



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**“EFECTO DEL SILICATO DE SODIO Y QUITOSANO EN EL CONTROL DE ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides*, PENZ. & SACC.) EN FRUTOS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) CV. ‘MARADOL’ EN POSTCOSECHA”**

POR:

BIOL. EDSON RAYÓN DÍAZ

TESIS PROPUESTA A LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

Director:

DR. PORFIRIO GUTIÉRREZ MARTÍNEZ

Co-director:

DRA. ANDREA BÁRBARA BIRKE BIEWENDT

TEPIC, NAYARIT

Octubre, 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Tecnológico de Tepic (LIIA) por abrirme las puertas de la institución y darme la oportunidad de crecimiento y desarrollo como un alumno de posgrado.

Agradezco a los que estuvieron directamente involucrados en la realización de este proyecto, principalmente al Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez, por abrirme las puertas en su equipo de trabajo y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, además de su apoyo en cada aspecto del mismo, su paciencia, confianza y aprendizaje que me llevo para ser mejor persona y profesionalista.

A mi comité tutorial, la Dra. Andrea B. Birke Biewendt quien fue una pieza fundamental en el desarrollo del proyecto y su disponibilidad para aclarar mis dudas, además de ser una parte importante durante mi desarrollo desde la licenciatura, así como a la Dra. Rita María Velázquez Estrada y al Dr. Rámses R. González Estrada, por sus valiosas aportaciones y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al Instituto de Ecología A. C. por las facilidades prestadas en el uso de sus instalaciones y equipos durante mi estancia académica y elaboración del proyecto de maestría, así como a la M. en C. Greta Hanako, quien me ayudó en el manejo del MEB y en la parte de microscopía que se presenta en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico que me permitió iniciar y culminar satisfactoriamente la Maestría (No. de registro: 933749)

A mis compañeros de laboratorio, a los M.C.A. Cristina Moreno, Juan Antonio Herrera, Azhael Rodríguez y Leonardo Coronado, y a los ingenieros Armando del Ángel, Héctor Cortés, Antonio Santoyo, Estefanía Martínez por su compañerismo y apoyo durante mi estancia en la institución.

Así mismo, a mis compañeros y amigos de generación, los M.C.A. David Morelos y Jerusalén Betancourt, a los IBQ, Alejandra Castañeda, Armando del Ángel, Cecilia Durán, Carlos Camacho y Ariana Torres gracias por su sincera amistad.

Y finalmente a mi familia, por todo el apoyo incondicional que me han brindado desde siempre para lograr mis sueños y objetivos.

## DEDICATORIA

Mi tesis se la dedico a Dios, por darme la oportunidad de vivir y estar presente en cada una de mis decisiones, enviarme salud, iluminar mi mente y espíritu, además de haber puesto personas muy importantes en mi vida, las cuales se han convertido en mi soporte y faro para esos días nublados.

A mis padres María de Jesús Díaz Reyes y César Rayón Dorantes, por siempre estar presentes en cada paso que doy, apoyarme desde siempre, darme sus consejos, valores y enseñanzas, todo lo que soy se lo debo a ustedes y cada uno de mis logros son gracias a su amor y confianza que me brindaron desde el primer día.

A mi esposa Alejandra Castañeda, gracias por todos los momentos que me has regalado, este camino lo comenzamos juntos y ahora emprendemos uno nuevo, eres lo más bonito que me pudo suceder, gracias por coincidir, te amo.

A mis abuelos Pedro Díaz (D.E.P.), Susana Reyes (D.E.P.), José Luis Rayón y Maclovia Dorantes por quererme, apoyarme y nunca dejarme solo, así me encuentre a kilómetros de casa.

A mis tías Dianabeti, Janet, Rita, Trini, Araceli, Susi, Moni, Eloína y tíos Pedro, Miguel Ángel, Héctor y Jaime y al Prob. Leobardo Neri, por darme ese impulso necesario y palabras de aliento para ser una mejor persona y profesionista.

A mis casi hermanos Luis Manuel, Hugo, Luigi y Arlethe, Diego, Beti, Lupita y a mis sobrinos Mateo y Meredith por sacarme muchas sonrisas aún a la distancia, gracias por su apoyo.

A las familias Castañeda-Durán, Durán-Avelar y Castañeda-Covarrubias por abrirme las puertas de su hogar y acogerme en este camino y hacerme sentir en casa, gracias por todo el apoyo, siempre les estaré agradecido.

A mi segunda familia, David, Armando, Carlos, Cecilia, Jerusalén y Ariana, gracias por ayudarme en este camino y objetivo que nos trazamos juntos, por hacerme sentir en casa con ustedes, son los mejores compañeros y amigos que pude encontrar.

A mis amigas Mildred y Cristina, que durante este camino también estuvieron presentes para sacarme una sonrisa y pasar un mejor día.

¡GRACIAS POR TANTO!

## RESUMEN

*Colletotrichum gloeosporioides* es uno de los principales hongos que ataca a frutos tropicales y subtropicales provocando la enfermedad conocida como antracnosis. Este hongo provoca daños severos a la producción de papaya 'Maradol' en México. Los recubrimientos a base de quitosano en combinación con otros compuestos han surgido como una estrategia amigable al ambiente y eficaz para tratar la antracnosis. El presente estudio consideró la evaluación de quitosano y silicato de sodio de forma individual y combinada a diferentes concentraciones, analizando factores como el efecto sobre el desarrollo micelial, esporulación de conidios (*in vitro*), así como, su efectividad en la reducción del daño ocasionado por este hongo y el efecto sobre parámetros de calidad en frutos de papaya 'Maradol' (*in vivo*). Los cambios morfológicos en el micelio de *C. gloeosporioides* se determinaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Los resultados señalan que, el silicato de sodio solo, redujo mínimamente el crecimiento de *C. gloeosporioides* (9% inhibición). Por el contrario, los tratamientos de quitosano (0.1% a 1.5%) inhibieron significativamente el crecimiento del hongo (97-99%). En todos los casos, los tratamientos combinados (quitosano y silicato de sodio) mostraron un efecto aditivo. Las afectaciones de los tratamientos en el desarrollo del hongo en las micrografías de MEB, indicaron que el quitosano solo y en combinación con silicato de sodio genera malformaciones en las hifas y micelio compactado. En el fruto, los tratamientos combinados de quitosano y silicato de sodio (1%+0.5% y 0.5%+1.5%) presentaron una reducción en el desarrollo de la antracnosis que varió entre un 51 y 57% respectivamente. Además, se demostró que estos tratamientos redujeron la senescencia de frutos de papaya almacenados a una temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con HR >50%. Concluimos que la combinación de quitosano y silicato de sodio resultan ser una estrategia prometedora en el tratamiento de la antracnosis y posiblemente permita prolongar la vida de anaquel de papaya 'Maradol'.

### Palabras clave

Sistemas alternativos; recubrimientos comestibles; biopolímero; fitopatógenos

## SUMMARY

*Colletotrichum gloeosporioides* is one of the main fungi that attacks tropical and subtropical fruits causing the disease known as anthracnose. This fungus causes severe damage to the papaya production 'Maradol' in México. Chitosan-based coatings in combination with other compounds have emerged as an environmentally friendly and effective strategy to treat anthracnose. The present study considered the evaluation of chitosan and sodium silicate individually and in combination at different concentrations, analyzing factors such as the effect on mycelial development, sporulation of conidia (*in vitro*), as well as their effectiveness in reducing the damage caused by this fungus and the effect on quality parameters in papaya fruits 'Maradol' (*in vivo*). Morphological changes in the mycelium of *C. gloeosporioides* were determined using scanning electron microscopy (SEM). The results indicate that sodium silicate alone minimally reduced the growth of *C. gloeosporioides* (9% inhibition). In contrast, chitosan treatments (0.1% to 1.5%) significantly inhibited fungal growth (97-99%). In all cases, the combined treatments (chitosan and sodium silicate) showed an additive effect. The effects of the treatments on the development of the fungus in the SEM micrographs indicated that chitosan alone and in combination with sodium silicate generates malformations in the hyphae and compacted mycelium. In the fruit, the combined treatments of chitosan and sodium silicate (1% + 0.5% and 0.5% + 1.5%) showed a reduction in the development of anthracnose that varied between 51 and 57% respectively. Besides, these treatments were shown to reduce the senescence of papaya fruits stored at a temperature of  $24 \pm 2$  ° C with RH > 50%. In conclusion the combination of chitosan and sodium silicate turns out to be a promising strategy in the treatment of anthracnose and possibly allows to prolong the shelf life of papaya 'Maradol'.

### Key words

Alternative system; edible coatings; biopolymer; phytopathogen

## CONTENIDO

|                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>                                                                | i    |
| <b>DEDICATORIA</b>                                                                    | ii   |
| <b>RESUMEN</b>                                                                        | iii  |
| <b>SUMMARY</b>                                                                        | iv   |
| <b>LISTA DE CUADROS</b>                                                               | VIII |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                               | ix   |
| <b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>                                                       | 1    |
| <b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES</b>                                                       | 4    |
| 2.1 Producción de papaya en México                                                    | 5    |
| 2.2 Principales plagas y enfermedades que afectan la producción en cultivos de papaya | 6    |
| 2.2.1 Fitopatógenos en papaya                                                         | 6    |
| 2.2.2 <i>Colletotrichum sp.</i> en papaya                                             | 7    |
| 2.2.3 Pérdidas económicas por <i>Colletotrichum sp.</i> en el cultivo de papaya       | 9    |
| 2.3 Recubrimientos comestibles                                                        | 9    |
| 2.4 Quitosano                                                                         | 12   |
| 2.5 Generalidades del silicato de sodio                                               | 14   |
| 2.5.1 Aplicaciones del silicato de sodio en frutos en postcosecha                     | 15   |
| <b>CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN</b>                                                      | 18   |
| <b>CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS</b>                                                          | 19   |
| <b>CAPÍTULO 5. OBJETIVOS</b>                                                          | 21   |
| 5.1 Objetivo General                                                                  | 23   |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2 Objetivos Específicos                                                                         | 23 |
| <b>CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA</b>                                                                    | 24 |
| 6.1 Preparación del Material Biológico                                                            | 25 |
| 6.1.1 Reactivación de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>                                       | 25 |
| 6.1.2 Preparación de los tratamientos                                                             | 25 |
| 6.2 Aplicación de tratamientos                                                                    | 26 |
| 6.3 Diseño experimental y análisis estadístico de los ensayos <i>in vitro</i>                     | 26 |
| 6.4 Pruebas <i>in vitro</i>                                                                       | 27 |
| 6.4.1 Determinación del crecimiento micelial                                                      | 27 |
| 6.4.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial                                           | 28 |
| 6.4.3 Esporulación (número de esporas)                                                            | 28 |
| 6.4.4 Evaluación de la interacción de los tratamientos                                            | 29 |
| 6.4.5 Pruebas con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)                                        | 30 |
| 6.5 Pruebas <i>in vivo</i>                                                                        | 30 |
| 6.5.1 Porcentaje de severidad de la enfermedad                                                    | 31 |
| 6.5.2 Pruebas fisicoquímicas                                                                      | 32 |
| 6.5.3 Análisis estadístico del ensayo in vivo                                                     | 33 |
| <b>CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                                                         | 35 |
| 7.1 Evaluación pruebas <i>in vitro</i>                                                            | 35 |
| 7.1.1 Monitoreo de reactivación del hongo <i>C. gloeosporioides</i>                               | 35 |
| 7.1.2 Crecimiento micelial <i>C. gloeosporioides</i>                                              | 35 |
| 7.1.3 Efecto del quitosano y silicato de sodio sobre la esporulación<br><i>C. gloeosporioides</i> | 44 |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 7.1.4 Evaluación del efecto sinérgico de los tratamientos combinados | 45 |
| 7.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)                       | 47 |
| 7.2 Evaluación pruebas <i>in vivo</i>                                | 49 |
| 7.2.1 Severidad e incidencia de <i>C. gloeosporioides</i> en papaya  | 49 |
| 7.2.2 Parámetros de calidad de papaya                                | 52 |
| <b>CAPITULO 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>                    | 60 |
| <b>CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA</b>                                      | 62 |
| <b>ANEXOS</b>                                                        | 73 |



## LISTA DE CUADROS

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 6.1 | Diseño experimental de pruebas “ <i>in vitro</i> ”                                                                                                                                                                                                                                      | 27 |
| Cuadro 6.2 | Escala para la determinación del porcentaje de severidad en los frutos                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| Cuadro 7.1 | Inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>C. gloeosporioides</i> en un curso temporal de 10 días en medio de cultivo ADP aplicando 26 tratamientos incubados a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$                                                             | 36 |
| Cuadro 7.2 | Crecimiento micelial (media $\pm$ SD) de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de cultivo ADP usando los tratamientos individuales de quitosano y silicato de sodio (relación 3:1), incubados por 10 días a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$                  | 39 |
| Cuadro 7.3 | Crecimiento micelial (media $\pm$ SD) de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de cultivo ADP mezclado con los tratamientos combinados de quitosano y silicato de sodio a diferentes concentraciones (relación 1:3), incubados por 10 días a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ | 41 |
| Cuadro 7.4 | Porcentaje de inhibición micelial de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de cultivo ADP combinando los diferentes tratamientos                                                                                                                                                           | 43 |
| Cuadro 7.5 | Efecto de la combinación de tratamientos de quitosano y silicato de sodio a diferentes concentraciones en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial ( $\text{ICM}_{\text{obs}\%}$ ) y el tipo de interacción de acuerdo al método de Abbott <sup>1</sup>                     | 46 |
| Cuadro 7.6 | Cambio de coloración en frutos de papaya evaluado durante 12 días a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , siendo a) luminosidad; b) parámetro a; c) parámetro b                                                                                                                                  | 58 |

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.1 | Presencia de antracnosis ocasionada por el hongo <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya                                                                                                                                                                                                                                     | 8  |
| Figura 2.2 | Estructura química del Silicato de Sodio                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| Figura 7.1 | Vista del micelio (A) y espora (B) de <i>C. gloeosporioides</i> a través de un microscopio óptico a 40X y 100X respectivamente y morfología del hongo en caja de Petri en medio ADP (C)                                                                                                                                            | 35 |
| Figura 7.2 | Micrografía de hifas de <i>C. gloeosporioides</i> aisladas de papaya expuestas a diferentes tratamientos: A) Control, B) Testigo (ácido acético), C) Quitosano 0.1%, D) Quitosano 1%, E) Silicato de sodio 0.5%, F) Silicato de sodio 1.5%, G) Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 1.5% y H) Quitosano 1% + Silicato de sodio 0.5%. | 48 |
| Figura 7.3 | Daños en frutos de papaya causado por la inoculación de <i>C. gloeosporioides</i> durante 12 días de almacenamiento en un ambiente controlado ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).                                                                                                                                                      | 50 |
| Figura 7.4 | Porcentajes en la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya tratados con quitosano + silicato de sodio durante 12 días a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                                                                                                                                            | 51 |
| Figura 7.5 | Pérdida de peso (%) de frutos de papaya tratados con recubrimientos de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5%, quitosano 1% + silicato de sodio 0.5% y control (agua) durante 12 días de almacenamiento a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                                                                            | 53 |
| Figura 7.6 | Evaluación de la firmeza (N) de frutos de papaya tratados con recubrimientos de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5%, quitosano 1% + silicato de sodio 0.5% y control (agua) durante 12 días de almacenamiento a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                                                                   | 54 |

- Figura 7.7 Evaluación de sólidos solubles totales (°Brix) en frutos de papaya tratados con quitosano + silicato de sodio durante 12 días a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  56
- Figura 7.8 Cambio de coloración en frutos cubiertos y no cubiertos con quitosano + silicato de sodio durante un tiempo de evaluación de 12 días en ambiente controlado ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 59

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

### CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los frutos tropicales de mayor importancia económica dentro de la familia Caricaceae, su volumen de producción a nivel mundial se estima en 13 332 mil toneladas; y se exportan cerca de 371 mil toneladas (FAO, 2017). Su consumo aporta beneficios al organismo, como propiedades antioxidantes, además de ser una fuente muy rica en vitaminas, minerales y fibra (Saeed *et al.*, 2014; Yogiraj *et al.*, 2014).

La papaya, es un fruto climatérico, lo que significa que su maduración ocurre después de la cosecha y se caracteriza por un aumento en la producción de etileno que se acompaña de ablandamiento, cambios en la coloración de la epidermis y la pulpa, además del desarrollo de un aroma fuerte (Mustaffa-Hamzah *et al.*, 2012).

*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. es un patógeno ubicuo, prolífero y económicamente de los más importantes debido a que produce pérdidas en frutos de clima tropical, subtropical y templado durante la postcosecha, además, es el principal agente causal de la antracnosis en frutos de importancia económica (Zavala-León *et al.*, 2004), teniendo presencia en frutos durante un estado inmaduro (desarrollo) y permaneciendo en estado latente hasta su corte o en el comienzo de su etapa de maduración de consumo (Li *et al.*, 2013).

Se ha estimado la antracnosis ocasiona mermas del 25–40 % en productos frutícolas a nivel mundial (Sañudo-Barajas y Báez-Sañudo, 2011) generando pérdidas cercanas a los \$28 millones de dólares (InfoAgro, 2018). Lo anterior, ha motivado el desarrollo de diversos métodos para proteger a los frutos del daño por este hongo, y técnicas que permitan además retardar la maduración y prolongar su vida en anaquel. El objetivo de estos métodos está basado en controlar factores como la tasa de respiración, pérdida de humedad, e incremento de resistencia a enfermedades en postcosecha (Almeida-Castro *et al.*, 2011).

Es por ello que las pruebas en laboratorio desde hace algunas décadas se han enfocado en generar modelos predictivos de infección y mecanismos de resistencia

bioquímica para que en los frutos se pueda inhibir el desarrollo de *C. gloeosporioides* (Pérez-Castro *et al.*, 2003).

Una de las alternativas es la aplicación de inductores de resistencia amigables con el ambiente, que, solos o combinados con otros métodos sean eficientes en el control de microorganismos, formen un recubrimiento sobre la cutícula de los frutos, que no solo inhiben el crecimiento de hongos, sino que a su vez controlen el proceso de maduración y el deterioro de los frutos ocasionado por sus actividades metabólicas como la senescencia (Bi *et al.*, 2006).

Por un lado, se encuentra el quitosano, un biopolímero obtenido de la quitina desacetilada de algunos insectos, hongos y crustáceos, que se ha utilizado como un recubrimiento comestible para frutas y hortalizas debido a que puede modular el intercambio de gases, además de tener actividad antimicrobiana y antifúngica, por lo que controla el desarrollo de microorganismos patógenos en los alimentos. Hoy en día, se ha demostrado que el quitosano es una alternativa confiable en su aplicación debido a que es biodegradable, no es tóxico, es inocuo y además es biocompatible con otros métodos de control de fitopatógenos (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018).

Por otro lado se encuentra el silicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ), una sal derivada del silicio (Si), y uno de los elementos más abundantes en la Tierra. El silicio, además de generar un balance en los nutrientes del fruto, le proporciona una rigidez estructural a la cutícula, creando así resistencia a hongos fitopatógenos (Tarabih *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011; Bi *et al.*, 2006).

En investigaciones recientes se le han atribuido al silicato de sodio algunas propiedades funcionales, se sugiere que interviene en el metabolismo del fruto, en específico en la activación de dos familias de enzimas (peroxidasa y quitinasa) encargadas de los mecanismos de defensa ante algunos patógenos (Bi *et al.*, 2006), y se ha comprobado que a su vez también reduce la pérdida de agua en los frutos, incrementa la cantidad de antioxidantes, compuestos fenólicos, reduce la tasa de respiración y con ello aumenta el tiempo de vida en anaquel, ya que se ha demostrado que el silicato de sodio bloquea los estomas (Wang *et al.*, 2017;

Moscoso-Ramírez & Palou, 2016). Varios autores reportan además el efecto inhibitorio que el silicato de sodio y el silicato de potasio tienen sobre hongos fitopatógenos como *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Trichotesium roseum*, *Alternaria alternata*, aplicado en postcosecha a melón (*Cucumis melón* L. cv Yindi y Cantaloupe), naranja (*Citrus sinensis* L.), albaricoque (*Armeniaca vulgaris* Lam), pera *Pyrus communis* L. cv Pinggouli) (Moscoso-Ramírez *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012; Bo *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2003). Este compuesto, aplicado en postcosecha a papaya reduce la susceptibilidad a la infección por *C. gloeosporioides* hasta en un 50-60% (Bandara *et al.*, 2015).

Los recubrimientos actuales consideran la combinación de compuestos que mejoran la permeabilidad, secado y las propiedades antimicrobianas, tal es el caso del quitosano aplicado con gomas, aceites esenciales o silicato de sodio (Xu *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2019; Aloui *et al.*, 2014; Guerra *et al.*, 2015).

Este trabajo tiene como objetivo evaluar recubrimientos a base de silicato de sodio y quitosano, solos y en combinación, en condiciones *in vitro* e *in vivo* sobre el hongo, *C. gloeosporioides*, causante de la antracnosis, con el fin de controlar el daño que este hongo ocasiona a la producción de papaya en postcosecha, y además incrementar la vida en anaquel.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Producción de papaya en México

La papaya (*C. papaya* L.), es un fruto originario del Sur de México y Centroamérica (FAO, 2003) y es considerado uno de los frutales tropicales exóticos con mayor producción a nivel mundial, siendo India el país con los más altos índices de producción, con aproximadamente 5' 940,000 toneladas, esto quiere decir, que cada dos toneladas de papaya que se producen en el mundo son originarias de este país (FAO, 2017).

México es uno de los países con mayor producción mundial de papaya, ubicándose en el lugar cuatro, en cuanto a producción, con un volumen de 1'051,960 toneladas, contribuyendo con el 6,6% de la producción mundial; entre los principales estados productores del país se encuentra Oaxaca, Colima, Chiapas y Veracruz. Oaxaca es el mayor productor nacional con 328,084 toneladas, aportando el 31% de la producción nacional y con ganancias de tres mil 195 millones de pesos anuales (SIAP, 2019). El estado de Nayarit ocupa el lugar 14 de 19 entidades productoras de este fruto con un total de 7,430 toneladas anuales aportando el 1% de la producción nacional (SIAP, 2019).

La papaya contiene diferentes propiedades nutricionales y medicinales, haciéndolo un producto de alto valor para la dieta humana, ya que aporta vitamina A, B, C, antioxidantes y minerales, los cuales favorecen la salud (Saeed *et al.*, 2014; Yogirai *et al.*, 2014). Es un alimento alto en fibra, por lo que contribuye a un mejor funcionamiento en el proceso digestivo, además, regula los niveles de azúcar y colesterol que se encuentran en el organismo. A su vez, aporta vitaminas B y  $\beta$  caroteno lo que fortalece al sistema nervioso y mantiene en equilibrio la salud de la piel (Vázquez-García *et al.*, 2010).

## 2.2 Principales plagas y enfermedades que afectan la producción en cultivos de papaya

Las principales plagas reportadas en papaya son: el ácaro blanco o cogollero *Polyphagotarsonemus latus*, Banks, gusano cachón *Erynnis ello* (L), lorito verde o saltahojas *Empoasca papayae* Oman, la mosca de la fruta *Anastrepha curvicauda* Gerstäcker (antes *Toxotryphana curvicauda* Gerst), cogollo arrepollado (Bunchy-top) *Myzus persicae* (Sulzer). Además, en México, se registran daños por virus y enfermedades ocasionadas principalmente por fitopatógenos como las bacterias *Erwinia sp.* Winslow, virus mosaico del papayo (VMP) *Potexvirus spp.* Bokx, virus de la mancha anular (VMAP) *Potyvirus spp.* Purcifull, antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz. & Sacc.), entre algunas otras que se manifiestan en pre y postcosecha. Las afectaciones son ocasionadas normalmente por los fitopatógenos ya mencionados, siendo más frecuente este último, ya que perjudican principalmente al fruto, hojas, tallos y raíces de la planta, ocasionando alteraciones en el desarrollo de la misma (Juárez-Becerra *et al.*, 2010; FHIA, 2007).

Este tipo de microorganismos son de gran importancia en la agricultura, debido a su adaptabilidad y a su capacidad de reproducción, además, algunos de estos microorganismos tienen una etapa de latencia, por lo que el daño no se aprecia hasta la etapa de maduración y por consiguiente en la comercialización del fruto, provocando pérdidas económicas considerables a agricultores y comercializadores (Bautista-Baños *et al.*, 2013; Ramos-García *et al.*, 2010b; Ventura *et al.*, 2004).

### 2.2.1 Fitopatógenos en papaya

Dentro de las principales enfermedades que afectan a frutos de papaya se encuentran los daños fúngicos, que por falta de controles sanitarios durante la cosecha y el almacenamiento son la causa principal de pérdida de producto (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2009).

Dentro de las enfermedades causadas por fitopatógenos que afectan al cultivo de papaya se encuentran: a) las pudriciones pedunculares, causadas por

*Lasiodiplodia theobromae* (Griffon&Maubl.) y *Phoma caricae-papayae* (Punith) b) la pudrición acuosa causada por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg), (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013), la mancha anular causada por un virus que es considerado uno de los más importantes, pues infecta a la planta sin importar la edad de ésta (Ventura *et al.*, 2004), c) la pudrición de la raíz, causada por los hongos *Phytophthora sp.* y *Pythium sp.* provocada por suelos mal drenados, d) la mancha negra producida por el hongo *Asperisporium sp.*, que ataca principalmente hojas y frutos y ocasiona reducción en la fotosíntesis y e) la antracnosis, provocada por el hongo *Colletotrichum sp.* que daña a los frutos tanto en campo como en postcosecha, teniendo mayor efecto en esta última (Bautista-Baños *et al.*, 2013).

La antracnosis es una de las enfermedades de mayor importancia en frutos tropicales y subtropicales, debido a que se presenta en cultivos de importancia económica como mangos, papayas, cítricos, guanábanas, aguacate, café, cultivos ornamentales, entre otros (Silva *et al.*, 2016). Cabe destacar que, la papaya es uno de los frutos más susceptibles en postcosecha, por lo que el manejo debe ser cuidadoso para evitar pérdidas cuantiosas (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013).

### **2.2.2 *Colletotrichum sp.* en papaya**

Existen alrededor de 900 especies del género *Colletotrichum*, de los cuales *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz & Sacc.) y *Colletotrichum acutatum* (J. H. Simmonds) han sido identificados como los principales agentes causantes de la antracnosis en papaya, de manera secundaria se registran *C. magna* (Jenkins & Winstead), *C. brevisporum* (Phouliv) y *C. truncatum* (Schwein) (Molina-Chaves *et al.*, 2017; Durán y Mora, 1987).

Calzada-Torres y colaboradores (2012), mencionan que en el campo mexicano se encuentran dos especies del género *Colletotrichum* que afectan diferentes partes de la planta (raíces, flores, tallos) y frutos, causando daños en la cosecha y pérdidas postcosecha estimadas en un 50% de la producción. *C. gloeosporioides* (Penz & Sacc.), *C. truncatum* (Butler & Bisby) son los principales responsables de estas

afectaciones; esta enfermedad se ha reportado en Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Calzada-Torres *et al.*, 2012).

Debido a que *C. gloeosporioides* no es exclusivo de frutos como la papaya, tiene la capacidad de adaptarse a distintos entornos, principalmente en ambientes tropicales y subtropicales. La sintomatología de esta enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones oscuras y hundidas, en forma circular o elipsoidal, dentro de la cual se presenta una cantidad considerable de esporas compactadas con una tonalidad salmón, naranja o rosa (Contreras-Hernández, 2006; Binyamini y Schiffmann-Nadel, 1972).

Los efectos que causan los hongos en las plantas pueden catalogarse en dos tipos: a) local, en el cual, el hongo solo afecta una porción pequeña de tejido sano, donde el micelio crece intercelularmente ocasionando manchas pequeñas o grandes de coloración oscura y a su vez ligeramente hundidas afectando solamente a la cáscara, sin embargo, en casos más severos puede afectar a la pulpa (Araya-Vargas, 2010), y b) general, teniendo un daño mayor afectando a la planta por completo, sin embargo, en una misma planta pueden presentarse los dos fenómenos (Figura 2.1) (Botero-Ospina, 1999), produciendo necrosis en el tejido infectado (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).



Figura 2.0.1 Presencia de antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en fruto de papaya (Fuente: Torres-Calzada *et al.*, 2013).

### **2.2.3 Pérdidas económicas por *Colletotrichum sp.* en el cultivo de papaya**

*Colletotrichum sp.* ocasiona pérdidas cuantiosas en países productores de frutos tropicales, un ejemplo es Brasil, cuyas pérdidas se han reportado hasta en un 90% del total de la producción nacional en condiciones ambientales idóneas debido al desarrollo del hongo (Tatagiba *et al.*, 2002). En Costa Rica, se reportó un 40% de incidencia de antracnosis en aproximadamente 90% de las plantaciones que no fueron tratadas con control químico (Solano y Arauz, 1995), y cuyas pérdidas económicas sobrepasan el 24%, es además, la principal causa de rechazo en las exportaciones hacia otros países (Bogantes-Arias y Mora-Newcomer, 2013).

Las especies de *Colletotrichum* atacan en cualquier estado de crecimiento a las plantas y frutos de papaya, aunque se observan daños con mayor severidad en postcosecha. En México se estima que alrededor del 50% de este fruto se ve afectado por la presencia de este hongo, por lo que, los productores optan por utilizar mecanismos de protección a base de productos químicos como son los fungicidas, los cuales tiene un efecto en la inhibición del crecimiento del hongo. Sin embargo, se ha documentado resistencia a algunos tipos de fungicidas como el benomilo, además de ser perjudiciales al medio ambiente, también suelen propiciar daños a la salud humana (Torres-Calzada *et al.*, 2013).

En postcosecha, *Colletotrichum sp.* en el año 2014 se estimaron pérdidas de producción en huertos comerciales cercanas al 35% en los estados de Chiapas y Campeche, es por ello que los esfuerzos se centran en encontrar y mejorar estrategias que permitan minimizar los daños por esta enfermedad (Tapia-Tusell *et al.*, 2016).

### **2.3 Recubrimientos comestibles**

Según la FAO, durante el año 2017, el volumen de alimentos perecederos que se desperdiciaron se estimó en 1,300 millones de toneladas; los principales factores reportados fueron, el manejo inadecuado de los productos en postcosecha y el incorrecto almacenamiento de los productos (FAO, 2018).

Solano-Doblado y colaboradores (2018), proponen que los recubrimientos comestibles pueden ser una de las alternativas al control químico con un efecto positivo en el control e inhibición de algunos agentes fitopatógenos, debido a que se utilizan con la finalidad de proteger a frutos y vegetales durante la etapa postcosecha.

Ramos-García y colaboradores (2010a) definen un recubrimiento comestible como una matriz continua, delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento. Los recubrimientos y películas comestibles están constituidos por finas películas de polímeros naturales (polisacáridos, proteínas animales y vegetales, lípidos) los cuales son biodegradables, seguros e inocuos, que sirven de barrera selectiva a los gases como el O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y etileno, disminuyendo la pérdida de agua y los procesos oxidativos como el pardeamiento enzimático y el crecimiento microbiano; aumentando la resistencia a daños mecánicos en frutos (De Ancos *et al.*, 2015)

La clasificación actual, derivada de una serie de investigaciones sobre la naturaleza de las películas, se basa en la fuente principal de la cual provenga el recubrimiento, por lo que se clasifican en: a) recubrimientos a base de lípidos (ácidos grasos y ceras), b) películas compuestas (bicapas y conglomerados) e c) hidrocoloides o gomas que incluyen a los recubrimientos a base de polisacáridos y proteínas (Kumar-Raghav *et al.*, 2016).

Los elaborados a base de lípidos, debido a su naturaleza hidrofóbica reducen la pérdida de agua, además, le brindan al fruto protección frente a la oxidación y el crecimiento bacteriano además de aportarle brillo, lo que mejora su presentación en el mercado. Sin embargo, al no tener una naturaleza polimérica su cohesión a la superficie se encuentra limitada (Velázquez y Guerrero, 2014).

Los recubrimientos elaborados a partir de proteínas son de naturaleza hidrofílica, son susceptibles al paso de vapor de agua, sin embargo, ejercen un control en el intercambio de gases debido a que tienen una mejor retención de oxígeno. El uso

de este tipo de recubrimientos depende del peso molecular, conformaciones, propiedades eléctricas y la estabilidad térmica (Montalvo *et al.*, 2012).

Los recubrimientos a base de polisacáridos son hidrofílicos y se utilizan para mantener algunas propiedades como el color, textura, sabor, además de prolongar la vida en anaquel de frutos y hortalizas. A diferencia de los recubrimientos antes descritos, este presenta mayor adherencia, una textura más homogénea y una tonalidad transparente, además, tiene una permeabilidad moderada al O<sub>2</sub>, (Kumar-Raghav *et al.*, 2016).

Sin embargo, por su solubilidad en agua, sus propiedades mecánicas son limitadas y muestran baja retención de humedad (Miramont, 2012), por lo que se ha optado por combinar este tipo de recubrimientos con algunos materiales hidrófobos como aceites y ceras para mejorar sus propiedades mecánicas (Vázquez y Guerrero, 2013).

Actualmente, se han mejorado los recubrimientos comestibles, a fin de modular la pérdida de agua y controlar algunas enfermedades, aumentando con ello su vida en anaquel. Los productos mayormente utilizados son la goma policaju, la cual se extrae a partir de la goma exudada del marañón (*Anacardium occidentale* L.); galactomanos e hidrocoloides con gran capacidad de estructurar matrices, a base de unidades manosa/galactosa. *Aloe vera* L., que es un gel extraído de la pulpa de *Aloe barbadensis* Mill., el cual ayuda a retrasar el crecimiento de algunos hongos. También se encuentra el quitosano, un biopolímero que aporta un valor potencial a la industria alimentaria (Quintero *et al.*, 2010).

Este último ha tenido resultados positivos en el control de fitopatógenos, además contribuye al incremento de la vida en anaquel de los frutos, así como una reducción en la susceptibilidad de enfermedades inducidas por hongos (principalmente afectaciones dadas por *Colletotrichum* sp) y bacterias en cítricos (Salvador-Figueroa *et al.*, 2003; Chien *et al.*, 2007; Fortiz-Hernández *et al.*, 2011), arándanos (Duan *et al.*, 2011), mango (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017; Hoa *et al.*, 2002), guayaba (Hong *et al.*, 2012), fresas (El-Ghaouth *et al.*, 1992), plátano (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017; Win *et al.*, 2007), papaya (Marpudi *et al.*, 2011), guanábana

(Ramos-Guerrero *et al.*, 2018; Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), entre otros cultivos de importancia económica.

## 2.4 Quitosano

El quitosano es uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales obtenido mediante la desacetilación de la quitina, teniendo la particularidad de ser un producto biodegradable, no tóxico, semipermeable con propiedades filmogénicas y antimicrobianas, por lo que le convierte en un material adecuado para el empaque de alimentos y formación de recubrimientos (Khan *et al.*, 2000).

Su mecanismo de acción es diverso y actúa como: a) película o recubrimiento, el cual se encarga de la modificación de la atmósfera en el fruto teniendo como resultado una disminución en la interacción de gases ambiente-fruto, aumentando el tiempo de vida del producto y así como desacelerando la senescencia del mismo (Bautista-Baños *et al.*, 2017), b) inductor, encargado de la activación de proteínas de bajo peso molecular relacionadas a la patogenicidad de las plantas, además, algunas de estas presentan actividad enzimática como la quitinasa, glucanasa y peroxidasa relacionadas a la activación del mecanismo de defensa de la mayoría de especies vegetales, así como el comienzo de actividades como la síntesis de lignina y calosa, producción de fitoalexinas e inhibidores de proteasas y proteínas relacionadas a la defensa del fruto (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009; Ben-Shalom *et al.*, 2003), c) antimicrobiano y antifúngico, debido a que es un biopolímero catiónico, la densidad de sus cargas positivas le confieren sus propiedades antimicrobianas y antimicóticas (Giraldo-Pedraza, 2015). Esta fase de su mecanismo de acción es debido a los grupos aminos protonados a un pH de 5.6, formando complejos poli-electrolitos con los grupos ácidos y básicos de la superficie celular y con ello creando desordenes (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009), sin embargo, la efectividad de éste se verá afectada por la concentración, grado de desacetilación, peso molecular, tipo de quitosano, la cepa objetivo, entre otros (Bautista-Baños *et al.*, 2017).



En algunos estudios ultraestructurales realizados en diferentes patógenos se mostró que el quitosano llega a erosionar la pared celular, lo cual se relaciona con el incremento del material proteico encargado de la defensa de los frutos y aunado a la reducción del crecimiento micelial, a su vez, la interacción de la carga positiva de la molécula de quitosano, con las carga negativa de las células microbianas tienen como resultado la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares (Kong *et al.*, 2010; Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

Recientemente, se han desarrollado investigaciones con miras a la generación de quitosanos mejorados, en estos, el quitosano actúa de manera sinérgica con otros métodos de control, para mejorar su actividad patogénica, combinándose también con otros métodos de conservación como los térmicos, radiación UV, envasado de atmósfera modificada (MAP), derivados vegetales, ácidos inorgánicos, sales, microorganismos antagonistas, fungicidas y otros recubrimientos (Bautista-Baños *et al.*, 2017).

Dentro de las actividades principales de un recubrimiento comestible está el formar una atmósfera modificada que regula algunos cambios fisicoquímicos de los frutos como el color, firmeza, respiración, producción de etileno, inhibición del crecimiento microbiano, entre algunas otras, otorgándole protección al alimento (Quintero *et al.*, 2010; Oms-Oliu *et al.*, 2008).

Se tiene registrado que aplicaciones de quitosano en mango “Tommy Atkins” indujeron resistencia al crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum sp.* (Berumen-Varela *et al.*, 2015), así como una inhibición de crecimiento de *Alternaria alternata* en el mismo cultivar (López-Mora *et al.*, 2013). A su vez, combinaciones con otro tipo de inductores de resistencia a enfermedades causadas por patógenos como el ácido salicílico o metil-jasmonato pueden potenciar la actividad fúngica del quitosano (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018).

## 2.5 Generalidades del Silicato de sodio

En investigaciones recientes en el campo de la fitopatología se ha impulsado la implementación de nuevas tecnologías de prevención, basadas en el uso de controladores biológicos, sustancias promotoras de resistencia como el sílice, las cuales son capaces de estimular la producción de fitoalexinas e incluso activan genes ligados al estrés biótico y abiótico, incrementando las defensas naturales de las plantas contra los patógenos (Araya-Vargas, 2010).

El silicio es uno de los elementos más abundantes en el planeta, ya que se combina fácilmente con otros elementos en el suelo y muestra efectos positivos en prácticamente todas las plantas (Guo *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que el sílice puede estimular la resistencia de algunas enfermedades en las plantas, aumentando la actividad de la peroxidasa y quitinasa, las cuales son enzimas que se relacionan con la resistencia a los fitopatógenos, siendo la primera a que induce a reforzar la pared celular y además se encuentra involucrada en la biosíntesis de la lignina y la segunda hidroliza la pared celular de los hongos fitopatógenos, y en algunos casos se ha observado que la actividad del sílice en plantas con afectaciones de hongos puede estimular la aparición de compuestos que pueden contribuir a la generación de fitoalexinas, por lo que también se puede utilizar en el periodo postcosecha (Araya-Vargas, 2010).

El ion  $\text{SiO}_4$  es considerado la unidad fundamental de los silicatos, la cual está ordenada en forma de tetraedro regular, estando unido a enlaces 50% iónicamente y 50% covalentemente (Rodríguez-Alegre, 2006).

El silicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) (Figura 2.2) es una solución acuosa de óxido de sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) y dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) combinado en diferentes proporciones y variando en las relaciones de estos compuestos se obtienen soluciones con diferentes aplicaciones (Basso y Conci, 2007).

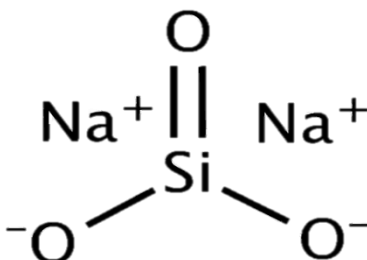


Figura 2.0.2 Estructura química del silicato de sodio (Fuente: Internet)

Es por eso que se han desarrollado estudios en busca de nuevas propiedades en el uso de silicato de sodio, dentro de los que destacan la utilización de este compuesto como recubrimiento, debido a que no tiene afectaciones por aceites, cebo y grasas minerales, otorgándole al producto como la madera o papel resistencia al fuego y plagas (Basso y Conci, 2007).

### 2.5.1 Aplicaciones del silicato de sodio en frutos postcosecha

Una de las propiedades del silicato de sodio es su efecto inhibitorio sobre fitopatógenos en frutos y hortalizas; además, regulan el intercambio de gases aumentando la vida de anaquel. Las sales se colocan en las lenticelas del fruto disminuyendo la tasa de respiración y con ello, disminuyendo la pérdida de agua, firmeza del fruto y manteniendo la calidad de los alimentos en postcosecha (Bandara *et al.*, 2015).

De acuerdo a Elsherbiny y Taher (2018), el silicato de sodio presenta tres métodos diferentes de acción contra el ataque a patógenos y protección a frutos y plantas: a) formación de una barrera mecánica debido a la síntesis polimérica que permite la adhesión a la pared celular, teniendo un efecto en la respiración de los frutos y plantas, b) inductor, encargándose de la activación de enzimas asociadas a la defensa como la fenilalanina amonio liasa, polifenoloxidasas, peroxidasa, quitinasa y B-1-3-glucanasa, c) antifúngico, produciendo y acumulando compuestos como las

fitoalexinas, fenoles, flavonoides y proteínas durante la infección del patógeno, además, una vez en la planta activa las vías de señalización y transcripción de genes relacionados a la defensa, como las MAPK, NPR1, ácido salicílico y el cebado de la planta (*priming*).

También se le ha atribuido el efecto de resistencia frente al estrés biótico y abiótico en las plantas, jugando un papel importante en la tolerancia al estrés salino, disminuir la toxicidad de algunos metales debido a que influye en la actividad de las enzimas antioxidantes (Roohizadeh *et al.*, 2015).

El silicato, aplicado a frutos, juega un papel importante como componente de la pared celular, esto va de la mano con la capacidad de ser un nutriente vegetal funcional, por lo que en algunas investigaciones el mecanismo de acción que tiene el Si actúa en el tejido del fruto, en el cual interrumpe señales que derivan en una activación más rápida y extensa de los mecanismos de defensa ante algunos patógenos, esta acción de protección se presenta por la activación de dos familias de enzimas, la peroxidasa y quitinasa, las cuales interfieren en procesos como la acumulación de lignina, compuestos fenólicos y proteínas relacionadas con la patogénesis en las plantas infectadas (Moscoso-Ramírez & Palou, 2016; Bi *et al.*, 2006).

También se le ha atribuido un papel fundamental en el incremento de la actividad de la catalasa, por lo que se ve afectada la actividad del tejido mesocarpial, haciendo que el Si se vaya depositando entre la pared celular y la membrana celular (Moscoso-Ramírez & Palou, 2015). Este mecanismo disminuye la permeabilidad de la membrana limitando la peroxidación de lípidos, por lo que, al impregnarse en las partes intracelulares de la cáscara del fruto se cubren los estomas, y con ello se mantiene la humedad del fruto, se reduce su respiración y su pérdida de peso. Además, se muestra un aumento en la reserva de antioxidantes lo que deriva en el aumento en el tiempo de vida postcosecha de los frutos (Tsfay *et al.*, 2011).

Los silicatos más usados en la industria, debido al mecanismo de acción que ejerce sobre algunos frutos son: el silicato de potasio, sodio y calcio probado en frutos como melón (Bi *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007), jujube (Guo *et al.*, 2019), aguacate

(Tesfay *et al.*, 2011), fresas (Lopes *et al.*, 2014), naranjas y mandarinas (Li *et al.*, 2019), albaricoques (Bo *et al.*, 2011) inclusive se ha utilizado con mezclas de algunas soluciones como el quitosano para lograr un efecto potenciado en la inhibición de hongos fitopatógenos (Guo *et al.*, 2019) y debido a las propiedades de ambos para poder mejorar otras características fisicoquímicas en los frutos, como ya lo ha reportado Al-Eryani-Raqeeb y colaboradores (2009) y Sivakumar y colaboradores (2005), en el que evaluaron el efecto de quitosano y soluciones de carbonato de amonio en la incidencia de antracnosis en papaya, al igual que el efecto de quitosano y calcio en la inhibición significativa de antracnosis con en el mismo objetivo.

## **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

*Carica papaya* o papaya es uno de los frutos tropicales de mayor demanda a nivel mundial, lo que hace que sea un fruto de los más importantes en la economía internacional; México se encuentra entre los cuatro productores principales de este fruto en el mundo (FAO, 2017).

Uno de los patógenos que causa daños severos en los cultivos es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, el cual, se adhiere fácilmente a los frutos y es capaz de penetrarlo y desarrollarse rápidamente, afectando la calidad y apariencia del producto y ocasiona pérdidas estimadas del 50% en la producción mundial de papaya.

La aplicación de tratamientos postcosecha como el recubrimiento a base de quitosano y la suspensión de soluciones de silicato de sodio, se han utilizado en frutas y hortalizas para inhibir el desarrollo de fitopatógenos fúngicos, ambos tratamientos resultan ser prometedores, ya que inducen la resistencia natural de frutas a estrés abiótico y biótico, tienen propiedades antifúngicas y extienden la vida de anaquel.

Sin embargo, la tendencia actual en el desarrollo de recubrimientos sugiere el uso combinado de uno o más compuestos, que permitan incrementar los beneficios de las películas confiriéndoles mejores propiedades antimicrobianas y antifúngicas regulando eficientemente el intercambio de gases, incrementando la solubilidad, cobertura y secado de las filminas. Es por ello que se necesitan desarrollar nuevas combinaciones, que cumplan con las características antes descritas.

El objetivo de esta investigación fue aplicar un recubrimiento comestible utilizando como base el silicato de sodio y quitosano en frutos de importancia económica como la papaya (*Carica papaya* L.) para incrementar su efectividad en la inhibición del hongo causante de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), manteniendo las características organolépticas de los frutos y extendiendo su tiempo de vida de anaquel.

## **CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS**



## CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

La combinación de quitosano y silicato de sodio en las distintas concentraciones evaluadas tendrá un efecto sinérgico o aditivo sobre la inhibición del desarrollo del hongo *C. gloeosporioides* (*in vitro* e *in vivo*), el agente causal de la antracnosis sin afectar las propiedades de los frutos de papaya 'Maradol'.

## **CAPÍTULO 5. OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto *in vitro* e *in vivo* del silicato de sodio y quitosano en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz&Sacc) y en la calidad de frutos de papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol en postcosecha.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar a nivel de prueba *in vitro* el efecto de los tratamientos de silicato de sodio y quitosano (a diferentes concentraciones) sobre el diámetro micelial, esporulación y germinación de *C. gloeosporioides*.
- Evaluar la incidencia y severidad en frutos de papaya cv. Maradol infectados por *C. gloeosporioides* tratados con silicato de sodio y quitosano almacenados a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Análisis del efecto de los tratamientos de silicato de sodio y quitosano sobre el desarrollo micelial de *C. gloeosporioides* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Evaluar los parámetros fisicoquímicos (firmeza, sólidos solubles totales, pérdida fisiológica de peso, color) en frutos de papaya cv. Maradol tratados con silicato de sodio y quitosano almacenados a temperaturas de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$

## **CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Preparación del Material Biológico

#### 6.1.1 Reactivación de *Colletotrichum gloeosporioides*

Se preparó un medio de cultivo con fruto de papaya, disolviendo en 400 mL de agua destilada con ocho gramos de agar bacteriológico marca MCD Lab® y 28 g de papaya fresca (principalmente pulpa y piel), posteriormente se agitó hasta obtener una muestra homogénea, y finalmente se esterilizó a una temperatura de 120° C y 1.5 PSI de presión. Una vez estéril el medio, se procedió a vaciar en cajas Petri de 80 mm de diámetro (20 mL por caja).

Las cepas conservadas a -80°C (aisladas de trabajos anteriores por el grupo de trabajo) se descongelaron en la campana de flujo laminar y se colocaron en papel filtro hasta que se secaron completamente. La inoculación del hongo se realizó en las cajas Petri con medio de papaya, previamente preparado y se incubaron a 27°C en la cámara de crecimiento por seis días.

#### 6.1.2 Preparación de los tratamientos

Se prepararon cuatro concentraciones de silicato de sodio Sigma-Aldrich® (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %), para ello se vertió el gramaje pesado en agua destilada dejando preparado un litro de solución. El pH de las soluciones osciló en un rango de 11.1 a 11.9, la alcalinidad es propio del mismo reactivo. Las soluciones de quitosano de la marca comercial América Alimentos®, de alto peso molecular se prepararon a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 %, para su disolución se agregó 2.0 % de ácido acético glacial (v/v), y posteriormente las concentraciones se estabilizaron a un pH de 5.6 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH 1N). A fin de potenciar el beneficio de ambos compuestos, también se evaluaron tratamientos de silicato de sodio con quitosano en sus múltiples (Cuadro 6.1), además del ácido acético al 2% como testigo y agua destilada como control.

### 6.2 Aplicación de tratamientos

Los tratamientos propuestos se aplicaron mezclando cada una de las concentraciones establecidas con ADP en cajas Petri (relación 1:3) agregando cinco mililitros del tratamiento y 15 mililitros de agar, una vez que el medio gelificó, se colocaron discos miceliales de 5 mm de diámetro del hongo *C. gloeosporioides*, en el centro de las cajas Petri. El control consistió en cajas con solo medio ADP sin aplicación de alguno de los tratamientos. Las cajas se incubaron a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , cada tratamiento se evaluó por triplicado, 78 cajas Petri totales por duplicado. Los mejores tratamientos estadísticamente evaluados se utilizaron en la etapa *in vivo*.

### 6.3 Diseño experimental y análisis estadístico de los ensayos *in vitro*

Para esta etapa se utilizaron dos tipos de análisis diferentes, el primero fue un análisis de medidas repetidas (ANOVA) para los tratamientos aplicados de manera individual y un diseño factorial  $4^2$  completamente aleatorizado, teniendo como factores a) recubrimiento (silicato de sodio, quitosano), b) la concentración que difiere entre recubrimientos, para los tratamientos combinados, para lo cual se utilizará un análisis factorial (ANOVA). En todos los casos se revisaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, cuando estos no se cumplían se utilizó la transformación de datos. Ambos análisis se evaluarán en un curso temporal (cada dos días durante 10 días), las variables de respuesta comprendieron: 1) crecimiento micelial, 2) esporulación de las muestras *in vitro*, en caso de existir diferencias significativas de los tratamientos en ambos análisis, se utilizarán comparaciones de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) en los tratamientos y fecha de revisión. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA 10 (Statsoft, 2011).

Cuadro 6.1 Diseño experimental de pruebas *in vitro*.

| Tratamiento       | Concentración | Días de evaluación |   |   |   |    |
|-------------------|---------------|--------------------|---|---|---|----|
| Control           | 0             |                    |   |   |   |    |
| Testigo (A. A.)   | 2.0%          |                    |   |   |   |    |
| Qitosano          | 0.1% - 0.5%   |                    |   |   |   |    |
|                   | 1.0% - 1.5%   | 2                  | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Silicato de sodio | 0.5% - 1.0%   |                    |   |   |   |    |
|                   | 1.5% - 2.0%   |                    |   |   |   |    |
| *Combinación      | *Propuestas   |                    |   |   |   |    |

\*Anexo. Diseño experimental completo de la prueba *in vitro*

## 6.4 Pruebas *in vitro*

### 6.4.1 Determinación del crecimiento micelial

El crecimiento micelial en cada uno de los tratamientos, se evaluó siguiendo la técnica utilizada por Ramos-Guerrero *et al.*, (2018) con algunas modificaciones, es decir, se tomó un disco de 3 mm de micelio, proveniente de la periferia de las cajas Petri (6 cajas diferentes) previamente inoculadas con el hongo *C. gloeosporioides* obtenido del cepario del ITTepic con un desarrollo de seis días. Este se colocó en el centro de cada una de las cajas Petri preparadas con los diferentes tratamientos, incluyendo el control (solo ADP) y un testigo (ácido acético al 2.0%) para fines comparativos.

Las cajas ya inoculadas se incubaron a una temperatura de 27°C. El diámetro micelial se midió cada 48 horas durante 10 días con ayuda de un vernier digital marca Trupper (López-Mora *et al.*, 2013).

### 6.4.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se utilizó la fórmula (1), utilizada en trabajos anteriores (El Ghaouth *et al.*, 1992; Ramos-Guerrero, 2018):

*Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial =*

$$\frac{\text{Diámetro de la colonia control} - \text{Diámetro de la colonia de tratamiento}}{\text{Diámetro de la colonia control} - \text{Diámetro del disco inicial}} \times 100 \quad (1)$$

### 6.4.3 Esporulación

La esporulación se midió, colocando primeramente a las cajas Petri ya inoculadas con los distintos tratamientos 10 mL de agua destilada esteril y 1 mL de Tween 80, esta técnica previene la agregación de conidios. La superficie se raspó con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, posteriormente ésta suspensión se filtró con una gasa estéril depositándose la solución en tubos de ensaye. Para el conteo de esporas se tomarán 50  $\mu\text{L}$  de las distintas soluciones, colocándose la alícuota sobre la cámara de Neubauer. El conteo se realizó visualizando el número de conidios/mL con ayuda de un microscopio óptico marca Motic BA300 utilizando el objetivo 40X.

Para calcular el número conidios/mililitro se utilizó la fórmula (2):

$$\frac{\text{Cel}}{\text{mL}} = \frac{N}{10} \cdot 25 \cdot 10^4 \cdot F = N \cdot 25 \cdot 10^3 \cdot F \quad (2)$$

Siendo:

N: Suma total de conidios contadas en los 10 cuadrados (5 arriba + 5 abajo)

25: Numero de cuadrados en cada cámara

$10^3$ : Factor para pasar el número de conidios en el cuadrado central (volumen=  $0.1\text{mm}^3 = 0.1 \mu\text{L}$ ) a número de conidios por mL ( $1000\text{mm}^3 = 1000\mu\text{L}$ )  $10N$

F: Factor de dilución



#### 6.4.4 Evaluación de la combinación de tratamientos

El efecto de la combinación e interacción de las 16 concentraciones de quitosano y silicato de sodio se evaluó aplicándose la fórmula utilizada por Oliveira *et al.*, (2017). El efecto sinérgico se determinó mediante el método de Abbott (Abbott, 1925) retomada por Oliveira *et al.*, (2017). El porcentaje total de la inhibición del crecimiento micelial esperado ( $CMF_{1\%exp}$ ) para cada mezcla sigue la fórmula mencionada (3):

$$CMF_{1\%exp} = (CHT_{1\%obs} + SiST_{1\%obs}) - (CHT_{1\%obs} * SiST_{1\%obs}/100)$$

Siendo:

$CMF_{\%exp}$ : porcentaje de crecimiento micelial esperado.

$CHT_{1\%obs}$ : el porcentaje de inhibición registrado para el quitosano al 0.1% sobre el crecimiento micelial final (CHT2, CHT3 y CHT4 [eq. a 0.5%, 1% y 1.5% de quitosano respectivamente]).

$SiST_{1\%obs}$ : el porcentaje de inhibición registrado para el silicato de sodio al 0.5% sobre el crecimiento micelial final (SiST2, SiST3, SiST4 [eq. a 1%, 1.5% y 2% de silicato de sodio respectivamente]).

A cada efecto de las mezclas se le asignó un índice de Abbott (AI) cuya fórmula (4) señala:

$$AI = CMF_{1\%obs}/CMF_{1\%exp}$$

Que el índice de Abbott para cada mezcla será el resultado del porcentaje del crecimiento micelial observado para cada combinación entre el porcentaje de crecimiento micelial esperado.

Índices de Abbott  $\geq 1.5$  presenta un efecto sinérgico, en el rango  $\geq 0.5$  a 1.5 presenta un efecto aditivo y  $\leq 0.5$  presenta un efecto antagónico.

### 6.4.5 Pruebas con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El trabajo de microscopía se realizó seleccionando los tratamientos más contrastantes obtenidos en la etapa *in vitro* (quitosano 0.1% y 1%, silicato de sodio 0.5% y 1.5%, quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5% y quitosano 1% + silicato de sodio 0.5%).

Previamente se inocularon discos de *C. gloeosporioides* en medio ADP junto con los tratamientos seleccionados, además de un control y un testigo (ácido acético 2%) y se incubaron por 12 días a 26°C. Una vez desarrollado el patógeno siguió el protocolo propuesto por Ramos-Guerrero *et al.*, (2018) para este fin, con ligeras modificaciones como las que se mencionan a continuación. En resumen, se cortaron las muestras con ayuda de una navaja para afeitar, se colocaron en viales previamente etiquetados a las cuales se agregaron 3 mL de fijador Karnovsky (pH 7.4) por 24 h a 4°C, posteriormente las muestras se lavaron con buffer de fosfato durante cinco minutos en tres repeticiones por tratamiento. Las muestras se deshidrataron con etanol a concentraciones graduales (30-90% v/v) por espacio de una hora para cada concentración con intervalos de agitación de 15 minutos y finalizando al 100% durante 20 minutos en tres ocasiones. Las muestras se secaron hasta punto crítico con CO<sub>2</sub> durante 40 minutos (secador de quorum K850, Quorum Technologies Ltd. EE. UU.). Por último, se montaron en portaobjetos y se cubrieron con oro usando un ionizador de metal (quorum Q150RS, Quorum Technologies Ltd. EE. UU.). Las muestras se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Quanta FEG 250, FEI Company Quanta TM, EE. UU.) el cual funciona a 5 kV y se fotografiaron.

### 6.5 Pruebas *in vivo*

Los frutos utilizados para esta etapa fueron cosechados en la localidad de Benito Juárez a la altura de Trapichillo, perteneciente al estado de Nayarit, se transportaron en cajas al Laboratorio de Biotecnología de Alimentos en el Instituto Tecnológico de Tepic, posteriormente se lavaron con una solución clorada al 2% (v/v) durante 1

minuto, y se secaron a temperatura ambiente. Se procedió a la inoculación mediante un sistema de herida con la ayuda de un punzón de 5 mm de profundidad y se colocaron discos de micelio de 3 mm de diámetro sobre la herida. Después de inoculados los frutos se les aplicaron los tratamientos de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5%, quitosano 1% + silicato de sodio 0.5% y un control (todos aplicados por aspersión), se dejaron secar a temperatura ambiente por 60 min y se almacenaron en un área con temperatura y humedad controlada ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $> 50\%$  HR) durante 12 días. En intervalos de 48 horas se procedió a la evaluación del porcentaje de severidad de la enfermedad.

### 6.5.1 Porcentaje de severidad de la enfermedad

Para evaluar el porcentaje de severidad de la enfermedad se tomaron evidencias fotográficas los días de evaluación a fin de observar la evolución de la infección. Además, se midió el desarrollo micelial de las heridas inoculadas. La severidad se calculó utilizando la fórmula 5 propuesta por Hernández-Lauzardo *et al.*, (2008).

$$\% \text{ Severidad} = \frac{DLA}{DLC} \times 100 \quad (5)$$

Dónde:

DLA: Diámetro promedio de las lesiones de las heridas control

DLC: Diámetro promedio de las lesiones de las heridas tratadas

Diámetro de lesión= Diámetro de la zona afectada – Diámetro de la herida

Para este análisis se dará un valor numérico a la severidad de acuerdo a la siguiente escala propuesta por Andrades *et al.*, (2009), que se muestra en el Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Escala para la determinación del porcentaje de severidad en los frutos  
(Fuente: Andrades *et al.*, 2009).

| Grado | % de severidad |
|-------|----------------|
| 0     | 0              |
| 1     | 1 – 3          |
| 2     | 4 – 6          |
| 3     | 7 – 12         |
| 4     | 13 – 25        |
| 5     | 26 – 50        |
| 6     | 51 – 75        |
| 7     | 76 – 87        |
| 8     | 88 – 94        |
| 9     | 95 – 97        |
| 10    | 98 – 100       |

### 6.5.2 Pruebas fisicoquímicas

Se realizaron pruebas para la determinación de las características fisicoquímicas del fruto de acuerdo a la metodología de Sañudo-Barajas y colaboradores (2008) con algunas modificaciones, en esta se midió la firmeza por medio de la utilización de un penetrómetro Shimpo® FGE-50 (20.00 Kg) con una punta de 8 mm (recomendada para frutos grandes y suaves). Los sólidos solubles totales, se determinaron utilizando un refractómetro digital Hanna® (HI 96801 0-85% °Brix) utilizando la técnica utilizada por Rayón-Díaz (2017). La pérdida de peso se determinará utilizando una báscula digital marca Ceslab® (XY20MB 22 kg ± 0.1 g.) y se medirá durante un tiempo de evaluación de 12 días en un área con temperatura controlada ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , HR 50%), a su vez, se medirá el cambio de coloración de los frutos mediante la implementación de un colorímetro Focus on Color® empleando los parámetros  $L^*a^*b$ .

### **6.5.3 Análisis estadístico del ensayo *in vivo***

Para el análisis de los datos de la segunda etapa se utilizaron análisis univariados (ANOVA de una vía) ó análisis no paramétricos cotejándose los supuestos con la prueba de (Levene) y la prueba de Kolmogrov-Smirnoff (Statistica 10). Las variables independientes fueron el tratamiento y el tiempo (medición cada 2 días durante 12 días), las variables de respuesta fueron: a) la severidad del daño, b) calidad del fruto/tratamiento, c) la firmeza, d) porcentaje de pérdida de peso, e) solidos solubles totales y f) color. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ , se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 10 para el análisis de resultados (Statsoft, 2011).

## **CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación pruebas *in vitro*7.1.1 Monitoreo de reactivación del hongo *C. gloeosporioides*

Se llevó a cabo la revisión macro y microscópica teniendo una cepa previamente identificada a nivel molecular de *C. gloeosporioides* obtenida de frutos de papaya, cuyas características morfológicas son micelio de color blanco, algodonoso, compacto y abundante, con características de segmentos, presentando esporas de color gris claro con distribución concéntrica, un tamaño estándar de 16 a 25  $\mu\text{m}$ , acorde con lo reportado por Torres-Calzada (2013). (Fig. 7.1).

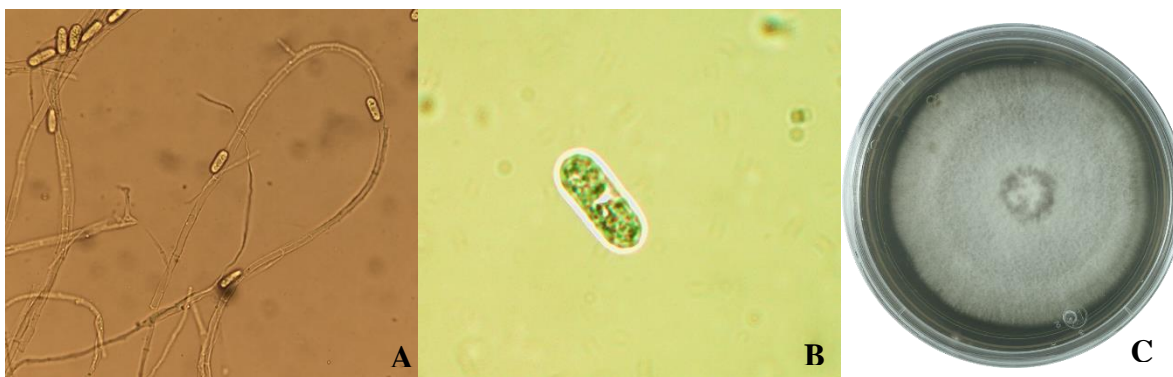


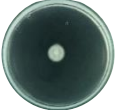





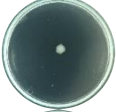
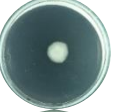
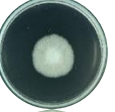









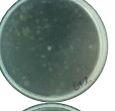




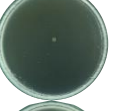
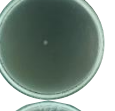
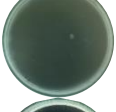




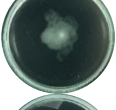





























Figura 7.0.1 Vista del micelio (A) y espora (B) de *C. gloeosporioides* a través de un microscopio óptico a 40X y 100X respectivamente y morfología del hongo en caja de Petri en medio ADP (C).

7.1.2 Crecimiento micelial *C. gloeosporioides*

Los resultados del desarrollo del hongo *C. gloeosporioides* inoculado en cajas Petri con medio de cultivo ADP con el tratamiento correspondiente se realizó a los 2, 4, 6, 8 y 10 días. Los resultados se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas para los tratamientos aplicados de manera individual y un análisis factorial para los tratamientos combinados. Cabe destacar que, a simple vista se notaron diferencias en el crecimiento del patógeno expuesto a los tratamientos propuestos durante el tiempo de evaluación, el cual se muestra en el Cuadro 7.1.

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.1 Inhibición del crecimiento micelial del hongo *C. gloeosporioides* en un curso temporal de 10 días en medio de cultivo ADP aplicando 26 tratamientos incubados a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

| Tratamiento/Días                        | 2                                                                                   | 4                                                                                   | 6                                                                                    | 8                                                                                     | 10                                                                                    |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Control                                 |    |    |    |    |    |
| Testigo                                 |    |    |    |    |    |
| Quitosano 0.1%                          |    |    |    |    |    |
| Quitosano 0.5%                          |    |    |    |    |    |
| Quitosano 1.0%                          |    |    |    |    |    |
| Quitosano 1.5%                          |   |   |   |   |   |
| Silicato de sodio 0.5%                  |  |  |  |  |  |
| Silicato de sodio 1.0%                  |  |  |  |  |  |
| Silicato de sodio 1.5%                  |  |  |  |  |  |
| Silicato de sodio 2.0%                  |  |  |  |  |  |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 0.5% |  |  |  |  |  |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 1.0% |  |  |  |  |  |



## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| Tratamiento/Días                        | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|-----------------------------------------|---|---|---|---|----|
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 1.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 2.0% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 0.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 1.0% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 1.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 2.0% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 0.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 1.0% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 1.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 2.0% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 0.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 1.0% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 1.5% |   |   |   |   |    |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 2.0% |   |   |   |   |    |

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico de medidas repetidas para los tratamientos aplicados de manera individual señalan diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 28.38$ ,  $df$  (49,112),  $P= 0.001$ ) y un efecto significativo en el tiempo ( $F= 121.72$ ,  $df= 4$ , 112,  $P= 0.001$ ). El análisis factorial para las combinaciones muestra diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial del hongo *C. gloeosporioides* para el factor tratamiento (quitosano\*silicato de sodio) ( $F= 2.006$ ,  $df= 16$ , 112,  $P= 0.0417$ ), concentración (0.1 - 1.5 %) ( $F= 9.6071$ ,  $df= 3$ , 160,  $P= >0.001$ ), concentración (0.5 – 2.0 %) ( $F= 1.4623$ ,  $df= 3$ , 160,  $P= 0.2268$ ) (Cuadro 7.2 y 7.3), siendo los tratamientos de quitosano (en sus cuatro concentraciones) y 14 tratamientos combinados los que tuvieron un mejor desempeño en la disminución del crecimiento. Gutiérrez-Martínez *et al.*, (2018) señalan que la reducción en el desarrollo de *C. gloeosporioides* de los tratamientos con quitosano responde a cambios en las hifas y estructuras reproductivas dados por las características propias de este biopolímero, cuyo grupo amino, genera una atracción electrostática con algunos componentes de la pared y membrana celular del patógeno, afectando su permeabilidad. La combinación con el silicato de sodio mostró un efecto de supresión de hifas, ejerciendo un control semejante al reportado por Guo *et al.*, (2019) sobre el hongo *A. alternata* en jujube. Wang *et al.*, (2010), mencionan que el silicato de sodio, a una concentración de 25 mM, modifica y altera la morfología de células hifales que se muestran con la fragmentación de hifas, así como con el encogimiento de la membrana celular.

A su vez, los tratamientos propuestos de silicato de sodio redujeron mínimamente el crecimiento micelial, siendo la concentración más baja (0.5%) la que mostró mayor inhibición del desarrollo del hongo en comparación con el resto de las concentraciones de silicato de sodio, sin embargo, esta no fue significativa (Cuadro 7.2). Otros estudios, reportados por Pivotto-Pavanello *et al.*, (2016), mencionan que tratamientos de metasilicato de sodio a concentraciones de 2 g/L inhibieron el crecimiento de *M. fructicola* en un 95%, y una concentración de 6 g/L inhibió completamente al patógeno fúngico en condiciones *in vitro*. Así mismo, Bi *et al.*, (2006), mostraron que concentraciones de 100 mM de silicato de sodio redujeron en un 100% el crecimiento de patógenos fúngicos como *A. alternata*, *T. roseum* y

*F. semitectum* y una concentración de 25 mM redujo en un 62, 72 y 40% el crecimiento de estos patógenos, respectivamente. Hae-Jun *et al.*, (2006), demostraron que nanopartículas de plata-silicato a 10 ppm son efectivas en la inhibición completa de *C. gloeosporioides* además de otros patógenos que afectan algunas especies de plantas y frutos. Un estudio previo, desarrollado por Youssef *et al.*, (2019), demuestra que una concentración de 0.3% de silicato de sodio, bicarbonato de potasio y quelato de calcio presenta una inhibición completa de crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, sin embargo, cabe resaltar que este tipo de patógenos con los que se trabajó se desarrollan en frutos que presenta heridas superficiales en la cutícula, a excepción de *M. fructicola*, el cuál presenta un desarrollo similar al de *C. gloeosporioides*.

Asimismo, los tratamientos con quitosano presentaron un efecto significativo en la inhibición de *C. gloeosporioides*. Resultados similares fueron reportados por Gutiérrez-Martínez *et al.*, (2017), quienes contrastan el efecto inhibitorio de tres concentraciones de quitosano (0.5, 1.0 y 1.5 %) sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* obtenidos a partir de frutos tropicales (mango, banana y guanábana), y muestran un efecto benéfico a concentraciones de 1.0 y 1.5 % en la disminución del crecimiento micelial del patógeno; así como en la esporulación y germinación del mismo a una temperatura de almacenamiento de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Živković *et al.*, (2018), observaron que concentraciones de 3 mg/mL tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de *A. alternata* y *C. gloeosporioides* durante 7 días de incubación, con un crecimiento promedio de 9 mm y 20.33 mm respectivamente, en comparación con el control el cual creció 76.33 mm en el caso de *A. alternata* y 90 mm para *C. gloeosporioides*.

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.2 Crecimiento micelial (media  $\pm$  SD) de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo ADP usando los tratamientos individuales de quitosano y silicato de sodio (relación 3:1) de manera individual, incubados por 10 días a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

| Tratamiento         | Media                |
|---------------------|----------------------|
| Control             | $81.03 \pm 0.35$ c   |
| Testigo (A.A.)      | $68.80 \pm 10.67$ bc |
| Quitosano 0.1%      | $0.37 \pm 0.32$ a    |
| Quitosano 0.5%      | $0.50 \pm 0.43$ a    |
| Quitosano 1.0%      | $0.60 \pm 0.17$ a    |
| Quitosano 1.5%      | $1.77 \pm 2.02$ a    |
| Silicato sodio 0.5% | $73.03 \pm 7.83$ c   |
| Silicato sodio 1.0% | $73.40 \pm 4.35$ c   |
| Silicato sodio 1.5% | $74.83 \pm 0.55$ c   |
| Silicato sodio 2.0% | $77.73 \pm 0.66$ c   |

Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.3 Crecimiento micelial (media  $\pm$  SD) de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo ADP mezclado con los tratamientos combinados de quitosano y silicato de sodio a diferentes concentraciones (relación 1:3), incubados por 10 días a una temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$

| Tratamiento                             | Media                |
|-----------------------------------------|----------------------|
| Control                                 | 81.03 $\pm$ 0.35 d   |
| Testigo (A.A.)                          | 68.80 $\pm$ 10.67 c  |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 0.5% | 19.97 $\pm$ 33.28 ab |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 1.0% | 19.73 $\pm$ 32.53 ab |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 1.5% | 28.80 $\pm$ 43.41 ab |
| Quitosano 0.1% + Silicato de sodio 2.0% | 23.90 $\pm$ 27.26 ab |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 0.5% | 3.03 $\pm$ 4.56 a    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 1.0% | 3.20 $\pm$ 5.37 a    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 1.5% | 0.40 $\pm$ 0.34 a    |
| Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 2.0% | 0.37 $\pm$ 0.11 a    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 0.5% | 0.43 $\pm$ 0.20 a    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 1.0% | 3.80 $\pm$ 4.13 a    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 1.5% | 0.30 $\pm$ 0.36 a    |
| Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 2.0% | 2.93 $\pm$ 4.47 a    |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 0.5% | 39.73 $\pm$ 17.32 b  |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 1.0% | 17.67 $\pm$ 8.70 ab  |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 1.5% | 6.73 $\pm$ 6.05 ab   |
| Quitosano 1.5% + Silicato de sodio 2.0% | 0.33 $\pm$ 0.23 a    |

Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos (Cuadro 7.4), señala una inhibición favorable, por arriba del 90 % en la mayoría de los tratamientos aplicados, siendo el quitosano en sus cuatro concentraciones muy efectivo, al igual que las combinaciones con silicato de sodio. La combinación que produjo el mejor efecto inhibitorio fue el tratamiento de quitosano 1.5 % y silicato de sodio 2.0 % con un 99.6 % de inhibición, al igual que la combinación de quitosano 1.0 % y silicato de sodio 1.5 % con el mismo porcentaje, esto puede atribuirse a la actividad fúngica del quitosano, debido al carácter catiónico que tiene el mismo, donde sus grupos amino que se encuentran en forma libre, interactúan con los residuos negativos de las macromoléculas presentes en la pared celular fúngica, provocando alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo anterior provoca una disminución en la función principal del patógeno.

Asimismo, los tratamientos de quitosano y silicato de sodio combinados, presentan modificación de hifas, además de una contracción de estas, debido a que los tratamientos actúan de manera aditiva, debido a que el silicato de sodio contiene aniones que posiblemente ayuden en la interacción de estos tratamientos que se refleja en la inhibición y control de estos patógenos (Niu *et al.*, 2016).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Rahman *et al.*, (2008), demostrando que el quitosano a una concentración de 1.0 % tuvo un efecto en la inhibición de *C. gloeosporioides* teniendo un porcentaje de inhibición de 82 % seguido por la concentración de 0.75 % con un efecto de 52.2 % de inhibición. Sin embargo, en los tratamientos con menor concentración no hubo un efecto significativo comparado con el control. También Ramos-Guerrero *et al.*, (2018) evaluaron el efecto del quitosano solo y combinado con metil-jasmonato (MJ) y ácido salicílico (SA) en la disminución del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, obteniendo como resultados un rango de 81-96% de inhibición aplicando quitosano al 1% solo y combinado con MJ o SA.

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.4 Porcentaje de inhibición micelial de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo ADP combinando los diferentes tratamientos.

| Tratamiento         | % Crecimiento | % inhibición |
|---------------------|---------------|--------------|
| Control             | 100.0%        | 0.0%         |
| Testigo (A.A.)      | 84.9%         | 15.1%        |
| Qui 0.1%            | 0.5%          | 99.5%        |
| Qui 0.5%            | 0.6%          | 99.4%        |
| Qui 1.0%            | 0.7%          | 99.3%        |
| Qui 1.5%            | 2.2%          | 97.8%        |
| SiS 0.5%            | 90.1%         | 9.9%         |
| SiS 1.0%            | 90.6%         | 9.4%         |
| SiS 1.5%            | 92.3%         | 7.7%         |
| SiS 2.0%            | 95.9%         | 4.1%         |
| Qui 0.1% + SiS 0.5% | 24.6%         | 75.4%        |
| Qui 0.1% + SiS 1.0% | 24.4%         | 75.6%        |
| Qui 0.1% + SiS 1.5% | 35.5%         | 64.5%        |
| Qui 0.1% + SiS 2.0% | 29.5%         | 70.5%        |
| Qui 0.5% + SiS 0.5% | 3.7%          | 96.3%        |
| Qui 0.5% + SiS 1.0% | 3.9%          | 96.1%        |
| Qui 0.5% + SiS 1.5% | 0.5%          | 99.5%        |
| Qui 0.5% + SiS 2.0% | 0.5%          | 99.5%        |
| Qui 1.0% + SiS 0.5% | 0.5%          | 99.5%        |
| Qui 1.0% + SiS 1.0% | 4.7%          | 95.3%        |
| Qui 1.0% + SiS 1.5% | 0.4%          | 99.6%        |
| Qui 1.0% + SiS 2.0% | 3.6%          | 96.4%        |
| Qui 1.5% + SiS 0.5% | 49.0%         | 51.0%        |
| Qui 1.5% + SiS 1.0% | 21.8%         | 78.2%        |
| Qui 1.5% + SiS 1.5% | 8.3%          | 91.7%        |
| Qui 1.5% + SiS 2.0% | 0.4%          | 99.6%        |

\* Las abreviaciones corresponden a Quitosano (Qui), Silicato de sodio (SiS).

### 7.1.3 Efecto del quitosano y silicato de sodio sobre la esporulación de *C. gloeosporioides*

Los resultados de la esporulación del patógeno señalan que los tratamientos de quitosano y algunas combinaciones presentaron una efectividad del 100% en la inhibición de la esporulación de *C. gloeosporioides* en comparación con el control ( $3.5 \times 10^6$  esporas/mL) y el ácido acético (pH 5.6) ( $4.5 \times 10^5$  esporas/mL), por el contrario, los tratamientos de silicato de sodio sufrieron una disminución en los niveles de esporulación en comparación con el control, a) Silicato de sodio 0.5% ( $7 \times 10^5$  esporas/mL), b) Silicato de sodio 1.0% ( $1 \times 10^6$  esporas/mL), c) Silicato de sodio 1.5% ( $2.6 \times 10^6$  esporas/mL) y d) Silicato de sodio 2.0% ( $3.2 \times 10^6$  esporas/mL), al igual que las combinaciones de quitosano al 0.1% más el silicato en sus cuatro concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %) ( $2.6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$  y  $2.7 \times 10^6$  esporas/mL), así como los tratamientos de quitosano al 0.5% con silicato de sodio al 0.5% y 1.5%, teniendo ( $8 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^5$  esporas/mL) respectivamente, demostrando que los efectos del tratamiento de quitosano combinado los del silicato de sodio al interactuar con la membrana celular del patógeno puede disminuirla o contraerla, y con ello fragmentar a nivel del núcleo las células hifales (Ge *et al.*, 2018), con ello puede ocasionar cambios en el metabolismo de las células miceliales como una disminución en la capacidad de esporular (Guo *et al.*, 2019).

Resultados similares son reportados por Bi *et al.*, (2006), quienes mencionan que el tratamiento con silicato de sodio reduce la presión de turgencia celular en patógenos como *A. alternata*, *F. semitectum* y *T. roseum* teniendo como resultado el colapso y contracción de las hifas y esporas, provocando la incapacidad del hongo para esporular. Adicionalmente, Ramos-Guerrero *et al.*, (2018), reportan una inhibición total de la esporulación de *C. gloeosporioides* cuando utilizaron quitosano al 1.5%, o al usar un tratamiento combinado con quitosano al 1.0%, metil-jasmonato y ácido salicílico.



### **7.1.4 Evaluación del efecto sinérgico de los tratamientos combinados**

Los resultados del efecto de la interacción usando el índice de Abbott (Cuadro 7.5), para comparar la combinación de los tratamientos de quitosano y silicato de sodio muestra efecto aditivo en todas las combinaciones, independientemente de la concentración, es decir, el mecanismo de acción que presentan ambos tratamientos no es sinérgico, únicamente aditivo, lo que influye positivamente en el control del desarrollo del patógeno. Esto también se puede ver influenciado por la naturaleza de estos tratamientos, debido a que Song *et al.*, (2016) demostraron que el quitosano combinado con nano-sílice (derivado del silicato de sodio) puede formar de manera satisfactoria puentes de  $H^+$  (N:H) y enlaces S – O – C, por lo que la eficacia de la aplicación de los tratamientos se mejora debido a la interacción de sus estructuras. Nuestros resultados coinciden con lo obtenido por Guo *et al.*, (2019), combinando quitosano y silicato de sodio.

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.5 Efecto de la combinación de tratamientos de quitosano y silicato de sodio a diferentes concentraciones en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial ( $ICM_{obs\%}$ ) y el tipo de interacción de acuerdo al método de Abbott.

| Tratamientos<br>combinados | Qui y SiS     |               | Combinaciones  |                | Índice de<br>Abbott |         |
|----------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------------|---------|
|                            | $ICM_{obs\%}$ | $ICM_{obs\%}$ | $ICMC_{obs\%}$ | $ICMC_{esp\%}$ | IA                  | Efecto  |
|                            | Qui           | SiS           |                |                |                     |         |
| Qui 0.1% + SiS 0.5%        | 99.3          | 9.87          | 75.35          | 99.37          | 0.76                | Aditivo |
| Qui 0.1% + SiS 1.0%        | 99.3          | 9.42          | 75.65          | 99.37          | 0.76                | Aditivo |
| Qui 0.1% + SiS 1.5%        | 99.3          | 7.65          | 64.46          | 99.35          | 0.65                | Aditivo |
| Qui 0.1% + SiS 2.0%        | 99.3          | 4.07          | 70.51          | 99.33          | 0.71                | Aditivo |
| Qui 0.5% + SiS 0.5%        | 99.18         | 9.87          | 96.26          | 99.26          | 0.97                | Aditivo |
| Qui 0.5% + SiS 1.0%        | 99.18         | 9.42          | 95.93          | 99.25          | 0.97                | Aditivo |
| Qui 0.5% + SiS 1.5%        | 99.18         | 7.65          | 99.51          | 99.24          | 1.00                | Aditivo |
| Qui 0.5% + SiS 2.0%        | 99.18         | 4.07          | 99.55          | 99.21          | 1.00                | Aditivo |
| Qui 1.0% + SiS 0.5%        | 99.26         | 9.87          | 99.47          | 99.33          | 1.00                | Aditivo |
| Qui 1.0% + SiS 1.0%        | 99.26         | 9.42          | 95.31          | 99.33          | 0.96                | Aditivo |
| Qui 1.0% SiS 1.5%          | 99.26         | 7.65          | 99.63          | 99.32          | 1.00                | Aditivo |
| Qui 1.0% + SiS 2.0%        | 99.26         | 4.07          | 96.38          | 99.29          | 0.97                | Aditivo |
| Qui 1.5% + SiS 0.5%        | 97.82         | 9.87          | 50.97          | 98.04          | 0.52                | Aditivo |
| Qui 1.5% + SiS 1.0%        | 97.82         | 9.42          | 60.07          | 98.03          | 0.61                | Aditivo |
| Qui 1.5% + SiS 1.5%        | 97.82         | 7.65          | 74.55          | 97.99          | 0.76                | Aditivo |
| Qui 1.5% + SiS 2.0%        | 97.82         | 4.07          | 99.59          | 97.91          | 1.02                | Aditivo |

\*Las siguientes abreviaciones corresponden a Qui (quitosano), SiS (silicato de sodio),  $ICM_{obs\%}$  (inhibición del crecimiento micelial observado),  $ICM_{esp\%}$  (inhibición del crecimiento micelial esperado),  $ICMC_{obs\%}$  (inhibición del crecimiento micelial de la combinación observado),  $ICMC_{esp\%}$  (inhibición del crecimiento micelial de la combinación esperado), IA (índice de Abbott).

### 7.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las micrografías de *C. gloeosporioides* (Fig. 7.2), a nivel de hifas, muestran que los tratamientos de quitosano al 0.1 y 1 % (Fig. 7.2 C y D) presentan un micelio mínimamente desarrollado y compacto, estos resultados son similares a los presentados por López-Mora *et al.*, (2013) y Ramos-Guerrero *et al.*, (2018), donde señalan que el efecto inhibitorio del quitosano es debido a la interacción que existe en la pared y la membrana celular del patógeno provocando un efecto de contracción de estas y una liberación de componentes citoplasmáticos, que afectan el desarrollo óptimo del hongo. El quitosano además actúa como una barrera para el desarrollo del tubo germinativo (Berumen-Varela *et al.*, 2015).

En los tratamientos de silicato de sodio al 0.5 y 1.5% (Fig. 7.2 E y F) las imágenes muestran un micelio con ligeras afectaciones de deshidratación, así como una cubierta de residuos alrededor de las hifas, propias del tratamiento. Esto demuestra que el silicato de sodio puede causar afectaciones a nivel morfológico en patógenos, como *C. gloeosporioides*, generando alteraciones en las hifas, lo que puede provocar una mayor permeabilidad de la membrana celular, como se demostró con *T. roseum* (Wang *et al.*, 2010).

Los tratamientos combinados (quitosano 0.5 % + silicato de sodio 1.5 % y quitosano 1.0 % + silicato de sodio 0.5 %) (Fig. 7.2 G y H) muestran afectaciones a nivel de hifas, que se caracterizan por malformaciones y reducción del tamaño de las mismas; esto indica que los mecanismos de acción que presentan ambos tratamientos se ve reflejado en el control del desarrollo micelial del patógeno. En comparación, en el tratamiento testigo (ácido acético 2.0 %) (Fig. 7.2 B) se observa deshidratación de las hifas, lo que implica un efecto en la respiración del patógeno y con ello serias afectaciones a nivel estructural, como cambios en la membrana y pared celular del patógeno permitiendo una permeabilidad libre entre estas por el bajo pH al que se encuentra (Kang *et al* 2003), ninguno de estos daños se observa en el tratamiento control (Fig. 7.2 A), que presenta un micelio sano sin afectaciones.

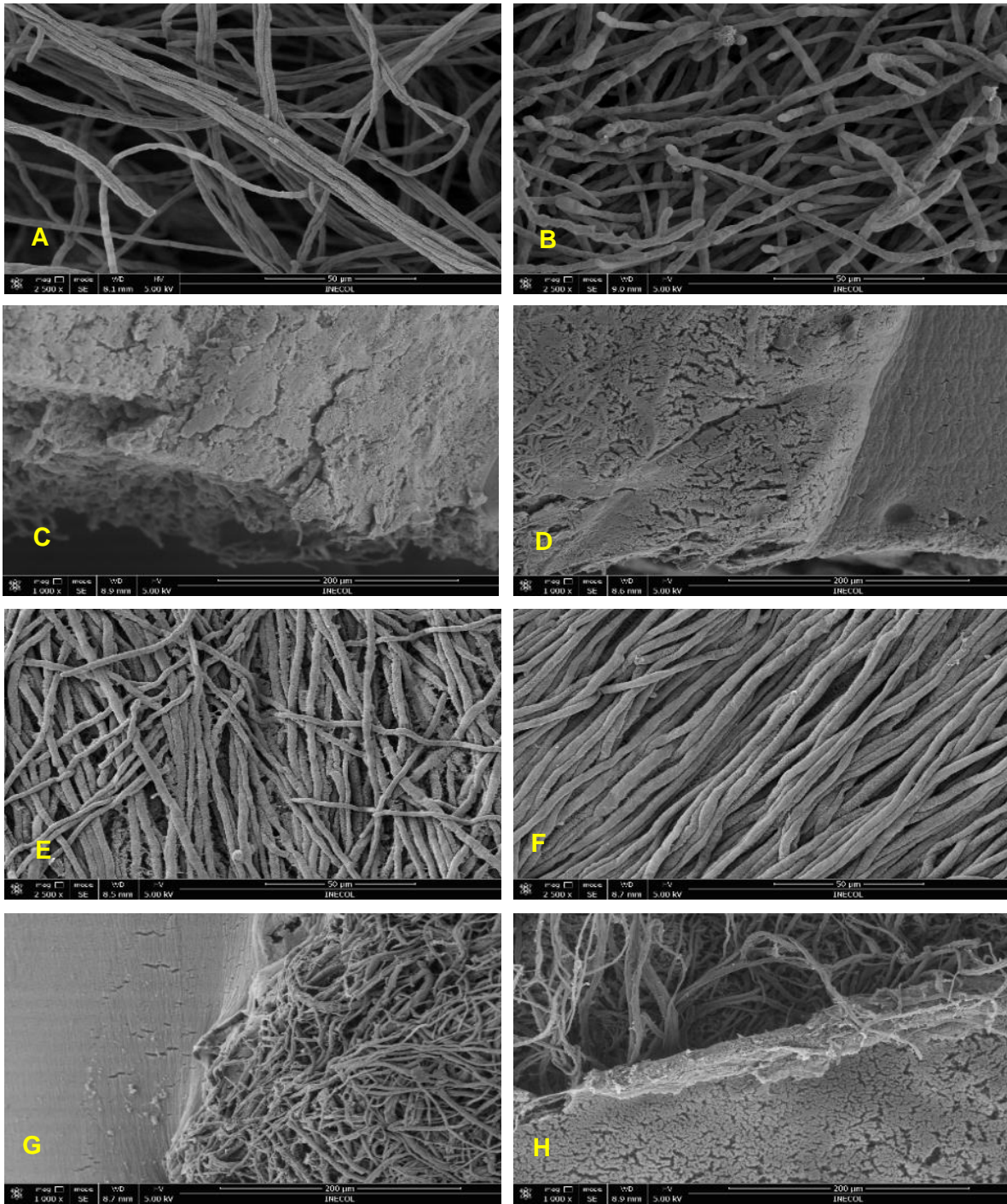


Figura 7.2 Micrografía de hifas de *C. gloeosporioides* aisladas de papaya expuestas a diferentes tratamientos (200 nm): A) Control, B) Testigo (ácido acético), C) Quitosano 0.1%, D) Quitosano 1.0%, E) Silicato de sodio 0.5%, F) Silicato de sodio 1.5%, G) Quitosano 0.5% + Silicato de sodio 1.5% y H) Quitosano 1.0% + Silicato de sodio 0.5%.

## 7.2 Evaluación pruebas *in vivo*

### 7.2.1 Severidad e incidencia de *C. gloeosporioides* en papaya

Los resultados del crecimiento micelial en las pruebas *in vivo* muestran diferencias significativas entre los tres tratamientos evaluados (Kruskal-Wallis,  $H(2, N=120)=76.89$ ,  $P < 0.001$ ), se observa una reducción en el desarrollo micelial de *C. gloeosporioides* cuando el hongo fue inoculado en frutos de papaya durante un tiempo de evaluación de 12 días, disminuyendo la severidad a la enfermedad en un 57.2 % en el tratamiento de quitosano 0.5 % + silicato de sodio 1.5 % y 50.7 % en el tratamiento de quitosano 1.0 % + silicato de sodio 0.5 %, en comparación con el control que tuvo daños notables afectando el 100 % del fruto (Fig. 7.3). En cuanto a la incidencia de la enfermedad, los frutos control presentaron afectaciones en un 100 %, en comparación con los frutos tratados con quitosano 0.5 % + silicato de sodio 1.5 % presentando un 40 % de incidencia, además, algunos efectos de deshidratación en la cutícula la mitad de los frutos evaluados, y los frutos con quitosano 1% + silicato de sodio 0.5% presentaron un 60 % de incidencia de antracnosis, presentando manchas oscuras no propias del daño por el patógeno.

Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos utilizados en esta investigación obtuvieron mayor porcentaje de inhibición del patógeno (50 – 57 %) en comparación con lo reportado por Guo *et al.*, (2019), disminuyendo en un 41.6% el desarrollo de *A. alternata* en frutos de jujube (*Ziziphus jujuba*, Mill) utilizando tratamientos de quitosano y silicato de sodio, así como, Bi *et al.*, (2006), con aplicaciones de silicato de sodio disminuyendo un 46 % el desarrollo de *T. roseum*.

Otros autores como Vilaplana *et al.*, (2019) y Salvador-Figueroa *at al.*, (2017) aplicaron tratamientos de quitosano combinado con agua caliente, así como, aceites esenciales de lima y canela, respectivamente, observando una reducción de la incidencia de *C. fructicola* y *C. gloeosporioides* en un 62 y 25 % en frutos de papaya. La disminución del desarrollo del patógeno se debe a que los tratamientos ejercen efectos de supresión micelial debido a los mecanismos de acción del quitosano y

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

silicato de sodio, y que a su vez, existe una correlación con los mecanismos de defensa propios del fruto (Guo *et al.*, 2017).

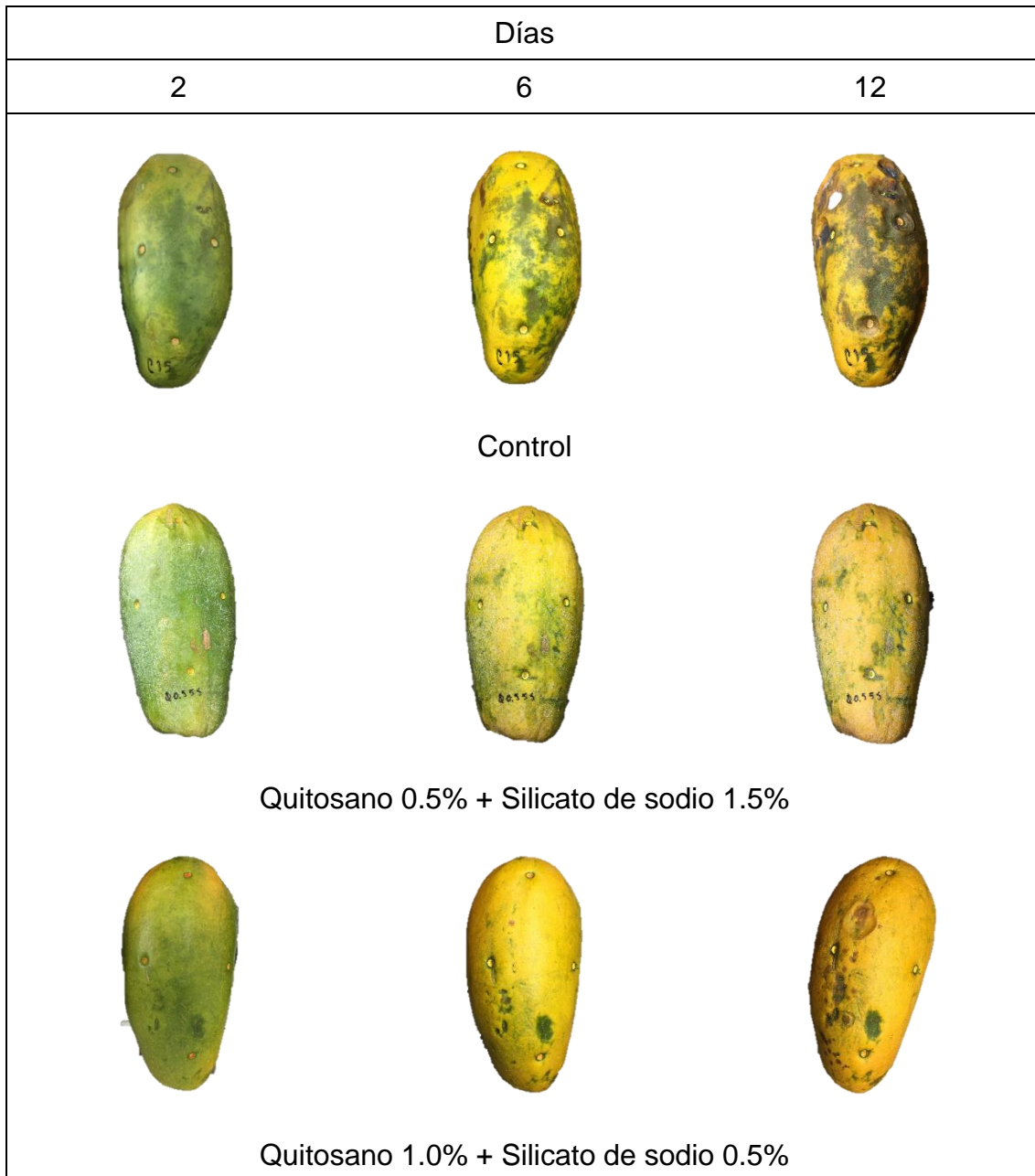


Figura 7.3 Daños en frutos de papaya causado por la inoculación de *C. gloeosporioides* durante 12 días de almacenamiento en un ambiente controlado ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

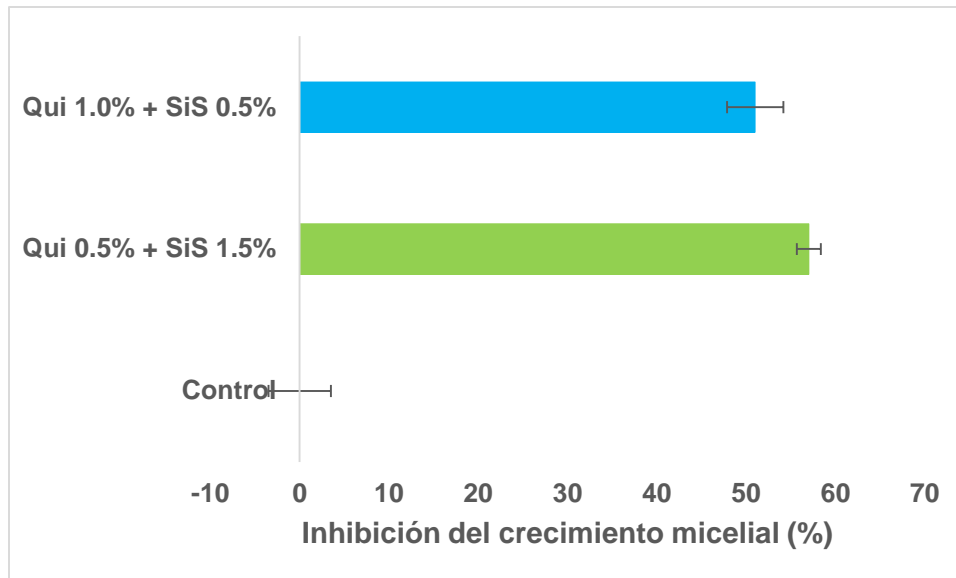


Figura 7.4 Porcentajes en la inhibición de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya tratados con quitosano + silicato de sodio durante 12 días a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Xing *et al.*, (2016), mencionan que, existe una unión electroquímica entre el quitosano y el patógeno, la cual se da por la interacción entre las cargas positivas del grupo amino del quitosano ( $-\text{NH}_3$ ) y las cargas negativas del grupo carboxilo ( $-\text{COO}^-$ ) presentes en la superficie de la membrana celular del patógeno, ocasionando alta peroxidación lipídica y pérdida de proteínas en los micelios que están en contacto con tratamientos de quitosano, además de promover la actividad de enzimas de defensa naturales del fruto como la PAL, POD, PPO y con ello englobar una serie de acciones que disminuyen el desarrollo del patógeno (Gutiérrez-Martínez *et al.* 2018; Bautista-Baños *et al.*, 2017). A su vez, se ha demostrado que el silicato de sodio puede actuar de una manera muy similar al quitosano, debido a que presenta un mecanismo inductor en la defensa natural de los frutos, el silicato de sodio cumple la misma función, ya que puede aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el fruto, siendo la primera línea de defensa en frutos ante el ataque de un patógeno (Li *et al.* 2011).

Con base a lo observado en las micrografías y de acuerdo a los resultados obtenidos en la parte *in vivo*, podría decirse que existe inhibición en el desarrollo del

patógeno *C. gloeosporioides* causada por la funcionalización no covalente del tratamiento de quitosano combinado con el silicato de sodio, debido a los grupos amino libres que se presentan en el quitosano y los enlaces formados por puentes de hidrogeno con el silicato de sodio debido a en la estructura del quitosano existe presencia de grupos hidroxilo (-OH), los cuales pueden actuar como sitios activos en la interacción del quitosano y compuestos inorgánicos como lo menciona Anaya-Esparza *et al.* (2020), mejorando las características del recubrimiento y por ende, obteniendo buenos resultados en la disminución del desarrollo del patógeno debido a las propiedades antifúngicas, de barrera e inductor.

### 7.2.2 Parámetros de calidad de papaya

- Pérdida de peso

De acuerdo con los resultados de las réplicas en frutos, si existe diferencia en la disminución del peso entre los tratamientos control y las combinaciones de quitosano con silicato de sodio, registrando una menor pérdida de peso el tratamiento de quitosano 1.0% + silicato de sodio 0.5%, desde el día 2 hasta el día final de evaluación, así mismo, el tratamiento de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5% tuvo una menor pérdida de peso en comparación con el control hasta el día 6, posterior a ello, fue el tratamiento que mayor pérdida de peso registró (Fig. 7.5).



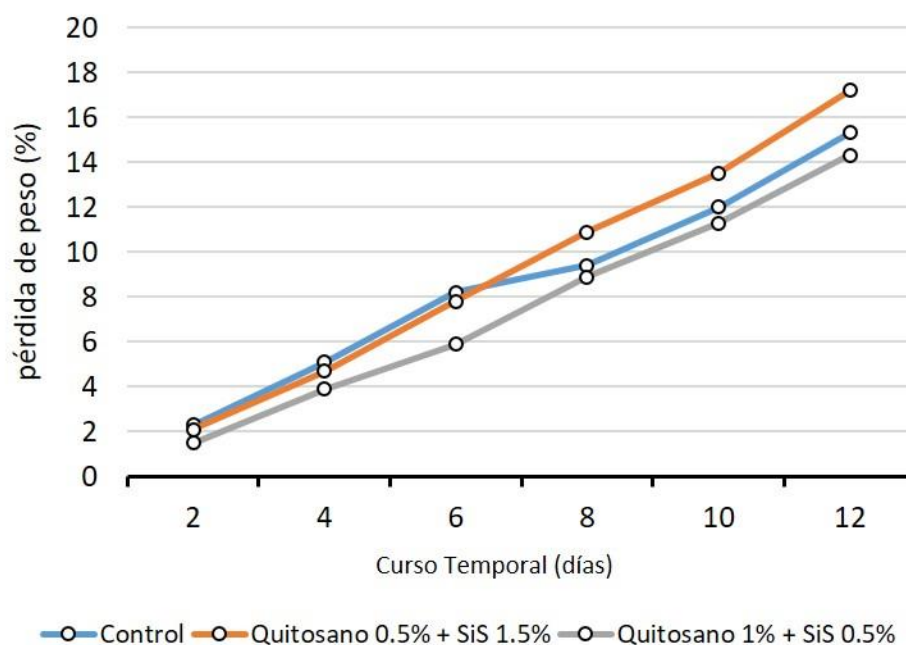


Figura 7.5 Pérdida de peso (%) de frutos de papaya tratados con recubrimientos de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5%, quitosano 1.0% + silicato de sodio 0.5% y control (agua) durante 12 días de almacenamiento a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La disminución en la pérdida de peso se debe a una modificación en la cutícula del fruto debido a la propiedad de recubrimiento propia de los tratamientos de quitosano + silicato de sodio aplicados, la cual disminuye de manera interna la cantidad de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}^+$  que necesita el fruto para llevar a cabo su proceso de maduración de manera normal. Resultados como los de Escamilla-García *et al.*, (2018), así como, Vilaplana *et al.*, (2019), mostraron que tratamientos de quitosano de manera individual (1.0%) y combinado con agua caliente lograron mantener de forma eficiente una estabilidad en el peso en frutos de papaya durante 15 y 7 días respectivamente a una temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . Bhanushree *et al.*, (2018) mencionan que la pérdida de peso en frutos se verá afectada por la concentración del quitosano, esto indica que el tratamiento de quitosano 1.0% + silicato de sodio 0.5% al ser una barrera de mayor concentración podría disminuir la interacción de gases (respiración y transpiración y producción de etileno) influyendo en el peso en los

frutos, aunque en este caso faltarían pruebas más contundentes para determinar este efecto del recubrimiento.

#### - Firmeza

Los tratamientos aplicados a los frutos presentaron diferencias muy marcadas durante los primeros 4 días de evaluación, posteriormente no hubo mucho margen de los tratamientos de quitosano con silicato de sodio en comparación con el control, sin embargo, hasta el día final de evaluación los frutos que fueron recubiertos por los tratamientos presentaron una leve diferencia en la firmeza, demostrando que la aplicación de quitosano y silicato de sodio pudo influir en la interacción de gases, disminuyendo la pérdida de agua y con ello manteniendo la firmeza durante más tiempo en frutos con el tratamiento que en el control.

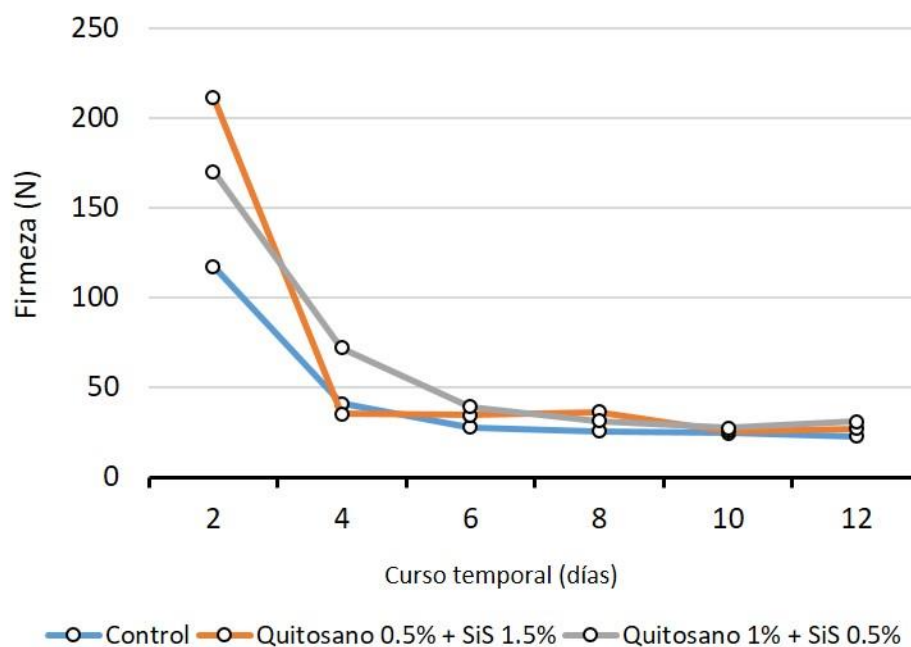


Figura 7.6 Evaluación de la firmeza (N) de frutos de papaya tratados con recubrimientos de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5%, quitosano 1.0% + silicato de sodio 0.5% y control (agua) durante 12 días de almacenamiento a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

De acuerdo a los resultados, los frutos tratados con quitosano 1% + silicato de sodio 0.5%, presentaron una mejor resistencia durante los primeros seis días, conservando de mejor manera la firmeza del fruto, esto coincide con los resultados obtenidos por Bandara *et al.*, (2015), los cuales evaluaron al silicato de sodio de manera individual logrando una firmeza de 17.6 N, y a lo obtenido por Barbosa-Galo *et al.*, (2014), los cuales evaluaron quitosano al 1.25% logrando mantener la firmeza del fruto. Una de las propiedades que tiene el quitosano sobre los frutos es la formación de una barrera que modifica la respiración (producción de etileno y CO<sub>2</sub>), así como la pérdida de agua, reduciéndolos en comparación con los frutos que no poseen el recubrimiento, con ello el fruto conserva sus características morfológicas como las que presenta en su maduración de 3/4 (una vez que es despegado de la planta), debido a que mantiene la turgencia en los tejidos, así como una alteración en la actividad respiratoria, envolviendo la cutícula y obstruyendo a las lenticelas reduciendo la senescencia del fruto durante el almacenamiento (Bhanushree *et al.*, 2018). Wang *et al.*, (2017), mencionan que el silicato de sodio puede influir en el reforzamiento de la pared celular de la cutícula en los frutos, y a su vez, las partículas de este tratamiento pueden colocarse como una obstrucción en las lenticelas provocando una disminución en la respiración que viene acompañada con una disminución en la maduración del fruto.

### - Sólidos solubles totales (°Brix)

De acuerdo con los resultados mostrados en la Fig. 7.7, el contenido de azúcares totales fluctuó durante los 12 días de evaluación, probablemente debido al número de réplicas.

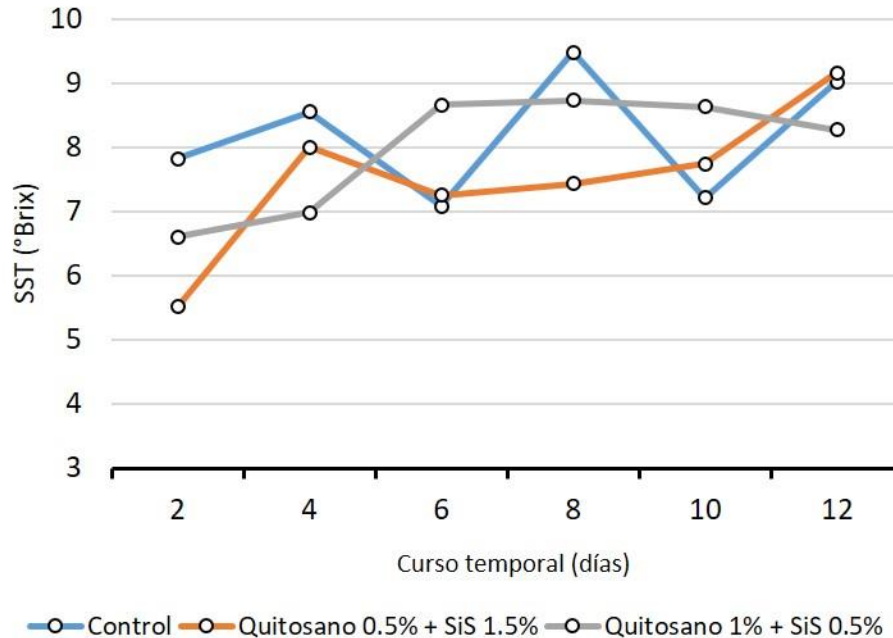


Figura 7.7 Evaluación de sólidos solubles totales (°Brix) en frutos de papaya tratados con quitosano + silicato de sodio durante 12 días a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Resultados similares los obtuvieron Escamilla-García *et al.*, (2018), evaluando durante 15 días frutos de papaya cubiertos con quitosano al 1% sin diferencias entre los frutos que no presentaban recubrimiento y por Bandara *et al.*, (2015), aplicando tratamientos de silicato de sodio a concentraciones de 7500 mg/L sin efectos en la disminución de sólidos solubles totales, por lo que este cambio en el aumento de los sólidos solubles totales se debe principalmente a las actividades metabólicas debido a la descomposición de la pectina y la hidrólisis de carbohidratos durante el almacenamiento (Jayathunge *et al.* 2014), aunque harían falta pruebas como la respiración del fruto para conocer si existe una disminución de esta y pueda tener correlación entre los recubrimientos evaluados en este trabajo y su aumento – descenso del porcentaje de SST durante el tiempo de evaluación, en caso de existir estaríamos observando efectos en la disminución de la senescencia del fruto, dados por la acción del recubrimiento de quitosano combinado con silicato de sodio.

### - Color

Conforme a los resultados obtenidos para el parámetro de luminosidad ( $L^*$ ) no se encontraron diferencias entre los tratamientos control y combinaciones, en las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  (parámetros de cromaticidad), si existen diferencias entre los tratamientos durante el tiempo de evaluación de 12 días, mostrando que en el parámetro  $a^*$  (verde - ; rojo +) el tratamiento de quitosano 0.5% + silicato de sodio 1.5% tuvo una disminución en el cambio de color, haciéndolo más lento debido al tratamiento aplicado en comparación con el control, por otro lado, en el parámetro  $b^*$  no existe una diferencia significativa al día final, (azul - ; amarillo +), demostrando que el fruto mantuvo coloraciones amarillas propias de la transición a su madurez de consumo.

Nuestros resultados preentan similitud con los obtenidos con dos Santos-Camatari *et al.*, (2018), los cuales mencionan que tratamientos de quitosano al 0.5% solo y con almidón se observó un cambio de coloración más lento en frutos de mango en el parámetro  $a^*$ , Vilaplana *et al.*, (2019), mencionan que esta disminución en el cambio de coloración del fruto de papaya se debe a la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO), la cual participa en la senescencia de los frutos, esto puede indicar que debido a la actividad de los tratamientos de quitosano y silicato de sodio, la cual consiste en activar mecanismos inductores del fruto, puedan realizar la tarea de retardo en uno de los parámetros de madurez, así como la participación de una atmosfera modificada propia del quitosano (Ali *et al.*, 2011), retardando la degradación de la clorofila presente en la cutícula del fruto gracias a la disminución en la interacción de gases (dos Santos-Camatari *et al.*, 2018).

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.6 Cambio de coloración en frutos de papaya evaluado durante 12 días a 24 + 2°C, siendo a) luminosidad; b) parámetro a; c) parámetro b.

| Tratamiento                                           | Curso temporal (días) |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|
|                                                       | 2                     | 4    | 6    | 8    | 10   | 12   |
| Control                                               | 34.5                  | 35.2 | 33   | 33.9 | 33.9 | 39.1 |
| Ch 0.5% +<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>1.5% | 42.1                  | 36.5 | 35.2 | 32.5 | 37.5 | 36.6 |
| Ch 1% +<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>0.5%   | 37.7                  | 47.2 | 34.9 | 35.5 | 32.5 | 36   |

a) Luminosidad (L\*)

| Tratamiento                                           | 2    | 4    | 6    | 8    | 10   | 12   |
|-------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Control                                               | 4.8  | 7.7  | 15.5 | 18.6 | 23.2 | 20.9 |
| Ch 0.5% +<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>1.5% | -5.9 | 11.9 | 6.6  | 17.7 | 16.2 | 14.7 |
| Ch 1% +<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>0.5%   | 0.7  | -3.2 | 17.8 | 20.6 | 20   | 21.6 |

b) a\*

| Tratamiento                                           | 2    | 4    | 6    | 8    | 10   | 12   |
|-------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Control                                               | 39.5 | 42.9 | 43.6 | 38.7 | 42.8 | 37.1 |
| Ch 0.5% +<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>1.5% | 24   | 43.6 | 34   | 36   | 34.4 | 35.3 |
| Ch 1% +<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>0.5%   | 35   | 33.6 | 39   | 40.2 | 39.3 | 41.2 |

c) b\*

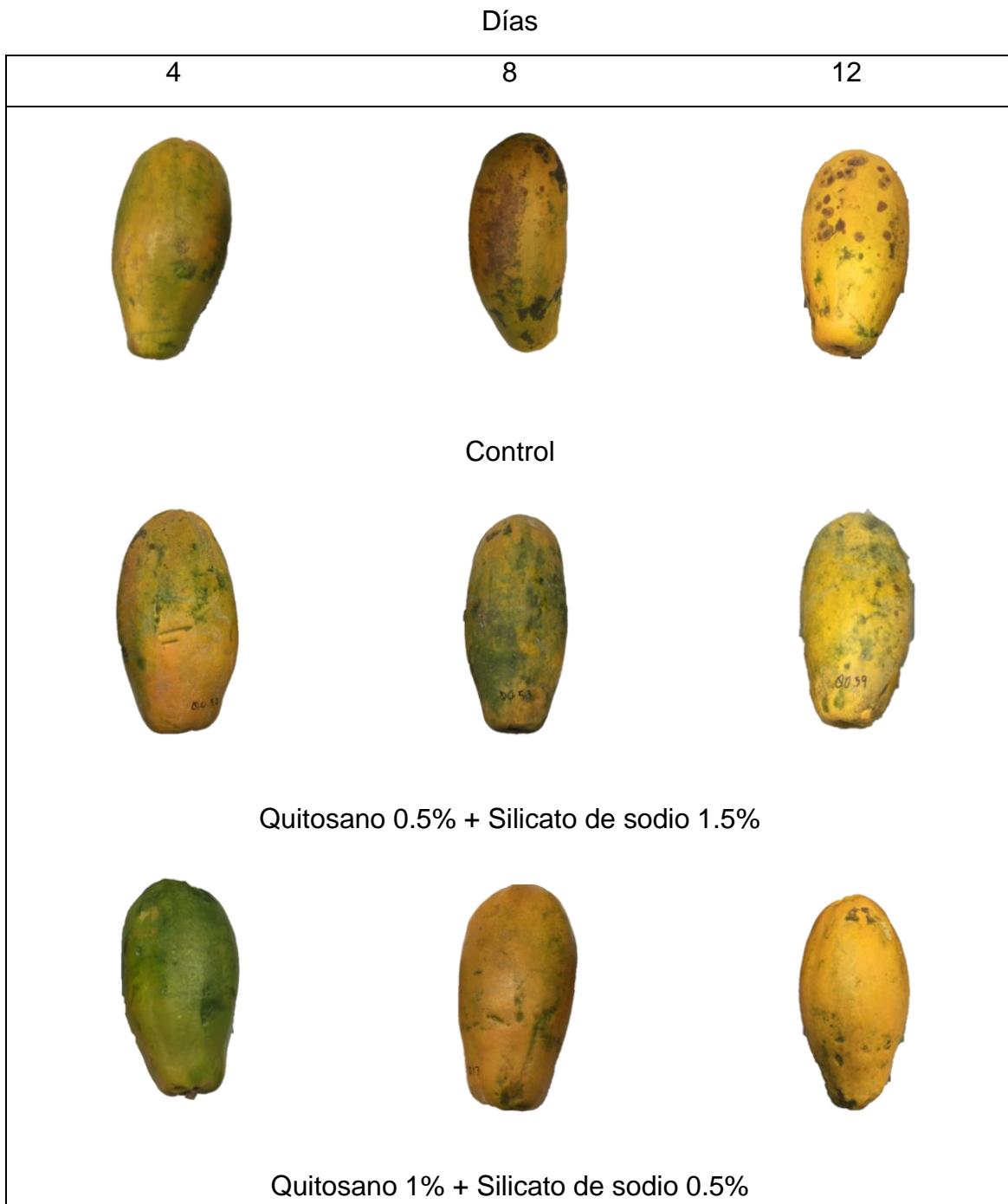


Figura 7.8 Cambio de coloración en frutos cubiertos y no cubiertos con quitosano + silicato de sodio durante un tiempo de evaluación de 12 días en ambiente controlado ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**



### CAPITULO 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La aplicación de tratamientos de quitosano de manera individual, así como su combinación con silicato de sodio reduce de manera significativa el desarrollo *in vitro* del hongo *C. gloeosporioides* aislado de papaya, debido a que ambos tratamientos presentan un mecanismo de acción capaz de afectar la estructura celular del patógeno disminuyendo sus funciones principales de desarrollo (crecimiento micelial y esporulación). Sin embargo, los tratamientos de silicato de sodio aplicados de manera individual presentaron afectaciones mínimas en el desarrollo del hongo, ya que su efecto va más de la mano con la activación de mecanismos de defensa propios de la planta y el fruto.

Las imágenes del MEB muestran afectaciones estructurales en las hifas de *C. gloeosporioides* por lo que refuerza los resultados obtenidos en la aplicación de los tratamientos.

Los tratamientos combinados de quitosano y silicato de sodio mostraron buenos resultados en la disminución del desarrollo micelial de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya, así como, un ligero efecto en los parámetros de calidad, teniendo a la combinación de quitosano 0.5% y silicato de sodio 1.5% con mejores resultados en la mayoría de las pruebas a excepción de la pérdida de peso, siendo quitosano 1% + silicato de sodio 0.5% la que tuvo un mejor comportamiento aunque no de manera significativa.

Nuestros resultados sugieren que la aplicación combinada de quitosano y silicato de sodio como recubrimiento comestible para el control de enfermedades resulta promisorio para atender el problema de antracnosis en papaya.

## **CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA**

## CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Eryani-Raqeeb, A., Muda-Mohamed, M. T., Syed-Omar, S. R., Mohamed-Zaki, A. R., & Al-Eryani, A. R. (2009). Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). *International Journal of Agricultural Research*, 4(2), 53-68.
- Almeida-Castro, A., Reis-Pimentel, J.D., Santos-Souza, D., Vieira-de Oliveira, T., da Costa-Oliveira, M. (2011). Estudio de la conservación de la papaya (*Carica papaya* L.) asociado a la aplicación de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología en Alimentos*. 2(1), 49-60.
- Aloui, H., Licciardello, K., Mazzaglia, F., Muratore, A., Hamdi, G., Restuccia, C. (2014). Efficacy of the combined application of chitosan and locust vean gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *International Journal of Food Microbiology*. 170, 21-28.
- Anaya-Esparza, L.M., Pérez-Larios, A., Ruvalcaba-Gómez, J.M., Sánchez-Burgos, J.A., Romero-Toledo, R., Montalvo-González, E. (2020). Functionalization of edible coating chitosan-based for fruits and vegetables postharvest preservation. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 23 (2020). Artículo (online) URL:  
<http://tip.zaragoza.unam.mx/index.php/tip/article/view/241/306>
- Araya-Vargas, L. (2010). Evaluación de la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la aplicación de sílice en frutos de mango (*Mangifera indica*) var. Tommy atkins para el control de enfermedades poscosecha. *Tesis de licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotécnia*. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. 71 págs.
- Bandara, W.M.K.I., Perera, O.D.A.N., Weerahewa, H.L.D. (2015). Enhancing disease resistance and improving quality of papaya (*Carica papaya* L.) by postharvest application of silicon. Forestry and plantation. *International Journal of Agriculture*. 1(24-27), 182 págs.
- Basso, A.S., Conci, F.S. (2007). Producción conjunta de silicato de sodio y derivados. *Cátedra de organización y proyecto industrial*. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 182 págs.
- Bautista-Baños, S., Dharini, S., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., Hernández-López, M. (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection*. 49: 8-20.

- Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R.I., Correa-Pacheco, Z., Corona-Rangel, M.L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 23(2): 103-121.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., Fallik, E. (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis cinérea* in cucumber plants by means of chitosan. *Elsevier. Crop Protection*. 22(2): 285-290.
- Berumen-Varela, G., Coronado-Partida, L.D., Ochoa-Jiménez, V.A., Chacón-López, M.A., Gutiérrez-Martínez, P. (2015). Effect of chitosan on the induction of disease resistance against *Colletotrichum sp.* in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Investigación y Ciencia*. 23(66): 16-21.
- Bi Y., Tian S.P., Guo Y.R., Ge, Y.H., Qin, G.Z. (2006). Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons: induced resistance and fungistatic effects. *Plant Dis*. 90: 279–283.
- Binyamini, N., Schiffmann-Nadel, M. (1972). Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*. 62: 592-594.
- Bogantes-Arias, A., Mora-Newcomer, E. (2013). Incidencia y severidad de la antracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía mesoamericana*. 24 (2): 441-417.
- Botero-Ospina, M.J. (1999). Estudio de la interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., agente causal de la antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betacea* (Cav.) Sendt.). *Tesis de Maestría en Ciencias*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 65 págs.
- Chien, P., Sheu, F., Lin, H. (2007). Coating citrus (Murcotttangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food chemistry. Elsevier*. 100, 1160-1164.
- Contreras-Hernández, C.A. (2006). Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum spp.* Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), garnadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mangifera indica* L) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. 115 págs.
- De Ancos, B., González-Peña, D., Colina-Coca, C., Sánchez-Moreno, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 16 (1): 8-17.

- Dos Santos-Camatari, F.O., Lins de Aquino-Santana, L.C., Gutiérrez-Carnelossi, M.A., Santos-Alexandre, A.P., Nunes, M.L., Fonseca-Goulart, M.O., Narain, N., Azevedo Pereira-Da Silva, M.A. (2018). Impact of edible coatings base on cassava starch and chitosan on the post-harvest shelf life of mango (*Mangifera indica*) "Tommy atkins" fruits. *Food Science and Technology*. 38:1, 86-95.
- Duan B, Sun PD, Wang XL, Yang C. (2011). Preparation and properties of starch nanocrystals/carboxymethyl chitosan nanocomposite films. *Starch-Starke*. 63(9): Pp. 528-535.
- El-Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Postharvest pathology and mycotoxins. *Phytopathology*. *The American Phytopathological Society*. 82(4): Pp. 398-402.
- Elsherbiny, E.A. & Taher, M.A. 2018. Silicon induces resistance to postharvest rot of carrot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and the posible of defense mechanisms. Elsevier. *Postharvest Biology and Technology*. 140. 11-17.
- Escamilla-García, M., Rodríguez-Hernández, M.J., Hernández-Hernández, H.M., Delgado-Sánchez, L.F., García-Almendárez, B.E., Amaro-Reyes, A., Regalado-González, C. 2018. Effect of a edible coating base don chitosan and oxidized starch on shelf life of *Carica papaya* L., and its physicochemical and antimicrobial properties. *Coatings*. 8:318, 14 págs.
- FAO. (2017). FAOSTAT *Carica papaya*. Estadísticas de la producción mundial. (online) URL: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- FAO. (2017). Perspectivas mundiales de las principales frutas tropicales. Artículo (online) URL: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Tropical\\_Fruits/Documents/Tropical\\_Fruits\\_Spanish2017.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tropical_Fruits/Documents/Tropical_Fruits_Spanish2017.pdf)
- FAO. (2018). Despilfarro de alimentos: datos y cifras clave. *Food wastage footprint*, 1-5. Artículo (online) URL: <http://www.fao.org/news/story/es/item/196450/icode/>
- Fortiz-Hernández, J., Mercado-Ruiz, J., Rodríguez-Félix, A. (2011). Efecto de recubrimiento con quitosano y cera comercial en la calidad de naranja 'valencia' durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. *Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. Hermosillo, Sonora. México*. 12(2): P.p. 164-174.

- Ge, Y., Chen, Y., Li, C., Wei, M., Lv, J., Meng, K. (2017). Inhibitory effects of sodium silicate on the fungal growth and secretion of cell Wall-degrading enzymes by *Trichothecium roseum*. *Journal of Phytopathology*. 2017. P.p.1-6.
- Giraldo-Pedraza, J.D. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *Aplicaciones de quitosano. Researchgate*. DOI: 10.13140/RG.2.1.3350.9287. Artículo (online): URL: [https://www.researchgate.net/publication/277302110\\_PROPIEDADES\\_OBTENCION\\_CARACTERIZACION\\_Y\\_APLICACIONES\\_DEL\\_QUITOSANO](https://www.researchgate.net/publication/277302110_PROPIEDADES_OBTENCION_CARACTERIZACION_Y_APLICACIONES_DEL_QUITOSANO)
- Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., de Souza-Pontes, A.L., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., de Souza, E.L. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 214, 168-178.
- Guo, Y., Liu, L., Zhao, J., Bi, Y. (2007). Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *International Journal of Food Science and Technology*. 42, 1012-1018.
- Guo, Y., Zhou, J., Zhang, J., Zhang, S. (2019). Chitosan combined with sodium silicate treatment induces resistance against rot caused by *Alternaria alternata* in postharvest jujube fruit. *Journal of Phytopathology*. 167, 451-460.
- Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Berúmen-Varela, G., Ramos-Guerrero, A., Hernández-Ibañez, A.M. (2017). *In vitro* response of *Colletotrichum* to chitosan. Effect on incidence and quality on tropical fruit. Enzymatic expression in mango. *Acta agronómica*. 66(2): 282-289.
- Gutiérrez-Martínez, P., Ledezma-Morales, A., Romero-Islas, L.C., Ramos-Guerrero, A., Romero-Islas, J., Rodríguez-Pereida, C., Casas-Junco, P., Coronado-Partida, L., González-Estrada, R. (2018). Chapter 15: Antifungal activity of chitosan against postharvest fungi of tropical and subtropical fruits. *Chitin-Chitosan, Myrlad Functionalities in Science and Technology*. IntechOpen. Open Access: 311-327. DOI: 10.5772/intechopen.76095
- Gutiérrez-Martínez, P., Ramos-Guerrero, A., Rodríguez-Pereida, C., Coronado-Partida, L., Angulo-Parra, J., González-Estrada, R. (2018). Chapter 12: Chitosan for postharvest disinfection of fruits and vegetables. *Postharvest disinfection of fruits and vegetables*. Elsevier Inc. Open Acces: 231-241. DOI: 10.1016/B978-0-12-812698-1.00012-1
- Hae-Jun, P., Sung Ho, K., Hwa Jung, K., Seong-Ho, C. (2006). A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *Plant Pathology Journal*. 22(3), 295-302.

- Hoá, T. T., Ducamp, M. N., Lebrun, M., Baldwin, E. A. (2002). Effect of different coating treatments on the quality of mango fruit. *Journal of Food Quality. Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut. 25*, 471-486.
- Hong, K., Xie, J., Zhang, L., Sun, D., Gong, D. (2012). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae. Elsevier. 144*, 172-178.
- Infoagro. (2018). La antracnosis en cultivo de papaya. *Revista Online Infoagro. Artículo (online) URL:*  
<https://infoagro.com/mexico/la-antracnosis-en-cultivo-de-papaya/>
- Jayathunge, K.G.L.R., Gunawardhana, D.K.S.N., Illeperuma, D.C.K., Chandrajith, U.G., Thilakarathne, B.M.K.S., Fernando, M.D., Palipane, K.B. (2014). Physico-chemical and sensory quality of fresh cut papaya (*Carica papaya*) packaged in micro-perforated polyvinyl chloride containers. *Journal Food Science and Technology 51(12)*, 3918-3925.
- Juárez-Becerra, G.P., Sosa-Morales, M.E., López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 4 (2)*, 14-23.
- Khan, T., Peh, K., Ch'ng, H. (2000). Mechanical, bioadhesivestrength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmaceutical Sciences. 3(3)*, 303-311.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology. 144(1)*, 51-63.
- Kumar-Raghav, P., Agarwal, N., Saini, M. (2016). Edible coating of fruits and vegetables: a review. *International Journal of Scientific Research and Modern Education. R y D modern research publication. 1(1)*, 188-204.
- Li, W., Bi, Y., Ge, Y., Li, Y., Wang, J., Wang, Y. (2012). Effects of postharvest sodium silicate treatment on pink rot disease and oxidative stress-antioxidative system in muskmelon fruit. *European Food Res. Technology. 234*, 137-145.
- Li, L., Tang, X., Ouyang, Q., Tao, N. (2019). Combination of sodium dehydroacetate and sodium silicate reduces sour rot of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology. 151*, 19-25.
- Lopes, U.P., Zambolim, L., Costa, H., Liparini-Pereira, O., Finger, F.L. (2014). Potassium silicate and chitosan application for gray mold management in strawberry during storage. *Crop Protection. 63*, 103-106.
- López-Mora, L.I., Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Jiménez-García, L.F., Zavaleta-Mancera. H.A. (2013). Evaluation of antifungal activity of chitosan in

- Alternaria alternata* and in the quality of “Tommy atkins” mango during storage. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 19(3), 315-331.
- Marpudi, S.L., Abirami, L.S.S., Pushkala, R., Nagarajan, S. (2011). Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using Aloe vera based antimicrobial coating. *Indian Journal of Biotechnology*. 10(1), Pp. 83-89.
- Miramont, S. (2012). Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos. *Tesis de maestría en Tecnología de Alimentos*. Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 109 págs.
- Moscoso-Ramirez, P.A., Palaou, L. (2015). Evaluación de tratamientos poscosecha con inductores químicos de resistencia para el control de las podredumbres verde y azul de los cítricos. *Levante Agrícola*. Págs. 1-7.
- Moscoso-Ramirez, P.A. & Palou, I. (2016). Potassium silicate: a new organic tool for the control of citrus postharvest Green mold. *ISHS Acta Horticulturae*. 287-292
- Montalvo, C., López-Malo, A., Palou, E. (2012). Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6(2), 32-46.
- Mustaffa-Hamzah, H., Osman, A., Ping-Tan, C., Mohamad-Ghazali, F. (2013). Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *Postharvest Biology and Technology*. ELSEVIER. 75, 142-146.
- Niu, L., Bi, Y., Bai, X., Zhang, S., Xue, H., Li, Y., Wang, Y., Calderón-Urrea, A. (2016). Damage to *Trichothecium roseum* caused by sodium silicate is independent from pH. *Canadian Journal of Microbiology*. 62, 1-12.
- NMX–FF–041–SCFI–2007. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano fruta fresca – papaya (*Carica papaya* L.) – Especificaciones (Cancela a la NMX–FF–041–SCFI–2003).
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. (2008). Using polysaccharide-based coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT- Food science and technology*, 41, 1862-1870.
- Pavanello, E.P., Brackmann, A., Dressler-da Costa, I.F., Both, V., Ludwig, V. (2016). Use of sodium metasilicate for management of peach brown rot. *Pesq. Agropec. Trop*. 46(3), 245-253.
- Quintero, C.J., Falguera, V., Muñoz, H.A. (2010). Films and edible coatings: importance and recent trends in fruit and vegetable value chain. *Ciencias – Química*. *Revista Tumbaga*. 5, 93-118.



- Rahman, M.A., Mahmud, T.M.M., Kadir, J., Abdul-Rahman, R., Begum, M.M. (2008). Antimicrobial activities of chitosan and calcium chloride on *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* from papaya. *Pertanika Journal Topical Agriculture Science*. 31(2), 223-232.
- Ramos-García, M.L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L.L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejacal, I., Estrada-Carrillo, M. (2010) (a). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Texcoco, México*. 28 (1), 44-57.
- Ramos-García, M.L., Bautista-Baños, S., Troncoso-Rojas, R., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejacal, I., Guillén-Sánchez, D., Gutiérrez-Martínez, P. (2010) (b). Papaya postharvest handling in Mexico: Use of chitosan and isothiocyanates to control postharvest diseases. *Fresh Produce. Global Science Books*. 4(1), 21-28.
- Ramos-Guerrero, A., González-Estrada, R.R., Hanako-Rosas, G., Bautista-Baños, S., Acevedo-Hernández, G., Tiznado-Hernández, M.E., Gutiérrez-Martínez, P. (2018). Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: *in vitro* tests. *Food Science Biotechnology*. 27(3), 755-763.
- Rodríguez-Alegre, M.T. (2006). Silicatos de sodio: síntesis, caracterización y evaluación de sus propiedades como cerámicos absorbentes de CO<sub>2</sub>". *Tesis de ingeniería química*. Universidad Nacional Autónoma de México. 71págs.
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D., Bosque-Molina, E., Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 15(3), 307-317.
- Roohizadeh, G., Majd, A., Arbabian, S. (2015). The effect of sodium silicate and silica nanoparticles on seed germination and growth in the *Vicia faba* L. *Tropical Plant Research Journal*. 2(2),85-89.
- Saeed, F. Arshad, M.U., Pasha, I., Naz, R., Batool, R., Khan, A.A., Nasir, M.A., Shafique, B. (2014). Nutritional and phyto-therapeutic potential of papaya (*Carica papaya* Linn.): an overview. *International Journal of Food Properties*. 17(7), 1637-1653.
- Salvador-Figueroa, M., Hernández-Ortiz, E., Ventura-González, C., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L. (2013). Effect of chitosan coatings on the Development of *Anastrepha ludens* (Loew) in mango fruits (*Mangifera indica* L.) cv Ataulfo. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*.

- Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. Hermosillo, Sonora. México. 14(1), 14-20.*
- Santamaría-Basulto, F., Sauri-Duch, E., Espadas-y Gil, F., Díaz-Plaza, R., Larqué-Saavedra, A., Santamaría, J.M. (2009). Postharvest ripening and maturity indices for maradol papaya. *Interciencia. 34(8), 583-588.*
- Sañudo-Barajas, J., Báez-Sañudo, M. (2011). La calidad poscosecha de la papaya mexicana. El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador. *Proyecto Interinstitucional SAGARPA-2011-163213. 11 págs.*
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Atlas agroalimentario 2018, Primera edición (Versión digital). *SAGARPA-SIAP. México, D.F. México. 236 págs.*
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Resumen Nacional de Producción. Estadísticas de Producción. *SAGARPA-SIAP. México, D.F. México. 29 págs.* URL: [http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intension/Intencion\\_cosechaPerenne\\_cultivo2018.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intension/Intencion_cosechaPerenne_cultivo2018.pdf)
- Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus Green mold. *Postharvest Biology and Technology. 99, 37-43.*
- Sivakumar, D., Sultanbawa, Y., Ranasingh, N., Kumara, P., & Wijesundera, R. (2005). Effect of the combined application of chitosan and carbonate salts on the incidence of anthracnose and on the quality of papaya during storage. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 80(4), 447-452.*
- Solano-Doblado, L.G., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 21(2), 1-13.*
- Solano, V., Arauz, L.F. (1995). Combate de antracnosis en frutos de papaya mediante aplicaciones de fungicidas en el campo en la zona Atlántica de Costa Rica. *Agronomía Costarricense. 19(2), 25-30.*
- Song, H., Yuan, W., Jin, P., Wang, W., Wang, X., Yang, L., Zhang, Y. (2016). Effects of chitosan/nano-silica on postharvest quality and antioxidant capacity of loquat fruit during cold storage. *Postharvest Biology and Technology. 119, 41-48.*
- Suárez-Quiroz, M.L., Mendoza-Bautista, I., Monroy-Rivera, J.A., Cruz-Medina, J.C., Angulo-Guerrero, O., Gonzáles-Ríos, O. (2013). Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol

- (*Carica papaya* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 14(2), 115-124.
- Tapia-Tusell, R., Cortés-Velázquez, A., Valencia-Yah, T., Navarro, C., Espinoza, E., Moreno, B., Pérez-Brito, D. (2016). Primer informe de *Colletotrichum magnun* causante de antracnosis en papaya en México. *APS Publications*. 1(1), 316-324.
- Tatagiba, J., Liberato, J., Zambolim, L., Ventura, J., Costa, H. (2002). Control y condiciones climáticas favorables a antracnosis de papaya. *Fitopatología Brasileira*. 27(2), 186-192.
- Tesfay, S.Z., Bertling, I., Bower, J.P. (2011). Effects of postharvest potassium silicate application on phenolics and other anti-oxidant systems aligned to avocado fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*. 60, 92-99.
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., Perez-Brito, D. (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). *European Journal Plant Pathology*. 135, 67-79.
- Vázquez-Briones, M.C., Guerrero-Beltrán, J.A. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental*. Universidad de las Américas Puebla. Puebla, México. 10 págs.
- Vázquez-García, E., Mata-Vázquez, H., Ariza-Flores, R., Santamaría-Basulto, F. (2010). Producción y manejo postcosecha de papaya maradol en la planicie Huasteca. *Libro técnico 4. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias*. Centro de Investigación Regional del Noreste. 180 págs.
- Velázquez-Moreira, A., Guerrero-Beltrán, J.A. (2014). Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental*. Universidad de las Américas Puebla. Puebla, México. 8 págs.
- Vilaplana, R., Chicaiza, G., Vaca, C., Valencia-Chamorro, S. (2019). Combination of hot water treatment and chitosan coating to control anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) during the postharvest period. *Crop protection*. 128, 8 págs.
- Wang, Y., Bi, Y., Li, Y.C., Yin, Y., Ge, Y.H. (2010). Antifungal activity of sodium silicate on *Trichothecium roseum* in vitro. *Acta Horticulturae*. 877, 1683-1690.
- Wang, Y., Bi, Y., Ren, Y., Wang, Y., Fan, C., Li, D., Yang, Z. (2012). Control of postharvest diseases and potentiation of reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits treated by sodium silicate. *Scientia Agriculture Sinica*. 45, 2242-2248.

- Wang, M., Gao, L., Dong, S., Sun, Y., Shen, Q., Guo, S. (2017). Role of silicon on plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*. 8(701), 14 págs.
- Win, N., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S., Sangchote, S. (2007). Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on Crown rot disease and quality of banana fruit. *Postharvest biology and technology*. Elsevier. 45, 333-340.
- Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, S., Che, Z., Lin, H. (2016). Chitosan-based coating with antimicrobial agents: preparation, property, mechanism and application effectiveness on fruit and vegetables. *International Journal of Polymer Science*. 2016, 24 págs.
- Xu, T., Gao, C., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., Tang, X. (2019). Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 134, 230-236.
- Yogiraj, V., Goyal, P.K., Chauhan, C.S., Goyal, A., Vyas, B. (2014). *Carica papaya* Linn: an overview. *International Journal of Herbal Medicine*. 2(5), 01-08.
- Youssef, K., Roberto, S., Gonçalves-de Oliveira, A. (2019). Ultra-structural alterations in *Botrytis cinérea* – The causal agent of gray mold – treated with salts solutions. *Biomolecules*. 9(582), 1-17.
- Zavala-León, M.J., Tun-Suárez, J.M., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Sánchez, E., Gutiérrez-Alonso, O., Vázquez-Calderón, M., Méndez-González, R. (2005). Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 11(2), 251-255.
- Zhang, B., Han, S., Jiang, Y., Bi, Y., Zhu, X. (2011). Effects of postharvest sodium silicate treatment on quality and volatile flavor components of apricot fruit during storage. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. 27, 375-381.
- Živković, S., Stevanović, M., Đurović, S., Ristić, D., Stošić, S. (2018). Antifungal activity of chitosan against *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pestic. Phytomed. Belgrado*. 33(3-4), 197-204.

**ANEXOS**

Cuadro 10.1 Diseño experimental completo de la parte *in vitro* (crecimiento micelial) tomando en cuenta a los 26 tratamientos que se realizarán para obtener a los recubrimientos de mayor efectividad.

| <b>Tratamiento</b>                  | <b>Nivel (%)</b> | <b>Tiempo de evaluación (días)</b> |   |   |   |    |
|-------------------------------------|------------------|------------------------------------|---|---|---|----|
| <b>Control</b>                      | 0                |                                    |   |   |   |    |
| <b>Testigo (A. A.)</b>              | 2%               |                                    |   |   |   |    |
| <b>Combinación (SSi- Quitosano)</b> | 0.5 - 0.1        | 2                                  | 4 | 6 | 8 | 10 |
|                                     | 0.5 - 0.5        |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 0.5 - 1          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 0.5 - 1.5        |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1 - 0.1          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1 - 0.5          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1 - 1            |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1 - 1.5          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1.5 - 0.1        |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1.5 - 0.5        |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1.5 - 1          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 1.5 - 1.5        |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 2 - 0.1          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 2 - 0.5          |                                    |   |   |   |    |
|                                     | 2 - 1            |                                    |   |   |   |    |
| 2 - 1.5                             |                  |                                    |   |   |   |    |

Cuadro 10.2 Efecto del quitosano y silicato de sodio sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM%) de *C. gloeosporioides*<sup>1</sup>.

| Tratamiento            | Curso temporal (días) |       |       |        |       |
|------------------------|-----------------------|-------|-------|--------|-------|
|                        | 2                     | 4     | 6     | 8      | 10    |
| Quitosano 0.1%         | 78.54                 | 91.1  | 93.39 | 94.78  | 95.77 |
| Quitosano 0.5%         | 79.76                 | 91.17 | 93.26 | 94.68  | 95.65 |
| Quitosano 1%           | 79.35                 | 91.25 | 93.51 | 94.68  | 95.73 |
| Quitosano 1.5%         | 79.36                 | 91.42 | 92.89 | -93.95 | 94.35 |
| Silicato de sodio 0.5% | -29.12                | -5.64 | -9.24 | -3.20  | 9.8   |
| Silicato de sodio 1%   | -9.28                 | 3.1   | -5.43 | -5.51  | 9.37  |
| Silicato de sodio 1.5% | 14.79                 | 10.93 | -4.31 | -2.56  | 7.67  |
| Silicato de sodio 2%   | 19.25                 | 10.59 | -7.43 | -9.60  | 4.23  |

<sup>1</sup>Cálculo ICM% reportado en Ramos-Guerrero (2018).

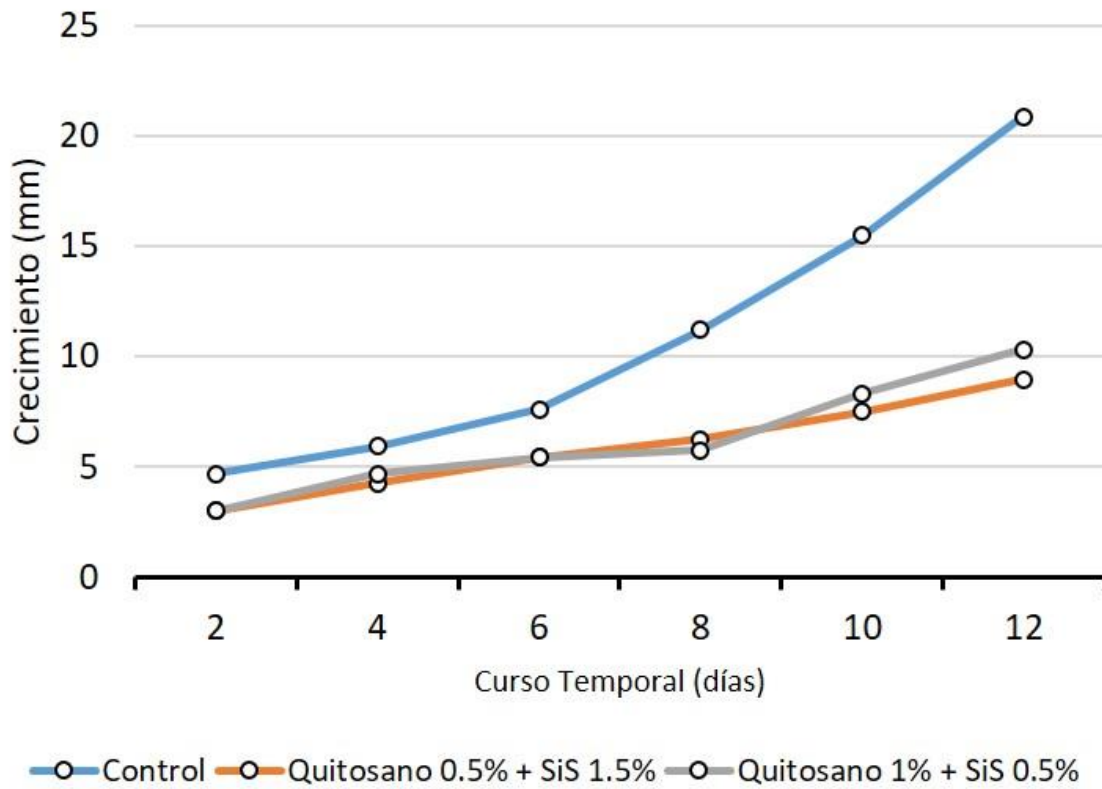


Figura 10.1 Efecto en el desarrollo de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya tratados con y sin quitosano + silicato de sodio durante un tiempo de evaluación de 12 días a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .