9GeDIKG06kPzpu5j3hypAVRD7jf3XdDDR/HkGWpgu1bi3Vj6/v4c41E/33ek315HC4OpUjv2MZS8ZH1bQbmGSCIQM1NbrnOcXR06Xry/luD3wj3o4J2vilzc3g2zPgGwfES1PiFo5Wh1GCT4eOeOBVDPRekKQBhqQByOsALw96QCpJtICMgSQqidIAVrO75vpILyQpfBxb61SPXEjcAp3mryu8l1aqbZVZuFByj++E1JN2jDa4kqSt7T+ZH28VZWBRwn6Yy+OzSsoVlesrPu5m+21w7DRJ0/+RKFKXmI5qSJRFuC1GeW8ZxoEIA==

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



QCzXWB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DVgPpfOgWXiVEJv96oVbDIVxiXhvGvQS>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Pablo Fernando Aparicio García, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022621, y que lleva por título **“Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

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

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

A t e n t a m e n t e

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña
SINODAL VOCAL .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2020-09-21 14:22:14 | Firmante

i6nTEW7LZnC1TWaZ/Tp58/74iqXd+dAgtvT8jly+1Lv/90LAoMtihtf6YonhXF6JdTIR196X7/XXdmjWSXEEudJ0Yovv8QTdHO5PCmSdpObl2Sy9R9SZyqk+xY6g1mfxv2j/zfbRm9gY
ZtmEbpIHUhmjkbk2L9INg2dwLT0KUidDluCx5l+pJvKAO0/rfFu+eluksdGKczFygbdzrQv/OCeg4uLlhDz7j/R+lMbmdSq8pMQZGcqRF59GEogtD9qib6CGdlgC7dy5+e0GLtdPexnsS
klzWdF5dgu/S44dZqMJYp0x0zctVYyTgX5aaSvsePnDXAneQ0fwbmBQQyLYHQ==

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



cJ8q6y

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dw2dCL7OxUpObYnCAu0xL3ZfalekwIUL>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Pablo Fernando Aparicio García, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022621, y que lleva por título **“Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

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

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

A t e n t a m e n t e

Dra.Margarita de Lorena Ramos García
SINODAL Suplente .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA | Fecha:2020-08-25 18:26:42 | Firmante

noUxzm0C8sDgY1B45fnG3pm2LGrHS+ZhKWlbf7hIUGlr+eK3MMTUaFcBF2R5ZzRM2PehOVAKrbFMiYue1xpOk/AAPp5E5URVSKuLse/1sbL9SqEQS2ILWTtVz/d2Ht5QUU37A3ld9yBc3a8CaqOIfFH7+B3yqrAXx82f7Fv76UGa3r7PcO33IAz9QA3wAbObFkZAYINykbaF2E0XfYMKHYxNFb65GvS7Z7aZnD/2ehnwB7JG+yyWka5ydf7TvwkYMrwZ794kjh2485CKbDyf9/ulTXmrUtlJYh4Fuvjk3DCjZawEjfi3FqUt4kzuRkwy8bltPYR0EU71Gcl10tYzA==

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



zLOE4k

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UV1uqY4WENJmFhWXNap91Gjj0WLIBu0W>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Pablo Fernando Aparicio García, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022621, y que lleva por título **“Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

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

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

A t e n t a m e n t e

Dra.Silvia Bautista Baños
SINODAL Suplente .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

SILVIA BAUTISTA BAÑOS | Fecha:2020-09-29 13:13:26 | Firmante

AdrEO4TMF49WQ3cvkAvJcdM4/Qmg4B24Wk8Cz6ZMCQ1cpR0VE0f6Wt+zYnBWmvXwp0mdmn1dhjXIKmLjD0slY6qw2pBpRBxECJM65AfacCV8DjDyhgwLeTA2dj5seu73N3U
U5lxsJ0P4abKwXe6ZBV/9JMC3uQwISarNWmvg4m1FqfcgTHKOb/+Ohz2OHnCeCCyTxa2nBrUKDIfCPWcP9QP5GgYSbc2EcaOe/4QKMCzgXWYf6YP039TJk8U7Qf/xhiTzD
sRwf93M0Txrija2m0rpsh1WbQowrIWROww+WMDr0emlv8rc2ms81BxrjUZ8y14zZomXn6QYb8GDNeBw==

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



[A8h4kL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/faButeHWFS0Xa5GeTi6K6icib30aQE8H>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

“Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de *Aspergillus flavus* y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado”.

TESIS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTA:

LICENCIADO EN NUTRICIÓN PABLO FERNANDO APARICIO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Margarita de Lorena Ramos García.

CODIRECTOR:

Dra. Silvia Bautista Baños.

COMITÉ TUTORAL:

Dra. América Ivette Barrera Molina.

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña.

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2020

AGRADECIMIENTOS

Dra. Margarita Ramos, muchas gracias por todo el apoyo que me brindó durante el transcurso de la carrera, por apoyarme y animarme en los momentos difíciles y por dirigirme de forma tan extraordinaria durante mi formación académica.

Dra. Silvia Bautista, faltan palabras para expresar mi agradecimiento por abrirme las puertas del laboratorio para realizar este proyecto, por dirigirme y orientarme tanto en la teoría como en la práctica, por darme aventón y por preocuparse por mi situación financiera, académica y de salud.

Sr. Raúl, muchísimas gracias por todo el apoyo que me brindó durante mi proyecto de investigación, gracias por los aventones y por esperarme cuando era necesario, gracias por sus palabras de ánimo y su amistad.

Maestra Mónica, muchas gracias por su dirección y su apoyo, gracias por su paciencia y el tiempo que me dedicó en el laboratorio, por enseñarme las técnicas y el manejo del equipo, por preocuparse por mi seguridad y por acompañarme a recolectar los frutos.

Maestra Maria Luisa, muchas gracias por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio. Gracias por instruirme y tenerme paciencia.

A mi comité tutorial: Dra. Azucena Salazar y Dra. Ivette Barrera, muchas gracias por sus observaciones y aportaciones para que mi proyecto de investigación fuera de mejor calidad.

A mis compañeros de CEPROBI, muchas gracias por ofrecerme su amistad y por brindarme su apoyo en mis momentos de necesidad, gracias por instruirme y por tenerme tanta paciencia.

Dra. Zormy, Dra. Laura y Dra. Rosa Isela, Muchas gracias por ofrecerme su apoyo en el laboratorio y por ayudarme a resolver mis dudas.

A mis padres: Muchísimas gracias por todo lo que han hecho por mí, gracias por animarme a seguir adelante cuando ya no quería, gracias por corregirme cuando era necesario y gracias por enseñarme la importancia de tener a Dios en mi vida. Gracias por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera seguir adelante. No podría haber llegado hasta aquí si no fuera por ustedes.

A mi hermano, muchas gracias por ser tan alegre y amoroso, gracias por transmitirme tu energía y motivarme a seguir adelante aun en momentos complicados.

Ylka, muchas gracias por tu amor y confianza, eres mi principal motivación para seguir adelante, sin ti, este camino hubiera sido completamente diferente. Muchas gracias por tus palabras de apoyo, gracias por tu animo y por todos tus cuidados,

gracias por desvelarte y desmañarte conmigo, gracias por estar ahí para mí y gracias por ser mi compañera de vida. Te amo mucho.

A Dios, sin duda tú eres lo más importante en mi vida y te agradezco por darme la oportunidad que me das de crecer académicamente, gracias porque pusiste a mi alcance todo lo necesario para poder emprender este viaje y terminarlo de forma satisfactoria. Gracias por la vida que me das y gracias por todas las personas que pusiste a mi alrededor porque puedo ver tu amor a través de ellas.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología Postcosecha del departamento de Interacciones Planta-Insecto del CEPROBI-IPN, participando en el proyecto SIP 20180091 bajo la dirección de la Dra. Silvia Bautista Baños y la Dra. Margarita de Lorena Ramos García.

Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de CONACyT (No. becario, 920415).

RESUMEN

Los frutos de higo son ricos en fibra, antocianinas, carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes. Sin embargo, son perecederos y sufren contaminación por el hongo *Aspergillus flavus*, que causa pudrición al fruto y produce aflatoxinas con serios efectos negativos en la salud humana. Actualmente, se buscan alternativas naturales para el control de este hongo, como la aplicación de cubiertas comestibles a base de compuestos no tóxicos, como el quitosano y propóleo. Aunado a esto, para potencializar el efecto fungicida, se han sintetizado nanopartículas de estos compuestos naturales. Los objetivos de esta investigación fueron entonces: 1) evaluar el efecto de diferentes formulaciones nanoestructuradas de quitosano/propóleo en: a) el proceso de maduración de los frutos (pérdida de peso, firmeza, SST, color, producción de CO₂ y etileno y actividad antioxidante), b) el desarrollo de *A. flavus* (incidencia y severidad) y su producción de aflatoxinas y c) la calidad sensorial (apariencia, aroma, sabor y aceptación), durante un tiempo de almacenamiento de 12 días a 4 °C. Respecto al proceso de maduración, las cubiertas nanoestructuradas, en general, no influyeron negativamente en este proceso al término del almacenamiento, además, en el caso de la actividad antioxidante, con respecto al control, esta se incrementó aproximadamente 30 % en los frutos de las cubiertas a base de Q+NP+EP. En relación al desarrollo de *A. flavus*, los resultados mostraron que los higos tratados con los recubrimientos de Q+NP, Q+NQ, Q+NP+NQ+EP y Q+NQ+EP lograron inhibir notablemente el desarrollo del hongo, bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel semicomercial, además, hubo una producción

significativamente menor de aflatoxinas (15 – 41.33 ppb) en comparación con los frutos sin tratamiento (250 ppb), y en cuanto a la calidad sensorial, esta fue aceptable entre los panelistas. Las cubiertas comestibles probadas pueden ser una alternativa viable, segura y no toxica para la conservación postcosecha y consumo de los frutos de higo.

ABSTRACT

Fig fruits are rich in fiber, anthocyanins, carotenoids, flavonoids and phenolic compounds with antioxidant properties. They are perishable and are contaminated by the fungus *Aspergillus flavus*, which causes rotting and produces aflatoxins with serious negative effects on human health. Natural alternatives like the application of edible coatings based on non-toxic compounds, such as chitosan and propolis are being sought for the control of *A. flavus*. Further, to increase the fungicidal effect, we made nanoparticles of these compounds. The objectives of this research were: 1) evaluate the effect of different chitosan / propolis nanostructured formulations on: a) the fruit ripening process (weight loss, firmness, TSS, color, CO₂ and ethylene production and antioxidant capacity), b) the development of *A. flavus* (incidence and severity) and its production of aflatoxins and c) the sensory quality (appearance, aroma, taste and acceptance), during a storage time of 12 days at 4 °C. The nanostructured covers not affects the ripening process, at the end of the storage, in addition, in the case of the antioxidant activity, with respect to the control, this increased approximately 30% in the fruits of the covers based on Q + NP + EP. Regarding the development of *A. flavus*, the figs treated with the coatings Q + NP, Q + NQ, Q + NP + NQ + EP and Q + NQ + EP significantly decreased the development of *A. flavus*. In addition, there was a significantly lower production of aflatoxins (15-41.33 ppb) compared to the untreated fruits (250 ppb), and in terms of sensory quality, this was acceptable among the panelists.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Frutos caducifolios.	4
2.1.1 Higos.	4
2.1.1.1 Valor nutricional del higo.	7
2.1.1.2 Atributos de calidad en frutos de higo.	8
2.2 Incidencia de microorganismos postcosecha en frutos de higo.	11
2.3 Importancia del género <i>Aspergillus</i> .	13
2.4 <i>Aspergillus flavus</i> .	13
2.4.1 Medios de cultivo.	15
2.4.2 Producción de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i> .	17
2.4.3 Control tradicional de <i>Aspergillus flavus</i> en los productos agrícolas.	20
2.5 Cubiertas comestibles.	22
2.5.1 Quitosano y su actividad antimicrobiana.	24
2.5.2 Propóleo.	27
2.6 Aplicación de cubiertas nanoestructuradas en el control de microorganismos postcosecha.	28
2.7 Cubiertas comestibles y aspectos sensoriales	31
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVO GENERAL	33
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Obtención y activación de la cepa de <i>Aspergillus flavus</i> .	34
6.2 Obtención de los frutos.	35
6.3 Evaluación del efecto del medio ambiente sobre la patogenicidad de <i>Aspergillus flavus</i> .	36

6.3.1 Preparación de medios nutritivos y concentración del inóculo de <i>Aspergillus flavus</i>	36
6.3.2 Variables evaluadas.	37
6.3.2.1 Incidencia.	37
6.3.2.2 Severidad de la infección.	37
6.4 Evaluación del efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre varios atributos de calidad de los frutos de higo.	37
6.4.1 Desarrollo de formulaciones para las cubiertas nanoestructuradas.	37
6.4.1.1 Solución de quitosano.	37
6.4.1.2 Nanopartículas de quitosano	38
6.4.1.3 Nanopartículas de propóleo.	38
6.4.2 Aplicación de las cubiertas en los frutos de higo.	40
6.4.3 Variables evaluadas	40
6.4.3.1 Pérdida de peso.	40
6.4.3.2 Firmeza.	40
6.4.3.3 SST.	41
6.4.3.4 Color.	41
6.4.3.5 Respiración y etileno.	41
6.4.3.6 Capacidad antioxidante.	42
6.4.3.6.1 Solución stock DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).	43
6.4.3.6.2 Sobrenadante.	43
6.4.3.6.3 Reacción.	43
6.5 Evaluación del efecto de las cubiertas nanoestructuradas en el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel semicomercial.	44
6.5.1 Variables evaluadas.	45
6.5.1.1 Incidencia. y severidad de la infección.	45
6.5.1.2 Producción de aflatoxinas.	45
6.6 Evaluación del efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre la calidad sensorial de los frutos de higo.	46

6.7 Diseño y análisis estadístico.	47
7. RESULTADOS	48
7.1 Efecto del medio ambiente (medios nutritivos y concentración del inóculo) sobre la patogenicidad de <i>Aspergillus flavus</i> sobre los frutos de higo. Evaluación de cubiertas nanoestructuradas en la calidad de los frutos de higo.	48
7.2 Efecto de cubiertas nanoestructuradas sobre la maduración de los frutos de higo.	53
7.2.1 Pérdida de peso.	53
7.2.2 Firmeza.	54
7.2.3 SST.	55
7.2.4 Color.	57
7.2.5 Capacidad antioxidante.	57
7.2.6 Producción de CO ₂ .	59
7.2.7 Producción de etileno.	60
7.3 Efecto de las cubiertas nanoestructuradas en el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel semicomercial.	62
7.3.1 Incidencia.	62
7.3.2 Severidad.	65
7.3.3 Producción de aflatoxinas.	68
7.4 Efecto en la calidad sensorial de los frutos de higo tratados con las cubiertas nanoestructuradas.	69
8. DISCUSIÓN	71
9. CONCLUSIONES	81
10. BIBLIOGRAFÍA	82

Índice de figuras.

Figura 1. Estructura botánica del fruto de higo.	6
Figura 2. Diferentes estados de madurez de frutos de higo.	6
Figura 3. Características morfológicas de <i>A. flavus</i>	14
Figura 4. Frutos de higo utilizados durante los experimentos.	35
Figura 5. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la pérdida de peso de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	53
Figura 6. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la producción de CO ₂ de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	60
Figura 7. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la producción de etileno de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	61
Figura 8. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la incidencia de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C, bajo condiciones de laboratorio.	63
Figura 9. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo a nivel semicomercial en la incidencia de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 15 días a 4 °C.	64
Figura 10. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la severidad de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C, bajo condiciones de laboratorio.	66

Figura 11. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo a un nivel semicomercial en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 15 días a 4 °C. 67

Figura 12. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en el contenido de aflatoxinas en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C. 69

Índice de tablas.

Tabla 1. Contenido nutricional del higo.	7
Tabla 2. Composición de diferentes medios de cultivo para el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>A. flavus</i> .	16
Tabla 3: Efectos de cubiertas comestibles a base de productos naturales sobre atributos de calidad en diferentes productos hortofrutícolas.	23
Tabla 4: Efectos de cubiertas comestibles a base de quitosano, propóleo y otros productos naturales, en la incidencia de microorganismos patógenos en diferentes productos hortofrutícolas.	26
Tabla 5: Efecto de cubiertas comestibles nanoestructuradas de quitosano combinadas con otros compuestos, en el desarrollo de microorganismos patógenos.	30
Tabla 6: Formulación de cubiertas nanoestructuradas de quitosano y propóleo.	39
Tabla 7: Efecto de los diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^4 en la incidencia de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 4 días.	49
Tabla 8: Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^5 en la incidencia de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 4 días.	50
Tabla 9: Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^4 en la severidad de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 4 días.	51

Tabla 10: Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 105 en la severidad de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 4 días.	52
Tabla 11: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la firmeza de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	55
Tabla 12: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la concentración de SST de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	56
Tabla 13: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en el color de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	57
Tabla 14: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la capacidad antioxidante de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.	58
Tabla 15: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en el contenido de aflatoxinas producidas por la inoculación de <i>A. flavus</i> en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4°C.	68
Tabla 16: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la calidad sensorial de frutos de higo.	70

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos que llegan a nuestra mesa pasan por diversos procesos, desde el cultivo, la cosecha, el almacenamiento y el transporte, estando expuestos a diversos contaminantes tanto naturales como sintéticos. Uno de ellos son las aflatoxinas, las cuales han sido asociadas con el desarrollo de cáncer (1).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el año 2015, se reportaron 8.8 millones de defunciones ocasionadas principalmente por cáncer pulmonar, colorrectal, gástrico, de mama y hepático (2). Este último es un problema importante en México, ya que en el año 2013 se reportaron 5,393 defunciones a causa de este padecimiento, lo que equivale al 7.3 % del total de decesos anuales. Dentro de las principales causas conocidas del cáncer hepático, se encuentra la cirrosis, hepatitis B y C, hígado graso no alcohólico y la aflatoxicosis. Carvajal *et al.* (3) trabajaron con células cancerosas de hígado y señalaron que el 65 % de los tumores de hígado tenían aductos de aflatoxinas.

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus* y su presencia puede ocurrir en cualquier parte del mundo, ya que *Aspergillus* se desarrolla en condiciones de clima frío, templado, tropical o subtropical y puede establecerse en un gran número de alimentos. Anteriormente, se reportó que la presencia de este género de hongos era exclusivo de cereales

tales como, maíz, sorgo, trigo, avena y centeno; sin embargo, estudios recientes han podido identificar aflatoxinas y estructuras de hongos productores de micotoxinas en frutos caducifolios (4). Dentro de los principales frutos caducifolios con alto valor nutricional se encuentra al higo (*Ficus carica* L.), el cual es un fruto altamente perecedero y su vida de anaquel se ve perjudicada por la presencia de hongos, los cuales disminuyen su calidad. Se ha reportado la presencia de *A. flavus* en frutos de higo (5) y por consiguiente la presencia de aflatoxinas, disminuyendo la calidad en los frutos y siendo un riesgo latente para el consumidor.

Se conocen diversos métodos para controlar el crecimiento de los hongos del género *Aspergillus* en productos agrícolas, los más utilizados son los fungicidas sintéticos; sin embargo, se han reportado efectos negativos serios en la salud humana, entre los que destacan, trastornos del sistema neurológico, infertilidad y cáncer (6). Debido a esto, se buscan alternativas naturales, las cuales inhiban el crecimiento de estos hongos promotores de aflatoxinas y que a la vez sean seguras para el consumo humano. Entre estos, el uso de cubiertas comestibles a base de compuestos naturales, biodegradables y no tóxicos, como el quitosano y el propóleo han demostrado tener actividad antimicrobiana contra una gran diversidad de hongos fitopatógenos, incluyendo a los del género *Aspergillus* (7,8).

Para potencializar la actividad fungicida de estos compuestos naturales, se ha propuesto la conversión de estos al tamaño nano para que a su vez sean incluidas en formulaciones de cubiertas vegetales. Como resultado se observó una mayor actividad antimicrobiana, además de mejorar algunas propiedades físicas de las cubiertas como el aumento en la resistencia y la flexibilidad, mejorando sus características de barrera, lo cual se traduce en una mayor conservación del producto hortofrutícola (9, 10, 11).

En previos estudios realizados por Cortes-Higareda *et al.*, (8) se evaluó el efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano y/o propóleo sobre el desarrollo *in vitro* de *A. flavus* y debido a los resultados prometedores que se obtuvieron, el siguiente paso fue conocer el efecto de estas formulaciones nanoestructuradas sobre la calidad de los frutos de higo y el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas, durante el almacenamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Frutos caducifolios

Los árboles caducifolios, son todos aquellos frutales que pierden su follaje en cierto periodo del año, tienen la característica de producir frutos abundantes en ciertas estaciones del año, mientras disminuyen su producción en otras. El higo es un fruto caducifolio de importancia nutricional y económica en México y su manejo postcosecha ha sido ampliamente estudiado, así como su susceptibilidad de contaminación por microorganismos durante sus etapas pre y postcosecha. Sin embargo, los estudios que reportan la presencia de micotoxinas en frutos de higo son limitados (12).

2.1.1 Higo

El higo es un fruto procedente del mediterráneo el cual se introdujo en México en el siglo XV. México fue el productor número 18 de este fruto a nivel mundial con un total de 7089 ton (13). Además, actualmente el estado de Morelos es el principal productor de higos a nivel nacional siendo los principales municipios productores: Ayala, Cuautla, Yauatepec y Yecapixtla. Morelos posee una superficie total de este cultivo de aproximadamente 783.5 ha y cada una registra un rendimiento promedio anual de 5.4 ton; lo cual genera un valor de producción superior a los 30 millones de pesos al año (14).

De acuerdo a la descripción botánica de Nieto *et al.* (15) el higo es una infrutescencia compleja de sabor dulce y forma ovalada, aplanada o cónica, formado por una estructura principal que se denomina sicono, además, está formado por un receptáculo floral de consistencia blanda y carnosa, que posee en su interior una gran cantidad de pequeños aquenios, cubiertos por una piel fina (Figura 1). Asimismo, mencionan estos autores que el color de esta fruta depende del proceso de maduración, presentando tonos verdes en estados inmaduros y colores morados, rojizos o negros cuando alcanzan un mayor estado de madurez (Figura 2) con un tamaño que oscila entre los 3 y 10 cm de largo y entre los 4 y 6 de diámetro, llegando a pesar entre 28 y 40 g. La producción de frutos de higo ocurre generalmente en verano y otoño mientras que la primera inflorescencia del año (breva), es producida durante la primavera (16).

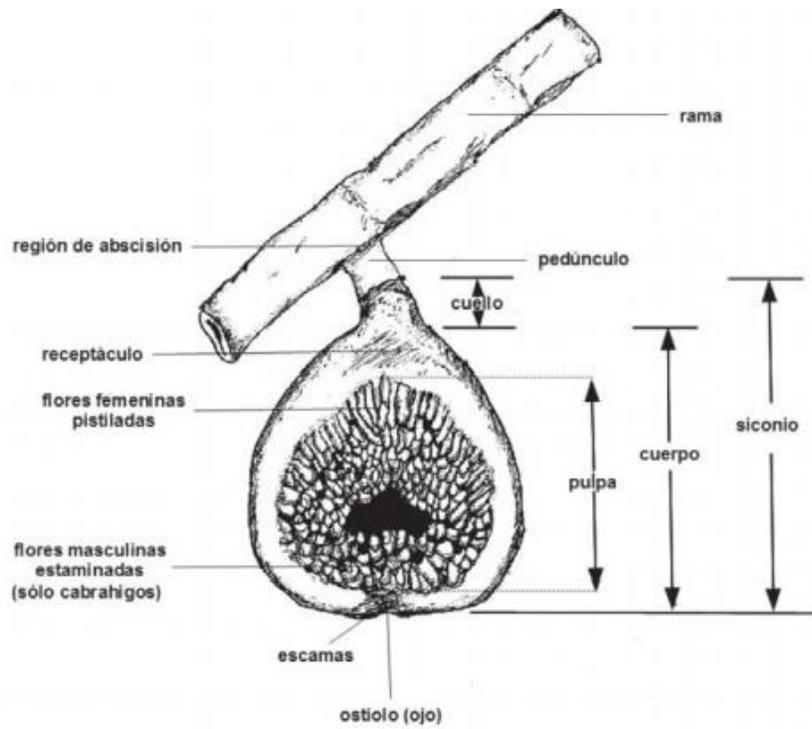


Figura 1. Estructura botánica del fruto de higo (17).

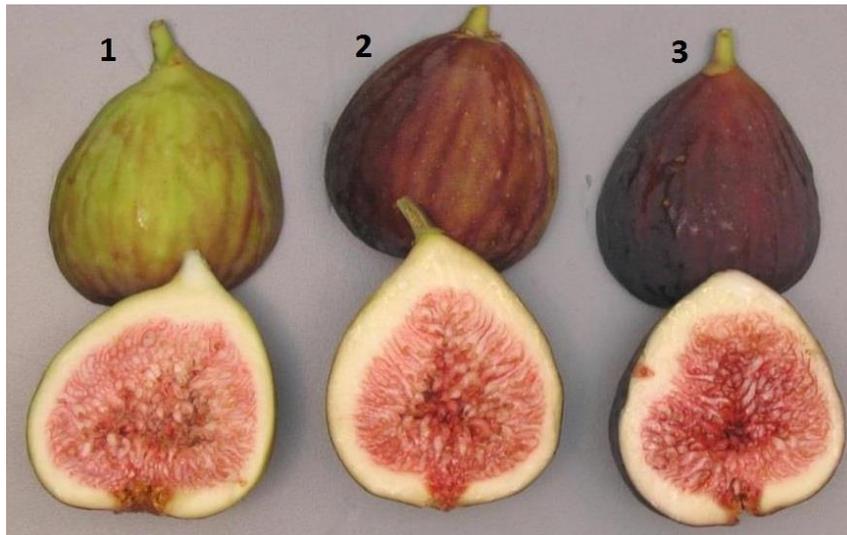


Figura 2. Diferentes estados de madurez de frutos de higo. 1. Madurez fisiológica, 2. Madurez comercial, 3. Senescencia (18).

2.1.1.1 Valor nutricional del higo

El higo es un fruto de alto valor nutricional y es buena fuente de energía ya que 100 g de fruto contiene 17.25 g de hidratos de carbono simples. Uno de los nutrimentos más importantes en este fruto es el potasio, y la fibra (Tabla 1) de la cual se estima que más del 28% es fibra soluble (19).

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

Nutrimento	Cantidad	Unidad
Energía	74	Kcal
Hidratos de carbono	17.25	g
Proteínas	0.75	g
Lípidos	0.75	g
Agua	79.11	%
Fibra	2.9	g
Sodio	30	mg
Potasio	232	mg
Calcio	35	mg
Hierro	0.37	mg
Fósforo	30	mg
Vitamina A	12.65	µg ER
Vitamina C	1.75	mg

Solomon *et al.* (20) mencionan que el higo contiene compuestos biológicamente activos con poder antioxidante, entre los que destacan: carotenoides, antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos como los ácidos gálico, clorogénico y cinámico. Igualmente, afirman que estos compuestos fungen en el organismo como antioxidantes, antimutagénicos, anticarcinogénicos, antiinflamatorios y antimicrobianos, dependiendo el contenido de estos elementos del estado de madurez del fruto, es decir que, a mayor estado de madurez, mayor contenido de compuestos fenólicos y más color (colores más oscuros indican mayor contenido de compuestos fenólicos). Por ejemplo, la variedad 'Black Mission' puede llegar a contener hasta 5 veces más antocianinas en comparación con otras variedades como 'Chechick' y la parte del fruto, el cual puede contener más compuestos fenólicos en la pulpa o en la piel.

2.1.1.2 Atributos de calidad en frutos de higo

Los atributos de calidad son las características que pueden influir en la elección inicial del producto y se consideran necesarias para cumplir con la satisfacción del consumidor, siendo las más importantes la apariencia y la frescura (21). La senescencia ligada al proceso de maduración y la infección por microorganismos, son factores que pueden disminuir la calidad de los frutos al modificar sus atributos de calidad. Los higos senescentes, generalmente son rechazados por el consumidor, debido a que entran en un proceso de fermentación lo cual daña su

calidad de forma rápida. Morton (22) menciona que el higo es altamente perecedero ya que su periodo de vida de anaquel oscila entre 1 y 2 días a temperaturas de 20 °C, mientras que, a temperaturas de entre 2.2 y 5 °C pueden alcanzar los 30 días (17). Aunado a esto, el higo es un fruto que fácilmente se contamina por diferentes microorganismos durante su vida pre y postcosecha (23).

Para determinar la calidad de los frutos de higo, deben considerarse diferentes atributos tales como: a) color, b) firmeza, c) sólidos solubles totales (SST), d) capacidad antioxidante y e) peso. Atributos que están condicionados por aspectos metabólicos como f) la respiración y producción de etileno (24).

a) Color

El color se ha relacionado con la textura, aroma y sabor que se esperan en el momento de consumo, por lo que se utiliza como un indicador de madurez. El cambio de color es causado por la degradación de la clorofila y la síntesis de pigmentos fenólicos (antocianinas y flavonoles) (25). El color puede medirse con la ayuda de instrumentos denominados “colorímetros”, los cuales se basan en la utilización de espacios cromáticos uniformes (CIELAB), que permiten visualizar y representar colores en tres dimensiones (L, a y b) (26).

b) Firmeza

La firmeza es un atributo que demuestra la frescura del producto y se define como la fuerza necesaria para deformar la superficie de un fruto. Esta se determina a través del uso de un penetrómetro (o texturómetro), que mide la resistencia de rotura y es muy utilizado para evaluar la calidad durante el almacenamiento (27).

c) SST

La cantidad de azúcares que poseen los frutos de higo es otro atributo de calidad ampliamente estudiado y puede estimarse a través de la determinación de los SST, donde se utiliza el índice refractométrico a través de un refractómetro automático y se expresa en grados Brix (°Brix). Entre mayor cantidad de °Brix, mayor contenido de azúcares tendrá el fruto (28).

d) Capacidad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante en frutos de higo se utiliza para medir los compuestos fenólicos, los cuales son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las células vegetales, que actúan como agentes protectores frente a microorganismos patógenos (29).

e) Pérdida de peso

Durante la postcosecha, se pierde agua de forma natural, disminuyendo la calidad del fruto. La mayor pérdida de agua se debe al almacenamiento en lugares con atmósferas con humedades relativas muy bajas. La pérdida de peso es una

evaluación muy utilizada para estimar la pérdida de agua en frutos de higo, ya que cerca del 80 % de su peso es agua (30).

f) Respiración y producción de etileno

El proceso de senescencia perjudica en gran medida la calidad de los frutos de higo y existen diversos factores que pueden acelerarlo; la actividad respiratoria es uno de ellos la cual se define como la oxidación de los azúcares para obtener anhídrido carbónico, agua y energía, generando un aumento de temperatura, que puede afectar al fruto. Una actividad respiratoria elevada implica que el tiempo de vida útil sea más corto. Otro factor que favorece el proceso de senescencia es la producción de etileno. El etileno es una hormona vegetal cuya función es acelerar el metabolismo del fruto, por lo que está implicado en el proceso de senescencia. Su producción puede estar favorecida por daños mecánicos sobre el tejido vegetal, aumento de la temperatura o la contaminación por microorganismos. En los frutos climatéricos como el higo, esta hormona ayudará en los procesos de maduración, mientras que en los no climatéricos acelerará la senescencia (24).

2.2 Incidencia de microorganismos postcosecha en frutos de higo

Los frutos de higo son altamente perecederos y necesitan de un cuidado especial durante su cultivo, cosecha y almacenamiento. La temperatura de almacenamiento y la presencia de microorganismos fitopatógenos son factores importantes que pueden disminuir su calidad y periodo de vida útil (12). El higo es un fruto propenso

a sufrir contaminación por microorganismos, ya que posee un alto contenido de azúcares y agua, además, posee una piel delgada que es propensa a sufrir heridas durante su cosecha, y presenta un orificio en su base denominado “ostiolo” por el cual pueden introducirse insectos como la mosca (*Drosophila* spp) o el escarabajo de fruta (*Carpophilus* spp) (31).

Los hongos son los microorganismos que atacan con mayor frecuencia a los frutos de higo. Entre ellos podemos encontrar la especie *Alternaria alternata* (32) la cual es responsable de la pudrición negra. Otro hongo reportado es *Botrytis cinerea* el cual se conoce en el sector agrícola por ser el causante de la enfermedad denominada “pudrición gris” (33). Este hongo tiene la facultad de contaminar al fruto sin la necesidad de que esté presente una herida.

Existen hongos que pueden comportarse de manera diferente dependiendo del fruto al que infecten, tal es el caso de *Rhizopus stolonifer*, causante de la enfermedad llamada “pudrición blanda”. Este hongo puede infectar frutos con o sin heridas en su epidermis y es muy común durante el almacenamiento (34). Los hongos del género *Aspergillus* (*A. parasiticus* y *A. flavus*) se encuentran comúnmente en cereales, leguminosas y frutos secos; sin embargo, también han sido reportados en frutos de higo (5 Centeno *et al.*, 2013); se estima que los hongos productores de aflatoxinas son responsables de la pérdida de aproximadamente el 25 % de los cultivos mundiales de alimentos (35).

2.3 Importancia del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece al reino *Fungi*, siendo del filo *Ascomycota*, de la clase *Eurotiomycetes* y el orden de los *Eurotiales*. Abarca un amplio número de especies de hongos con características morfológicas y fisiológicas similares con importancia a nivel biotecnológico (36). Samson *et al.* (37) mencionan a 184 especies, de las cuales se ha reportado que 40 de estas pueden causar enfermedades en humanos y se transmiten por alimentos. Entre las especies que destacan se encuentran las siguientes: *A. caesiellus*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. parasiticus* y *A. flavus*.

Además, los hongos del género *Aspergillus* se conocen por producir micotoxinas, pudrir alimentos y causar enfermedades en cultivos, animales y humanos, los cuales se presentan como agentes contaminantes naturales en una amplia variedad de alimentos, como cereales, leguminosas, alimentos deshidratados, alimentos de origen animal, chiles, café y en varias frutas en estado seco y fresco (38).

2.4 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es un hongo de importancia agronómica y nutricional, debido a que puede infectar varios grupos de alimentos tanto en pre y postcosecha, generando pérdidas económicas a nivel agropecuario y ocasionando problemas de salud en animales y humanos (39).

Aspergillus flavus pertenece al subgénero *Circumdati* y se encuentra en la sección *Flavi*. Sus colonias presentan un color verde amarillento con micelio blanco de

estructura aterciopelada. Las cabezas de sus conidios pueden ser uniseriadas o biseriadas; los estipes presentan un tono café claro, las vesículas son esféricas y los conidios elipsoidales (40). El hongo tiene la capacidad de producir esclerositos (masas duras y compactas de micelio que varían en forma y tamaño) que generalmente son de color café y se desarrolla óptimamente en condiciones templadas, tropicales y subtropicales (25 °C y HR de 70-90 %) (4). Sin embargo, puede crecer en un amplio rango de temperaturas, teniendo como mínima 6 °C y como máximo 46 °C. Se encuentra en el suelo de campos de cultivo, áreas de almacenamiento, plantas de procesamiento y centros de distribución de alimentos, además, tiene la capacidad de propagarse por el aire a través de sus esporas (41) (Figura 3).

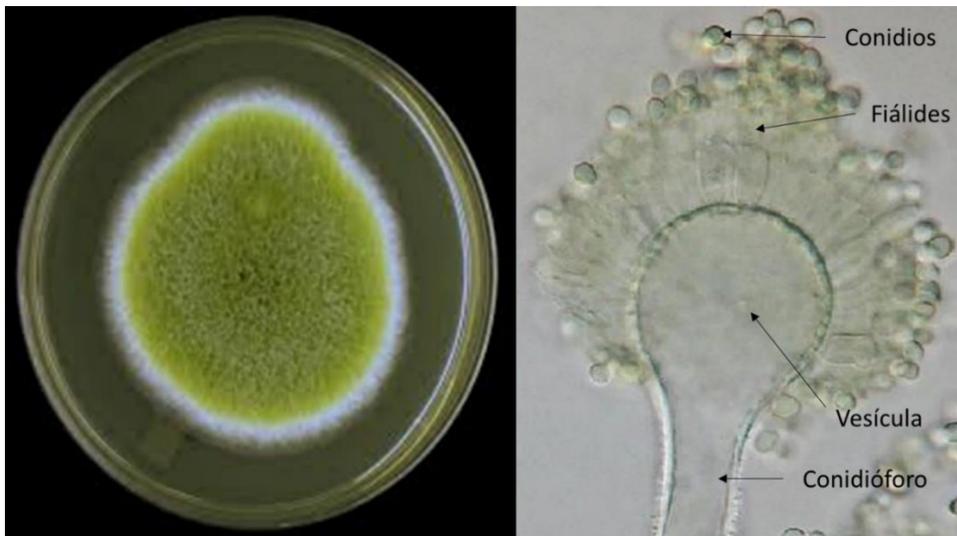


Figura 3. Características morfológicas de *A. flavus* (42).

2.4.1 Medios de cultivo

Aspergillus flavus es un hongo que se ha estudiado ampliamente bajo condiciones de laboratorio. Para su estudio, los medios nutritivos son una herramienta que nos permite desarrollar los hongos en un medio artificial y así poder evaluar su desarrollo bajo condiciones controladas. Para aislar a los hongos del género *Aspergillus* se han utilizado diferentes medios de cultivo (Tabla 2). Estos medios de cultivo se han recomendado para aumentar la tasa de crecimiento y producción de esporas en comparación con los medios de cultivo utilizados convencionalmente como PDA (43).

Tabla 2. Composición de diferentes medios de cultivo para el crecimiento *in vitro* de *A. flavus*.

Medio de cultivo	Componentes	Cantidad (g L ⁻¹)	pH	Referencia			
CZAPEK	Sacarosa	30	7.3	44			
	Nitrato de sodio	2					
	Fosfato dipotásico	1					
	Sulfato de magnesio	0.5					
	Sulfato ferroso	0.01					
	Agar	15					
PDA*	Extracto de papa	4	5.6	45			
	Dextrosa	20					
	Agar	15					
Dextrosa Sabouraud	Digerido pancreático de caseína	5	5.6	46			
	Digerido péptico de tejido animal	5					
	Dextrosa	40					
	Agar	15					
	Malta	Extracto de malta			30	5.5	47
		Agar			15		
Agar V8	Jugo de verduras "V8"	160 (mL L ⁻¹)	5.7	43			
	Sodio	0.093					
	Potasio	0.6					
	Azúcar	4.66					
	Proteína	1.33					
	Carbonato de calcio	3					
	Agar	20					

*PDA: Agar de papa y dextrosa.

2.4.2 Producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus tiene la capacidad de formar micotoxinas, específicamente del grupo aflatoxinas, los cuales son compuestos químicos orgánicos, no proteicos y de bajo peso molecular. Estas toxinas tienen la característica de ser cancerígenas, teratogénicas y mutagénicas y causan tropismo en órganos como hígado, cerebro y riñón. Además, tienen la capacidad de introducirse en el organismo humano por inhalación, ingesta o contacto (48). Las intoxicaciones por aflatoxinas se conocen como aflatoxicosis, la cual puede ser aguda (nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad), o crónica (desnutrición proteica, carcinogénesis e inmunosupresión) (49).

A la fecha, se han descrito 18 tipos de aflatoxinas procedentes de alimentos, donde se destacan B1, B2, G1, G2, M1 y M2. El metabolito tóxico más importante de este grupo es la aflatoxina B1, la cual, de acuerdo a Serrano-Colli *et al.* (1) se le ha relacionado con inmunosupresión, problemas en el desarrollo fetal, deficiencias nutricionales y hepatocarcinoma celular. La aflatoxina B1 se clasifica como carcinógeno humano y es el hepatocarcinógeno de origen natural más potente conocido (50). Al respecto, estos autores también resaltan que basta ingerir 15 mg/kg diariamente para ocasionar cáncer. Otros autores resaltan que el ingerir alimentos contaminados por aflatoxinas puede aumentar el riesgo relativo de desarrollar cáncer hepático 3.3 veces, además, de que su efecto hepatocarcinógeno

es sinérgico, aumentando el riesgo relativo al combinarse con factores como el alcoholismo y los virus de la hepatitis B y C (51, 52).

La aflatoxina B1 que contamina a los alimentos llega al tracto gastrointestinal donde se absorbe en el intestino delgado y llega al hígado, en este órgano, varias enzimas de la familia citocromo P450 (IA2, IIA3, IIIA3, IIIA4 y IIB7), convierten a la AFB1 en aflatoxina Q1, aflatoxina B2a, aflatoxina P1, aflatoxina M1 y Aflatoxina B1-8,9-epóxido, siendo esta última responsable de la actividad carcinogénica y mutagénica, al unirse al N7 de la guanina del ADN, causando una mutación en el exón 7, codón 249 del gen supresor P53 (implicado en la regulación del crecimiento celular) sustituyendo una guanina por una timina (41, 53).

Alrededor del mundo, existen reportes de contaminación de alimentos por aflatoxinas, identificándose en leche, hígado de pollo y res, maíz, arroz, naranjas, manzanas, uvas, cacahuates, nueces, duraznos e higos, entre otros (12, 48, 49). Las aflatoxinas pueden permanecer en el fruto incluso después de que el micelio del hongo no está presente, por lo que, el percibir alimentos libres de hongos, no garantiza que sea libre de aflatoxinas (48).

Durante el proceso de la cadena alimentaria (producción, cosecha, procesamiento, almacenamiento, distribución, preparación y consumo), los productos hortofrutícolas pueden estar expuestos a diversos contaminantes naturales o sintéticos, los cuales pueden afectar la salud de sus consumidores. Los hongos

productores de aflatoxinas son un riesgo para la salud humana, ocasionando graves padecimientos, por lo tanto, se han utilizado diversos métodos para controlar o eliminar estos patógenos en frutos.

Los frutos de higo son un alimento que puede perder sus atributos de calidad en un corto periodo de tiempo, esto obliga a los productores a vender su producto de forma rápida y no les permite negociar los precios, generando así una desventaja a nivel comercial y una baja competitividad en el mercado en comparación con otros productos alimenticios. Para comercializar los frutos de higo se deben cosechar durante un periodo de madurez fisiológica; en cuanto a la postcosecha, debido a la fragilidad del fruto al momento de manipularlo, no se realiza ningún tipo de tratamiento que comprometa su integridad y apariencia, como el lavado o el cepillado. Para su transporte, se recomienda que sea enfriado mediante aire forzado a 0 °C. En cuanto al almacenamiento, se recomienda colocar los frutos en cajas y mantener la misma temperatura utilizada durante el transporte y una humedad relativa de 90 – 95 % (54).

2.4.3 Control tradicional de *Aspergillus flavus* en los productos agrícolas

A la fecha, se han utilizado diversos métodos para controlar el crecimiento de hongos en los frutos; entre los más comunes tenemos a los métodos químicos y físicos. En los métodos químicos, se reportan los fungicidas (sustancias químicas enfocadas en la eliminación o inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos) (55). En la actualidad, se conocen más de 100 tipos de fungicidas; sin embargo, los que más se han utilizado son aquellos que pertenecen a los grupos de los tiocarbamatos (Cobrethane 61,1 WP Dithane 60 SC, Diligent 72 WP), organometálicos (Cercobin M), tioftalimidas (Merpan 80 WG, Folpan 80 WG) y bencenos (Glider 72 SC, Vertice 50 SC) (56).

Durante muchos años, estos compuestos controlaron el desarrollo de *Aspergillus* pero su aplicación no disminuyó la producción de micotoxinas y en ocasiones aumentó la producción de la toxina al estar el hongo en una fase de estrés. Aunado a esto, su aplicación continua provocó efectos negativos en la salud humana, causando en ocasiones toxicidad aguda y crónica por contacto, inhalación y/o ingesta; reportando trastornos del sistema neurológico, infertilidad y cáncer (57).

Por esa razón, se ha experimentado con otras alternativas para disminuir la concentración de aflatoxinas en granos, por ejemplo, la más utilizada ha sido la “dilución de semillas”, la cual se realiza mezclando semillas contaminadas con otras

que no lo están. A pesar de que este método reduce los niveles iniciales de producción de aflatoxinas, después de cierto tiempo se pueden presentar concentraciones superiores a las permitidas por la legislación (2µg/kg de alimento para aflatoxina B1 y 20µg/kg de alimento para aflatoxinas totales) (58).

Otro método comúnmente utilizado es la separación mecánica, que consiste en desechar aquellos productos que presenten crecimiento de micelio. El problema de la separación mecánica es que genera pérdidas económicas al productor, además de resultar una tarea muy tardada y agotadora, esto sin mencionar que el no tener crecimiento micelial, no garantiza que el producto esté libre de aflatoxinas. Del mismo modo, se han considerado los tratamientos alcalinos, entre estos se encuentra la “nixtamalización” con hidróxido de calcio; sin embargo, no se ha podido eliminar por completo la presencia de los compuestos tóxicos (38).

Otro método utilizado para eliminar hongos promotores de aflatoxinas es la radiación gamma, la cual ha reportado efectos fungicidas con dosis de entre 1 a 8 kGy. Se ha reportado que la radiación gama actúa a nivel genético y que no presenta daños para la salud humana; sin embargo, puede alterar el material genético de los cultivos y por ende sus propiedades biológicas, así como su contenido de nutrientes (59).

Otras sustancias para eliminar micotoxinas presentes en granos y hortalizas, han sido el amoníaco, formol, monometilamina, que si bien, han mostrado una

disminución en las concentraciones de aflatoxinas, son productos que tienen alta residualidad y pueden generar daños en la salud humana (60).

En la actualidad, se han reportado un gran número de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas, entre los que destacan el quitosano y el propóleo por su capacidad de controlar hongos durante la postcosecha, incluido *A. flavus* (8, 61, 62, 63, 64). Estos compuestos son de baja residualidad y su permanencia sobre los frutos es corta, por lo tanto, es importante incorporarlos a cubiertas vegetales, para asegurar su permanencia en el fruto (65).

2.5 Cubiertas comestibles

Las cubiertas comestibles pueden definirse como matrices continuas, generalmente formuladas con proteínas, lípidos o hidratos de carbono (65) que envuelven al alimento y sirven como barrera protectora generando una atmósfera modificada que disminuye la oxidación del fruto, y conserva o incluso mejora algunos parámetros de calidad (Tabla 3).

Tabla 3: Efectos de cubiertas comestibles a base de productos naturales sobre atributos de calidad en diferentes productos hortofrutícolas.

Cubierta	Producto hortofrutícola	Atributos de calidad	Referencia
Quitosano y aceites esenciales de limón y tomillo	Jitomate	Mayor firmeza, disminución de la pérdida de peso, menor producción de etileno y CO ₂ .	65, 66
Propóleo	Mango	Disminución de pérdida de agua	67
Quitosano	Aguacate	Mayor calidad sensorial y apariencia visual del fruto, disminución de pérdida de peso	68
HPMC* y propóleo	Uva	Reducción de pérdida de peso y control de producción de CO ₂	61
Quitosano, cera de abeja y aceites esenciales	Higos	Calidad y vida de anaquel estable.	69
Quitosano y montorillonita	Mandarinas	Disminución de pérdida de agua y respiración y mantenimiento del contenido nutrimental.	70
Quitosano y aceite de canela	Fresas	Extensión de la vida de anaquel mayor a 7 días.	71
Quitosano	Níspero japonés	Conservación de firmeza, características organolépticas y la presentación de los frutos.	72
Cera y propóleo	Papaya	Proceso de maduración ligeramente tardío respecto al control.	73
Propóleo y alginato	Arándanos	Características fisicoquímicas similares a las que tenía al inicio del experimento hasta el día 28.	62

*HPMC = hidroxipropil metilcelulosa

Las cubiertas sirven como vehículo para adicionar otros compuestos como medicamentos, vitaminas, saborizantes, colorantes, conservadores y antimicrobianos. La adición de algunos de estos compuestos antimicrobianos le proporciona a las cubiertas la capacidad de controlar el desarrollo de microorganismos y aumentar la vida de anaquel de los productos (65). Uno de los productos más utilizados para la elaboración de cubiertas comestibles ha sido el quitosano (63, 64).

2.5.1 Quitosano y su actividad antimicrobiana

El quitosano es un polímero natural, no tóxico, biodegradable y biocompatible proveniente de la quitina. Puede encontrarse en alas de insectos, caparazones de crustáceos y paredes celulares de hongos (74). Es una poli(β -N-acetilglucosamina), la cual, mediante una reacción de desacetilación, se convierte en quitosano (poli(β -N-acetilglucosamina-co- β -glucosamina)). Se ha reportado que los recubrimientos a base de quitosano pueden mejorar la calidad postcosecha en frutos, ya que disminuyen la pérdida de peso, el ingreso de oxígeno, conserva el aroma e inhibe el crecimiento de microorganismos. (63, 75). A la fecha, se sabe que la naturaleza policatiónica de este compuesto y la longitud de su cadena polimérica son las causantes de su actividad antimicrobiana, ya que, al unirse con la membrana

de los microorganismos ocasiona un desequilibrio en la homeostasis celular iónica de K y Ca^{2+} causando la salida de diversas moléculas (fosfatos, nucleótidos y sustrato de reacciones enzimáticas) que pueden afectar la respiración y la nutrición de los hongos patógenos (7, 75).

Las cubiertas comestibles a base de quitosano sólo y en combinación con otros productos naturales (aceites esenciales, propóleo, etc.), se han probado en diferentes alimentos agrícolas, generalmente, dando como resultado una disminución en la incidencia de microorganismos. En la Tabla 4, se resumen su potencial como agentes antimicrobianos en varios productos hortofrutícolas.

Tabla 4: Efectos de cubiertas comestibles a base de quitosano, propóleo y otros productos naturales, en la incidencia de microorganismos patógenos en diferentes productos hortofrutícolas.

Cubierta	Fruto	Microorganismo	Referencia
Quitosano y aceites esenciales de limón y tomillo	Jitomate	Control de crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i>	76
Quitosano	Aguacate	Concentraciones de quitosano de 0.25 a 2 % inhibieron el crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp y <i>Diplodia</i> sp	68
Quitosano, cera de abeja y aceites esenciales	Higo	Inhibición del crecimiento de los géneros <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Penicillium</i> hasta un 50 %	69
Quitosano y aceite de canela	Fresa	Disminución de mesófilos aerobios con respecto al control entre 1 y 1.6 Log ufc/g.	71
Quitosano y propóleo	Papaya	Inhibición del crecimiento de mesófilos aerobios, mohos y levaduras.	73
Propóleo y alginato	Arándano	Inhibición del crecimiento micelial de mohos y levaduras.	62
Quitosano	Mango	Disminución de las UFC un 13.7 % con respecto al control.	77
Propóleo, aceite de canola y goma guar	Zanahoria	Inhibición del crecimiento de hongos con respecto al control.	78
Propóleo pardo	Mango	Disminución de severidad de antracnosis por <i>Colletotrichum</i> 57 % con respecto al control.	79

HPMC = hidroxipropil metilcelulosa.

2.5.2 Propóleo

El propóleo es una sustancia producida por la abeja *Apis mellifera*, de color verde pardo, marrón o negro, compuesto por más de 150 sustancias, entre las que destacan: resina, polen, cera, bálsamo y aceites aromáticos con propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antimicóticas (73) que le han otorgado gran interés para fines terapéuticos, llegando a utilizarse en tratamientos de infecciones para las vías respiratorias, antiséptico para aftas en la boca, herpes, amigdalitis y contra las caries (80, 81).

Los principales compuestos bioactivos del propóleo son los polifenoles y los flavonoides, en específico, el ácido cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, sustancias que inhiben la peroxidación lipídica y que se han visto asociadas a disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (82).

El propóleo ha sido utilizado como recubrimiento en diferentes productos hortofrutícolas, como el arándano, aguacate y mango, logrando preservar sus atributos de calidad por más tiempo y disminuyendo la contaminación por microorganismos. Por ejemplo, Pastor *et al.* (61) utilizaron un recubrimiento de HPMC y propóleo, el cual logró reducir la pérdida de peso en uvas *Moskatel*, así como disminuir la producción de CO₂ e inhibir el crecimiento de *A. niger*. Por su parte, Figueroa *et al.* (67) reportaron que el mango tratado con cera de abeja logró aumentar 3 días su vida de anaquel con respecto al control, mientras que Casteñeda

(62) evaluó diferentes concentraciones de alginato de sodio y propóleo en cubiertas comestibles en arándano fresco, logrando inhibir el crecimiento de hongos y levaduras con concentraciones de propóleo del 1 %, independientemente de la temperatura y las concentraciones de alginato.

Por otro lado, con la finalidad de potencializar aún más la capacidad antimicrobiana se han adicionado compuestos nanoestructurados, los cuales permiten tener una amplia superficie de acción (7, 11, 63, 83, 84).

2.6 Aplicación de cubiertas nanoestructuradas en el control de microorganismos postcosecha

La nanoestructuración es la caracterización, manejo y fabricación de estructuras por debajo de los 100 nm. Cuando se aplica al desarrollo de recubrimientos comestibles, se pueden desarrollar propiedades funcionales diferentes con respecto a las no modificadas en tamaño, por ejemplo, mejorando su capacidad de barrera debido a que existe una mayor superficie de contacto (84). Además, la incorporación de nanopartículas a las cubiertas comestibles, han demostrado brindar mejores características al recubrimiento, aumentando su resistencia y flexibilidad, mejorando las características del alimento, como la textura, el color y el sabor (10) y mejorando su capacidad antimicrobiana. Este último atributo, va a depender en gran medida del tamaño de las nanopartículas, su concentración y el pH (85).

Sobre el tema, Istúriz (86) evaluó diferentes formulaciones de cubiertas nanoestructuradas de quitosano y aceite esencial de canela en pepino, reportando inhibición en el crecimiento de *A. niger* y bacterias aerobias. Por su parte, Correa-Pacheco *et al.* (87) evaluaron el efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano con aceite esencial de tomillo en frutos de aguacate. En los resultados se reportó una firmeza mayor con respecto al control y 60 % menor incidencia de *C. gloeosporioides*. En otros estudios, Cortés-Higareda *et al.* (8) evaluaron cubiertas nanoestructuradas de quitosano y propóleo *in vitro* en diferentes concentraciones y formulaciones para inhibir a *A. flavus*. Los resultados mostraron que el hongo incubado en el medio nutritivo adicionado con nanopartículas de quitosano y propóleo al 40 % tuvo un mayor efecto inhibitorio en comparación con concentraciones menores (20 y 30 %).

En la Tabla 5, se muestran los efectos de las cubiertas nanoestructuradas comestibles y sus beneficios en diferentes productos hortofrutícolas.

Tabla 5: Efecto de cubiertas comestibles nanoestructuradas de quitosano combinadas con otros compuestos, en el desarrollo de microorganismos patógenos.

Cubierta	Productos hortofrutícolas	Efecto	Referencia
Nanopartículas de quitosano y plata	Mango	Inhibición de la antracnosis	88
Nanopartículas de quitosano con aceite de canela	Pepino	Menor porcentaje de pérdida de peso e inhibición de <i>Colletotrichum</i> sp y <i>Diplodia</i> sp	86
Nanopartículas de quitosano y aceite de tomillo	Aguacate	Mayor firmeza del fruto con respecto al control e inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> en 60 %.	87
Nanopartículas de quitosano y extracto de nanche	Pimiento	Disminución de la pérdida de peso y cambio de color, aumento del contenido de compuestos fenólicos y reducción de la actividad microbiana en 85 %.	89
Nanopartículas de quitosano y própolis	Fresa	Inhibición significativa en el desarrollo de microorganismos de los alimentos (<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i>)	90

2.7 Cubiertas comestibles y aspectos sensoriales

Las cubiertas comestibles cubren al alimento a tal grado que llegan a ser parte de él; por lo que, al consumir el alimento, estamos ingiriendo también la cubierta. Estas se aplican con el objetivo de mejorar la seguridad del producto, extender su vida útil y preservar atributos sensoriales. Por eso es importante que las cubiertas no alteren los atributos sensoriales del fruto (gusto, aroma y apariencia) (91).

El aroma se define como la percepción de compuestos volátiles producidos por el alimento a través del olfato. Varios autores mencionan que nuestro sentido del olfato es bastante limitado en comparación con otras especies y solamente alcanzamos a percibir siete tipos de aromas primarios (alcanforado, almizclado, floral, mentolado, etéreo, picante y pútrido); la apariencia se define como el conjunto de atributos que se pueden percibir mediante el sentido de la vista, entre ellos tenemos al color, forma, tamaño, textura y uniformidad del alimento; el gusto es la percepción, por parte de las papilas gustativas presentes en la lengua, de la proporción e intensidad de la combinación de los 5 sabores fundamentales: dulce, salado, ácido y amargo (92).

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación de alimentos por hongos del género *Aspergillus* y su producción de aflatoxinas es un grave problema económico y sanitario. Actualmente, se ha reportado la presencia de *A. flavus* durante el almacenamiento de diferentes productos agrícolas como cereales, semillas, frutas y hortalizas. Este microorganismo también se ha aislado de frutos caducifolios como el higo, el cual es un fruto con excelente calidad nutricional. En general, se han implementado diferentes métodos (químicos principalmente) para inhibir el desarrollo de los hongos productores de aflatoxinas, incluyendo *A. flavus*; sin embargo, el efecto inhibitorio ha sido mínimo, además, pueden causar serios problemas a la salud humana. A la fecha, se ha estudiado en forma extensiva al polímero quitosano sólo o combinado con otros compuestos antimicrobianos como el propóleo, mediante cubiertas comestibles nanoestructuradas. En previos estudios se demostró *in vitro*, el potencial antifúngico de estas formulaciones en el desarrollo de *A. flavus*. Los resultados demostraron una total inhibición de las esporas del hongo y de su producción de aflatoxinas. Por lo tanto, como siguiente paso, era necesario evaluar esta tecnología en estudios *in situ*. En este caso, determinar el efecto directo de su aplicación en la calidad y desarrollo de *A. flavus* en frutos de higo durante el almacenamiento.

4. HIPÓTESIS

Las cubiertas nanoestructuradas a base de quitosano/propóleo no afectarán la maduración de los frutos de higo durante su almacenamiento, reducirán el desarrollo de *A. flavus* y conservarán la calidad sensorial de los frutos tratados.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de cubiertas nanoestructuradas a base de quitosano/propóleo, en el proceso de maduración de frutos de higo, en el desarrollo de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas, y en la calidad sensorial, durante un periodo de almacenamiento controlado y determinado.

5.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los medios nutritivos sobre la patogenicidad de *A. flavus* en frutos de higo.
- Determinar el efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre varios atributos de calidad (pérdida de peso, firmeza, SST, color, capacidad antioxidante, respiración y producción de etileno) de los frutos de higo.
- Conocer el efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre la incidencia, severidad y producción de aflatoxinas de *A. flavus* en frutos de higo, bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel semicomercial.
- Evaluar el efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre los atributos sensoriales (aroma, color y sabor) de los frutos de higo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención y activación de la cepa de *Aspergillus flavus*

La cepa de *A. flavus* se obtuvo del Laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional.

Para la activación de la cepa, se preparó medio de cultivo CZAPEK. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se vertieron 6 g de medio de cultivo CZAPEK (BD Bioxon) en 120 mL de agua desionizada. Con la ayuda de un agitador magnético, se mezcló la solución durante 15 min a una temperatura de 100 °C la cual se esterilizó en una autoclave (modelo CV300) durante 15 min a 121 °C y 15 lbs de presión. Una vez esterilizado, se adicionaron 25 ml del medio en cajas Petri. Se dejaron enfriar y se almacenaron hasta su uso posterior.

Con la ayuda de una aguja de disección, se tomó micelio de la cepa de *A. flavus*, el cual se depositó en el centro de las cajas Petri con medio CZAPEK. Se incubó a 27 °C durante una semana. Este procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar (VECO E-6140, México) previamente esterilizada con luz ultravioleta durante 15 min.

6.2 Obtención de los frutos

Los frutos de higo se cosecharon en el poblado de Telixtac, municipio de Axochiapan del Estado de Morelos, México. Se seleccionaron aquellos frutos que se encontraban en un estado de madurez comercial (etapa en la cual el fruto alcanzó su tamaño máximo, consistencia firme y coloración morada con tonalidades aun verdes) (Figura 4) y se desecharon aquellos que presentaron daños físicos o microbiológicos.



Figura 4. Frutos de higo utilizados durante los experimentos.

6.3. Evaluación del efecto del medio ambiente sobre la patogenicidad de *Aspergillus flavus*

6.3.1 Preparación de medios nutritivos y concentración del inóculo de *Aspergillus flavus*

Se prepararon 5 medios nutritivos, CZAPEK (BD Bioxon), agar V8 (Jumex), PDA (BD Bioxon), dextrosa Sabouraud (BD Bioxon) y agar de malta (BD Bioxon) y se colocaron en cajas Petri. Con la ayuda de un horador, se realizaron orificios de 5mm en la cepa de *A. flavus* previamente activada la cual se sembró en cada medio de cultivo. Las cajas Petri se incubaron por una semana a 27 °C. Una vez que se desarrolló el hongo en los diferentes medios de cultivo (ocho días) se prepararon dos soluciones de esporas; 10^4 y 10^5 esporas / mL. Para realizar la inoculación, los frutos se enjuagaron rápidamente con una solución de cloro al 1 % y posteriormente en agua desionizada. Los frutos se secaron a temperatura ambiente en bandejas con papel absorbente. Con ayuda de una aguja de disección se realizó una herida en la cara anterior y otra en la cara posterior de los frutos y se colocaron 10 μ L de cada solución de esporas en las heridas. Los frutos se almacenaron durante 4 días a temperatura ambiente a 20 ± 2 °C. Se utilizaron 90 frutos por cada medio de cultivo dividido en las 2 concentraciones de esporas (45 frutos por concentración).

6.3.2 Variables evaluadas

6.3.2.1 Incidencia

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

$$\text{Frutos infectados} / \text{Total de frutos} \times 100$$

6.3.2.2 Severidad de la infección

El índice de severidad se determinó mediante la superficie del fruto que se vio afectada por la contaminación por *A. flavus*. Donde 1 = 0 %; 2 = 1-25 %; 3 = 26-50 %; 4 = 51-75 % y 5 = 76-100% (93).

6.4 Evaluación del efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre varios atributos de calidad de los frutos de higo.

6.4.1 Desarrollo de formulaciones para las cubiertas nanoestructuradas

6.4.1.1 Solución de quitosano

Para elaborar una solución de quitosano al 1 %, se vertieron 10 ml de ácido acético glacial (Fermont) en 1 L de agua desionizada y se sometió a agitación por 5 min; después, se agregaron 10 g de quitosano de bajo peso molecular, con un grado de desacetilación ≥ 75 % (Aldrich) y se sometió a agitación por 24 h a una temperatura máxima de 70 °C. Se ajustó el pH a 5.6 utilizando hidróxido de sodio 1 N (Hycel) (8).

6.4.1.2 Nanopartículas de quitosano

Se preparó una solución de quitosano al 0.05 % con ácido acético al 1 %. Se ajustó el pH a 5.6. Al mismo tiempo, se preparó una solución alcohólica con 480 mL de etanol (Hycel) y 8 mL de tween 20 (Hycel) y se sometió a agitación por 1 h a temperatura ambiente. Se vertieron 80 ml de la solución alcohólica en un matraz de 125 mL. Se le colocó un tapón de papel aluminio al que se le realizó un agujero con una aguja de disección, por el cual pasó una manguera de 0.101 pulgadas. Se vertieron por goteo 5 mL de la solución de quitosano (0.05 %) en la solución alcohólica, a través de una bomba peristáltica y una manguera, mientras que, esta última se encontraba en agitación constante. Una vez finalizado el goteo, se mantuvo en agitación por 15 min para después extraer el etanol de la solución con ayuda de un rotavapor (Buchi R-300) con vacío de 100 y rotación de 40 (8).

6.4.1.3 Nanopartículas de propóleo

Se preparó una solución de propóleo a una concentración del 10 %, la cual estaba compuesta por 458.4 mL de etanol, 16.8 ml de Tween 20 y 4.8 mL de extracto fluido de propóleo (Rosa Elena Dueñas S.A. de C.V.). Se dejó en agitación por 1 h, evitando su exposición a la luz. La metodología de obtención de las nanopartículas, fue similar a la descrita para las nanopartículas de quitosano (inciso 6.2.1.2).

Se realizaron 9 formulaciones de cubiertas con una concentración de nanopartículas al 40 %, alternando entre diferentes concentraciones de propóleo y quitosano (Tabla 6).

Tabla 6: Formulación de cubiertas nanoestructuradas de quitosano y propóleo

Tratamientos	Solución de quitosano (1 %)	Glicerol	Nanopartículas de quitosano	Nanopartículas de propóleo	Extracto de propóleo (10 %)
Q+NP	59.7	0.3	---	40	---
Q+NQ	59.7	0.3	40	---	---
Q+EP	99.1	0.3	---	---	0.6
Q+NQ+NP	59.7	0.3	20	20	---
Q+NP+NQ+EP	59.1	0.3	20	20	0.6
Q+NP+EP	59.1	0.3	---	40	0.6
Q+NQ+EP	59.1	0.3	40	---	0.6
Q	99.7	0.3	---	---	---
C	---	---	---	---	---

Q = solución de quitosano; NP = nanopartículas de propóleo; NQ = nanopartículas de quitosano; EP = extracto de propóleo; C = control.

6.4.2 Aplicación de las cubiertas en los frutos de higo

Los frutos se lavaron durante 10 s con una solución de agua destilada y cloro al 1 % y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se secaron a temperatura ambiente y se sumergieron en las diferentes formulaciones durante 2 min. Se dejaron a temperatura ambiente (27 °C) para su posterior almacenamiento a 4 °C (69).

6.4.3 Variables evaluadas

6.4.3.1 Pérdida de peso

Se pesaron 10 frutos por tratamiento diariamente durante 15 días en una balanza (HCB1002, Highland BBADAM). El porcentaje de pérdida de peso se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$\%PP = \text{Peso inicial} - \text{Peso final} \div \text{Peso inicial} \times 100$$

6.4.3.2 Firmeza

Se evaluaron 5 frutos por tratamiento y las mediciones se realizaron cada 3 días durante 15 días. Los frutos se colocaron en una superficie plana y firme, se ejerció presión en la parte ecuatorial con la ayuda de un penetrómetro análogo con aguja de 8 mm (KANDPI, Japón). Los valores de firmeza se registraron en Newtons (N).

6.4.3.3 Sólidos solubles totales (SST)

Para esta variable se evaluaron 5 frutos por tratamiento y las mediciones se realizaron cada 3 días durante 15 días. Se extrajo una gota del jugo de los frutos y se colocó sobre el sensor de un refractómetro automático (ATAGO, Japón), calibrado con agua destilada antes de cada medición. Los datos se expresaron en °Brix.

6.4.3.4 Color

A 10 frutos de cada tratamiento se les midieron los parámetros de color “L”, “a” y “b” de forma diaria durante 14 días. Se midió el color con la ayuda de un colorímetro (modelo Boking Meter BC-10. Konica Mitolta, Japón) previamente calibrado, diariamente, durante 14 días. Los resultados se transformaron a valores de matiz (h^*) mediante el cálculo del arco tangente de (b^*/a^*) ; croma (C) utilizando el cálculo de $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$. El índice de color (IC) se calculó a través de la siguiente fórmula: $[(a^* \times 1000)/(L \times b^*)]$ (25).

6.4.3.5 Respiración y etileno

La producción de CO₂ y etileno se midió utilizando la técnica de “espacio-cabeza”. Se seleccionaron 3 frutos de higo por tratamiento y se obtuvo el volumen. Posteriormente, los frutos se colocaron dentro de frascos de plástico con capacidad de 230 mL, sellados herméticamente con una tapa equipada con un septum de

caucho de silicona. Después de 2 h a 27 ± 2 °C, se extrajeron 6 mL de aire de los frascos con una jeringa de 5 mL y se inyectaron en tubos vacutainer. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su posterior evaluación (69).

Para medir la producción de CO₂ y etileno se inyectaron 0.5mL de la muestra en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 7890B) equipado con ionización de flama. Se utilizaron dos columnas (HP-PLOT/Q y CPMOLSIEVE 5A), dos detectores (FID / TCD) y un inyector que se mantuvo en modo split con temperaturas de 300, 250 y 200 °C respectivamente. Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La respiración se expresó en ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹ y se utilizó la siguiente ecuación (94):

$$\text{Respiración} = \frac{\Delta\%CO_2 \times 10 \times \text{volumen libre del contenedor (L)}}{\text{Peso de fruto (Kg)} \times \text{Tiempo de almacenamiento (h)}} \times \frac{556 \text{ mL CO}_2}{1000 \text{ mg}}$$

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

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

6.4.3.6 Capacidad antioxidante

Se almacenaron 3 frutos de higo por tratamiento cada tercer día durante 15 días en un ultra congelador (New Brunswick, U570) a -50 °C para su posterior evaluación.

6.4.3.6.1 Solución stock DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Se preparó una solución stock de DPPH (Aldrich) adicionando 0.01g de DPPH a 25 mL de metanol (J.T. Baker). Para poder observar la reacción de capacidad antioxidante, se realizó una dilución a partir de 1.3 mL de la solución stock y 8.7 mL de metanol.

6.4.3.6.2 Sobrenadante

Se pesaron 0.5 g de cada fruto de higo y se maceraron en 6 mL de metanol para su posterior centrifugación a 8000 RPM durante 10 min; después, se colectó el sobrenadante y se realizó una dilución con metanol a 8000 PPM (300 µL de sobrenadante y 1200 µL de metanol).

6.4.3.6.3 Reacción

Para medir la capacidad antioxidante, se mezclaron 750 µL de la solución diluida de DPPH con 250 µL del sobrenadante diluido. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en obscuridad por 30 min. Se midió la absorbancia a 517 nm. La capacidad antioxidante se consideró como el porcentaje de inhibición del DPPH (95).

6.5 Evaluación del efecto de las cubiertas nanoestructuradas en el desarrollo de *Aspergillus flavus* bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel semicomercial.

Se lavaron 10 y 66 frutos de higo (laboratorio y semicomercial, respectivamente), por tratamiento con una solución de agua destilada y cloro al 1 %; posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) en bandejas con papel absorbente. Para las evaluaciones a nivel de laboratorio, una vez secos los higos, se sumergieron en todas las formulaciones diferentes mientras que, a nivel semicomercial los frutos se sumergieron en las formulaciones que presentaron una incidencia igual o menor al 30 % en los experimentos a nivel laboratorio (Q+NP, Q+NQ, Q+NP+NQ+EP, Q+NQ+EP). Para ambos experimentos el tiempo de tratamiento fue de 30 s. Los frutos se secaron durante 2 h a temperatura ambiente. Con ayuda de una aguja de disección se realizó una herida en la cara anterior y otra en la cara posterior de los frutos y se colocaron 10 μ L de una solución de esporas de *A. flavus* a una concentración de 10^4 , para su posterior almacenamiento a 4 °C durante 15 días. El experimento se realizó por triplicado.

6.5.1 Variables evaluadas

6.5.1.1 Incidencia y severidad de la infección

La metodología correspondiente a la incidencia y severidad se ha explicado anteriormente en los incisos 6.3.2.1 y 6.3.2.2

6.5.1.2 Producción de aflatoxinas

Se licuaron 10 g de frutos de higo con 50 ml de solución de metanol con agua (70/30) durante 1 min. Se filtró la mezcla a través de un papel whatman grado 1 para su posterior centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Se depositaron 5 mL del extracto en un matraz Erlenmeyer y se le agregaron 20 mL de agua bidestilada. Se volvió a filtrar la dilución a través de un papel whatman grado 1 y se pasaron 10 mL por la columna de afinidad monoclonal (Aflatest, VICAM). Posteriormente, se enjuagó la columna con agua bidestilada; se pasó 1 mL de metanol grado HPLC por la columna y se recuperó para introducirlo a un detector de fluorescencia de longitud de onda múltiple (VICAM, Series-4) usando excitación a 365 nm y emisión a 440 nm para la detección de aflatoxinas. Los datos se expresaron en partes por billón (PPB) de aflatoxinas totales (96).

6.6 Evaluación del efecto de las cubiertas nanoestructuradas sobre la calidad sensorial de los frutos de higo

Las cubiertas comestibles se aplicaron el mismo día de la evaluación. Se utilizaron 5 frutos por tratamiento. Estos se colocaron dentro de vasos de unicel. A cada vaso se le otorgó un número aleatorio de cuatro dígitos no consecutivos. Los frutos se depositaron en cada uno de los vasos rotulados y se reservaron para la evaluación de los jueces. Antes de que los jueces evaluaran el color /aparencia de los frutos, los vasos se cerraron durante 20 min. Para el sabor, los frutos se cortaron en cuatro partes y se colocaron dentro de vasos pequeños de plástico debidamente rotulados con los números asignados en la aleatorización.

Para este estudio fue necesaria la presencia de 30 jueces evaluadores, los cuales asistieron de manera voluntaria. Se entregaron dos hojas de evaluación (anexo 1), así como dos muestras aleatorias a evaluar, en las cuales se calificó aroma, color y sabor en una escala del 1 al 9.

Dónde:

1. Me disgusta extremadamente
2. Me disgusta mucho
3. Me disgusta moderadamente
4. Me disgusta poco
5. Ni me gusta ni me disgusta
6. Me gusta poco
7. Me gusta moderadamente

8. Me gusta mucho

9. Me gusta extremadamente

Entre cada muestra se les pidió a los jueces que consumieran una galleta salada para limpiar sus papilas gustativas y no contaminar la evaluación de la siguiente muestra.

6.7 Diseño y análisis estadístico

Los datos de cada variable se promediaron y se incluyó la desviación estándar (\pm).

Se utilizó un análisis de varianza con un método de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico infostat (v. 2017).

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del medio ambiente (medios nutritivos y concentración del inóculo) sobre la patogenicidad de *Aspergillus flavus* sobre los frutos de higo.

Los resultados mostraron que en el día dos de almacenamiento los porcentajes de infección más altos se observaron en las cepas provenientes de los medios CZAPEK (31 %) y PDA (24 %) a la concentración 10^4 aunque no se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en ambos medios. En el día tres, el medio CZAPEK fue estadísticamente diferente al resto de los medios con 62 % de infección. En el día cuatro el medio CZAPEK, PDA y Agar de Malta fueron estadísticamente similares ($p < 0.05$) al mostrar los porcentajes de infección más altos al final del almacenamiento (64 53 y 51 %, respectivamente). La cepa proveniente de medio agar V8 fue la que mostró menor porcentaje de infección durante los días de almacenamiento (4, 13, 24 %, respectivamente) (Tabla 7).

Tabla 7: Efecto de los diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^4 en la incidencia de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días.

Medio nutritivo	INCIDENCIA (%)			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	0	24 ^{cd*}	40 ^b	53 ^{bc}
Agar de malta	0	16 ^{bc}	40 ^b	51 ^{bc}
Dextrosa	0	9 ^{ab}	27 ^{ab}	44 ^b
Sabouraud				
CZAPEK	0	31 ^d	62 ^c	64 ^c
V8	0	4 ^a	13 ^a	24 ^a

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$)

En los días dos, tres y cuatro de almacenamiento, se observó el mayor porcentaje de infección en las cepas de *A. flavus* en la concentración de 10^5 proveniente de los medio Dextrosa Sabouraud (27, 47 y 51 %, respectivamente), CZAPEK (20, 42 y 51 %, respectivamente) y PDA (13, 38 y 47 %, respectivamente). Es importante mencionar que se observó similitud estadística ($p < 0.05$), en los medios mencionados. Una vez más el medio agar V8 fue estadísticamente diferente ($p <$

0.05) al resto de los medios evaluados, al mostrar la menor incidencia durante el almacenamiento (4, 4 y 36 %, respectivamente) (Tabla 8).

Tabla 8: Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^5 en la incidencia de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días.

Medio nutritivo	INCIDENCIA (%)			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	0	13 ^{ab*}	38 ^{bc}	47 ^{ab}
Agar de malta	0	16 ^b	31 ^b	56 ^b
Dextrosa	0	27 ^c	47 ^c	51 ^{ab}
Sabouraud				
CZAPEK	0	20 ^{bc}	42 ^c	51 ^{ab}
V8	0	4 ^a	4 ^a	36 ^a

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$)

En los resultados de severidad, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los medios evaluados. En los días de almacenamiento dos y tres la cepa de *A. flavus* 10^4 del medio CZAPEK presentó mayor índice de severidad (1.5 y 2, respectivamente), seguida de la cepa del medio PDA (1.4 y 1.9, respectivamente) (Tabla 9), ambos medios fueron estadísticamente similares. En el

día cuatro de almacenamiento la cepa del medio PDA fue la que mostró mayor índice de severidad (2.4); sin embargo, fue estadísticamente similar ($p < 0.05$) al resto de los medios, excepto el medio agar V8, el cual mostró menor severidad durante los días dos, tres y cuatro de almacenamiento (1, 1.1 y 1.6, respectivamente).

Tabla 9: Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^4 en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días.

Medio nutritivo	SEVERIDAD			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	1 ± 0.0	1.4 ± 0.8 ^{bc*}	1.9 ± 1.2 ^{bc}	2.4 ± 1.5 ^b
Agar de malta	1 ± 0.0	1.2 ± 0.6 ^{ab}	1.6 ± 0.9 ^{ab}	2.1 ± 1.3 ^{ab}
Dextrosa Sabouraud	1 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^{ab}	1.4 ± 0.7 ^{ab}	2.1 ± 1.4 ^{ab}
CZAPEK	1 ± 0.0	1.5 ± 0.8 ^c	2.0 ± 0.9 ^c	2.3 ± 1.1 ^{ab}
V8	1 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.4 ^a	1.6 ± 1.3 ^a

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$). ± = desviación estándar. Escala de severidad: 1= 0 %, 2= 1-25 %, 3= 26-50 %, 4= 51-75 %, 5= 76-100 % de infección en la superficie de los frutos de higo.

En general no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la severidad de los frutos de higo inoculados con la concentración 10^5 de los medio PDA, Agar de Malta, dextrosa Sabouraud y CZAPEK durante el almacenamiento (Tabla 10). El agar V8 fue estadísticamente diferente al resto de los medios, durante los días dos y tres (0.2 y 0.4); sin embargo, en el día cuatro, no se observaron diferencias entre los medios evaluados.

Tabla 10: Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de esporas 10^5 en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días.

Medio nutritivo	SEVERIDAD			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	1 ± 0.0	1.4 ± 0.4 ^{ab*}	1.6 ± 0.9 ^b	2.0 ± 1.2 ^a
Agar de malta	1 ± 0.0	1.2 ± 0.5 ^{ab}	1.5 ± 1.0 ^b	2.4 ± 1.4 ^a
Dextrosa Sabouraud	1 ± 0.0	1.4 ± 0.7 ^b	1.7 ± 0.8 ^b	1.9 ± 0.9 ^a
CZAPEK	1 ± 0.0	1.2 ± 0.4 ^{ab}	1.6 ± 0.8 ^b	1.9 ± 0.9 ^a
V8	1 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.4 ^a	1.9 ± 1.3 ^a

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$). \pm = desviación estándar. Escala de severidad: 1= 0%, 2= 1-25%, 3= 26-50%, 4= 51-75%, 5= 76-100% de infección en la superficie de los frutos de higo.

7.2 Efecto de cubiertas nanoestructuradas sobre la maduración de los frutos de higo.

7.2.1 Pérdida de peso

En los días de almacenamiento 3, 6, 9 y 12 los frutos de higo cubiertos con el tratamiento Q mostraron menor pérdida de peso (6.1, 12.6, 19.1 y 25.4 %, respectivamente), siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos y al grupo control (9.5, 18.6, 26.8 y 32.5 %, respectivamente); sin embargo, en el día 9 los valores fueron similares al tratamiento Q+NP+EP, mientras que, al final del almacenamiento, la pérdida de peso fue similar con el tratamiento Q+NP+EP y Q+NQ+EP (25.4, 31.1 y 31.9 %, respectivamente) (Figura 5).

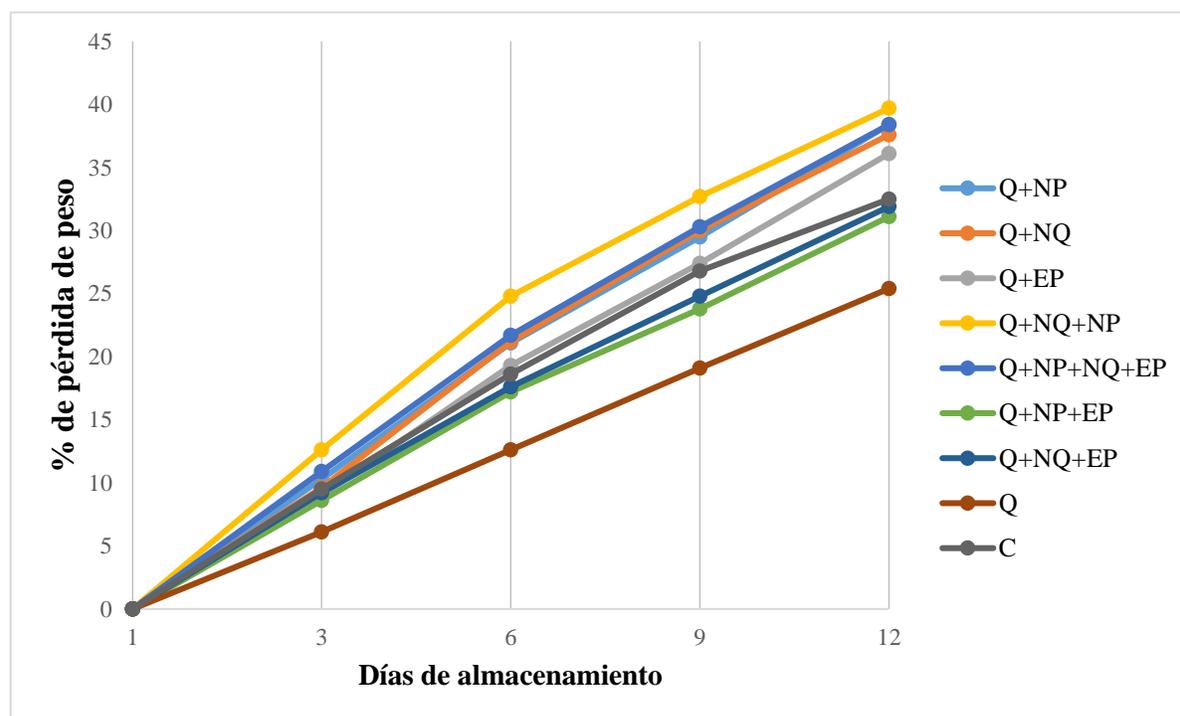


Figura 5. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la pérdida de peso de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

7.2.2 Firmeza

Con respecto a la firmeza, en el día 3 de almacenamiento, los frutos sin tratar (C) mostraron los valores más altos de firmeza (6.4 N) siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos. En el día 6 los frutos cubiertos con el tratamiento Q+NQ mostraron la mayor firmeza (7.0 N) en comparación con el resto de los tratamientos. En el día 9 no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. En el día 12 de almacenamiento los frutos con mayor firmeza correspondieron a los tratamientos Q+NQ+NP (6.0 N), seguido del Q+NP+NQ+EP (5.6 N), Q+NQ+EP (5.6 N), Q+NP (5.1 N), C (4.9 N) y Q (4.1 N); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 11).

Los frutos de higo tratados con las cubiertas Q+NQ+NP, Q+NP+NQ+EP, Q+NP+EP, Q+NQ+EP y Q, no mostraron diferencias estadísticas en los valores de firmeza durante todo el almacenamiento.

Tabla 11: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la firmeza de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

Tratamiento	FIRMEZA (N)				
	Días de almacenamiento				
	1	3	6	9	12
Q+NP	5.6 ± 1.4 ^{aAB}	3.1 ± 1.1 ^{aA}	5.4 ± 1.4 ^{abAB}	6.2 ± 2.1 ^{ab}	5.1 ± 1.3 ^{bAB}
Q+NQ	6.3 ± 1.7 ^{aA}	4.6 ± 3.0 ^{abA}	7.0 ± 1.0 ^{bA}	5.8 ± 2.0 ^{aA}	4.5 ± 1.1 ^{abA}
Q+EP	7.0 ± 0.8 ^{aC}	4.3 ± 1.3 ^{abAB}	5.3 ± 1.9 ^{abABC}	5.6 ± 1.5 ^{abC}	2.8 ± 1.1 ^{aA}
Q+NQ+NP	4.5 ± 1.4 ^{aA}	6.0 ± 1.1 ^{abA}	4.6 ± 1.7 ^{abA}	5.3 ± 0.9 ^{aA}	6.0 ± 1.3 ^{bA}
Q+NP+NQ+EP	6.1 ± 1.7 ^{aA}	6.2 ± 0.4 ^{abA}	6.1 ± 1.6 ^{abA}	4.4 ± 0.9 ^{aA}	5.6 ± 1.0 ^{bA}
Q+NP+EP	4.8 ± 1.2 ^{aA}	4.9 ± 1.2 ^{abA}	5.0 ± 1.0 ^{abA}	4.4 ± 0.8 ^{aA}	4.4 ± 1.0 ^{abA}
Q+NQ+EP	5.5 ± 1.2 ^{aA}	5.8 ± 2.2 ^{abA}	6.2 ± 1.0 ^{abA}	4.9 ± 0.4 ^{aA}	5.6 ± 0.5 ^{bA}
Q	5.0 ± 1.7 ^{aA}	3.9 ± 0.5 ^{abA}	3.9 ± 0.9 ^{aA}	3.8 ± 1.2 ^{aA}	4.1 ± 0.7 ^{abA}
C	6.0 ± 1.6 ^{aAB}	6.4 ± 1.1 ^{bB}	4.6 ± 0.9 ^{abAB}	4.4 ± 0.6 ^{aA}	4.9 ± 0.6 ^{bAB}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Tukey, $p < 0.05$).

7.2.3 SST

Al día 1 de almacenamiento, los frutos de los tratamientos Q+NP+EP y Q+NQ+EP presentaron la mayor concentración de °Brix (21.2°), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con el tratamiento Q+NQ (14.8°). En el día 3, las formulaciones de Q y Q+NQ+EP tuvieron los valores más altos (23.6 y 24.8°,

respectivamente), mientras que, el grupo control (C) tuvo menor cantidad de °Brix (16.8°), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En el día 6, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos. En el día 9, los higos del tratamiento Q+EP presentaron la mayor concentración de SST (26.6 °Brix), presentando diferencias estadísticas con el tratamiento Q (18.4°) ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias con respecto al control (C) ni entre los demás tratamientos. Al final del experimento, no se observaron diferencias entre el control y los tratamientos (Tabla 12).

Tabla 12: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la concentración de SST de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

Tratamiento	SST (°Brix)				
	Días de almacenamiento				
	1	3	6	9	12
Q+NP	16.2 ± 1.9 ^{abA}	20.6 ± 3.8 ^{abcAB}	20.8 ± 1.8 ^{aAB}	23.0 ± 3.7 ^{abB}	22.2 ± 4.0 ^{aAB}
Q+NQ	14.8 ± 2.9 ^{a*A*}	20.8 ± 3.6 ^{abcB}	18.2 ± 2.4 ^{aAB}	20.6 ± 3.8 ^{abAB}	21.2 ± 2.6 ^{aB}
Q+EP	17.4 ± 3.4 ^{abA}	19.8 ± 2.8 ^{abcAB}	16.4 ± 5.0 ^{aA}	26.6 ± 0.6 ^{bc}	24.0 ± 3.9 ^{aBC}
Q+NQ+NP	18.2 ± 2.9 ^{abA}	17.4 ± 2.9 ^{abA}	15.8 ± 2.2 ^{aA}	19.8 ± 3.4 ^{abAB}	24.0 ± 3.7 ^{aB}
Q+NP+NQ+EP	16.6 ± 2.7 ^{abA}	17.6 ± 4.5 ^{abA}	19.2 ± 3.4 ^{aA}	22.4 ± 4.7 ^{abA}	22.8 ± 5.5 ^{aA}
Q+NP+EP	21.2 ± 2.4 ^{ba}	23.0 ± 3.4 ^{abcA}	21.4 ± 2.6 ^{aA}	20.4 ± 3.5 ^{abA}	25.6 ± 2.1 ^{aA}
Q+NQ+EP	21.2 ± 2.8 ^{ba}	24.8 ± 2.6 ^{ca}	19.6 ± 4.5 ^{aA}	21.8 ± 3.7 ^{abA}	22.6 ± 2.8 ^{aA}
Q	21 ± 3.6 ^{ba}	23.6 ± 2.5 ^{bcA}	19.4 ± 2.7 ^{aA}	18.4 ± 2.88 ^{aA}	20.0 ± 4.5 ^{aA}
C	18 ± 1.9 ^{abA}	16.8 ± 2.8 ^{aA}	18.8 ± 2.4 ^{aA}	23.0 ± 2.1 ^{abA}	22.0 ± 5.7 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre días de almacenamiento (Tukey, $p < 0.05$).

7.2.4 Color

Para la variable de color, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, durante los 12 días de almacenamiento de los frutos de higo (Tabla 13).

Tabla 13: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en el color de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

Tratamiento	COLOR				
	Días de almacenamiento				
	1	3	6	9	12
Q+NP	8.3 ± 2.6 ^{a*}	6.4 ± 2.3 ^a	4.5 ± 2.0 ^a	4.7 ± 2.4 ^a	3.7 ± 2.2 ^a
Q+NQ	7.2 ± 2.6 ^a	5.5 ± 1.5 ^a	4.2 ± 1.2 ^a	3.9 ± 1.8 ^a	3.7 ± 1.5 ^a
Q+EP	7.5 ± 3.5 ^a	7.4 ± 2.5 ^a	5.8 ± 2.3 ^a	4.8 ± 1.7 ^a	3.9 ± 1.3 ^a
Q+NQ+NP	6.8 ± 2.8 ^a	6.2 ± 2.9 ^a	4.8 ± 2.6 ^a	4.1 ± 2.4 ^a	3.4 ± 2.3 ^a
Q+NP+NQ+EP	7.7 ± 4.1 ^a	5.5 ± 2.3 ^a	4.1 ± 2.1 ^a	2.9 ± 1.2 ^a	2.7 ± 1.8 ^a
Q+NP+EP	6.5 ± 3.0 ^a	6.3 ± 3.1 ^a	4.7 ± 2.4 ^a	4.0 ± 2.0 ^a	3.2 ± 1.4 ^a
Q+NQ+EP	8.2 ± 5.0 ^a	7.6 ± 4.2 ^a	4.8 ± 2.3 ^a	4.5 ± 2.7 ^a	3.7 ± 2.1 ^a
Q	6.7 ± 2.4 ^a	6.9 ± 3.3 ^a	4.8 ± 1.3 ^a	4.2 ± 1.3 ^a	3.3 ± 1.7 ^a
C	7.7 ± 3.7 ^a	6.9 ± 3.7 ^a	5.3 ± 3.1 ^a	3.8 ± 2.7 ^a	3.5 ± 2.1 ^a

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

7.2.5 Capacidad antioxidante

Con respecto a la variable de capacidad antioxidante, en el día uno, los frutos del tratamiento Q+NQ+NP y Q mostraron los valores más altos (56 y 54.5 %, respectivamente), mientras que, en el día tres los valores más altos se reportaron en Q+NP+NQ+EP (61 %). Al 6º día de almacenamiento, los frutos de la formulación

Q+NP+EP mostraron los valores más altos que el resto de los tratamientos. Sin embargo, a los seis días de almacenamiento no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos. En el 9º día de almacenamiento, los frutos del tratamiento Q+NQ+EP tuvieron la mayor capacidad antioxidante (83.7 %), seguido del Q+NQ+NP (67.7 %) y Q+NP+EP (60.6%), siendo estadísticamente similares entre sí ($p < 0.05$). Al final del experimento, los higos del tratamiento Q+NP+EP mostraron la mayor capacidad antioxidante (73.6 %) aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas respecto al control (57 %) (Tabla 14).

Tabla 14: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la capacidad antioxidante de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

Tratamiento	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (% de inhibición de DPPH)				
	Días de almacenamiento				
	1	3	6	9	12
Q+NP	36.4 ± 10.0 ^{abc*}	38.1 ± 6.8 ^{ab*}	54.8 ± 13.0 ^a	39.0 ± 24.3 ^{ab}	48.8 ± 3.0 ^{ab}
Q+NQ	29.3 ± 3.1 ^{ab}	49.0 ± 10.1 ^{abc}	57.6 ± 16.9 ^a	38.1 ± 9.6 ^{ab}	43.0 ± 18.0 ^{ab}
Q+EP	42.5 ± 26.2 ^{abc}	32.9 ± 16.6 ^a	47.7 ± 3.3 ^a	32.8 ± 3.0 ^a	60.7 ± 12.6 ^{bc}
Q+NQ+NP	56.0 ± 7.3 ^c	34.9 ± 6.1 ^{ab}	56.6 ± 11.3 ^a	67.7 ± 15.6 ^{cd}	62.7 ± 7.1 ^{bc}
Q+NP+NQ+EP	40.8 ± 11.4 ^{abc}	61.0 ± 9.7 ^c	54.6 ± 6.9 ^a	48.7 ± 12.8 ^{abc}	61.1 ± 9.1 ^{bc}
Q+NP+EP	28.1 ± 9.4 ^a	44.8 ± 11.7 ^{abc}	63.9 ± 11.6 ^a	60.6 ± 10.7 ^{bcd}	73.6 ± 17.4 ^c
Q+NQ+EP	50.4 ± 6.2 ^{bc}	49.4 ± 2.7 ^{abc}	52.9 ± 10.7 ^a	83.3 ± 2.8 ^d	43.6 ± 9.8 ^{ab}
Q	54.5 ± 11.9 ^c	50.9 ± 5.1 ^{bc}	47.4 ± 25.4 ^a	47.7 ± 7.1 ^{abc}	37.6 ± 9.2 ^a
C	45.0 ± 4.4 ^{abc}	44.9 ± 3.1 ^{abc}	52.0 ± 6.8 ^a	53.8 ± 7.9 ^{abc}	57.0 ± 14.8 ^{abc}

*Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). ± = desviación estándar.

7.2.6 Producción de CO₂

Los valores de producción de CO₂ fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a partir del 3º día. Los frutos de los tratamientos Q+NP+NQ+EP y Q tuvieron la menor tasa de respiración (45.6 y 46.2 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹, respectivamente), mientras que, los de los tratamientos Q+NP+EP, Q+NQ+EP y C presentaron la mayor tasa de respiración (57.3, 59.1 y 55.0 CO₂ Kg⁻¹h⁻¹, respectivamente). En el 6º día, los higos de los tratamientos Q+NQ, Q+NQ+NP y Q+NP+NQ+EP presentaron la menor tasa de respiración (54.8, 58.7 y 55.7 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹, respectivamente), mientras que, la mayor producción de CO₂ (78.5 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹) correspondió a los frutos del tratamiento Q+NQ+EP; sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control. En el 9º día del almacenamiento, la menor producción de CO₂ (58.5 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹) fue en los frutos del tratamiento Q, y la mayor en los del control y Q+NP+EP (92.5 y 88.2 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹, respectivamente). Al final del experimento, en el tratamiento Q+NP+EP se observó la mayor tasa (129.4 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹), y en el tratamiento Q+NQ, la menor (71.3 ml CO₂ Kg⁻¹h⁻¹); sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas con el control (C). Los demás tratamientos tampoco tuvieron diferencias estadísticamente significativas con el control (Figura 6).

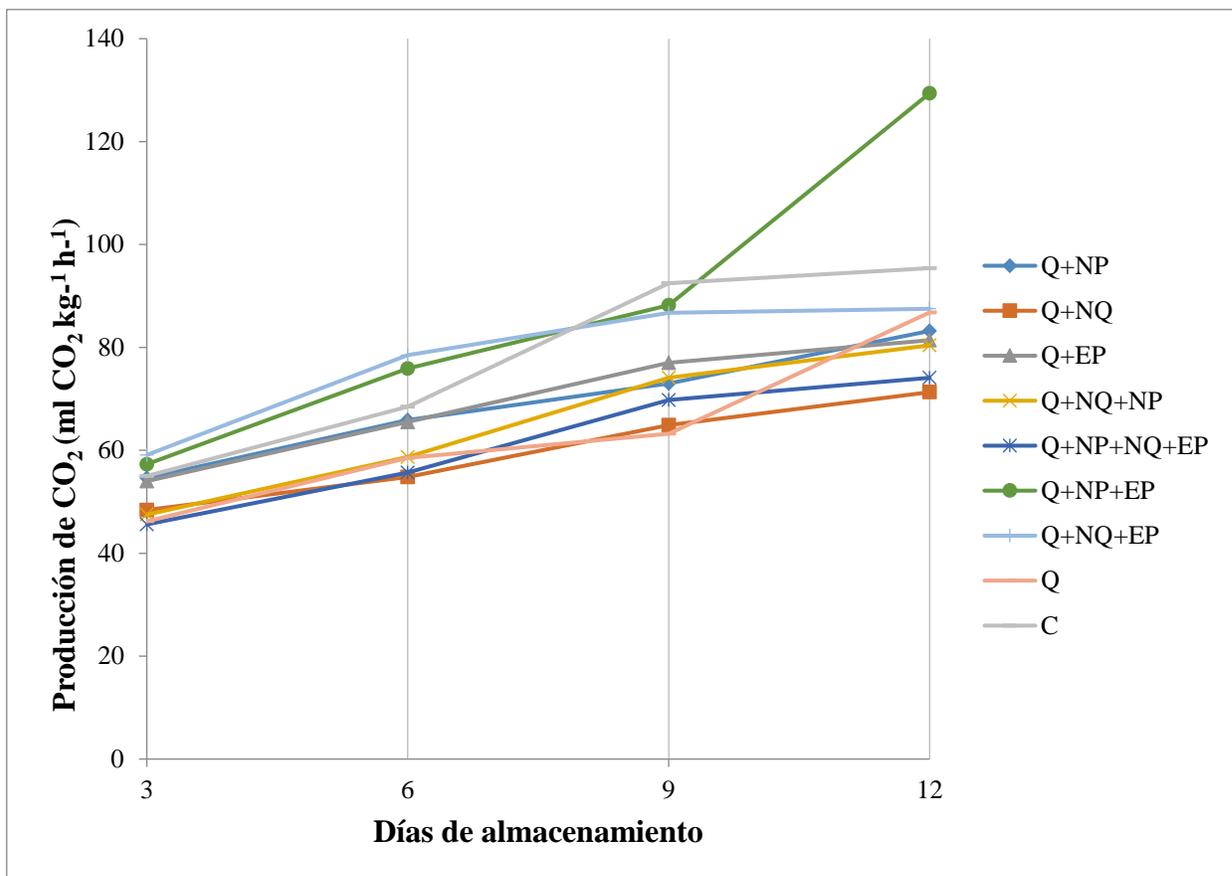


Figura 6. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la producción de CO₂ de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

7.2.7 Producción de etileno

En la producción de etileno, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el día 9 de almacenamiento, donde todos los tratamientos, con excepción del Q+NP+NQ+EP (61.2 mL / Kg⁻¹h⁻¹), resultaron tener la menor producción de etileno en comparación con el grupo control (C) (148.8 mL / Kg⁻¹h⁻¹). No se observaron diferencias entre los demás días de almacenamiento (Figura 7).

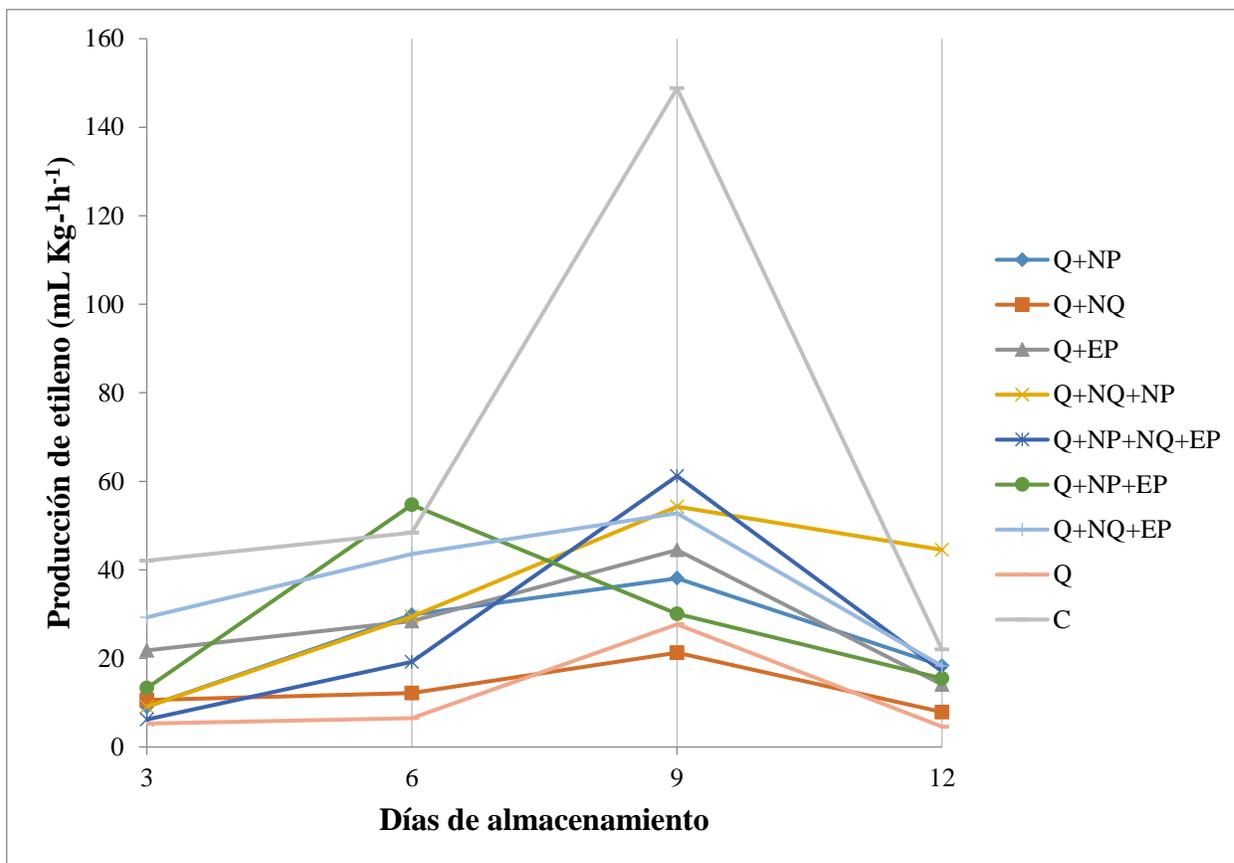


Figura 7. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la producción de etileno de frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

7.3 Efecto de las cubiertas nanoestructuradas en el desarrollo de *Aspergillus flavus* bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel semicomercial.

7.3.1 Incidencia

En relación a la incidencia de *A. flavus* bajo condiciones de laboratorios se observó que los síntomas de la infección iniciaron hasta el 3^o día de almacenamiento, siendo el tratamiento Q+NP+EP el que tuvo una mayor incidencia (20%). En el 6^o día de almacenamiento, los frutos de los tratamientos Q+NP y Q+NQ presentaron el menor porcentaje de infección (0 y 3.3 %, respectivamente), mientras que, los higos del grupo control (C) tuvieron la mayor incidencia (33%). En el 9^o día de almacenamiento, los menores porcentajes de infección (23.3, 16.7, 20 %) correspondieron a los frutos provenientes de las formulaciones Q+NP, Q+NQ y Q+NQ+EP, respectivamente. El grupo control (C) fue el que presentó el mayor porcentaje de infección (60 %) en comparación con todos los tratamientos, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). A los 12 días de almacenamiento, los frutos con la menor incidencia (20 %) fueron los tratados con Q+NQ (20%) seguido de Q+NQ+EP y Q+NP (23.3 y 26.7 %, respectivamente); y el grupo del control mantuvo el mayor porcentaje de infección (66.7 %), siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos. (Figura 8).

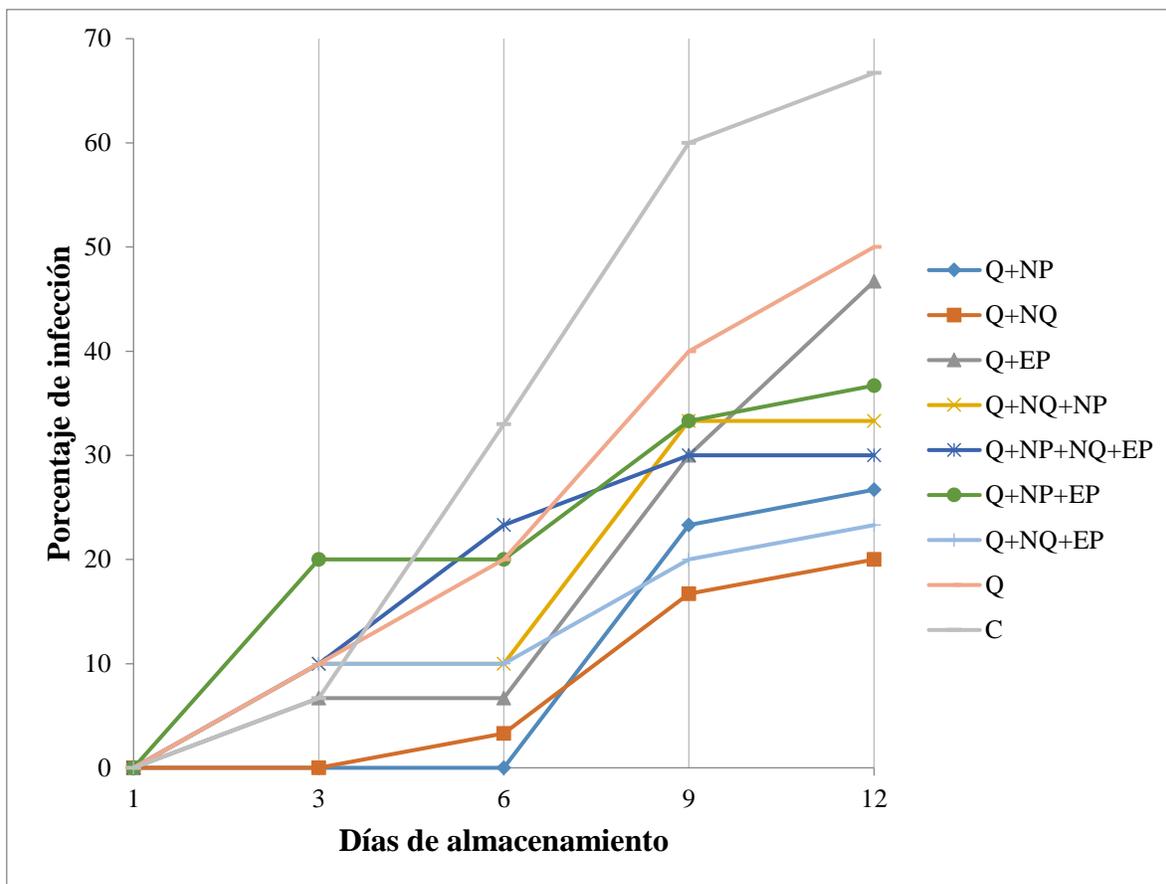


Figura 8. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la incidencia de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C, bajo condiciones de laboratorio.

La infección de los frutos por *A. flavus* bajo condiciones semicomerciales, inició hasta el 3º día de almacenamiento, siendo el grupo control el que presentó una mayor incidencia (15 %), siendo estadísticamente superior en comparación con los demás tratamientos ($p < 0.05$). En el 6º día de almacenamiento, los frutos del tratamiento Q+NQ presentaron el menor porcentaje de infección (15.3 %), siendo estadísticamente diferente al tratamiento Q+NQ+EP y al grupo control (19.3 y 29 %,

respectivamente) los higos del grupo control fueron los que presentaron la mayor incidencia (33%). Este comportamiento se repitió durante todo el experimento, pues el tratamiento Q+NQ fue el que presentó una menor incidencia, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), mientras el grupo control fue el que presentó un mayor porcentaje de infección (Figura 9).

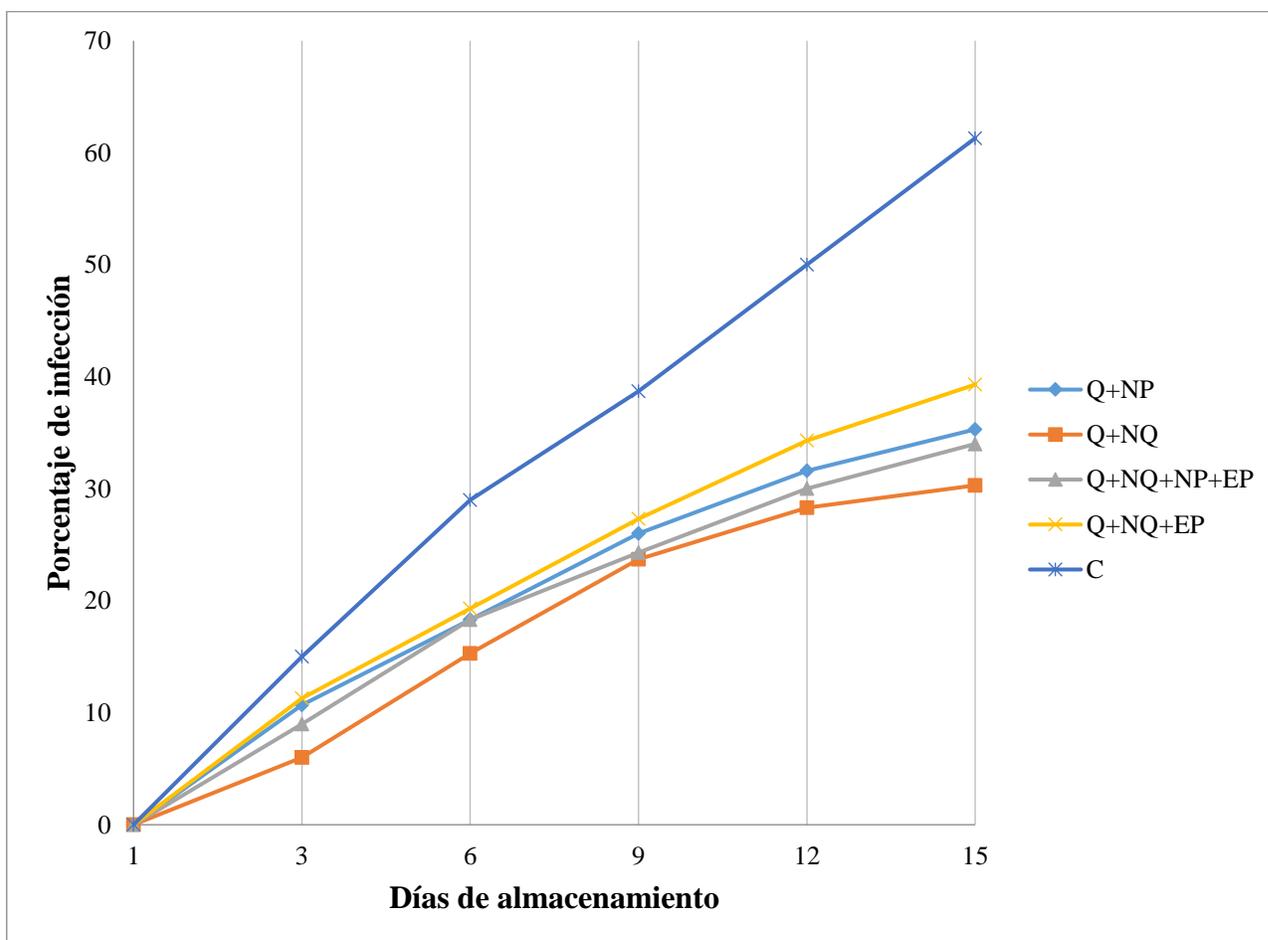


Figura 9. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo a nivel semicomercial en la incidencia de *A.flavus* en frutos de higo almacenados durante 15 días a 4 °C.

7.3.2 Severidad

En cuanto a la severidad de la infección, no se observaron diferencias estadísticas hasta el 6^a día de almacenamiento, donde los frutos de los tratamientos Q+NP, Q+NQ, Q+EP y Q+NQ+NP presentaron la severidad menor (1, 1.1, 1.1 y 1.3, respectivamente) en comparación con el grupo control (2.1). En el 9^o día de almacenamiento, los higos provenientes de los tratamientos Q+NP, Q+NQ y Q+NQ+EP presentaron menor severidad (1.7, 1.6 y 1.7, respectivamente), que los del grupo control (3.1), presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En el último día de almacenamiento, la menor severidad (2.0, 1.8, 2.1 y 1.8) correspondió con los tratamientos Q+NP, Q+NQ, Q+NP+NQ+EP y Q+NQ+EP, respectivamente y el grupo control mostró la mayor severidad (3.6) con diferencias estadísticas ($p < 0.05$) (Figura 10).

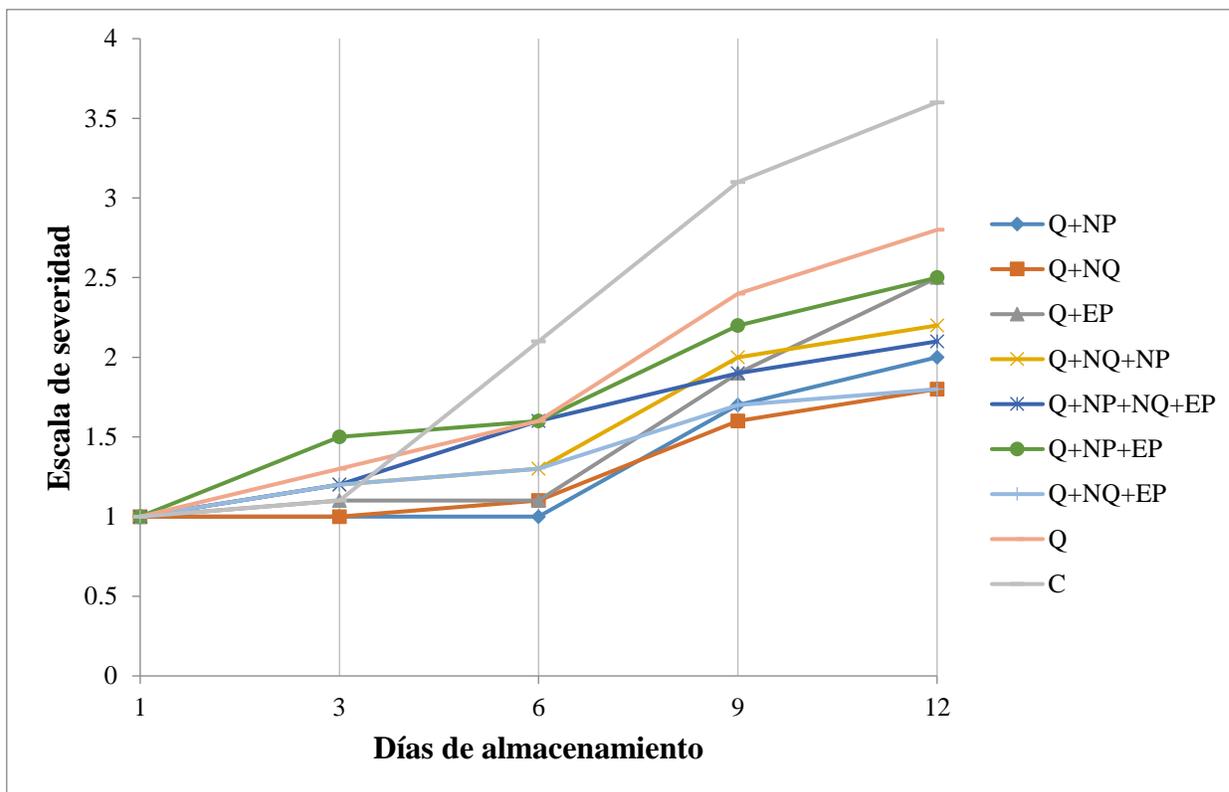


Figura 10. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C, bajo condiciones de laboratorio.

En cuanto a la severidad de la infección en condiciones semicomerciales, se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) desde el 3er día de almacenamiento, donde los frutos del tratamiento Q+NQ presentaron la menor severidad de la infección (1.16) en comparación con el grupo control (1.39). En el 6º día de almacenamiento, los higos provenientes de los tratamientos Q+NP, Q+NQ y Q+NQ+NP+EP presentaron menor severidad (1.43, 1.39 y 1.35, respectivamente), que los del grupo control (1.77), presentando diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0.05$). En el 9º día de almacenamiento, la menor severidad (1.64 1.60) correspondió con los tratamientos Q+NP, Q+NQ y Q+NP+NQ+EP, respectivamente, y el grupo control mostró la mayor severidad (2.04) con diferencias estadísticas ($p < 0.05$). En el 12º día de almacenamiento, todos los tratamientos presentaron una severidad estadísticamente inferior ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control (2.35); este comportamiento se repitió en el último día de almacenamiento, siendo el grupo control el que presentó la mayor severidad en comparación con los demás tratamientos, con diferencias estadísticamente significativas (Figura 11).

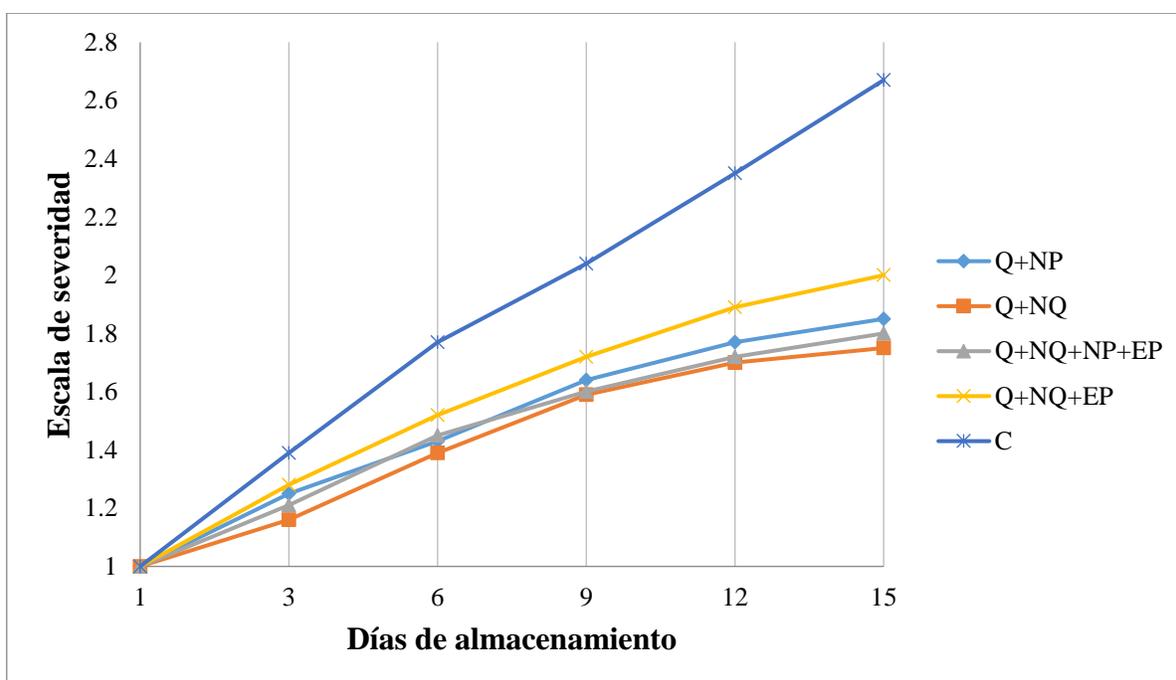


Figura 11. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo a un nivel semicomercial en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 15 días a 4 °C.

7.3.3 Producción de aflatoxinas

En los resultados asociados con la producción de aflatoxinas totales en los frutos de higo tratados, los tratamientos que presentaron valores permitidos por la legislación fueron los siguientes: Q+NQ, Q+NQ+NP, Q+NP+NQ+EP, Q+NP+EP y Q+NQ+EP con valores correspondientes a 19.00, 15.00, 15.00, 17.33 y 18.00 PPB, respectivamente; por otro lado, la mayor cantidad de aflatoxinas (250.00 PPB) se obtuvo en los frutos del grupo control (C). Se obtuvieron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con excepción del tratamiento Q (41.33 PPB) (Tabla 15; Figura 12).

Tabla 15: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en el contenido de aflatoxinas producidas por la inoculación de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4°C.

Tratamiento	Aflatoxinas (PPB)
Q+NP	22.67 ± 2.08 ^a
Q+NQ	19.00 ± 2.00 ^a
Q+EP	22.67 ± 1.53 ^a
Q+NQ+NP	15.00 ± 2.00 ^a
Q+NP+NQ+EP	15.00 ± 3.00 ^a
Q+NP+EP	17.33 ± 6.11 ^a
Q+NQ+EP	18.00 ± 1.00 ^a
Q	41.33 ± 39.80 ^{ab}
C	250.00 ± 216.56 ^b

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). ± = desviación estándar.

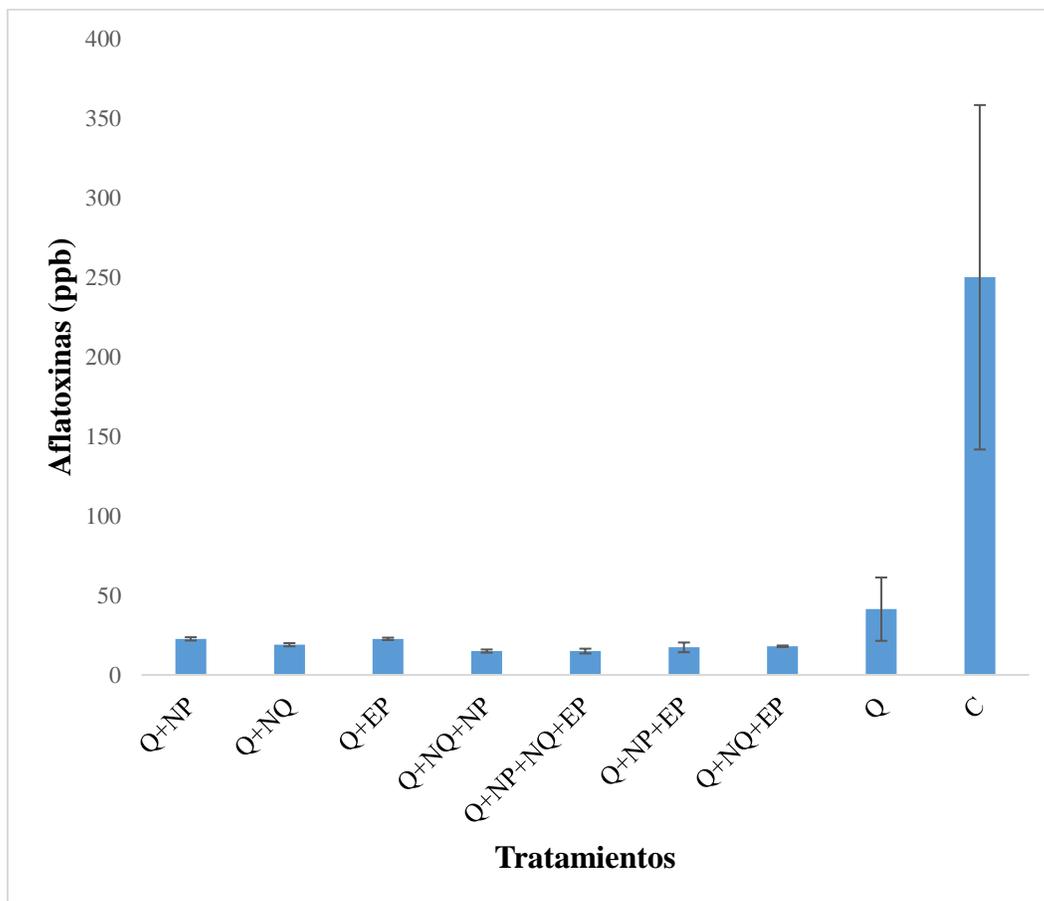


Figura 12. Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en el contenido de aflatoxinas en frutos de higo almacenados durante 12 días a 4 °C.

7.4 Efecto en la calidad sensorial de los frutos de higo tratados con las cubiertas nanoestructuradas

La apariencia de los higos tratados con cubiertas nanoestructuradas no se afectó de forma significativa en comparación con el grupo control. En cuanto al aroma, el tratamiento Q+NQ+EP, generó una aceptación significativamente mayor en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Los demás tratamientos no generaron

cambios significativos. Para la variable de sabor, los tratamientos no generaron cambios significativos en comparación con aquellos frutos de higo que no recibieron tratamiento y en la variable en la que los consumidores decidían si comprarían o no el producto, el tratamiento Q+NP+NQ+EP fue el que presentó una mayor aceptación (90%) en comparación con el grupo control (60%) (Tabla 16).

Tabla 16: Efecto de cubiertas nanoestructuradas de quitosano/propóleo en la calidad sensorial de frutos de higo.

Tratamiento	Apariencia	Aroma	Sabor	¿Lo comprarían? (%)
Q+NP	8.6 ± 0.5 ^b	6.8 ± 1.4 ^{ab}	6.6 ± 2.5 ^a	70 ± 48 ^a
Q+NQ	7.2 ± 1.5 ^a	6.5 ± 1.3 ^{ab}	6.7 ± 1.8 ^a	80 ± 42 ^a
Q+NP+NQ+EP	7.8 ± 0.9 ^{ab}	6.7 ± 1.5 ^{ab}	7.6 ± 1.8 ^a	90 ± 32 ^a
Q+NQ+EP	8.3 ± 1.0 ^{ab}	8.0 ± 0.5 ^b	7.2 ± 1.6 ^a	70 ± 48 ^a
C	7.3 ± 1.1 ^{ab}	6.2 ± 1.0 ^a	7.2 ± 1.7 ^a	60 ± 52 ^a

Escala de aceptabilidad. *Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

En relación al efecto del medio nutritivo y concentración del inóculo, el primero influyó sobre la patogenicidad de *A. flavus*. Sobre este tema, Barajas-Ontiveros *et al.* (97) reportaron que los medios de cultivo pueden influir en el crecimiento y la germinación de las esporas ya que estas contienen reservas de nutrientes; sin embargo, la composición nutrimental del medio puede afectar también el proceso de germinación (98). Varios autores (44, 99) han reportado que el medio CZAPEK favorece el desarrollo de este patógeno, incluso Luna *et al.* (100) observaron que las cepas de *Aspergillus* incubadas en este medio, tuvieron diferencias macroscópicas (micelio blanco con pigmento amarillo difundido en el medio) al compararla con medio PDA (micelio blanco). Seguido del medio CZAPEK, la cepa del medio PDA mostró alta incidencia sobre los frutos inoculados con las concentraciones 10^4 (64 y 53%, respectivamente) y 10^5 (51 y 47%, respectivamente). Este resultado concuerda con lo reportado por Cota-Arriola *et al.* (99) y Hassouni *et al.* (98). Los autores demostraron que hongos del género *Aspergillus* incubados en medio CZAPEK mostraron mayor germinación de esporas (6.55 esporas h^{-1}) comparado con los desarrollados en papa dextrosa y azúcar de bagazo de caña (5.6 esporas h^{-1}).

La germinación de las esporas es de vital importancia en la patogenicidad del hongo debido a que es la primera etapa del crecimiento y es indicativo para la adaptación en el fruto (99).

El medio Agar V8, se ha utilizado cuando los medios tradicionales no desarrollan esporas en los hongos (101). González-Peña, (43) reportó que la biomasa producida de hongo *Phytophthora nicotianae* fue mayor en el medio V8, favoreciendo el crecimiento y la esporulación. Contrario a esto, en la presente investigación, el medio Agar V8 propició menor capacidad de infección al compararlo con los otros medios nutritivos estudiados. Este efecto concuerda con lo reportado por McAlpin y Donald (102), los cuales encontraron que el medio nutritivo Agar V8 produjo una baja cantidad de estromas (102 estromas) al compararlo con el medio CZAPEK (2672 estromas), PDA (2218 estromas) y Agar de Malta (657 estromas). Sin embargo, se ha reportado que el Agar V8 puede favorecer la expresión de enzimas hidrolíticas (43), lo que podría explicar su similitud estadística con el resto de los medios evaluados en la variable de severidad al término del almacenamiento de los higos.

En relación al efecto de las cubiertas aplicadas sobre la calidad de los frutos, la pérdida de peso en los higos provenientes de la cubierta Q, tuvieron en general, menor pérdida de peso en comparación con el grupo control (C) durante todo el almacenamiento. Estos resultados concuerdan con lo reportado por varios autores, entre ellos el de Contreras-Oliva *et al.* (103) quienes evaluaron cubiertas comestibles a base de quitosano en naranjas y obtuvieron una pérdida de peso 10 % menor en las tratadas, en comparación con las no tratadas, Igualmente, Ramos-García *et al.* (104) señalaron que jitomates 'Saladette' cubiertos con quitosano (1

%), ácido oleico (0.1 %) y aceite esencial de limón (0.1 %) presentaron una pérdida de peso de 7.19 % en comparación con aquellos sin recubrimiento (8.93 %) y Martínez-González *et al.* (105) en fresas tratadas con diversas cubiertas a base de quitosano, nanopartículas de quitosano y extracto de propóleo, entre otros, presentaron una pérdida de peso de 9.77 % en comparación con el grupo control (14.93 %).

De acuerdo a Bautista-Baños *et al.* (75) el quitosano es una sustancia que tiene la capacidad de extender la vida de anaquel de diversos productos hortofrutícolas, ya que forma una barrera semipermeable que regula el intercambio de gases, lo que genera, disminución de la pérdida de agua por transpiración, y por ende la pérdida de peso. Por otro lado, según Fernández-Valdez *et al.* (91) el glicerol utilizado para la elaboración de cubiertas comestibles funge como agente plastificante, gracias a su elevada higroscopicidad, ya que, puede abosorber la mitad de su peso en agua, además, de tener una gran capacidad para formar puentes de hidrógeno y formar polímeros, que mejoran la flexibilidad y funcionalidad, disminuyendo la rigidez y fragilidad de la cubierta.

En general, la firmeza de los frutos tratados y no tratados no mostraron cambios significativos, lo cual concuerda con los estudios realizados por Ramos-García *et al.* (76) quienes reportaron que no hubo diferencias entre las formulaciones de quitosano con aceites esenciales aplicados en jitomate y el control. La conservación de la firmeza en los frutos de higo en este estudio también pudiera atribuirse al

propóleo ya que este compuesto lo conforman más de 150 sustancias, entre las que destacan: la resina, polen, ceras, bálsamos, aceites aromáticos y compuestos fenólicos como el ácido poligalacturónico (80).

En esta investigación, el contenido de SST fue similar entre todos los tratamientos. Al respecto, Baldoni *et al.* (69) reportaron resultados similares en la misma variedad que la de nuestro estudio (Black mission), aunque en las evaluaciones de los autores antes citados, las formulaciones fueron a base de quitosano (1%), cera de abeja (0.5%) y aceites esenciales de canela (0.025%) y limón (1%) y el almacenamiento consistió en 16 días. Mata *et al.* (106) señalaron que los SST están estrechamente relacionados con el proceso de maduración de los frutos, por lo que, a un mayor periodo de maduración, habrá un mayor contenido de SST. En este estudio, en la mayoría de los tratamientos, el promedio final de los SST (día 12) fue mayor que el inicial (día 1).

En cuanto al color, los resultados también concordaron con lo reportado por Baldoni *et al.* (69) ya que no se observaron cambios de color significativos en los frutos de higo en comparación con los frutos no tratados. Figueroa *et al.* (67) mencionan que el cambio en el color de forma natural de los frutos se debe al proceso de maduración ya que, en este proceso, ocurre una degradación de la clorofila y comienza la síntesis de pigmentos como las antocianinas. Aguilar-Ortíz *et al.* (107) reportaron que las antocianinas presentes en frutos de la variedad "Black mission" son estables a un rango de pH entre 3 y 8. Las cubiertas comestibles aplicadas en

este estudio tuvieron un pH de 5.6, por lo que, no afectaron el contenido de antocianinas. Por otra parte, estos autores también reportaron que temperaturas mayores a 60 °C aumentaron la degradación de antocianinas; sin embargo, este experimento se realizó a una temperatura de 4 °C, razón por la cual los pigmentos no se afectaron.

Los higos del tratamiento Q+NP+EP, tuvieron la mayor capacidad antioxidante (73.6 %) al final del almacenamiento; sin embargo, no resultó ser estadísticamente diferente al grupo control. Cabe resaltar, que este tratamiento fue el que presentó la mayor cantidad de propóleo en comparación con los demás tratamientos. Vargas *et al.* (108) mencionan que el propóleo es una sustancia que presenta un gran poder antioxidante, el cual se debe a su alto contenido de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que contienen grupos hidroxilo en su estructura química, los cuales presentan un mecanismo de secuestro de radicales libres y quelación de iones metálicos. Por su parte, Baldoni *et al.* (69) reportaron diferencias en la capacidad antioxidante a los 12 días del experimento. En este estudio, los higos del tratamiento con quitosano (1%) y aceite esencial de limón (1%) presentaron la mayor capacidad antioxidante (68%), en comparación con los tratamientos con quitosano (1%) y quitosano (1%) + aceite esencial de canela (0.025%) (50% y 55%, respectivamente).

El higo es un fruto con alta capacidad antioxidante. Sobre el tema, Solomon *et al.* (20) reportaron que el higo contiene compuestos biológicamente activos con poder

antioxidante, entre los que destacan: carotenoides, antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos como los ácidos gálico, clorogénico y cinámico. López-Mata *et al.* (71) mencionaron que las cubiertas comestibles tienen la capacidad de proteger a los productos hortofrutícolas del daño oxidativo y disminuir la pérdida de su valor comercial sin afectar la composición química del alimento.

En cuanto a la respiración de los frutos, los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por Ramos-García *et al.* (76) quienes no encontraron diferencias significativas en la tasa respiratoria de jitomates tratados con cubiertas a base de quitosano y aceites esenciales y el grupo control. Al respecto, Ortiz *et al.* (109) mencionan que el efecto de atmósfera modificada por parte de las cubiertas comestibles, es el que permite regular el intercambio de gases: sin embargo, esto no necesariamente afecta la tasa de respiración y metabolismo del fruto. La respiración en frutos es un proceso natural en el cual las células vegetales continúan siendo metabólicamente activas y obtienen la energía necesaria mediante el catabolismo de sus reservas orgánicas; dichas reservas se van agotando, generando un cambio en su sabor.

En relación al efecto de las cubiertas sobre el desarrollo de *A. flavus*, todos los tratamientos presentaron una menor incidencia en comparación con el grupo control. Estos resultados concuerdan con los reportados por Baldoni *et al.* (69) quienes reportaron inhibición de hasta 50% en el crecimiento de varios hongos fitopatógenos, específicamente del género *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Por

su parte, Barrera *et al.* (73) encontraron que el extracto de propóleo presentó actividad antifúngica ante *C. gloeosporioides*, logrando inhibir su crecimiento hasta 57%. En otros estudios llevados a cabo por Correa-Pacheco *et al.* (87) también se redujo hasta 60% a *C. gloeosporioides*, en frutos de aguacate con la formulación de nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo.

Bautista-Baños *et al.* (63) señalan que el quitosano es una sustancia con propiedades antimicrobianas que se ha utilizado en diversos productos hortofrutícolas, logrando disminuir el desarrollo de numerosos microorganismos. Como mecanismos de acción, se ha propuesto que la naturaleza policatiónica y la longitud de la cadena polimérica del quitosano al unirse con la membrana de los microorganismos ocasionan un desequilibrio en la homeostasis celular iónica de K y Ca² causando la salida de diversas moléculas que involucran a la nutrición del microorganismo (7, 75).

En la evaluación semicomercial, los frutos con la menor incidencia y severidad fueron los tratados con la cubierta Q+NQ (30.3 % y 1.75, respectivamente) en comparación con el grupo control (61.3 % y 2.67, respectivamente). Locaso y del Carmen (110) lograron inhibir hasta en 55% la incidencia de *Penicillium digitatum* en naranja, cubiertas con 24 películas diferentes a base de quitosano. Ramos-García *et al.* (76) redujeron hasta 100 % a *Escherichia coli* DH5a en jitomates tratados con quitosano (1 %), cera de abeja (1 %) y aceite esencial de limón (0.1 %).

El índice de severidad de la infección está estrechamente relacionado con el crecimiento de micelio, ya que es una variable cualitativa basada en la superficie del fruto afectada por el hongo. Mohammadi *et al.* (111) reportaron cero crecimientos del hongo *Phytophthora* en pepinos con recubrimientos nanoestructurados a base de quitosano y aceite esencial de canela (1.5 g/L), en comparación con el grupo control. Flores *et al.* (112) lograron inhibir la severidad de *B. cinerea* en 100% con compositos de quitosano (12.5 mg / mL) y octanato de sodio (0.51 mg / mL) en fresas.

Xoca-Orozco *et al.* (113) mencionan que la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos presentes en el propóleo podría deberse a las catequinas; en específico, a la fracción de la molécula de ácido gálico y al grupo hidroxilo presente en su estructura. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con la capacidad de estos compuestos de inactivar enzimas relacionadas con la permeabilidad de la membrana, la cual eventualmente se rompe causando lisis de conidios e hifas resultando en una pérdida de la integridad celular.

En relación al contenido de aflatoxinas, los frutos tratados con las cubiertas de Q+NQ, Q+NQ+NP, Q+NP+NQ+EP, Q+NP+EP y Q+NQ+EP, presentaron valores que se encuentran dentro de lo permitido por la legislación (< 20 PPM) y los higos del grupo no tratado presentaron la mayor cantidad de aflatoxinas (250 PPM). Sobre este tema, Cortés-Higareda *et al.* (8) reportaron también una total inhibición *in vitro*

de aflatoxinas de *A. flavus* con cubiertas a base de una formulación de quitosano 1.0% (59.1%), glicerol (0.3 %), nanopartículas de propóleo (20 %), nanopartículas de quitosano (20 %) y extracto de propóleo al 10% (0.6%). Igualmente, Torlak y Sert (114) lograron inhibir la producción de aflatoxinas al 100 % a nivel *in vitro*, con cubiertas nanoestructuradas a base de quitosano y propóleo (40%), señalando que esto podría explicarse debido a la actividad sinérgica del quitosano y el propóleo y a las ventajas que otorga la nanoestructuración. Los mismos autores resaltaron que la actividad antimicrobiana de las formulaciones a base de quitosano mejoró cuando se agregó extracto de propóleo, probablemente debido a que la aplicación de nanotecnología a las cubiertas comestibles les confiere mayor reactividad y eficiencia.

Juarez-Morales *et al.* (115) mencionaron que el quitosano tiene la capacidad de adsorber la aflatoxina B1 cuando las cargas positivas de su grupo amino interactúan con las cargas negativas de los átomos de oxígeno de las aflatoxinas. Por su parte, Klitch (116) señaló que los compuestos fenólicos (presentes en el propóleo) y el quitosano tienen la capacidad de disminuir la producción de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mientras que, Hashem *et al.* (117) reportaron que el propóleo a concentraciones de 0.6 g / 100 ml, inhibió completamente la producción de aflatoxinas provenientes de *A. parasiticus*. Estos autores, proponen que el mecanismo de acción se encuentra en el metabolismo de los lípidos, ya que se observó una represión catabólica por parte del propóleo, observando un incremento

de la acumulación de ácidos grasos saturados; esto sugiere un mecanismo de resistencia de la membrana fúngica al disminuir su fluidez y elasticidad.

Por su parte, Carvajal (118) señaló que las aflatoxinas se producen cuando *A. flavus* se encuentra bajo estrés, lo que interrumpe la reducción de grupos cetónicos, favoreciendo así, las reacciones de condensación en la ruta metabólica de la síntesis de ácidos grasos, generando compuestos policetónicos como las aflatoxinas. Igualmente, Montero-Álvarez *et al.* (119) reportaron que la capacidad del quitosano para inhibir las aflatoxinas es un mecanismo que implica la quelación de iones, y para ello requiere los grupos –OH y –O de los residuos de D-glucosamina como ligantes, y 2 o más grupos aminos de una misma cadena para unirse a un mismo ión.

Por otro lado, en este estudio, el quitosano solo, no inhibió de forma significativa la producción de aflatoxinas. Cortés-Higareda *et al.* (8) mencionaron que el efecto antimicrobiano de este compuesto depende del tipo de microorganismo, pH de la formulación, peso molecular, concentración y grado de desacetilación del quitosano. Valencia (120) reporta que la carga superficial de las células puede cambiar dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre, lo que indica que la susceptibilidad de las células a los antibióticos puede cambiar. En este estudio se utilizó quitosano de bajo peso molecular (50,000-190,000 Da) con un grado de desacetilación >75. El grado de desacetilación está asociado con una mayor solubilidad y densidad de carga protónica. Estos dos factores son muy importantes

para la adhesión del quitosano a la pared celular de los microorganismos, ya que a mayor grado de desacetilación, mayor su capacidad antimicrobiana. La densidad de la carga positiva es la capacidad de algunos biopolímeros para protonar su grupo amino y pasar de $-NH_2$ a $-NH_3^+$, esta depende del grado de desacetilación y del pH. Los grupos $-NH_3^+$ son los responsables de interactuar con las estructuras externas de los microorganismos, desestabilizándolas y causando lisis celular.

En relación al efecto de las cubiertas con la calidad sensorial de los higos, la mayoría de los tratamientos preservaron la calidad de estos durante el periodo de almacenamiento. Sobre el tema, Restrepo y Aristizábal (121) en un análisis sensorial realizado en fresas tratadas con recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca sábila y cera carnaúba, también encontraron que los recubrimientos preservaron los atributos de sabor, olor, color y textura hasta el 10^o día, en comparación con el grupo control que mantuvo los mismos atributos solo hasta el 5^o día de almacenamiento. Por su parte, Zambrano *et al.* (122) evaluaron el efecto de una cubierta comestible de mucílago de cactus sobre los atributos sensoriales de piñas, y reportaron que los frutos que recibieron tratamiento tuvieron mayor aceptación en comparación con el grupo control después de 7 días de almacenamiento. Los autores explican que la mayor aceptación fue debido a que los frutos tratados presentaron una menor pérdida de peso y mayor firmeza al finalizar del almacenamiento, por lo que lograron mantener de mejor forma los compuestos volátiles relacionados con aspectos como el sabor y el aroma.

9. CONCLUSIONES

La mayor patogenicidad de *A. flavus* en los frutos de higo 'Black mission', se presentó en las cepas incubadas en los medios nutritivos: CZAPEK, PDA y AM y a la concentración de esporas de 10^4 .

En general, el proceso de maduración de los higos 'Black mission' tratados con las cubiertas nanoestructuradas de quitosano + propóleo no se afectó durante el tiempo de almacenamiento de 12 días a 4°C.

Se observó menor incidencia, severidad y producción de aflatoxinas de *A. flavus* en los frutos 'Black mission' tratados con las cubiertas nanoestructuradas de quitosano + propóleo, tanto a nivel de laboratorio y semicomercial y almacenados a 4°C. 1

Los higos 'Black mission' tratados con las cubiertas, tuvieron una calidad sensoria aceptable.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Serrano-Colli HA y Cardona-Castro N. Micotoxicosis y micotoxinas: Generalidades y aspectos básicos. *Revista CES Medicina*. 2015; 29(1): 143-152.
2. OMS (Organización Mundial de la Salud). Datos y cifras contra el cáncer. 2017 [Internet]. Consultado el 4 de junio de 2018. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
3. Carvajal M y Díaz M. Detección y Cuantificación de Aflatoxinas (Mutágenos y cancerígenos), sus metabolitos y aductos de AFB-ADN (Biomarcadores de riesgo de enfermedad) en hepatocarcinomas humanos de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fitopatología. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2010. (p. 238)
4. Vega V. Hongos Micotoxigénicos y Aflatoxinas en Granos de Diferentes Orígenes Geográficos de la República Mexicana. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila, México. 2012. (p. 65).
5. Centeno S y Carrera Y. Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. *Saber*. 2013; 25(2): 185-192.
6. Juárez-Becerra GP, Sosa-Morales ME y López-Malo A. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*. 2010; 4(2): 14-23.

7. Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Hernández-López M y Rodríguez-González F. Morphological and ultrastructural modifications of chitosan-treated fungal phytopathogens. (pp. 251-276). En: Chitosan in the preservation of agricultural commodities (Bautista-Baños S. ed.) Academic Press/elsevier. 2016. (p. 394).
8. Cortés-Higareda M, Ramos-García ML, Correa-Pacheco ZN, Río-García CD, Bautista-Baños S. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. Heliyon. 2019; 5(5): 1-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01776>
9. Sotelo-Boyás ME, Valverde-Aguilar G, Plascencia-Jatomea M, Correa-Pacheco ZN, Jiménez-Aparicio A, Solorza-Feria J y Bautista-Baños S. Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. *In vitro* effect on *Pectobacterium carotovorum*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2016a; 14(3): 589-599.
10. Rai M, Ingle AP, Gupta I, Pandit R, Paralikar P, Gade A, Chaud MV y Alves C. Smart nanopacking for the enhancement of food shelf life. Environmental Chemistry Letters. 2018; 17(1): 277-290. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0794-8>
11. Bautista-Baños S, Correa-Pacheco ZN, Ventura-Aguilar RI. The use of chitosan based nanoformulations for controlling fungi during storage of horticultural commodities. (pp. 371-394) En: Chitin and chitosan: properties

and applications. (Ben van den Broek L., Boeriu C. eds.). Wiley Editors. 2020. (p. 536).

12. Fischer G. Comportamiento de los frutales caducifolios en el trópico. En: Los frutales caducifolios en Colombia. (Miranda D., Fisher G., Carranza C. eds.) Sociedad Colombiana de Ciencias Agrícolas, Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2013. (30-45).
13. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2016). FAOSTAT statistics database [Internet]. Consultado el 11 de octubre de 2018. Disponible en: <https://search.library.wisc.edu/catalog/999882363002121>
14. Gobierno del Estado de Morelos (2015). El cultivo del higo, buena alternativa en la fruticultura [Internet]. Consultado el 19 de octubre de 2018. Disponible en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:c_vLEXmPxEQJ:morelos.gob.mx/%3Fq%3Dprensa/nota/el-cultivo-del-higo-buena-alternativa-en-la-fruticultura+%&cd=12&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx
15. Nieto C, Jarrín P y Pinto N. El higo *Ficus carica* L “Manual de producción, uso y aprovechamiento”. 1ª Edición. Quito, Ecuador. SENACYT; 2007.
16. FEN (Fundación Española de la Nutrición). (2013). Higo [Internet]. Consultado el 11 de octubre de 2018. Disponible en: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/higo.pdf>

17. Villalobos MC. Estudio para la prolongación de la vida útil de variedades de higos y brevas interesantes para su consumo en fresco y estudio de técnicas alternativas para el sacado de higos. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura, España. 2015. (p. 566).
18. Cantwell. Estado de maduración de frutos de higo [Internet]. 2002 [Citado el 27 de marzo de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Color-de-los-higos-cv-Netzahualcoyotl-cosechados-en-madurez-de-consumo-A-T1_fig2_340844935
19. Caliskan O. The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach. San Diego, California, E.U. Elsevier 2014. (p. 698)
20. Solomon A, Golubowicz S, Yablłowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, Flaishman MA, et al. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006; 54(20): 7717–7723. doi:10.1021/jf060497h
21. Silveira AC, Sautter CK, Tonetto S, Galiotta G y Brackmann A. Determination of some quality parameters of the Fuji cultivar and their mutants at harvest. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2007; 27(1): 149-153.
22. Morton FJ. Fruits of warm climates. Miami, Florida, E.U. Echo Point Books & Media; 2013.
23. Janick J (Ed). Horticultural reviews (Vol.34). New Jersey: John Wiley & Sons, inc; 2008. (p. 531)

24. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2007). Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (papaya, piña, plátano, cítricos). [Internet]. Consultado el 22 de marzo de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ac304s.pdf>
25. Benito-Bautista P, Arellanes-Juárez N y Pérez-Flores ME. Color y estado de madurez del fruto de tomate de cáscara. *Agronomía Mesoamericana*. 2016; 27(1): 115-130. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i1.21891>
26. Delmoro J, Muñoz D, Nadal V, Clementz A, y Pranzetti V. El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Invenio: Revista de Investigación Académica*. 2010; 25: 145-152.
27. Diezma D, Marañón A, Ruiz-Altisent M, Flores L y Diez J. Firmeza de la fruta: Determinación por métodos no destructivos. *Horticultura*. 2001; 154: 1-8.
28. Valero C y Ruiz-Altisent M. Conjunto de técnicas de medidas de calidad y atributos de la fruta. *Vida Rural*. 2000; 166: 60-64.
29. Muñoz AM, Ramos-Escudero DF, Alvarado-Ortiz C y Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad de Química del Perú*. 2007; 73(3): 142-149.
30. INCAP & OPS (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá & Organización Panamericana de la Salud (2012). *Tabla de composición de alimentos de Centroamérica (2ª Ed)*. Guatemala: Serviprensa, S.A. (p. 132)

31. Galleti L, Berger H, Montealegre JR, Herrera R y Oyarzún J. Identificación de hongos causantes de pudriciones en postcosecha de brevas e higos. *Boletín de Sanidad Vegetal*. 2000; 26 (3): 439-443.
32. Trigos A, Ramírez K y Salinas A. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*. 2008; 28: 125-129.
33. Rebordinos L, Vallejo I, Santos M, Collado I, Carbú M y Cantoral JM. Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinérea*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2000; 17: 37-42.
34. Bautista-Baños S, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL. *Rhizopus stolonifer* (soft rot). En: *Postharvest Decay. Control Strategies*. (pp.1-44). (Bautista-Baños S. ed.) Academic Press/elsevier. 2014. (p. 394).
35. OMS (Organización Mundial de la Salud). Aflatoxinas. 2018 [Internet]. Consultado el 14 de noviembre de 2019. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_SP.pdf
36. Cortés-Sánchez AJ y Mosqueda-Olivares T. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*. 2013;12(2):64-90.
37. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 2014; 78: 141-173. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.

38. Valle P, Lucas B. Toxicología de los alimentos (1ª Ed). México: INSP; 2000.
(p. 267)
39. Bucio-Villalobos CM, Guzmán-de-Peña D y Peña-Cabriaes JJ. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. Revista Iberoamericana de Micología. 2001; 18: 83-87.
40. Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergillosis nosocomial. Revista Iberoamericana de Micología. 2000; 17: 79-84.
41. Carreño A, Hurtado JJ y Navas MC. Exposición a aflatoxinas: un problema de salud pública. IATREIA. 2013; 27(1): 42-52.
42. Medmyco. Características morfológicas de *A. flavus* [Internet]. 2019. [Citado el 26 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/aspergillus-flavus/>
43. González-Peña D, Costales D y Falcón-Rodríguez AB. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae*. Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal. 2014; 29(1): 33-41.
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n1/rpv04114.pdf>
44. Liofilchem. 2015. Czapek Dox Agar [Internet]. Consultado el 24 de febrero de 2019. Disponible en: http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/10017_IFU.pdf
45. Neogen. 2015. Agar papa dextrosa – Potato Dextrose Agar (7149) [Internet]. Consultado el 24 de febrero de 2019. Disponible en: https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf

46. BD. (2015). BBL Sabouraud Dextrose Agar [Internet]. Consultado el 18 de febrero de 2019. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22894>
47. Neogen. 2017. Malt agar (7456) [Internet]. Consultado el 24 de febrero de 2019. Disponible en: https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7456_pi.pdf
48. Martínez MM, Vargas LM y Gómez VM. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. Biosalud. 2013; 12(2): 89-109.
49. Londoño-Cifuentes EM y Martínez-Miranda MM. Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. Revista Biosalud. 2017; 16(1): 53-66. Doi: 10.17151/biosa.2017.16.1.7
50. IARC (International Agency for Research on Cancer) (2012). List of classifications, volumes 1-123. Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>
51. Bogantes-Ledezma P, Bogantes-Ledezma D y Bogantes-Ledezma S. Aflatoxinas. Acta Médica Costarrica. 2004; 46(4): 174 – 178.
52. Ferris J, García J, Berbel O y Clar S. Micotoxinas y cáncer pediátrico. Revista Española de Pediatría. 2001; 57(3): 279-280.
53. Guzman D. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. Salud Pública en México. 2007; 49: 227-235.
54. Catraro MA. El Cultivo de la Higuera: Producción de higos y su deshidratación como método para el agregado de valor del producto. Tesis de Especialidad. Universidad Nacional del Litoral. Argentina. 2014. (p. 45).

55. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2017a). Documento de debate sobre los niveles máximos para las micotoxinas en las especias [Internet]. Consultado el 5 de junio de 2018. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-11%252FWD%252Fcf11_11s.pdf
56. Badii MH y Landeros J. Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *Cultura Científica y Tecnológica*. 2015; 4(19):21-34.
57. del Puerto AM, Suárez S y Palacios DE. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2014; 52(3): 372-387.
58. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2017b). Principios y directrices para la selección de productos representativos con miras a la extrapolación de límites máximos de residuos de plaguicidas para grupos de productos [Internet]. Consultado el 20 de noviembre de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>
59. Domínguez AM, Rodríguez S, Bañuelos R, Vega HR y Méndez A. Crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con radiación gamma y en maíz tratado con D-limoneno. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018; 3: 157-166.

60. Lara J. Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal. Investigación aplicada. NUTEK. 2003.
61. Pastor C, Sanchez-Gonzalez L, Marcilla A, Chiralt A, Chafer M y Gonzalez-Martinez CH. Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropyl-methylcellulose edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology*. 2010; 60(1):64-70.
62. Castañeda ME. Efecto de concentración de propóleo y alginato de sodio en cubierta comestible, temperatura y tiempo de almacenamiento en las características físicoquímicas, fisiológicas y microbiológicas del arándano fresco (*vaccinium corymbosum* L). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2015. (p. 79).
63. Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI, Correa-Pacheco Z y Corona-Rangel ML. Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo serie Horticultura*. 2017a; 23(2): 103-121. Doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
64. Romanazzi G, Feliziani E, Bautista-Baños S y Sivakumar D. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017; 57(3):579-601. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
65. Ramos-García ML, Bautista-Baños S y Barrera-Necha LL. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en

- productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2010; 28: 44-57.
66. Bautista-Baños S, González-Soto R y Ramos-García ML. Propiedades físicas de películas de quitosano adicionadas con aceite esencial de limón y su impacto en la vida de anaquel del jitomate. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2018; 17(1): 1-11.
67. Figueroa J, Salcedo J, Aguas Y, Olivero R y Narvaez G. Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y perspectiva al uso del propoleo en su formulación. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 2011; 3(2): 386-400.
68. Salvador L, Miranda S, Aragón N y Lara V. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Revista de la Sociedad de Química de México*. 1999; 43(01):18-23.
69. Baldoni D, Ventura-Aguilar RI, Hernández-López M, Corona-Rangel MA, Barrera-Necha LL, Correa-Pacheco Z y Bautista-Baños S. Calidad postcosecha de higos "Black mision" tratados con cubiertas naturales. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 2016; 17(2): 267-275.
70. Xu D, Qin H y Ren D. Prolonged preservation of tangerine fruits using chitosan/montmorillonite composite coating. *Postharvest Biology and Technology*. 2018; 143:50-75.
71. López-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Navarro-Preciado C, Ornelas-Paz JJ, Estrada-Alvarado MI, Gassos-Ortega LE y Rodrigo-García J. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y

- conservación de la calidad de fresas. *Revista de Ciencias Biológicas y de Salud*. 2012; 14(1): 33-43.
72. Márquez CJ, Cartagena JR y Pérez-Gago MB. Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad postcosecha de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* T.). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2009; 16(3): 304-310.
73. Barrera E, Gil L, García, CM, Durango DL y Gil JH. Empleo de un recubrimiento formulado con propóleos para el manejo poscosecha de frutos de papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 2012; 65(1) : 6497-6506.
74. Marmol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler C y Gutiérrez E. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de su aplicación. *Revista Tecnológica URU*. 2011; 1: 53-58.
75. Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del-Valle MG, Hernández-López M, Ait E, Bosques-Molina E y Wilson CL. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*. 2006; 25(2): 108-118. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
76. Ramos-García ML, Bosques-Molina E, Hernández-Romano J, Zavala-Padilla G, Terrés-Rojas I, Alia-Tejacal E, Hernández-López M, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. Antimicrobial evaluation of edible coatings based-chitosan in combination with other natural compounds to control

- Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5α on fresh whole tomatoes. Crop Protection. 2012; 38:1-6.
77. Chien, PJ, Sheu F y Yang FH. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. Journal of Food Engineering. 2007;78(1):225–229. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.09.02
78. Moreno H y David R. Efecto de dos gomas y tintura de propóleo en el desarrollo de un recubrimiento evaluado en zanahoria (*Daucus carota*). Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 2013. (p. 24)
79. Vitón TM, Jiménez AP y Vasallo JG. Efecto de extractos de propóleos en la calidad poscosecha del mango Super Haden. Fitosanidad. 2016; 20(1): 5-11.
80. Premoli G, Laguado P, Diaz N, Villarreal J y González A. Uso del propóleo en odontología. Acta Odontológica Venezolana. 2009; 48(2): 1-13.
81. Carrillo ML, Castillo LN y Mauricio R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la huasteca potosina (México). Información Tecnológica. 2011; 22(5): 21-28. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642011000500004>
82. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Álvarez A y Rodríguez E. Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo argentino. Acta Farmacológica Bonaerense. 2004; 23(3): 369-372.
83. Bautista-Baños S, Correa-Pacheco ZN, Barrea-Necha LL y Ventura-Aguilar RI. Inserción del CEPROBI en el campo de la nanotecnología con temas sobre la conservación de productos agrícolas. (pp. 88-103). En:

- Agronotecnología: nuevo paradigma científico en la producción de alimentos. 2017b. (Lira S-R-H. Méndez A.B. Vera R.I. eds.) Saltillo Coahuila, México. (p. 211).
84. Solano-Doblado LG, Alamilla-Beltrán L. y Jiménez-Martínez C. . Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2018; 21: 30-42.
85. Sotelo-Boyás ME, Bautista-Baños S, Correa-Pacheco ZN, Jiménez-Aparicio A, Sivakumar D. 2016b. Biological activity of chitosan nanoparticles against pathogenic fungi and bacteria. (pp. 339-349) En: Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. (Bautista-Baños, S., Romanazzi, G. Jiménez-Aparicio, A. eds.). Academic Press/Elsevier. (p. 394).
86. Istúriz MA. Evaluación de recubrimientos de quitosano nanoestructurados adicionados con aceite de canela sobre la calidad postcosecha de pepino. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 2016. (p. 142).
87. Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Valle-Marquina M y Hernández-López M. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* and on cv Hass avocado and fruit quality. Journal of Phytopathology. 2017; 165(5):297-305.
88. Chowdappa P, Gowda S, Chethana CS, y Madhura S. Antifungal activity of chitosan-silver nanoparticle composite against *Colletotrichum gloeosporioides* associated with mango anthracnose. African Journal of

Microbiology Research. 2014; 8(17) : 1803-1812. doi: 10.5897/AJMR2013.6584

89. González-Saucedo A, Barrera-Necha LL, Ventura-Aguilar RI, Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S y Hernández-López M. Extension of the postharvest quality of bell pepper by applying nanostructured coatings of chitosan with *Byrsonima crassifolia* extract (L.) Kunth. Postharvest Biology and Technology. 2019; 149: 74–82. doi:10.1016/j.postharvbio.2018.11.019
90. Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Lorena Ramos-García ML, Martínez-González MC y Hernández-Roman J. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of propolis-chitosan nanoparticles edible coatings. Progress in Organic Coatings. 2019. 137: 105326.: 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105326>
91. Fernández-Valdés D, Bautista-Baños S, Ocampo-Ramírez A, García-Pereira A y Falcón-Rodríguez A. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias. 2015; 24(3): 52-57.
92. Hernández E. Evaluación sensorial. Bogotá, DC. Centro Nacional de Medios para el Aprendizaje. Bogotá, Colombia. 2005. (p. 128). Universidad Nacional de Aprendizaje a Distancia.
93. Ramos ML. Recubrimientos biodegradables para el control de microorganismos patógenos y conservación de la calidad de frutos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Tesis de Doctorado. Centro de

Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional;. Morelos, México. 2012. (p. 163).

94. Contreras-Saavedra S. Actividad antifúngica de un recubrimiento biodegradable para el manejo postcosecha de *Ficus carica*. Tesis de Maestría en Ciencias Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 2019. (p. 96).
95. López-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Navarro-Preciado C, de Jesús Ornelas-Paz J, Estrada-Alvarado MI, Gassos-Ortega LE y Rodrigo-García J. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. *Biotecnia*; 2012 14(1): 33-43.
96. Accinelli C, Abbas HK, Little NS, Kotowicz JK, y Shier WT. Biological control of aflatoxin production in corn using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* administered as a bioplastic-based seed coating. *Crop Protection*. 2018; 107: 87-92.
97. Barajas-Ontiveros C, Morales-Romano MD, Pozo-Nuñez EM, Rodríguez-Aguilar ML y Nuñez-Lopez JJ. Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. *Tecnociencia Chihuahua*. 2009; 1: 33-38.
98. Hassouni H, Ismaili A, Lamrani K, Gaime I, Augur C and Roussos S. Comparative spore germination of filamentous fungi on solid state fermentation under different culture conditions. *Micología Aplicada Internacional*. 2007; 19: 7-14.

99. Cota-Arriola O, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Robles-Sanchez R, Ezquerro-Brauer J, Ruiz-García J, Vega-Acosta J y Cortez-Rocha M. Preparation of chitosan matrices with ferulic acid: physicochemical characterization and relationship on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *CyTA Journal of Food*. 2017; 15: 65-74. DOI: 10.1080/19476337.2016.1213317
100. Luna M, Lozada Y y Trigos A. Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger* productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*. 2010; 32: 63-68. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v32/v32a8.pdf>
101. Mogollón A y Castaño J. Evaluación *in vitro* de inductores de resistencia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*. 2012; 65:6327-6336.
102. McAlpin E y Donald T. Culture media and sources of nitrogen promoting the formation of stromata and ascocarps in *Petromyces alliceus* (*Aspergillus* section Flavi). *Canadian Journal of Microbiology*. 2005; 51: 765-771. DOI: 10.1139/w05-057
103. Contreras-Oliva A, Pérez-Gago MB, Salvador A, Bermejo A, y Rojas-Argudo C. Calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de naranjas cv. Valencia recubiertas con quitosano. *Agrociencia*. 2012; 46(5): 441-453.
104. Ramos-García ML, Bautista-Baños S, y González-Soto R. Physycal properties of chitosan films with lemon essential oil added and their impact on

- the shelf life of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2018; 17(1): 1-11.
105. Martínez-González MC, Bautista-Baños S, Correa-Pacheco ZN, Corona-Rangel ML, Ventura-Aguilar RI, del Río-García JC y Ramos-García ML Effect of nanostructured chitosan/propolis coatings on the quality and antioxidant capacity of strawberries during storage. *Coatings*. 2020; 10(2): 90.
106. Mata NM y Natera JRM. Efecto de reguladores de crecimiento sobre el epicarpo, mesocarpo y sólidos solubles totales del fruto de melón (*Cucumis melo* L.) cv. Edisto 47. *Revista Científica UDO Agrícola*. 2009; 9(2): 295-303.
107. Aguilera-Ortiz M, Alanis-Guzmán MG, García-Díaz CL y Hernández-Brenes CM. Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. *Universidad y Ciencia*. 2009; 25(2): 151-158.
108. Vargas-Sánchez RD, Torrescano-Urrutia GR, Mendoza-Wilson, AM, Vallejo-Galland B, Acedo-Félix E, Sánchez-Escalante JJ y Sánchez-Escalante A. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biocencia*. 2014; 16(1): 32-37.
109. Ortiz KL, Villalba KJ, Ochoa-Martinez CI y Pasos CV. Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de películas de proteína de lactosuero/quitosano y su efecto sobre la respiración en banano recubierto. *Innotec*. 2016; 11: 59-64.
110. Locaso DE y del Carmen M. Empaque sin costo ambiental formulado con quitosano para reducir la podredumbre verde en postcosecha de

- naranjas. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 2011; 12(1): 35-43.
111. Mohammadi, Hashemi M, y Hosseini SM. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. Postharvest Biology and Technology. 2015; 110: 203-213. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.019>
112. Flores S, Guadalupe M, Jiménez R, Santoyo G, Alva PN, López JE y Loeza PD. Compósitos de quitosano-ácidos grasos reducen la infección de *Botrytis cinerea* en fresa en poscosecha. Nova Scientia. 2018; 10(21): 207-227.
113. Xoca-Orozco LA, Zamora-Gasga V, Espinosa-Alonso G, Velázquez-Estrada RM, López-García U, Sáyago-Ayerdi S y Chacón-López A. Actividad antioxidante y antifúngica *in vitro* de extractos de carambola (*Averrhoa carambola* L.). Biotecnia. 2018; 20(2): 104-109.
114. Torlak E, Sert D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. International Journal of Biological Macromolecules. 2013; 1(60):52-5.
115. Juárez-Morales LA, Hernandez-Cocoletzi H, Chigo-Anota E, Aguila-Almanza E, Tenorio-Arvide MG. Chitosan-aflatoxins B1, M1 interaction: a computational approach. Current Organic Chemistry. 2017;(28):2877-83.
116. Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. Medical Mycology. 2006; 44: 127-131. Doi <https://doi.org/10.1080/13693780600796546>

117. Hashem A, Abd-Allah EF, Alwathnani HA. Effect of propolis on growth, aflatoxins production and lipid metabolism in *Aspergillus parasiticus* spear. *Pak. J. Bot.* 2012;44(3):1153-8.
118. Carvajal M. Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2013; 16(2): 109-120.
119. Montero-Álvarez JA, Paredes-Bautista MJ y Rivera-Morales MC. Utilización de quitosana para la remoción de arsénico (As) del agua. *Superficies y Vacío.* 2010; 23: 136-139.
120. Valencia G. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria.* 2015; 2: 32-38.
121. Restrepo JI y Aristizábal ID. Conservación de fresa (*fragaria x ananassa* duch cv. *camarosa*) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca sábila (*aloe barbadensis* miller) y cera de carnaúba. *Vitae.* 2010; 17(3): 252-263.
122. Zambrano J, Valera A, Maffei M, Materano W, Quintero I y Graterol K. Efecto de un recubrimiento comestible formulado con mucílago del cactus (*Opuntia elatior* Mill.) sobre la calidad de frutos de piña mínimamente procesados. *Bioagro.* 2017; 29(2): 129-136.