



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTO DE NANOFIBRAS A BASE DE  
BIOPOLÍMEROS Y EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE  
FITOPATÓGENOS EN *Averrhoa carambola* L.**

POR:  
IBQ. KARLA DEYANIRA AYÓN MACÍAS

TESIS PROPUESTA A LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

Director de tesis:  
DRA. MONTSERRAT CALDERÓN SANTOYO

Co-director de tesis:  
DR. JUAN ARTURO RAGAZZO SÁNCHEZ

"2021, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"


Tepic, Nayarit, 02/Julio/2021  
**CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
No. Oficio CMCA: 114-2021

**M.C. Luz del Carmen Romero Islas**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**P R E S E N T E**


Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno I.B.Q. Karla Deyanira Ayón Macías con número de control MI4400231, cuyo título es "Aplicación de recubrimientos de nanofibras a base de biopolímeros y extractos vegetales para el control de fitopatógenos en *Averrhoa carambola* L.", a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.




**Dra. Montserrat Calderón Santoyo**  
(Presidente)



**Dr. Juan Arturo Ragazzo Sánchez**  
(Secretario)



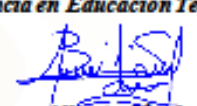
**Dra. María de Lourdes García Magaña**  
(Vocal)



**Dr. Pedro Ulises Bautista Rosales**  
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®*



**Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos**  
Presidente del Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente



Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **17/06/2021**

No. Oficio: 23-383-2021

Asunto: Constancia de Originalidad de Trabajo de Tesis

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez realizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1710, el trabajo de tesis "Aplicación de recubrimientos de nanopartículas a base de alopolímeros y extractos vegetales para el control de fitopatógenos en *Averrhoa carambola* L." como doctor en el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la C. ING KARLA DEYANIRA AYÓN MACIAS con número de control M14400291 cuenta con un nivel de originalidad Excelente según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no conste un plagio.


Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas indexadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin más por el momento envío saludos cordiales

**ATENTAMENTE**

Director de Educación Tecnológica  
Subsecretaría de Tecnología y Calidad de nuestra escuela

  
**MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ**  
DIRECTOR





Ccp. Archivo D-RI



Tepic, Nayarit, **07/Jun/2021**  
No. Oficio: 25-418-2021  
Asunto: Autorización de impresión

**I.B.Q. KARLA DEYANIRA AYÓN MACÍAS**  
**PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado "Aplicación de recubrimientos de nanofibras a base de biopolímeros y extractos vegetales para el control de fitópatógenos en *Averrhoa carambola* L."

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica*  
*Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.*



**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



ccp. Archivo DEPI.



**Tecnológico Nacional de México**  
**Instituto Tecnológico de Tepic**


DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

**ASUNTO:** Carta de sesión de derechos

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el día 08 de JULIO del 2021, el que suscribe **Karla Deyanira Ayón Macías** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Alimentos** con número de control M14400231, manifiesto que todos los resultados derivados de mis estudios de posgrado, realizados bajo la dirección de la Dra. **Montserrat Calderón Santoyo**, pertenecen al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos e investigación. Así mismo manifiesto, que es de mi conocimiento que si estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

Atentamente



---

Karla Deyanira Ayón Macías

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Celida Macías Carlo** y **Jorge Ayón Muñoz**, por haberme educado de la forma en que lo hicieron y entregar una gran parte de su vida para que yo sea lo que soy ahora, por siempre darme todo lo que podían dar de ellos para que nunca me faltara nada, en especial a mi mamá por enseñarme a ser una mujer fuerte, independiente, que sigue sus sueños y cumple sus metas hasta el final, a mi padre por siempre confiar en mí y apoyarme sin miedo ni duda en todas mis decisiones. Agradezco me dieran la vida y enseñanzas que tuve, ya que gracias a eso soy quien soy y estoy en donde estoy.

A mi hermano **Jorge** y mi abuela **Isabel** por apoyarme siempre, escucharme y hacerme saber cuánto me quiere y lo importante que soy para ellos.

A mi tía **Julia** por ser un pilar importante en mi vida, por apoyarme en los momentos difíciles y darme momentos de tanto amor y felicidad, por no dejarme caer nunca y confiar en mí siempre.

A mi ángel más amado **Lauro**, por ser el abuelo más amoroso de todos, por apoyarme y cuidarme desde donde se encuentre.

A mis amigos **Kevin Llanos** y **Héctor Llanos, Heriberto, Antonio, Gema, Claudia, Mónica, Francia, José, Crisel** y en especial a **Maho** por estar presentes desde el inicio de este camino, darme fuerzas, apoyarme, impulsarme y confiar en mi desde principio a fin.

Y en general a mis amigos y compañeros de laboratorio, **Maricarmen, Katia, Rafael, Leonardo, Irving, Yuliana**, porque en ellos encontré la motivación, admiración e inspiración que me faltaba, porque este posgrado sin ellos no hubiera sido lo mismo, por darme los mejores momentos de esta etapa en mi vida y enseñarme mucho más de lo que hubiera aprendido sola.

Con todo el amor y cariño del mundo

Karla Deyanira Ayón Macías

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por siempre darme las fuerzas para seguir adelante, por permitirme llegar hasta donde estoy, poner en mi vida a las personas correctas y guiarme siempre hacia el mejor camino para mí.

Al **Instituto Tecnológico de Tepic**, mi alma máter, porque hasta la fecha me ha permitido crecer profesionalmente hasta un grado de maestría con grandes enseñanzas.

A mi directora de tesis, la **Dra. Montserrat**, quien me dio su apoyo en todo momento y me brindo enseñanzas que nadie más podría darme, al **Dr. Arturo**, por sus aportes a mi trabajo y crecimiento profesional, al **Dr. Ulises** y la **Dr. Lourdes**, por sus aportaciones al presente trabajo.

Agradezco a **CONACyT**, por la beca otorgada con numero 001262 para la realización del presente proyecto.

## RESUMEN

Ayón-Macías, Karla Deyanira. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Junio 2021. Aplicación de recubrimiento de nanofibras a base de biopolímeros y extractos vegetales para el control de fitopatógenos en *Averrhoa carambola* L. Directora: Calderón-Santoyo, Montserrat, Co-Director: Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo.

Nayarit es el quinto estado en producción de carambolo (*Averrhoa carambola* L.) en México. *Averrhoa carambola* L. es una fruta tropical, no climatérica, su color varía de amarillo claro a oscuro y es característica por su forma de estrella. Existen fitopatógenos que lo afectan en postcosecha como *Aspergillus sydowii* y *Cladosporium tenuissimum*. Los recubrimientos comestibles pueden ser funcionalizados con agentes antimicrobianos como extractos vegetales para proveer al fruto protección frente a fitopatógenos. Existen diferentes técnicas para aplicación de recubrimientos, la tecnología innovadora de electrospinning es utilizada para la formación de nanofibras poliméricas mediante fuerzas electrostáticas, sin la utilización de tratamientos térmicos, recientemente se estudia su aplicación en el área de los alimentos. El objetivo de esta investigación fue inhibir fitopatógenos en *Averrhoa carambola* L. mediante la aplicación de nanofibras adicionadas con extracto vegetal de hoja de *Artocarpus heterophyllus* L. Los extractos vegetales se obtuvieron a partir de hojas de *Coccoloba wifera* y *Artocarpus heterophyllus* L. mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido (EAU) (30 min, 42 kHz) en una mezcla etanol/agua (8:2 v/v) y el extracto de hoja de *A. heterophyllus* L. mediante altas presiones hidrostáticas (APH) (15 min, 250 MPa), los extractos se concentraron y se determinó fenoles solubles totales (FST). Se aisló y purificó un patógeno del fruto de carambolo y posteriormente se identificó mediante características macro y microscópicas de la colonia. Posteriormente, se reactivaron dos cepas previamente aisladas e identificadas en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic. Se realizaron pruebas de patogenicidad y se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los tres fitopatógenos en medio PDA adicionado con extracto vegetal a 0.5, 2.0 y 5.0 mg/ml. Se calculó el porcentaje de inhibición micelial y porcentaje de inhibición de germinación de esporas, como parámetro de selección del extracto. Finalmente se formuló la solución polimérica para obtener las fibras mediante zeína, adicionadas o no con extracto vegetal. Se determinó la actividad antifúngica preventiva y curativa de las fibras *in vivo*; posteriormente se caracterizaron las fibras en base al espesor, ensayo de tracción, WVP, solubilidad en agua, TGA, DSC, eficiencia de encapsulación, SEM e identificación presuntiva de compuestos en extracto y fibras con extracto por HPLC-Masas. Se aisló e identificó el hongo *Aspergillus* spp. del fruto *A. carambola* L. y se comprobó la patogenicidad de las cepas identificadas como *A. sydowii*, *C. tenuissimum* y *Aspergillus* spp. Se observó la estimulación del crecimiento *in vitro* de *Aspergillus* spp. con el extracto hidroalcohólico obtenido de hoja de uva de mar mediante EAU. Se demostró la actividad antifúngica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hoja de jaca obtenido por APH a una concentración de 5.0 mg/ml contra *C. tenuissimum*, *A. sydowii* y *Aspergillus* spp. con 88.18, 99.30 y 82.40% de inhibición respectivamente, presentando 100% de inhibición en la germinación de esporas. Los resultados para porcentaje de incidencia *in vivo* fueron de 0, 25 y 25% y 50, 75 y 38% para efecto preventivo y curativo respectivamente. Se obtuvieron fibras por electrospinning con y sin extracto, uniformes, libres de perlas, con baja permeabilidad al vapor ( $6.79 \pm 0.63$  y  $6.22 \pm 0.77$  (g/m·s·Pa)  $\times 10^{-7}$ ) y baja solubilidad en agua (34 y 39%). Se obtuvieron inhibiciones de 100, 70 y 78% y 77, 70 y 90% para efecto preventivo y curativo respectivamente. Se comprobó por HPLS-Masas la presencia de los compuestos fenólicos como ácido cafeico, cinámico, catequina, naringenina, carvacrol, kaempferol, entre otros en las nanofibras. Así mismo, se obtuvo una eficiencia de encapsulación de 72% del extracto de hoja de jaca. Se determinó una mejora en la estabilidad térmica de las fibras por la adición del extracto, así como termoprotección de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico dentro de las fibras. Fue posible la obtención de fibras con extracto, de tamaño nanométrico, uniformes, resistentes y con baja permeabilidad de agua, capaces de estabilizar los compuestos fenólicos del extracto de hoja de jaca con efecto termoprotector, las cuales formaron un recubrimiento con propiedades antifúngicas, como una alternativa eficiente para el recubrimiento de frutos de *Averrhoa carambola* L.

**Palabras clave:** extractos fenólicos, electrospinning, recubrimientos, actividad antifúngica, fibras.



## ABSTRACT

Ayón-Macías, Karla Deyanira. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Junio 2021. Application of nanofiber coating based on biopolymers and plant extracts for the control of phytopathogens in *Averrhoa carambola* L. Directora: Calderón-Santoyo, Montserrat, Co-Director: Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo.

Nayarit is the fifth state in production of carambola (*Averrhoa carambola* L.) in Mexico. *Averrhoa carambola* L. is a tropical, non-climacteric fruit, its color varies from light to dark yellow and is characteristic for its star shape. There are phytopathogens that control it in postharvest such as *Aspergillus sydowii* and *Cladosporium tenuissimum*. Edible coatings can be functionalized with antimicrobial agents such as plant extracts to provide the fruit with protection against phytopathogens. There are different techniques for the application of coatings, the innovative electrospinning technology is used for the formation of polymeric nanofibers through electrostatic forces, without the use of heat treatments, its application in the food area has recently been studied. The objective of this research was to inhibit phytopathogens in *Averrhoa carambola* L. by applying nanofibers added with plant extract from the leaf of *Artocarpus heterophyllus* L. Plant extracts were obtained from leaves of *Coccoloba uvifera* and *Artocarpus heterophyllus* L. using the technique of Ultrasound-assisted extraction (EAU) (30 min, 42 kHz) in an ethanol/water mixture (8:2 v/v) and the leaf extract of *A. heterophyllus* L. using high hydrostatic pressure (HHP) (15 min, 250 MPa), the extracts were concentrated and total soluble phenols (FST) were determined.

A pathogen of carambolo fruit was isolated and purified and subsequently identified by macro and microscopic characteristics of the colony. Subsequently two strains previously isolated and identified in the Food Microbiology laboratory of the Instituto Tecnológico de Tepic were reactivated. Pathogenicity tests were performed on the three strains. The *in vitro* antifungal activity of the three phytopathogens was evaluated in PDA medium added with plant extract at 0.5, 2.0 and 5.0 mg/ml. The percentage of mycelial inhibition and percentage of spore germination inhibition were calculated as a selection parameter for the extract. Finally, the polymeric solution was formulated to obtain the fibers by means of zein, added or not with vegetable extract. The preventive and curative antifungal activity of the fibers was determined *in vivo*; Subsequently, the fibers were characterized based on thickness, tensile test, WVP, solubility in water, TGA, DSC, encapsulation efficiency, SEM and presumptive identification of compounds in extract and fibers with extract by HPLC-Mass. The fungus *Aspergillus* spp. was isolated and identified from the fruit *A. carambola* L. and the pathogenicity of the strains identified as *A. sydowii*, *C. tenuissimum* and *Aspergillus* spp. *In vitro* growth stimulation of *Aspergillus* spp. was observed with the hydroalcoholic extract obtained from sea grape leaf by UAE. The *in vitro* antifungal activity of the hydroalcoholic extract of jackfruit leaf obtained by APH at a concentration of 5.0 mg/ml was demonstrated against *C. tenuissimum*, *A. sydowii* and *Aspergillus* spp. with 88.18, 99.30 and 82.40% inhibition respectively, presenting 100% inhibition in spore germination. The results for percentage of incidence *in vivo* were 0, 25 and 25% and 50, 75 and 38% for preventive and curative effect respectively. Fibers were obtained by electrospinning with and without extract, uniform, free of beads, with low vapor permeability ( $6.79 \pm 0.63$  and  $6.22 \pm 0.77$  (g/m·s·Pa)  $\times 10^{-7}$ ) and low solubility in water (34 and 39%). Inhibitions of 100, 70 and 78% and 77, 70 and 90% were obtained for preventive and curative effect respectively. The presence of phenolic compounds such as caffeic acid, cinnamic acid, catechin, naringenin, carvacrol, kaempferol, among others, in nanofibers was verified by HPLS-Mass. Likewise, an encapsulation efficiency of 72% of the jackfruit leaf extract was obtained. An improvement in the thermal stability of the fibers was determined by the addition of the extract, as well as thermoprotection of the compounds present in the hydroalcoholic extract within the fibers. It was possible to obtain fibers with extract, of nanometric size, uniform, resistant and with low water permeability, capable of stabilizing the phenolic compounds of the extract of jackfruit leaf with a thermoprotective effect, which formed a coating with antifungal properties, such as an efficient alternative for the coating of fruits of *Averrhoa carambola* L.

**Keywords:** phenolic extracts, electrospinning, coatings, antifungal activity, fibers.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIV
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	5
2.1. Generalidades del carambolo ( <i>Averrhoa carambola</i> L.).....	5
2.1.1. Descripción botánica.....	5
2.1.2. Usos de <i>Averrhoa carambola</i> L. ....	6
2.1.3. Cosecha y postcosecha.....	6
2.1.4. Principales productores de <i>Averrhoa carambola</i> L. en México y Nayarit.....	7
2.1.5. Plagas y enfermedades en <i>Averrhoa carambola</i> L.....	8
2.2. Actividad antifúngica en extractos vegetales.....	9
2.2.1. Extracto de <i>Artocarpus heterophyllus</i> .....	9
2.2.2. Extracto de <i>Coccoloba uvifera</i> .....	10
2.3. Recubrimientos y biopolímeros como conservadores y encapsulantes.....	11
2.4. Técnica de electrospinning.....	13
2.4.1. Principio de electrospinning.....	13
2.4.2. Parámetros de la técnica de electrospinning.....	14
2.4.3. Disolventes utilizados en electrospinning.....	15
2.4.4. Técnica de electrospinning como generador de recubrimiento en alimentos.....	15
3. Justificación.....	17

4.	Objetivos .....	19
4.1.	Objetivo general.....	19
4.2.	Objetivos específicos .....	19
5.	Materiales y métodos .....	21
5.1.	Recolección de materia prima.....	21
5.2.	Obtención de extractos vegetales.....	21
5.3.	Aislamiento e identificación de patógenos (micro y macroscópicos) .....	21
5.4.	Ensayos de patogenicidad en Carambolo .....	22
5.5.	Identificación Morfológica .....	22
5.6.	Evaluación de grado de inhibición de extractos vegetales .....	23
5.7.	Inhibición de germinación de esporas.....	23
5.8.	Determinación de fenoles solubles totales.....	24
5.9.	Elaboración de nanofibras por electrospinning .....	24
5.10.	Evaluación de inhibición recubrimiento - fitopatógenos <i>in vivo</i> .....	25
5.10.1.	Efecto Preventivo .....	25
5.10.2.	Efecto curativo.....	25
5.11.	Caracterización de las nanofibras.....	25
5.11.1.	Propiedades mecánicas .....	25
5.11.2.	Propiedades fisicoquímicas .....	26
5.11.3.	Propiedades térmicas .....	27
5.11.4.	Propiedades estructurales .....	27
5.11.5.	Cálculo de eficiencia de encapsulación.....	28
5.11.6.	Evaluación de las nanofibras por HPLC-Masas .....	28
6.	Resultados y discusión .....	30
6.1.	Identificación de presuntiva del hongo patógeno .....	30

6.2.	Ensayos de patogenicidad en Carambolo .....	30
6.3.	Obtención de extractos hidroalcohólicos de hoja de jaca y hoja de uva de mar....	31
6.3.1.	Contenido de fenoles solubles totales .....	32
6.4.	Evaluación de grado de inhibición de los fitopatógenos usando extractos hidroalcohólicos de hoja de jaca y de uva de mar. ....	34
6.5.	Inhibición de germinación de esporas.....	41
6.6.	Inhibición recubrimiento-fitopatógenos <i>in vivo</i> .....	43
6.7.	Caracterización de las nanofibras .....	52
6.7.1.	Espesor del recubrimiento .....	52
6.7.2.	Ensayo de tracción.....	52
6.7.3.	Permeabilidad de vapor (WVP).....	53
6.7.4.	Solubilidad en agua .....	54
6.7.5.	Análisis de calorimetría diferencial de barrido.....	55
6.7.6.	Análisis Termogravimétrico .....	58
6.7.7.	Microscopia Electrónica de Barrido .....	62
6.7.8.	Eficiencia de encapsulación.....	64
6.7.9.	Identificación de compuestos en el extracto etanólico y en las fibras con extracto por HPLC-Masas.....	65
7.	Conclusiones .....	69
8.	Bibliografía.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Averrhoa carambola</i> L.....	5
Figura 2. Equipo de electrospinning.....	14
Figura 3. Extractos etanólicos de hoja de jaca (izquierda) y hoja de uva de mar (derecha). .....	332
Figura 4. Porcentaje de inhibición micelial de <i>C. tenuissimum</i> utilizando extractos de uva de mar y jaca obtenidos por ultrasonido.....	35
Figura 5. Porcentaje de inhibición micelial de <i>C. tenuissimum</i> utilizando extracto de jaca obtenidos por APH. ....	35
Figura 6. Porcentaje de inhibición micelial de <i>A. sydowii</i> utilizando extractos de uva de mar y jaca obtenidos por ultrasonido.....	36
Figura 7. Porcentaje de inhibición micelial de <i>A. sydowii</i> utilizando extracto de jaca obtenidos por APH.....	37
Figura 8. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Aspergillus</i> spp. utilizando extractos de uva de mar y jaca obtenidos por ultrasonido.....	39
Figura 9. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Aspergillus</i> spp. utilizando extracto de jaca obtenidos por APH. ....	40
Figura 10. Incidencia de <i>Cladosporium tenuissimum</i> en carambolo al día 14. ....	44
Figura 11. Incidencia de <i>Aspergillus sydowii</i> en carambolo al día 14. ....	45
Figura 12. Incidencia de <i>Aspergillus</i> spp en carambolo al día 14. ....	46
Figura 13. Severidad de <i>Cladosporium tenuissimum</i> en carambolo al día 14.....	47
Figura 14 Severidad de <i>Aspergillus sydowii</i> en carambolo al día 14. ....	48
Figura 15. Severidad de <i>Aspergillus</i> spp en carambolo al día 14.....	49
Figura 16. Análisis de DSC para fibra de zeína sin extracto.....	56
Figura 17. Análisis de DSC para fibra de zeína con extracto.....	57
Figura 18. Análisis de DSC para polímero de zeína.....	57
Figura 19. Análisis de TGA para polímero de zeína.....	60
Figura 20. Análisis de TGA para fibra de zeína sin extracto.....	60
Figura 21. Análisis de TGA para fibra de zeína con extracto.....	61
Figura 22. Análisis de TGA extracto etanolico.....	61
Figura 23. Análisis de TGA para Tween 80.....	62

Figura 24. Morfología de fibras sin extracto obtenidas mediante SEM.....	63
Figura 25. Morfología de fibras con extracto obtenidas mediante SEM.....	63

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales estados productores de carambolo en México .....	7
Cuadro 2. Municipios productores de carambolo en Nayarit.....	7
Cuadro 3. Identificación presuntiva macro y microscópica de fitopatógeno aislado.....	30
Cuadro 4. Prueba de patogenicidad en carambolo .....	31
Cuadro 5. Inhibición micelial de <i>Aspergillus spp.</i> aislado de carambolo contra extracto de hoja de uva de mar obtenido por EAU. ....	38
Cuadro 6. Inhibición micelial de hongos fitopatógenos aislados de carambolo, día siete de estudio.....	41
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición en la germinación de esporas de hongos fitopatógenos aislados de carambolo a las 12 h. ....	42
Cuadro 8. Inhibición en la germinación de esporas de hongos fitopatógenos aislados de carambolo a las 12 h. ....	43
Cuadro 9. Carambolos con efecto preventivo al día 14.....	50
Cuadro 10. Carambolos con efecto curativo al día 14.....	51
Cuadro 11. Propiedades físicas y mecánicas de fibras .....	55
Cuadro 12. Análisis de DSC para fibras de zeína y polímero de zeína.....	56
Cuadro 13. Análisis de TGA para fibras de zeína y sus componentes.....	59
Cuadro 14. Identificación tentativa de metabolitos secundarios mediante HPLC-Masas, análisis de extracto etanólico de hoja de jaca y fibra de zeína adicionada con extracto; se indica presencia (+) o ausencia (-) de estos metabolitos. ....	67

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

## 1. Introducción

Nayarit es un importante productor de frutos tales como jaca, mango, plátano, carambolo, etc. ya que tiene un clima tropical y subtropical. Debido a estas condiciones se encuentra como uno de los cinco principales estados en producción de carambolo (*Averrhoa carambola* L.) en México.

El carambolo (*Averrhoa carambola* L.) es una fruta de origen tropical, con sabor que va de ácido a dulce, su color varía de amarillo claro a oscuro y es característica por su forma de estrella debido a sus 5 vértices (Mateus y cols., 2015). Una vez que el fruto es apto para recolección y alcanza su maduración fisiológica, se debe tener especial cuidado con su manejo, puesto que acciones mecánicas podrían dañarlo, además, otro de los mayores problemas latentes son los daños biológicos. La principal plaga que afecta este fruto es la mosca de la fruta, sin embargo, existen otros fitopatógenos que pueden afectarlo, principalmente en postcosecha. En el estado de Nayarit se han identificado *Aspergillus sydowii* y *Cladosporium tenuissimum* como principales patógenos (Castañeda Andrade, 2019).

El daño de fitopatógenos en postcosecha es una de las principales preocupaciones para los productores hortofrutícolas, debido a la pérdida económica que representa. En busca de opciones para conservar la integridad de los frutos durante un mayor periodo se han estudiado diversas alternativas.

Los recubrimientos comestibles están formados por varios componentes los cuales varían dependiendo la utilidad que este vaya a tener, estos componentes son polímeros que pueden ser adicionados con otros agentes los cuales pueden proporcionar actividades adicionales. Estos recubrimientos tienen el propósito de ser vehículos portadores de conservadores, antioxidantes y antimicrobianos. Los extractos de algunas plantas pueden presentar actividades antimicrobianas y pueden ser utilizados como agentes inhibidores naturales, entre los ya identificados se encuentran los extractos de *Artocarpus heterophyllus* L. y algunas especies de *Coccoloba* spp.

El electrospinning es una técnica utilizada en la formación de nanofibras poliméricas mediante fuerzas electrostáticas. Estas fibras son utilizadas en una amplia gama de áreas,



como la farmacología, en ingeniería ambiental, áreas biomédicas y en los últimos años se empieza a estudiar en el área de los alimentos (Erencia y cols., 2017). Existe un gran interés por esta técnica para el área de los alimentos debido a que ofrece ventajas sobre otros tratamientos, pues no utiliza tratamientos térmicos, lo que permite la conservación de la calidad del alimento, así como de las propiedades del material que se encapsula.

Por lo anterior el presente estudio propone la alternativa de aplicar una nanofibra polimérica con extracto vegetal de *Artocarpus heterophyllus* L. o *Coccoloba uvifera* elaborada mediante electrospinning para el control de fitopatógenos en *Averrhoa carambola* L.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

## 2. Antecedentes

### 2.1. Generalidades del carambolo (*Averrhoa carambola* L.)

El carambolo (*Averrhoa carambola* L.), es una fruta de origen tropical originario del sureste asiático de la familia *Oxalidaceae* que puede encontrarse también en condiciones del subtrópico. Se cultiva en diversas regiones tropicales y subtropicales cálidas, entre ellas México (Mateus y cols., 2015).

#### 2.1.1. Descripción botánica

El fruto presenta un patrón de crecimiento sigmoidal simple con tres fases y durante este periodo de desarrollo el tamaño, peso, porcentaje de pulpa, relación de sólidos solubles totales y la acidez total titulable aumentan, mientras que el porcentaje de corteza, la firmeza y acidez del fruto disminuyen. Este fruto es una baya carnosa dorada en su etapa madura, con una cutícula cerosa de color translúcido o dorado pálido que puede medir entre 5-15 cm de longitud y 3-6 cm de ancho. La forma de estrella es característica de este fruto (figura 1) debido a los 4-5 vértices o aristas longitudinales y redondeadas que siempre están presentes. La pulpa tiene color amarillo claro a oscuro, es crujiente y jugosa; el sabor varía desde muy ácido con poco azúcar a muy dulce con poca acidez, esto depende en medida de la variedad utilizada, copa-patrón y las condiciones ambientales. El peso recomendado para comercialización en fresco se encuentra entre 100 y 300 g. Se estima que alrededor del 95% del fruto es comestible, siendo en promedio el 70% pulpa, el 25% corteza y 5 % semilla (Mateus y cols., 2015).



**Figura 1.** *Averrhoa carambola* L.

### **2.1.2. Usos de *Averrhoa carambola* L.**

Los carambolos maduros se comen en fresco, en rodajas empaquetadas al vacío para ensaladas o se usan como guarniciones (Hansraj y cols., 2012). También se cocinan en mermeladas, pudines, tartas, guisos y curry. Se pueden además tener conservas de este fruto, por ejemplo, el fruto maduro deshidratado, confitado o en almíbar, lo que permite la exportación de estos productos con mayor facilidad. Por otra parte, el jugo de carambolo se sirve como bebida refrescante y se pueden elaborar sorbetes y gelatinas (Hansraj y cols., 2012). El principal atractivo de este producto es su actividad antioxidante. Se ha encontrado también que el carambolo es rico en fibra dietaría (Mateus y cols., 2015).

### **2.1.3. Cosecha y postcosecha**

Los frutos se recolectan manualmente preferiblemente maduros, ya que en postcosecha estos tienen un proceso mucho más lento para alcanzar color, aunque sigue perdiendo clorofila y desarrollando carotenoides, mientras que el contenido de azúcares no varía luego de recolectado, ya que es un fruto no climatérico. El punto de recolección comercial es el cambio de color de verde a verde amarillento, de tal forma que ya tenga un contenido de azúcares considerable sin ser demasiado maduros pues esto acorta su vida en postcosecha. Si se deja madurar mucho en árbol el proceso de clasificación, empaque y transporte podría dañar la fruta por acciones mecánicas, principal problema en el manejo poscosecha; este punto de madurez sólo es recomendado para consumo inmediato. Estudios afirman que el cambio de color de la corteza está ligado al aumento de la concentración de azúcares en carambolo siendo por tanto un buen indicador de madurez, además del tamaño del fruto (Mateus y cols., 2015).

Los frutos pueden encontrarse en el árbol en diversas épocas del año, en Nayarit, México el primer periodo de cosecha es entre febrero y marzo (correspondiente a la floración ocurrida en noviembre) y el segundo en los meses de septiembre y noviembre (floración de junio y julio) (Mateus y cols., 2015).

#### 2.1.4. Principales productores de *Averrhoa carambola* L. en México y Nayarit

En Nayarit, México (trópico seco) se cultivan dos especies de carambolo, el cultivar Fwang Tung alcanzó producciones medias de 150 kg/árbol, y el Maha 130 kg/árbol (Mateus y cols., 2015).

**Cuadro 1. Principales estados productores de carambolo en México**

<b>Entidad federativa</b>	<b>Producción (Ton)</b>	<b>Valor Producción (miles de pesos)</b>	<b>Rendimiento (Ton/ha)</b>
<b>Michoacán</b>	182.47	1,267.86	7.3
<b>Jalisco</b>	113.16	775.60	7.54
<b>Morelos</b>	144	965.87	16
<b>Colima</b>	89.57	584.68	8.53
<b>Nayarit</b>	25.84	80.46	3.69

Fuente: Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>, 2018.

El Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera informó los principales productores de carambolo en México en 2018, siendo Michoacán el principal productor seguido de Morelos, Jalisco, Colima y Nayarit, estos se muestran en el cuadro 1, mientras que los principales municipios productores en Nayarit son Tecuala y San Blas, en el cuadro 2 se pueden observar las producciones obtenidas.

**Cuadro 2. Municipios productores de carambolo en Nayarit.**

<b>Municipio</b>	<b>Producción (Ton)</b>	<b>Valor Producción (miles de pesos)</b>	<b>Rendimiento (ton/ha)</b>
<b>Tecuala</b>	14	28.67	2.8
<b>San Blas</b>	11.84	51.79	5.92

Fuente: Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>, 2018.

### **2.1.5. Plagas y enfermedades en *Averrhoa carambola* L.**

El carambolo es relativamente libre de plagas, excepto por las moscas de la fruta. Sin embargo, se reportó por Mateus y cols. (2015) que *Botrytis* spp., *Alternaria* spp. y *Colletotrichum* spp., entre otros hongos pueden afectar la calidad externa de los frutos de carambolo, además de las flores y hojas de esta planta.

En Florida la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* es un problema, así como la mancha foliar puede surgir del ataque de *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp. o *Cercospora averrhoae* (Hansraj y cols., 2012).

En Nayarit se detectaron afectaciones por *Aspergillus sydowii* y *Cladosporium tenuissimum* en el fruto del carambolo (Castañeda Andrade, 2019).

#### **2.1.5.1. *Aspergillus sydowii***

Las especies de *Aspergillus* se encuentran entre los hongos más abundantes en todo el mundo. No son muy selectivos con respecto a las condiciones de crecimiento abiótico. Por ejemplo, pueden crecer en un amplio rango de temperatura (6–55 ° C) y con humedad relativamente baja. Además, las especies de *Aspergillus* se alimentan de una gran variedad de sustratos que incluyen heces de animales y tejidos humanos. No obstante, se encuentran predominantemente en polímeros complejos de plantas y se consideran hongos comunes de descomposición de alimentos. El éxito de *Aspergillus* también se explica por su efectiva dispersión. Las esporas de este género se encuentran entre las estructuras fúngicas más dominantes en el aire, dispersándose en distancias cortas y largas. Los hongos del género *Aspergillus* son conocidos por ser patógenos saprófitos (Krijgsheld y cols., 2013). No obstante, no se tienen estudios sobre patogenicidad en frutos de *A. sydowii*. Sin embargo, en un estudio realizado por Cai y Lu (2012) se aisló e identificó *Aspergillus sydowii* F5 del trigo chino.

#### **2.1.5.2. *Cladosporium tenuissimum***

El hifomiceto dematiáceo *Cladosporium tenuissimum* se conoce desde hace tiempo como un saprófito polífago que se presenta en el aire, el suelo y las superficies de las plantas. Es un

colonizador frecuente de material vegetal senescente o muerto y es común en la filósfera y la rizosfera de las especies vegetales. También se informa como un endófito y un patógeno vegetal facultativo, que causa enfermedades, manchas en las hojas, y podredumbre de semillas, frutos y flor. La naturaleza hiperparasitaria de *C. tenuissimum* fue reportada por Moricca y cols. en 2005.

*Cladosporium tenuissimum* se identificó por tener colonias color grisáceo a marrón oscuro, confluentes, conidióforos erectos, solitarios o en mechones sueltos (Heuchert y cols., 2005).

Se han reportado diversas afecciones de *C. tenuissimum* en frutos, como el causante de la floración del tizón en fresa en Corea (Myeong Hyeon Nam, 2015), así como en arroz (Delgado, 2011), en las vainas del maíz en Carolina del sur (Doilom y cols., 2016), en mango en Sri Lanka (Sinniah y cols., 2012). En Michoacán se detectó presencia de necrosis en flor y fruto de *Mangifera indica* (Fernández-Pavía y cols., 2012).

## **2.2. Actividad antifúngica en extractos vegetales**

Los compuestos con propiedad antifúngica encontrados en las plantas como los extractos fenólicos, pueden afectar a patógenos en diferente grado, ya sea de manera individual o por las mezclas en diferentes concentraciones y proporciones. Así mismo, diversos métodos de extracción son estudiados para salvaguardar las propiedades de las moléculas extraídas de la mejor y más viable manera posible (Villa-Martínez y cols., 2015).

### **2.2.1. Extracto de *Artocarpus heterophyllus***

*Artocarpus heterophyllus* L. posee conocidas actividades antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas, antiinflamatorias y antioxidantes.

Shanmugapriya y cols. (2011), obtuvieron resultados de análisis fitoquímicos de semilla de *A. heterophyllus* L. que mostraban la presencia de alcaloides, taninos y compuestos fenólicos en la extracción con acetona, acetato de etilo, extracto etanólico y extracto acuoso (agua) y encontraron flavonoides en etanol, acetona y extracto acuoso y saponinas en el extracto acuoso.

Se analizó la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos obtenidos, el extracto de acetato de etilo de *A. heterophyllus* L. mostró una considerable actividad antibacteriana contra los aislados bacterianos ya que fue el único extracto que consiguió inhibir todas las cepas bacterianas, principalmente contra *Yersinia* sp. El extracto acuoso crudo sólo fue activo contra especies de *Haemophilus*. El extracto acetónico y etanólico mostraron actividad moderada, sin embargo, mostraron inhibición para los hongos *Cephalosporium* sp, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* y *Candida albicans*. Con concentraciones mínimas inhibitorias que van desde 50 hasta 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Shanmugapriya y cols, 2011).

Vázquez-González (2019) reporta que las fracciones de polaridad intermedia de la hoja de jaca, presentaron actividades antifúngicas contra *C. gloeosporioides* para un extracto obtenido con etanol, se mostró un  $83.78\pm 1.25\%$  de inhibición, mientras que para *P. italicum* fue la fracción con metanol con un  $66.45\pm 5.92\%$  de inhibición, esto es atribuido a la concentración de taninos totales presentes en el extracto, los cuales reducen la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este compuesto en exceso es perjudicial para muchos patógenos, puesto que se convierte en especies de oxígeno altamente reactivas (EOR), promoviendo daño oxidativo en los patógenos, los taninos son capaces de bloquear la actividad de la catalasa producida por algunos patógenos, promoviendo la acumulación de EOR.

### **2.2.2. Extracto de *Coccoloba uvifera***

Existen pocos estudios sobre *Coccoloba uvifera* L. y los componentes que se han podido aislar de esta planta. Aun no existen estudios sobre la actividad antifúngica que estos componentes aislados de la hoja en extractos podrían tener, sin embargo, se sabe que los compuestos fenólicos se encuentran como metabolitos secundarios en todas las plantas, confiriendo resistencia a patógenos, por lo cual se puede atribuir esta resistencia a compuestos como flavonoides, saponinas, polifenoles, taninos, entre otros. Existen pocos reportes sobre la actividad antifúngica en variedades como *Coccoloba acrostichoides*, *Coccoloba mollis* (Barros y cols., 2003), y *Coccoloba dugandiana* (Li, 1999).

Barros y cols. (2003) realizaron análisis fitoquímico para las partes aéreas de *C. acrostichoides*, obteniendo triterpenos, flavonoides, saponinas y taninos para el extracto etanólico. En la extracción con diclorometano identificaron betulina y  $\beta$ -sitosterol. Se



detectaron flavonoides y saponinas en la fracción de acetato de etilo mientras que se mostraron triterpenos y taninos en las fracciones de n-hexano y agua, respectivamente. Se analizó la actividad antibacterial y antifúngica de los extractos. Se obtuvo como resultado para el extracto de etanol que únicamente presentaba actividad antibacterial, mientras que la fracción de n-hexano y de acetato de etilo mostraron ambas actividades. La fracción de agua además de la betulina mostraron únicamente actividad antifúngica. Los análisis se realizaron utilizando *F. oxysporum* y *A. niger*, los cuales no fueron inhibidos por ningún extracto.

Se aislaron ácido gálico, galato de epigallocatequina, miricetina-3-orhamnosido y triterpenos mediante un extracto etanólico de *C. dugandiana*, se realizaron análisis para determinar actividad antifúngica, demostrando que el galato de epigallocatequina resultaba efectivo contra *C. neoformans* (Li, 1999).

Barros y cols. (2011) realizaron el análisis químico de los extractos etanólicos de *C. mollis* que mostró una mezcla de hidrocarburos de cadena larga, ésteres de carboxilo y 3-taraxerona en el extracto de la hoja. Se aislaron e identificaron dos antraquinonas (emodina y fisción) a partir del extracto de raíz. El cribado fitoquímico utilizando los métodos farmacognósticos reveló la presencia de flavonoides y taninos en las hojas y raíces. Las antraquinonas solo se encontraron en el extracto de raíz. Se analizó la actividad antifúngica de los extractos de *C. mollis* y las antraquinonas aisladas de la raíz de esta planta contra *Botryosphaeria ribis*, *B. rhodina* fueron efectivas.

Varios ácidos carboxílicos, ésteres y aldehídos se han identificado para *C. uvifera* (Shaw y cols., 1992), además de realizar la extracción de lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina de distintas partes de la planta obteniendo la mayor fracción de estos compuestos de la hoja utilizando extracción asistida por ultrasonido como método de extracción más efectivo. Aun no se han realizado estudios sobre la actividad antifúngica de *C. uvifera* (Ramos-Hernández y cols., 2018).

### **2.3. Recubrimientos y biopolímeros como conservadores y encapsulantes.**

Un recubrimiento comestible está compuesto por una delgada capa de material protector, integrado por varios componentes, que varían según la utilidad de éste, y pueden ser consumidos como parte del producto. Con el propósito de utilizar recubrimientos comestibles

como vehículos portadores de conservantes, que aseguren una mayor vida útil de los productos recubiertos, se han incorporado diferentes compuestos o mezclas con actividad antimicrobiana que además podrían aportar actividad antioxidante, que actúe en la superficie del producto, extendiendo su vida útil. En la formulación de estos recubrimientos se han incorporado también productos naturales con actividad antimicrobiana procedentes de plantas, organismos marinos, insectos o microorganismos como alternativas viables al uso de antimicrobianos sintéticos (Chiralt y cols., 2012).

Mayachiew y cols. (2009) utilizaron un recubrimiento de quitosano con extracto de galangal como agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, además, Cha y cols. (2002) utilizaron extracto de semilla de uva y toronja como agente antimicrobiano.

Entre los biopolímeros más utilizados para el recubrimiento de alimentos se encuentran el alginato, proteína de suero de leche (WPC), caseinato sódico, caseína, proteína de soya, almidón de yuca, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), quitosano, zeína entre otros (Raybaudi-Massilia y cols., 2012).

La zeína comprende una mezcla compleja de proteínas de almacenamiento que enriquecen las semillas de maíz, donde se organizaron en cuerpos proteicos ubicados en el endospermo. Más de la mitad de los residuos de aminoácidos de la zeína son no polares, lo que la convierte en una de las pocas proteínas naturales que pueden solubilizarse en soluciones acuosas de etanol, pero no en agua debido a su alta hidrofobicidad. La zeína se considera un biopolímero natural, renovable, biodegradable y económico, que se ha examinado como una materia prima potencial para la aplicación de polímeros desde el siglo XX. Recientemente, los estudios de biopolímeros y su aplicación aumentaron significativamente en numerosos campos científicos y diversas industrias. La zeína se ha empleado en numerosas aplicaciones potenciales, incluidos emulsionantes, desarrollo y fabricación de varias películas, plásticos, sustratos para fines biomédicos, sustitutos del trigo en sistemas de masa sin gluten, sistemas de administración de fármacos, envasado de alimentos y materiales de plegado de andamios para la ingeniería celular / tisular. Además, la zeína posee características notables como compresibilidad, flexibilidad, alta tenacidad, brillo y propiedades antioxidantes (Suganya y cols., 2017).

Drosou y cols. (2017) definen la encapsulación como una tecnología para "empaquetar" materiales en forma de micro y nanoestructuras a través del atrapamiento de un agente activo dentro de otra sustancia. En la industria alimentaria, en particular, la encapsulación se utiliza para suministrar una variedad de ingredientes alimentarios en pequeñas cápsulas cuando la adición directa del ingrediente alimentario compromete la calidad del producto alimenticio fabricado. Las películas poliméricas se pueden usar para formar embalajes con permeabilidad diferencial para O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> y vapor de agua, además, estos materiales tienen como objetivo dar brillo a la fruta, apariencia atractiva, reducir la pérdida de peso y la respiración normal de las frutas, sin causar condiciones de anaerobiosis, lo que aumenta la vida útil de varios productos vegetales (Costa y cols., 2011). El objetivo principal de la encapsulación es proteger el material del núcleo de las condiciones ambientales adversas, como los efectos indeseables de la luz, la humedad y el oxígeno, mejorando así la estabilidad del ingrediente funcional y al mismo tiempo promoviendo su liberación controlada o dirigida. Además, el uso de la encapsulación puede aumentar la calidad nutricional de los alimentos, así como aumentar la estabilidad y extender la vida útil del producto.

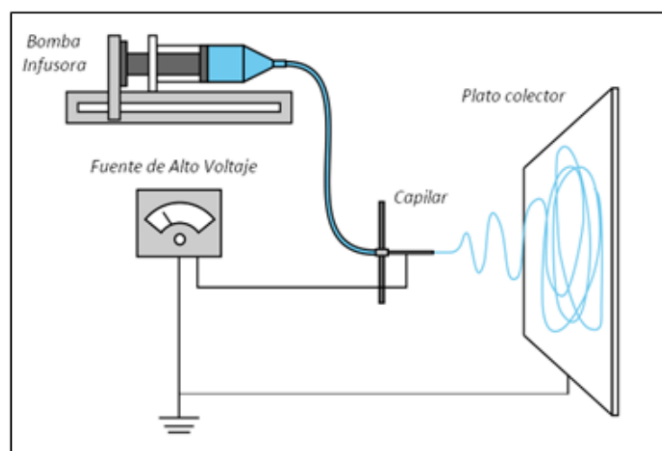
Existen diferentes métodos para la encapsulación de ingredientes alimenticios, el secado por pulverización es una de las técnicas de encapsulación más antiguas y más utilizadas en la industria alimentaria durante varias décadas. Sin embargo, el uso de temperaturas de trabajo relativamente altas durante el proceso de secado puede causar degradación y por lo tanto afectar la estabilidad de los ingredientes térmicamente lábiles. Como resultado, en los últimos años, el electrospinning ha atraído un interés generalizado y ha encontrado la posible aplicación en la industria alimentaria para la producción de nanofibras. La ventaja más interesante de los procesos de electrospinning es que pueden lograr altas eficiencias de encapsulación sin aplicación de tratamiento térmico (Drosou y cols., 2017).

## **2.4. Técnica de electrospinning**

### **2.4.1. Principio de electrospinning**

El principio del electrospinning se basa en que fuerzas eléctricas repulsivas mutuas superan las fuerzas más débiles de tensión superficial en el líquido polimérico cargado (Figura 2). Este proceso ofrece facilidad para producir nanofibras con estructuras porosas controlables,

además de ofrecer muchas ventajas como una proporción superficie-volumen muy alta, posibilidad de controlar la composición química de las fibras, así como su acomodo. El electrospinning se lleva a cabo a temperatura ambiente bajo las condiciones atmosféricas y consiste básicamente en 3 componentes principales tales como: fuente de alto voltaje, un inyector y un colector conectado a tierra, usualmente una placa plana, placa o tambor rotante. Se utiliza la fuente de alto voltaje para cargar con una polaridad a la solución polimérica, la cual es posteriormente acelerada hacia el colector de polaridad opuesta. La solución polimérica que depende de su tensión superficial al final del tubo capilar es sometida a un campo eléctrico, y una carga eléctrica es inducida en la superficie del líquido debido a este campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial. La solución cargada es expulsada de la punta del cono de Taylor como un rápido batido inestable que ocurre entre el tubo capilar y el colector, donde se permite la evaporación del solvente dejando únicamente una fibra polimérica. El hilo sólo es estable en la punta del capilar e inmediatamente después comienza su inestabilidad (Díaz-Ocaña, 2012).



**Figura 2. Equipo de electrospinning (Díaz-Ocaña, 2012).**

#### **2.4.2. Parámetros de la técnica de electrospinning**

El control de las propiedades de las nanofibras obtenidas (diámetro, porosidad, etc.) pasa por un buen conocimiento de los parámetros que intervienen en el proceso de electrospinning que fundamentalmente tienen relación con tres aspectos: las propiedades de la solución de hilatura (viscosidad, concentración, tensión superficial, peso molecular, conductividad), las

condiciones del proceso (voltaje, distancia al colector, caudal) y las condiciones ambientales (humedad y temperatura). (Erencia y cols., 2017)

### **2.4.3. Disolventes utilizados en electrospinning**

Los disolventes utilizados deben tener propiedades como volatilidad, presión de vapor, punto de ebullición y deben mantener la integridad de la solución polimérica. Erencia y cols. (2017) reportan que la elección del disolvente apropiado en función del tipo de polímero seleccionado es uno de los parámetros más importantes que influyen en el proceso de electrospinning, ya que éste determina la viscosidad, conductividad y tensión superficial de la disolución.

### **2.4.4. Técnica de electrospinning como generador de recubrimiento en alimentos**

El creciente interés del consumidor por la promoción de la salud y la prevención de enfermedades a través de una nutrición mejorada ha llevado a numerosos intentos de desarrollar sistemas de entrega de calidad alimentaria, incluido el envasado activo, para encapsular, proteger y liberar de manera controlada los componentes bioactivos. Más específicamente, los compuestos naturales con características antimicrobianas son de gran interés para la industria del envasado activo y su eficiente encapsulación y liberación controlada representan un desafío importante considerando su sensibilidad al calor, el oxígeno y la luz. Recientemente, el electrospinning ha recibido gran atención en los alimentos funcionales y en los sistemas de envasado de alimentos activos. (Drosou y cols., 2017)

En los últimos años, el electrospinning ha atraído el interés de los investigadores debido a sus posibles aplicaciones en materiales alimenticios. Este proceso de electrospinning ha demostrado un gran potencial para producir nanofibras y últimamente se están utilizando para encapsular compuestos bioactivos. Sin embargo, la industria no ha explorado ampliamente las potencialidades de las fibras y partículas en aplicaciones relacionadas con los alimentos como pueden ser frutas, ya que se necesita más investigación para optimizar las condiciones de funcionamiento y las propiedades de la solución para la encapsulación efectiva de diversos bioactivos. (Drosou y cols., 2017)

## **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

### 3. Justificación

Nayarit es uno de los cinco principales productores de carambolo en México, esto se debe a la variedad de condiciones climatológicas que se presentan en el territorio, las cuales permiten el desarrollo de estos frutos. Estos tienen un alto interés en el mercado, sin embargo, el daño por fitopatógenos en carambolo durante la postcosecha resulta en grandes pérdidas, afectando directamente en la economía de los productores y el estado.

Para controlar las pérdidas ocasionadas por fitopatógenos tradicionalmente se recurre al uso de fungicidas sintéticos, sin embargo, en los últimos años se ha buscado disminuir su uso debido a los daños secundarios que estos llegan a presentar, como la contaminación de ecosistemas por su nivel de toxicidad, así como la afección a otras especies entre ellos el ser humano.

Actualmente, el avance de la ciencia y la tecnología tiene un papel importante en el desarrollo de nuevas técnicas para la obtención de productos de interés en beneficio al sector productivo-comercial. En los últimos años se han estudiado alternativas para disminuir los daños causados por fitopatógenos al fruto en postcosecha, así como la radicación del uso de fungicidas sintéticos, por lo cual, se han desarrollado técnicas como el uso de extractos vegetales en donde se ha estudiado la actividad antifúngica que pueden tener además de la aplicación de recubrimientos a base de biopolímeros con extractos.

Por lo que resulta interesante evaluar la alternativa de utilizar recubrimientos a base de nanofibras obtenidas mediante la nueva tecnología de electrospinning, adicionándole un extracto vegetal el cual ayude en la inhibición de fitopatógenos para el fruto de *Averrhoa carambola L.*

Esta nueva tecnología tiene la capacidad de generar y aplicar nanofibras con la ventaja de no utilizar tratamiento térmico, lo cual permite mantener la calidad del fruto integra, así como la conservación de las propiedades del extracto y su liberación controlada de las nanofibras, lo cual permitiría inhibir el desarrollo de fitopatógenos.

## **CAPÍTULO 4. OBJETIVOS**



## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Inhibir el desarrollo de fitopatógenos en *Averrhoa carambola* L. mediante la aplicación de nanofibras adicionada con extracto vegetal de hoja de *Artocarpus heterophyllus* L.

### 4.2. Objetivos específicos

- Aislar y purificar los hongos fitopatógenos que causen enfermedades en *Averrhoa carambola* L.
- Evaluar la patogenicidad de cepas aisladas de *Averrhoa carambola* L.
- Evaluar la actividad antifúngica de extractos vegetales obtenidos de *Artocarpus heterophyllus* L. y *Coccoloba uvifera* sobre los hongos fitopatógenos.
- Establecer condiciones de proceso de electrospinning para elaborar nanofibras a base de biopolímeros y el extracto vegetal con actividad antifúngica.
- Caracterizar las nanofibras en cuanto a propiedades mecánicas, fisicoquímicas y térmicas y estructurales.
- Evaluar los compuestos encapsulados en la matriz biopolimérica por HPLC-masas

## **CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Recolección de materia prima**

Los frutos de carambolo se recolectaron del municipio de Tepic, Nayarit, seleccionando los frutos en estado de madurez de consumo y posteriormente se almacenaron. Los extractos se obtuvieron de la hoja de uva de mar y la hoja de Jaca.

### **5.2. Obtención de extractos vegetales**

La obtención de los extractos de *Coccoloba uvifera* y *Artocarpus heterophyllus* L. se realizó mediante la metodología utilizada por Vázquez-González (2019). La extracción por ultrasonido se realizó con un baño ultrasónico (Kendal, modelo CD-4820), para lo cual se homogenizaron 50 g de muestra con 500 ml de una solución de Et:Ag en una relación 8:2 (v/v) a 10 °C en un vaso de precipitado, posteriormente se aplicaron ondas sónicas durante 30 min a una frecuencia de 42 kHz. La extracción por APH se realizó con un equipo de altas presiones hidrostáticas modelo CIP42260 (Avure Autoclave Systems, Eri PA USA), se pesaron 50 g de muestra y se mezclaron con 500 mL de Et:Ag en una relación 8:2 (v/v) a 10 °C, se empacaron al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad (FoodSaver) empleando un sistema de sellado al vacío (FoodSaver modelo V38305) y consecutivamente se presurizó a 20 °C con una presión de 200 MPa por 15 min. Después de aplicar los diferentes métodos de extracción, las muestras se filtraron usando papel filtro estéril (Millipore) con un tamaño de poro de 45 µm, el filtrado obtenido se colocó en un evaporador rotatorio a 40 °C para eliminar el solvente y, por último, las muestras se almacenaron a -18 °C hasta su posterior uso.

### **5.3. Aislamiento e identificación de patógenos (micro y macroscópicos)**

Los frutos se recolectaron en el municipio de Tepic en el estado de Nayarit, seleccionando los frutos en estado de madurez de consumo, se incubaron en una cámara de almacenamiento a 25°C y 80 ±2% de humedad, se monitorearon los cambios cada 24 h hasta aparición de lesiones visibles. Se tomaron segmentos de 1cm<sup>2</sup> (50% tejido dañado, 50% tejido sano) de la

fruta en tres diferentes zonas: (1) zona del pedúnculo, (2) zona ecuatorial, y (3) zona inferior. Estas muestras se desinfectaron por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron con agua estéril y se transfirieron a placas con agar papa dextrosa PDA. Estas cajas se incubaron a 28 °C con 80% de humedad relativa hasta que el micelio fue visible, los micelios del hongo desarrollado se sembraron en cajas Petri con agar papa dextrosa hasta que se obtuvieron cepas puras (Castañeda Andrade, 2019).

#### **5.4. Ensayos de patogenicidad en Carambolo**

Se preparó una suspensión de esporas de las cepas aisladas y purificadas con 7 días de crecimiento, para lo cual, se agregaron 10 ml de solución salina estéril al 0.85 % NaCl (m / v), y se raspo el micelio fúngico con una varilla de vidrio en condiciones asépticas, posteriormente, se filtró la solución usando una gasa estéril. El filtrado obtenido se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml usando una cámara Neubauer y la fórmula de diluciones.

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Los frutos sanos, se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % (m / v) por 1 min, se enjuagaron con agua destilada con el fin de eliminar el polvo y microorganismos saprófitos, posteriormente, estos se colocaron en una campana de flujo laminar para su secado. Con un punzón estéril (3 mm de diámetro, 4 mm de profundidad) se realizó una herida en el fruto y se inocularon 10 µL de la suspensión de esporas. Los frutos se llevaron a incubación a la cámara de incubación a  $28 \pm 3$  °C y 80 % HR, revisando diariamente hasta observar la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad (Trinidad-ángel y cols., 2017).

#### **5.5. Identificación Morfológica**

Los hongos resultantes positivos a ensayos de patogenicidad, se clasificaron de acuerdo a claves dicotómicas observando el color, apariencia, tipo de micelio (largo, corto), coloración del medio (Girmé y cols., 2014). Los hongos se inocularon por medio de la técnica de microcultivo cubos de PDA incubados a 28 ° C durante 10 días o hasta observar el

crecimiento de hifas y esporas usando un microscopio (MOTIC BA 300) magnificación (100X).

### **5.6. Evaluación de grado de inhibición de extractos vegetales**

Para evaluar el grado de inhibición de los fitopatógenos identificados (*Cladosporium tenuissimum* (AC13) y *Aspergillus sydowii* (AC19) y *Aspergillus* spp. (AK1)) con los extractos obtenidos a partir de hoja de jaca y hoja de uva de mar se realizará un ensayo antifúngico *in vitro* utilizando la metodología mencionada por González-Estrada y cols. (2017), utilizando concentraciones de 0.5, 2.0 y 5.0 mg / ml.

### **5.7. Inhibición de germinación de esporas**

La inhibición de germinación de esporas fue determinada de acuerdo a González Estrada y cols., (2017) con algunas modificaciones, previo al experimento los fitopatógenos fueron cultivados en PDA durante 7 días a 28 °C. Se añadieron 10 ml de solución salina estéril que contenía Tween 80 (0.1% v/v) a cada placa para recuperar las esporas, las suspensiones de las mismas se hicieron frotando la superficie de agar con un asa Drigalsky estéril. Después, la suspensión se filtró con una gasa estéril y se recuperó en un tubo cónico estéril. La concentración de esporas se ajustó a  $1 \times 10^5$  esporas / ml por recuento microscópico en cámara Neubauer, en 8 ml de caldo papa dextrosa (PDB por sus siglas in inglés) se agregaron 160  $\mu$ l de suspensión de esporas del hongo ( $1 \times 10^5$  esporas / ml) y 400  $\mu$ l de cada extracto a diferentes concentraciones (0.5, 2 y 5 mg / ml). Los tubos se incubaron en un agitador rotatorio a 110 rpm a 28 °C; la tasa de germinación de los hongos se determinó microscópicamente midiendo el porcentaje de germinación de los hongos durante 8 h para ambos hongos, en muestras de aproximadamente 200 esporas. Se consideraron las esporas germinadas cuando la longitud del tubo germinal fue igual o mayor al diámetro de la espora inicial. Se usó como control tubos con PDB sin extracto. Se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{Inhibición}(\%) = \frac{\text{No. de esporas control} - \text{No. de esporas tratamiento}}{\text{No. de esporas control}} \times 100$$

## **5.8. Determinación de fenoles solubles totales**

El contenido de FST se determinó con la metodología descrita por Gutierrez y cols. (2008) se tomaron 1 ml de cada extracto fenólico se diluyó 1/100, se tomó 1 ml de las diluciones anteriores y se agregó 0.8 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma-Aldrich), se homogenizó y posteriormente se le agregaron 0.2 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % y se llevó a un volumen de 10 ml con agua destilada, se homogenizaron los matraces y se dejaron reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos (García y cols., 2015). Transcurrido este tiempo las muestras se leyeron en un lector de microplacas (BioTek modelo Synergy/HTX multi-mode reader) a 760 nm. Las estimaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de hoja de jaca en base seca (Loizzo y cols., 2010). Para la determinación de FST se realizaron lecturas de densidad óptica de las diferentes concentraciones del estándar (0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml ácido gálico) y se utilizaron para la construcción de la curva de calibración, la gráfica obtenida mostro un valor de R<sup>2</sup> de 0.9959. Los valores obtenidos en la curva de calibración fueron utilizados para cuantificar el contenido de FST presente en las hojas de jaca y uva de mar para los métodos empleados.

## **5.9. Elaboración de nanofibras por electrospinning**

Para la obtención de las nanofibras se utilizó el equipo de electrospaying marca Fluidnatek® LE-10, equipado con una fuente de alimentación de 0-30 kV de alto voltaje variable; el ánodo se fijó a una aguja de acero inoxidable con un diámetro interno de 0,9 mm que se conectó a través de un tubo a la solución polimérica que estuvo contenida en una jeringa de plástico de 5 ml (Fernández y cols., 2009). La aguja se conectó al electrodo emisor de polaridad positiva de la fuente de alimentación de alta tensión. Las nanofibras se electro estiraron directamente sobre los frutos de carambolo, dando tratamientos preventivos y curativos. Para la solución polimérica se utilizó una concentración de sólidos totales del 24% p/p de zeína, se utilizó Tween 80 como surfactante (3%) y una solución hidroalcohólica (etanol:agua 8:2) como disolvente (fase acuosa). Se añadió la solución en un tubo Falcon que contenga el extracto vegetal (22% p/p o 5 mg/ml) y se llevaron a agitación durante 15 minutos utilizando un agitador magnetico IKA C-MAG HS 7 durante 15 min. Las condiciones en las cuales se

procesó la solución fueron a la velocidad de flujo de 0.350 ml/h, un voltaje de 21 kV y una distancia de 22 cm de la punta de la aguja al fruto. Los frutos tratados se almacenaron en cámaras a temperatura y HR controladas para su evaluación.

## **5.10. Evaluación de inhibición recubrimiento - fitopatógenos *in vivo*.**

### **5.10.1. Efecto Preventivo**

Se inocularon los hongos fitopatógenos aislados e identificados a 10 frutos por tratamiento, realizando 6 heridas mediante un punzón a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas / ml posterior al tratamiento de recubrimiento con nanofibras puras y nanofibras con extracto, posteriormente se almacenaron durante 7 días en una cámara de incubación a  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  y 80 % HR, revisando diariamente hasta observar la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad. Se evaluaron la incidencia de la enfermedad (porcentaje de fruta infectada), las heridas infectadas (porcentaje) y la severidad (diámetro de la lesión). Una fruta se consideró descompuesta cuando al menos una de las heridas inoculadas estuvo infectada.

### **5.10.2. Efecto curativo**

Se inocularon los hongos fitopatógenos aislados e identificados antes del tratamiento de recubrimiento con nanofibras puras y nanofibras con extracto antifúngico, posteriormente se incubaron en una cámara de incubación a  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  y 80% HR durante 7 días, revisando diariamente hasta observar la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad. Los análisis evaluados fueron los mencionados para efecto preventivo.

## **5.11. Caracterización de las nanofibras**

### **5.11.1. Propiedades mecánicas**

#### **5.11.1.1. Espesor del recubrimiento**

El espesor de cada película se midió con un micrómetro (Mitutoyo, Kanagawa, Japón) en diez posiciones aleatorias de las películas. La permeabilidad al vapor de agua (WVP) y las propiedades mecánicas se calcularon en función del espesor promedio.

### **5.11.1.2. Ensayo de tracción**

Las mediciones de tracción se realizaron usando un analizador de textura (Stable Micro Systems, Modelo TA-XT plus, Surrey, Reino Unido). La velocidad del motor se ajustó a  $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ , diámetro de punción 2 mm. Se evaluó un promedio de seis mediciones para cada muestra (recubrimiento puro y recubrimiento con extracto), la prueba se realizó por triplicado para obtener fuerza de punción.

## **5.11.2. Propiedades fisicoquímicas**

### **5.11.2.1. Permeabilidad al vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua de las nanofibras se determinó gravimétricamente usando una técnica estandarizada modificada (AFNOR NFH00-030, 1974). Cada película de muestra (discos de 4,0 cm) se colocó entre dos anillos de teflón en la parte superior de una celda de vidrio que contenía agua destilada, proporcionando un 100% de humedad relativa. Las celdas se mantuvieron luego a  $25^{\circ}\text{C}$  en un desecador que contenía gel de sílice seco asegurando 0% de HR. La medición se realizó a un gradiente de 90-95% HR. Durante 7 días se pesaron las celdas de prueba. Cuando la relación entre la pérdida de peso y el tiempo sea lineal, la pendiente de la gráfica se usó para determinar la velocidad de transferencia de vapor de agua a través de la película. Para cada película, se realizaron tres determinaciones (González-Estrada y cols., 2018).

### **5.11.2.2. Solubilidad en agua**

La solubilidad en agua se determinó usando circunferencias de película de 4 cm de diámetro, que se colocaron en un matraz de dilución con 50 ml de agua destilada a  $25^{\circ}\text{C}/2 \text{ h}$  con agitación suave continua a 100 rpm. La solución se filtró a través de papel de filtro (Whatman # 1), y la película no disuelta restante se desecó a  $105^{\circ}\text{C}/24 \text{ h}$ . El peso de la materia seca solubilizada se calculó restando el peso de la materia seca insolubilizada del peso inicial de la materia seca y se expresó como un porcentaje del peso total (Murrieta-Martínez y cols., 2019). La prueba se realizó utilizando cinco muestras y se repetirá tres veces.



### **5.11.3. Propiedades térmicas**

#### **5.11.3.1. Termogravimetría (TGA)**

Se colocaron 5-10 mg de muestra en una charola de platino HT en atmósfera de N<sub>2</sub>, a una velocidad de calentamiento de 10°C / min, en un rango de temperatura de 25-600 °C, en el equipo de termogravimetría TGA Discovery 550. La pérdida de peso con respecto a la temperatura se expresa de acuerdo a la curva termogravimétrica TG y la curva termogravimétrica derivada de primer orden TGD mediante el software TRIOS. Este análisis se realizó para cada uno de los componentes de las nanofibras y para las mismas nanofibras.

#### **5.11.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La determinación de la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) y algunos eventos térmicos, se realizó en el equipo de calorimetría diferencial de barrido DSC Discovery 250. Se colocaron de 1 a 3 mg de muestra en una charola de aluminio hermética; se utilizó una charola de aluminio hermética vacía como referencia y se equilibró a 25 °C. Se aplicó un rango de calentamiento de 25-400 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. El calorímetro se calibró con el estándar indio (Roos, 2005). Durante la medición se utilizó nitrógeno como gas portador (50 ml/min). Los datos se analizaron en el software TRIOS. Este análisis se realizó para cada uno de los componentes de las nanofibras y para las mismas nanofibras.

### **5.11.4. Propiedades estructurales**

#### **5.11.4.1. Microestructuras de nanofibras por SEM**

Se realizó un estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las nanofibras. Se utilizó un equipo SEM SEC 3200 M, Corea del Sur, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Se colocaron 2 mg de muestra a una cinta adhesiva de doble cara colocada en un portaobjetos de metal; las muestras fueron metalizadas con una capa fina de oro durante 3 min. Todas las imágenes se tomaron buscando un campo representativo de la muestra que este lo más plano posible, empleando una magnificación de 500 a 15000x aumentos con 25 µm.

### 5.11.5. Cálculo de eficiencia de encapsulación.

Para la determinación del compuesto encontrado, se pesaron X mg de nanofibras (conociendo el contenido teórico de mg de compuesto), se aplicó el método de extracción y el filtrado resultante se analizó por espectroscopía UV a 760 nm y se calculó el % de eficiencia de encapsulación aplicando la ecuación 2.

$$\%EE = \frac{mg \text{ compuesto encontrado}}{mg \text{ compuesto teórico}} \times 100 \quad Ec. 2$$

### 5.11.6. Evaluación de las nanofibras por HPLC-Masas

Los compuestos fenólicos fueron separados del extracto vegetal usando un sistema Agilent HPLC 1260/espectroscopia MS 6100 (Agilent Technologies, CA, USA), el cual consiste en una desgasificadora, un inyector automático y una bomba binaria equipada con una columna analítica Poroshell 120 EC-C18 (250 x 4.6 mm, un tamaño de poro 5 µm) de Agilent Technologies. Un gradiente de elución fue programado usando como fase móvil A, agua acidificada (0.6% ácido acético, v/v) y como fase móvil B, acetonitrilo. La velocidad de flujo fue de 0.30 ml / min a lo largo del gradiente, el volumen de inyección fue de 10 µL y los espectros de UV se registrarán de 200 a 700 nm (Vázquez-González, 2019).

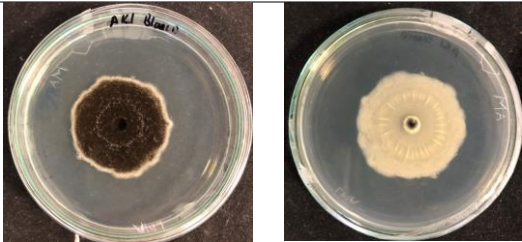

## **CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Identificación presuntiva del hongo patógeno

Los frutos de carambolo fueron recolectados en el municipio de Tepic, Nayarit en septiembre del 2020. Se tomaron muestras de 10 frutos con signos de enfermedad, se sembraron en placas de PDA hasta obtener crecimiento único y uniforme morfológicamente. Se obtuvo un hongo fitopatígeno aislado (cuadro 3), se le realizaron pruebas de identificación macro y microscópica. La cepa aislada se clasificó de acuerdo a las características macroscópicas propuestas por Trinidad-Ángel y cols. (2017), tipo de micelio, coloración del medio de soporte, así como velocidad de crecimiento (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Identificación presuntiva macro y microscópica de fitopatígeno aislado.**

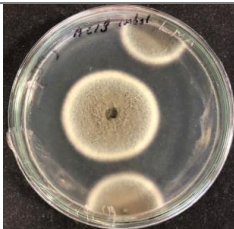

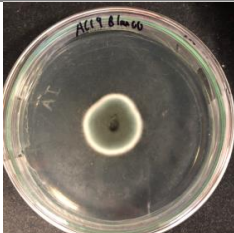

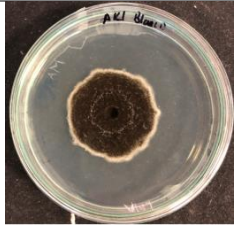
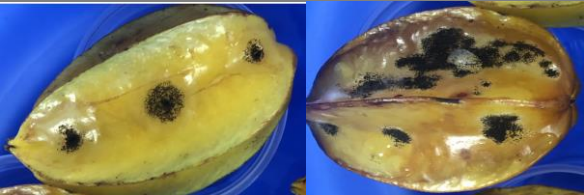
Aislado	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Descripción	Identificación presuntiva
AK1			Crecimiento acelerado, micelio blanco con aspecto polvoriento color negro, esporas redondas pequeñas y negras.	<i>Aspergillus</i> spp.

### 6.2. Ensayos de patogenicidad en Carambolo

Se reactivaron dos cepas aisladas del fruto de carambolo, obtenidas en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic, identificadas como *Cladosporium tenuissimum* AC13 y *Aspergillus sydowii* AC19 (Castañeda Andrade, 2019), además del aislado previamente obtenido e identificado como *Aspergillus* spp. AK1. La patogenicidad de las tres cepas fue comprobada a partir de los postulados de Koch (Volcy, 2008) en frutos de la misma variedad. La infección por *C. tenuissimum* presentó manchas

mohosas en el exterior, contornos oscuros y tejido necrosado. Para la enfermedad por *A. sydowii* se observaron manchas color café y tejido blando alrededor de la herida, la infección fue lenta y se presentó al cabo de 8 días. Por último, para el hongo identificado como *Aspergillus* spp. se observó ablandamiento de la pared celular del fruto y liberación de agua del mismo, así como la aparición de la coloración polvorienta negra característica del género *Aspergillus* (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Prueba de patogenicidad en carambolo**

Nombre / Código	Patógeno	Enfermedad inducida
<i>Cladosporium tenuissimum</i> AC13*		
<i>Aspergillus sydowii</i> AC19*		
<i>Aspergillus</i> spp. AK1		

\*Fitopatógenos aislados e identificados por Castañeda-Andrade (2019).

### 6.3. Obtención de extractos hidroalcohólicos de hoja de jaca y hoja de uva de mar

Se sabe que los extractos vegetales pueden tener propiedades antifúngicas las cuales pueden variar en base a la fuente vegetal del extracto, los componentes presentes en el extracto, así como método de extracción utilizado.

Se obtuvieron dos extractos fenólicos hidroalcohólicos a partir de hoja de jaca y hoja de uva de mar (Fig. 3), estos fueron de un color verde vivo y marrón respectivamente. El rendimiento obtenido para el extracto de hoja de jaca fue de un 24% lo cual coincide con lo reportado por Vázquez-González (2019) quien obtuvo un 25% para extracto de hoja de jaca bajo las mismas condiciones de extracción. Para el extracto de hoja de uva de mar se obtuvo un rendimiento de 13%. Estos valores son atribuidos a factores como los reportados por Awuor Ojwang y cols. (2019) quienes demostraron que la composición fitoquímica de diferentes partes de la planta varía tanto en la misma planta como de una especie a otra, debido a que éstas pueden estar expuestas a diferentes condiciones de crecimiento como la composición del suelo, humedad, así como a la diferencia de altitud de las regiones de donde se obtienen. Además, puede atribuirse a factores genéticos, ya que se sabe que las plantas pueden codificar una mayor o menor cantidad de fitonutrientes en diferentes partes de las plantas, así como la variación entre una planta y otra (Andrew y cols., 2010).



**Figura 3. Extractos etanólicos de hoja de jaca (izquierda) y hoja de uva de mar (derecha).**

### **6.3.1. Contenido de fenoles solubles totales**

Las defensas químicas de las plantas son de diversa índole y poseen una elevada actividad biológica, entre los compuestos que cuentan con esta actividad se encuentran fenoles, taninos,

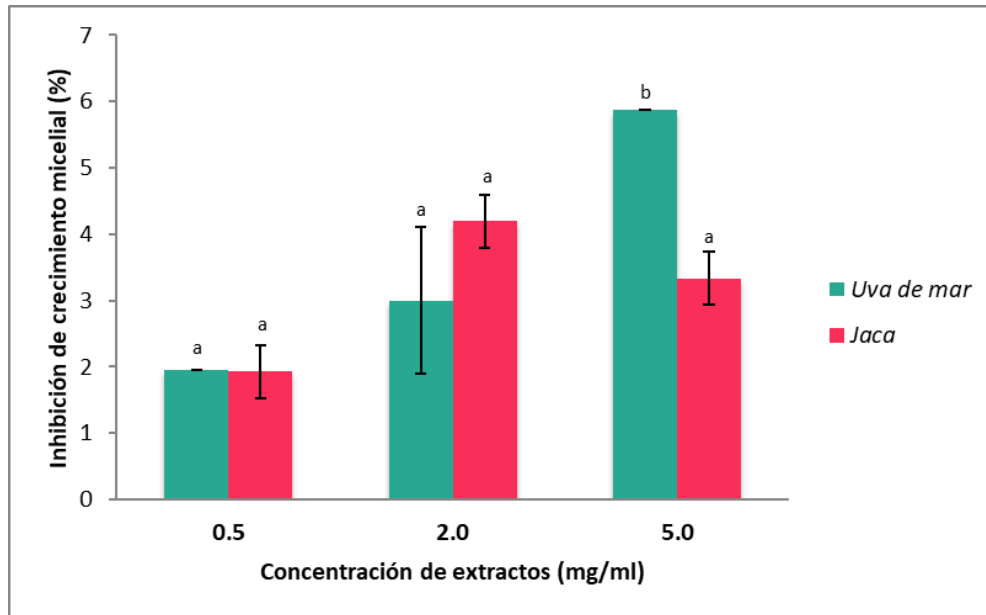
saponinas, antocianinas, flavonoides entre otros (Villa-Martínez y cols., 2015). El contenido de FST fue de  $80.86 \pm 3.39$  mg EAG / g hoja de jaca BS y de  $44.83 \pm 6.07$  mg EAG / g hoja de uva de mar BS, obtenidos mediante EAU. La cantidad de los compuestos fenólicos producidos por una especie están determinados por distintos factores entre los que destacan la genética, las condiciones ambientales y la fenología de la planta; hay factores como la sequía, la poda, la defoliación y el ataque de plagas que causan daños fisiológicos y pueden influir en la cantidad de polifenoles presentes en la planta (Chandra Shekhar y cols. 2014; Pérez-Pérez y cols., 2014). Para el extracto obtenido por APH el contenido de FST fue  $100.81 \pm 3.72$  39 mg EAG / g hoja de jaca BS. Este aumento en la cantidad de FST obtenidos para hoja de jaca es atribuido al método de extracción utilizado, las APH es una tecnología emergente, la cual aplica altas presiones sobre la matriz vegetal, transmitidas por un líquido en un sistema cerrado, la presión aplicada hace que el aire presente en las vacuolas de la célula vegetal se escape y dañe la membrana celular aumentando su porosidad permitiendo el contacto entre el solvente de extracción y los compuestos de interés, además este método permite cambiar la conformación o desnaturalizar proteínas de la membrana celular, lo que permite que los compuestos fenólicos sean más accesibles para su extracción (Cascaes y cols., 2021). Vázquez-González y cols. (2020) realizó extracción de FST a partir de hoja de jaca mediante diferentes métodos (ultrasonido, microondas y altas presiones) varió las condiciones de los mismos, y obtuvo extractos desde 60 mg EAG / g BS hasta  $164 \pm 6,29$  mg EAG / g BS las concentraciones de FST más altas fueron obtenidas por microondas (900W por 3min), APH (200 MPa por 15min) y EAU (42 Hz por 30min). Por otro lado, Awuor Ojwang y cols. (2019) determinaron el contenido de FST de hoja, raíz y corteza del árbol de la jaca, obteniendo  $35.18 \pm 2.33$ ,  $23.59 \pm 8.84$  y  $65.56 \pm 3.05$  mg EAG / g BS respectivamente por el método de maceración. La diferencia de FST obtenidos entre el método de maceración antes reportado y la EAU aplicado en el presente proyecto se atribuye principalmente al mecanismo de extracción utilizado debido a que, cuando se aplica EAU se genera una explosión de burbujas producidas por la cavitación, llevando a generar presiones localizadas causando rompimiento de tejido celular y mejorando la exclusión de sustancias celulares en el solvente (Goula y cols., 2017). Por otro lado, Linares Rivero y cols. (2018) mencionan que el tiempo óptimo para EAU se encuentra entre 10-60 min a temperatura variable y con tiempos mayores a 60 min pudiera ocurrir la oxidación de diferentes

compuestos fenólicos obteniendo un rendimiento más bajo para estos extractos. Por otro lado, los valores obtenidos para hoja de uva de mar difieren de los obtenidos por Ashmawy y cols. (2020) quienes estudiaron tres extractos de uva de mar mediante maceración, obtuvieron 90.68, 139.68 y 213.30 mg EAG / 100 g de extracto utilizado como solventes agua, acetona (90%) y etanol (96%) respectivamente. Por otro lado, Mex-Álvarez y cols. (2018) obtuvieron extracto de hoja, semilla y cáscara y pulpa de uva de mar por el método de maceración, se usó metanol y acetona como disolventes, obtuvieron  $239.61 \pm 4.76$ ,  $224.45 \pm 6.63$ ,  $688.74 \pm 8.16$ ,  $600.86 \pm 5.78$ ,  $102.56 \pm 1.65$  y  $186.21 \pm 7.82$  mg EAG / g de extracto respectivamente. La diferencia en los resultados se atribuye a la variación en el tipo de solvente utilizado los, así como por la cantidad de solvente utilizado en relación a la masa de la muestra para extracción y el método de extracción utilizado.

#### **6.4. Inhibición de los fitopatógenos por extractos hidroalcohólicos de hoja de jaca y de uva de mar.**

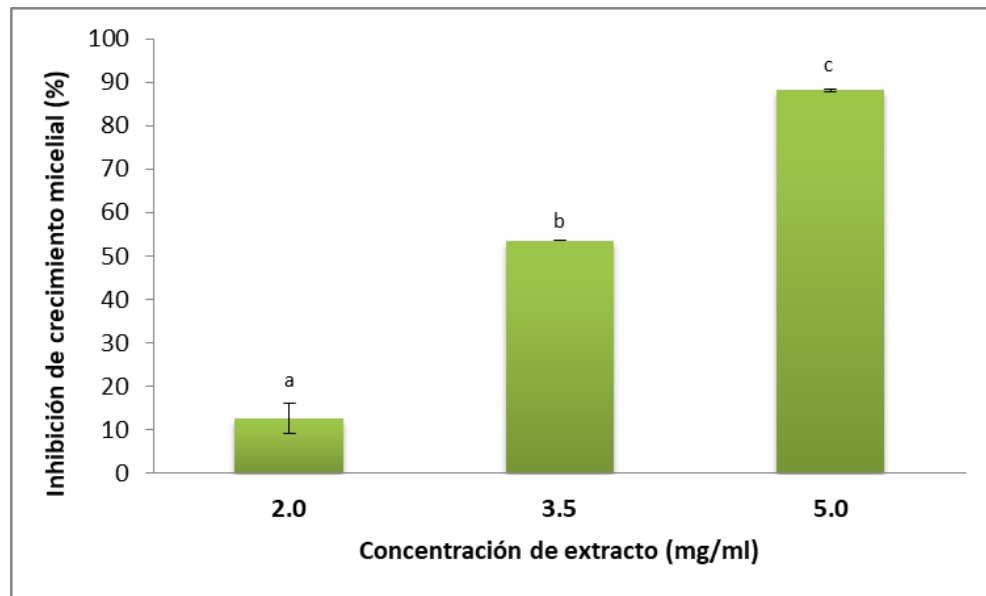
Los extractos de hoja de jaca y hoja de uva de mar obtenidos por EAU se evaluaron en concentraciones de 0.5, 2.0 y 5.0 mg / ml (base seca) sobre el hongo *C. tenuissimum* (Fig. 4), para el extracto de uva de mar se obtuvieron inhibiciones de  $1.96 \pm 0.0\%$ ,  $3.28 \pm 1.96\%$  y  $5.88 \pm 0.0\%$  y para el extracto de jaca fueron de  $1.93 \pm 1.13\%$   $3.98 \pm 1.10\%$   $3.33 \pm 0.77\%$  respectivamente, los porcentajes de inhibición presentados para los dos extractos en las concentraciones de 0.5 y 2.0 mg / ml no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Se evaluó además el extracto fenólico de hoja de jaca obtenido por APH sobre *C. tenuissimum*, su actividad antifúngica para 2.0, 3.5 y 5.0 mg / ml (base seca) aumentó considerablemente a valores de  $12.59 \pm 3.50$ ,  $53.55 \pm 0.09$  y  $88.18 \pm 0.32\%$  respectivamente, estos valores fueron diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ), la concentración de 5.0 mg / ml fue la que mostró un mayor porcentaje de inhibición (Fig. 5).





**Figura 4. Porcentaje de inhibición micelial de *C. tenuissimum* utilizando extractos de uva de mar y jaca obtenidos por ultrasonido.**

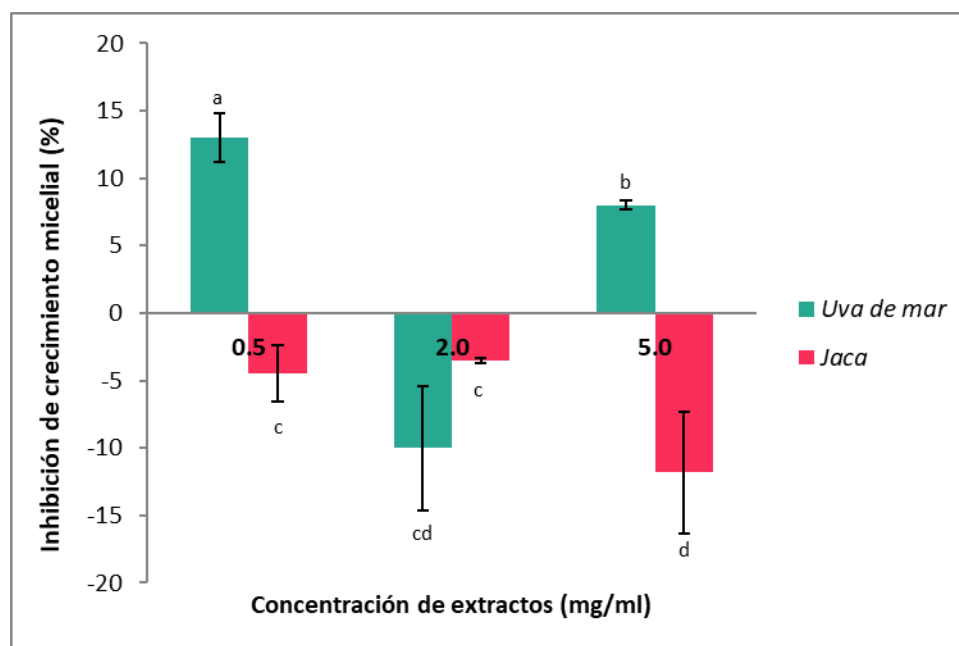
Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa entre extractos y concentraciones ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 5. Porcentaje de inhibición micelial de *C. tenuissimum* utilizando extracto de jaca obtenidos por APH.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Los porcentajes de inhibición para el hongo *A. sydowii* (Fig.6) de los extractos de hoja de jaca y uva de mar obtenidos por EAU fueron de  $-2.76 \pm 5.94\%$ ,  $-3.90 \pm 0.17\%$ ,  $-11.80 \pm 4.29\%$  y  $11.60 \pm 3.42\%$ ,  $-5.53 \pm 11.89\%$ ,  $2.46 \pm 9.07\%$  correspondientes a las concentraciones de extracto de 0.5, 2.0 y 5.0 mg / ml (base seca). El porcentaje de inhibición más alto se obtuvo del extracto de uva de mar a una concentración de 0.5 mg / ml (base seca), sin embargo, no existe una diferencia significativa entre la combinación de extractos y concentraciones ( $p>0.05$ ), pero si entre los tipos de extractos ( $p<0.05$ ). Se sabe que la actividad biológica de un extracto vegetal puede variar con base a la composición de la matriz de extracción, así como al método de extracción aplicado, estos extractos pueden tener una actividad en diferente grado dependiendo del microorganismo en el cual se aplique (Mesa y cols., 2019).

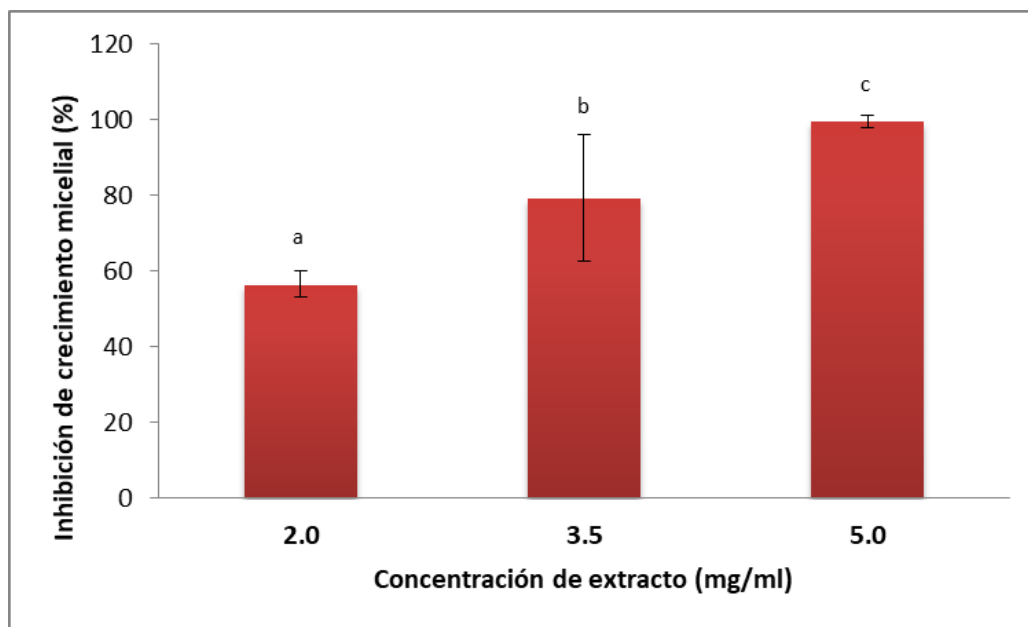


**Figura 6. Porcentaje de inhibición micelial de *A. sydowii* utilizando extractos de uva de mar y jaca obtenidos por ultrasonido.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa entre extractos y concentraciones ( $p \leq 0.05$ )

Vázquez-González y cols. (2020) evaluaron extractos de hoja de jaca mediante APH sobre *C. gloeosporioides* y *P. italicum* obteniendo inhibiciones de 55.41% y 46.49% respectivamente, esta tendencia se atribuyó a la alta concentración de flavonoides en el

extracto obtenido por APH. Esto coincide con lo obtenido para el presente estudio, se evaluó el extracto de hoja de jaca obtenido por APH en concentraciones de 2.0, 3.5, 5.0 mg / ml (base seca) y se consiguieron como porcentajes de inhibición  $56.37 \pm 3.44\%$ ,  $79.22 \pm 16.81\%$  y  $99.30 \pm 1.70\%$  respectivamente (Fig. 7), se mostró diferencia significativa entre concentraciones ( $p < 0.05$ ). Los flavonoides se han asociado a una amplia actividad antimicrobiana. Yang y cols. (2017) informaron que las propiedades antimicrobianas inherentes de estos compuestos están determinadas por su estructura química, ya que en el anillo A (de su estructura), las hidroxilaciones en las posiciones 5 y 7 son las más críticas para su actividad antimicrobiana. Este posible mecanismo de acción para flavonoides fue demostrado principalmente para el 5, 7 dihidroxiflavonoide, que inhibe las bombas de protones involucradas en la cadena de respiración de las mitocondrias presentes en la célula, lo que eventualmente lleva a la muerte celular o apoptosis. Estas bombas son la principal causa de resistencia de los microorganismos a los fungicidas de síntesis química (Yang y cols. 2017).

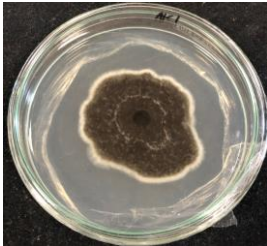
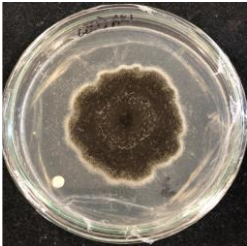
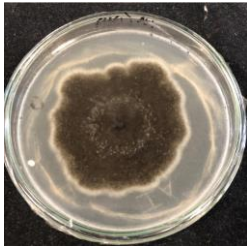
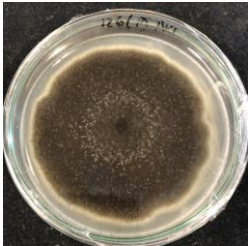


**Figura 7. Porcentaje de inhibición micelial de *A. sydowii* utilizando extracto de jaca obtenidos por APH.**

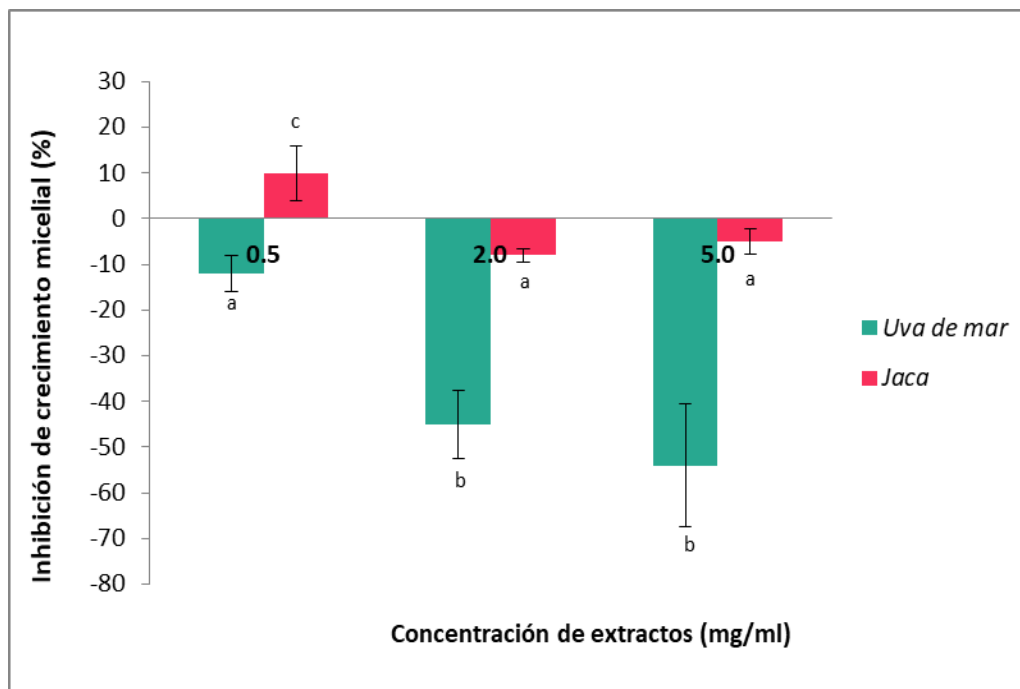
Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Para el extracto de hoja jaca obtenido por EAU se observó un ligero porcentaje de inhibición micelial para *Aspergillus* spp. de  $9.92 \pm 5.95\%$  a una concentración de 0.5 mg / ml, mientras que para los demás tratamientos no se mostró inhibición (Fig. 8). Cabe resaltar que el extracto obtenido a partir de la hoja de uva de mar por EAU potenció el crecimiento del fitopatógeno, se puede proponer que el extracto puede ser asimilado como sustrato por el hongo estudiado (cuadro 5), se puede ver la diferencia en el crecimiento al día siete respecto al control, se observó un aumento en el crecimiento hasta un  $49.36 \pm 17.21\%$ , se muestran diferencias significativas entre los dos extractos ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 5. Inhibición micelial de *Aspergillus* spp. aislado de carambolo contra extracto de hoja de uva de mar obtenido por EAU.**

Hongo	Control	0.5 mg/ml	2.0 mg/ml	5.0 mg/ml
<i>Aspergillus</i> spp. (EAU)				

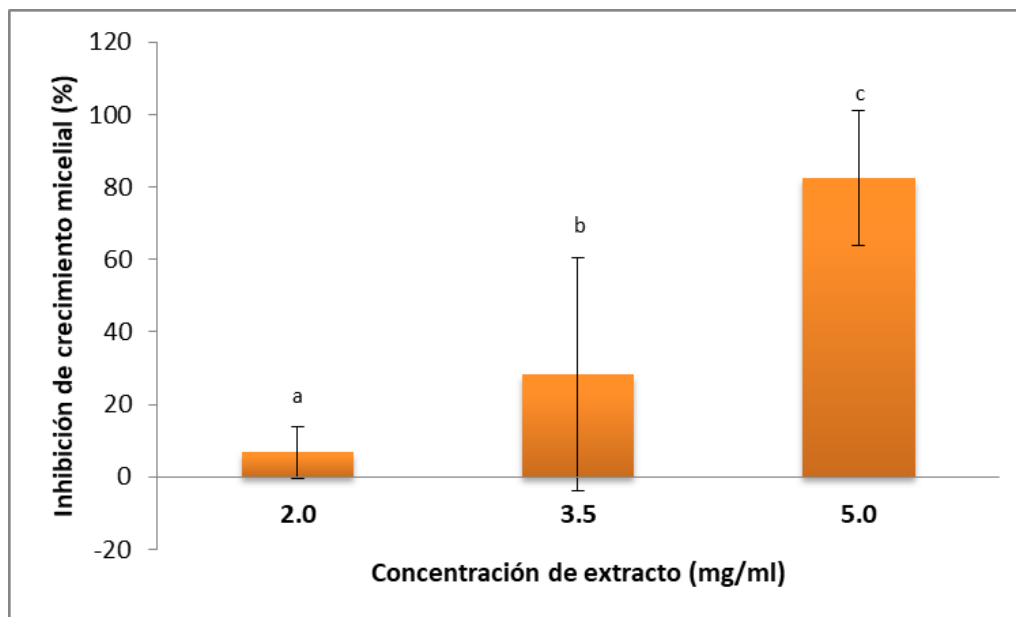
Este resultado puede ser atribuido a la composición de los extractos vegetales obtenidos, los cuales pueden variar en el contenido de compuestos extraídos, así como la cantidad de los compuestos presentes en base al material biológico utilizado. Ashmawy y cols. (2020) evaluaron extractos a partir de la hoja de uva de mar sobre los hongos *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, obtuvieron un  $0.00 \pm 0.00\%$  de inhibición contra *F. culmorum* con extracto acuoso con concentraciones de 1, 2, y 3% y de acetona al 1% y etanol al 1%. Sin embargo, para *B. cinerea* y *R. solani* presentaron inhibiciones por encima del  $31.85 \pm 1.69\%$ , con los mismos extractos, estos resultados demuestran lo mencionado por Mesa y cols. (2019) quienes mencionan que la actividad biológica de un extracto con respecto a un hongo varía en función de factores como la matriz de extracción.



**Figura 8. Porcentaje de inhibición micelial de *Aspergillus* spp. utilizando extractos de uva de mar y jaca obtenidos por ultrasonido.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa entre extractos y concentraciones ( $p \leq 0.05$ )

Abdel Hakim y cols. (2019) mencionaron la presencia de flavonoides como la miricetina 3-O- $\alpha$  ramnosido, miricetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-ramnosido y quercetina 3-O-arabinósido, los cuales son glucósidos de flavonoides, al estar estos azúcares reductores unidos a estas moléculas se vuelven hidrosolubles mejorando sus propiedades antimicrobianas. Algunos flavonoides como la quercetina, así como sus glucósidos y dihidromicetina en altas concentraciones, pueden disminuir la tasa de respiración de las mitocondrias y la síntesis de ATP en las células fúngicas, lo que lleva a la muerte celular (Trumbeckaite y cols. 2006). Se analizó el extracto de hoja de jaca obtenido por APH (Fig. 9), se utilizaron concentraciones de 2.0, 3.5 y 5.0 mg / ml (base seca) y presentaron inhibiciones de  $6.70 \pm 7.15\%$ ,  $28.35 \pm 32.06\%$  y  $82.40 \pm 18.67\%$  respectivamente, se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) Estos resultados de igual forma, se atribuyen a la mayor concentración de flavonoides obtenidos mediante el método de APH, así como la cantidad de FST presentes.



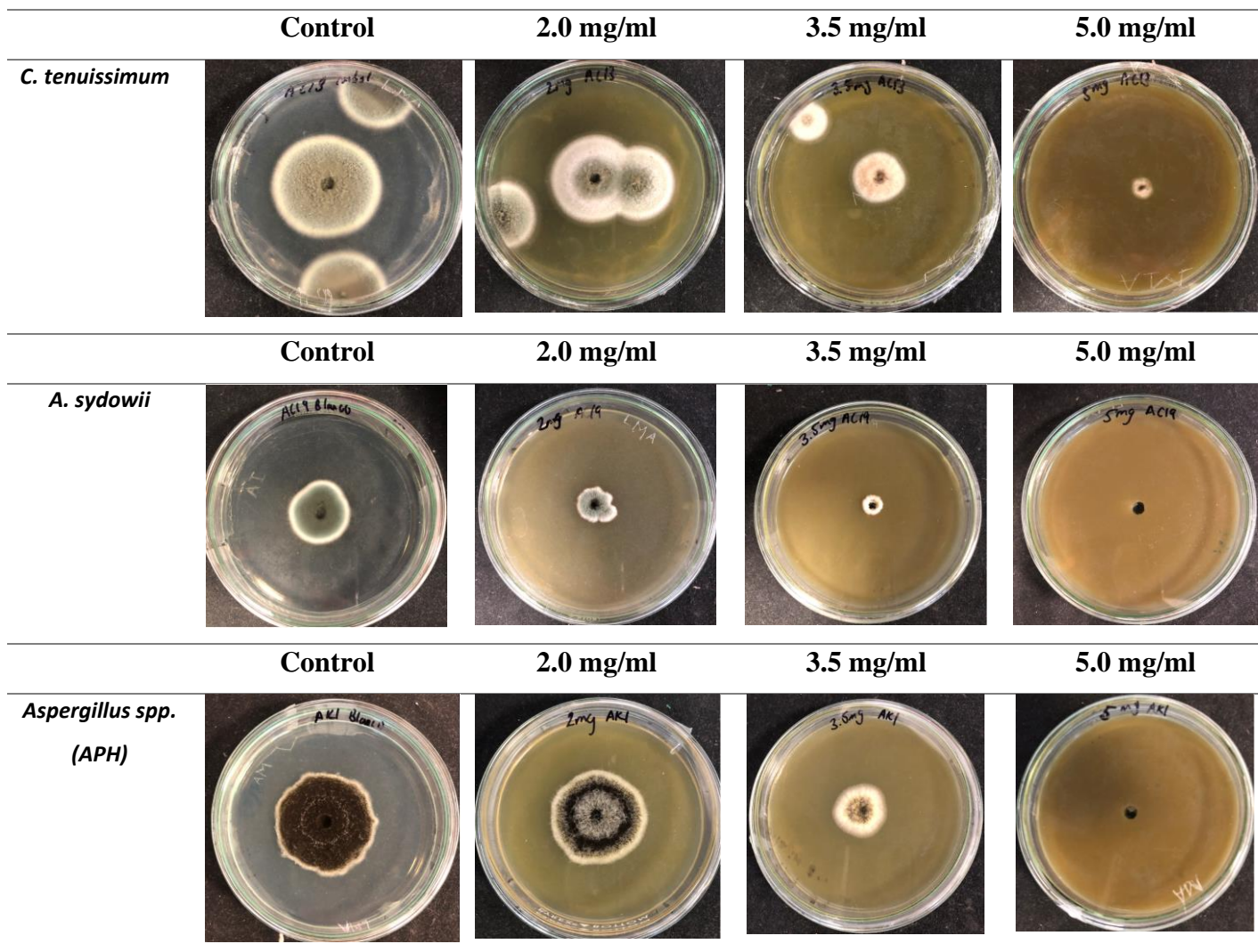
**Figura 9. Porcentaje de inhibición micelial de *Aspergillus* spp. utilizando extracto de jaca obtenidos por APH.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Los compuestos fenólicos presentan diferentes mecanismos de acción frente a los microorganismos, particularmente contra hongos que causan granulación y ruptura de las membranas citoplasmática. Estos mecanismos comprenden el alterar la permeabilidad de las células mediante la disipación del gradiente de pH, producen la inhibición de enzimas en la membrana e inhibición en la elongación de la hifa micelial y en el desarrollo de las esporas; además de ocasionar interferencia en la generación y conservación del ATP en la célula mediante el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y por tanto la afección de la respiración celular. Otro mecanismo podría ser mediante la interacción de los compuestos fenólicos con las proteínas de membrana. Los fenoles interfieren en la estructura proteica produciendo cambios conformacionales o pérdida de su funcionalidad y flexibilidad estructural e inactivándolas; lo cual está relacionado con la posición y número de grupos hidroxilos enlazados a la molécula, los que pueden interactuar directamente con las proteínas mediante la formación de enlaces iónicos o enlaces por puentes de hidrógeno ( Linares Rivero y cols., 2018).

En el cuadro 6 se observa la disminución en el crecimiento micelial de los hongos con diferentes concentraciones (2.0, 3.5, 5.0 mg / ml) de extracto de hoja de jaca obtenido por APH.

**Cuadro 6. Inhibición micelial de hongos fitopatógenos aislados de carambolo, día siete de estudio.**



### 6.5. Inhibición de germinación de esporas

Los valores obtenidos para la inhibición de germinación de esporas fueron de  $100 \pm 0.00\%$  con la concentración de 5.0 mg / ml para *C. tenuissimum* y *Aspergillus spp.* Se observó que

a concentraciones menores de 5.0 mg / ml disminuía el porcentaje de inhibición a excepción de *A. sydowii* se mostró que a las concentraciones de 3.5 y 5.0 mg / ml se obtuvo una inhibición de  $100 \pm 0.00\%$  evaluando el extracto obtenido a partir de APH (Cuadro 7). Estos resultados fueron obtenidos a las 12 h de análisis y se obtuvieron las lecturas una vez que el control mostró el 100% de germinación (Cuadro 8). Estos resultados son de gran importancia debido a que, para el caso de los hongos patógenos, la germinación de las esporas es un factor determinante al inicio de la colonización del huésped (Sharma y Kumar, 2009). Vázquez-González y cols. (2020) realizaron inhibición de germinación para *P. italicum* con extracto etanólico de hoja de jaca y observaron que el tubo germinativo de esporas en los tratamientos donde germinó presentó menor alargamiento en comparación con las esporas control. Estos autores mencionan como una posible explicación de este comportamiento, que en la germinación de las esporas intervienen varios factores fundamentales tales como la temperatura, el agua disponible y la humedad relativa.


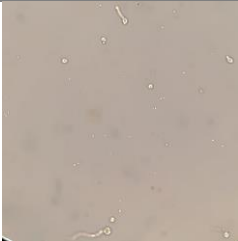




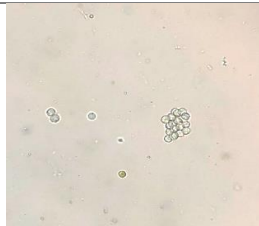




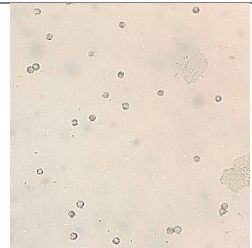
**Cuadro 7. Porcentajes de inhibición en la germinación de esporas de hongos fitopatógenos aislados de carambolo a las 12 h.**

Hongo	2.0 mg/ml	3.5 mg/ml	5.0 mg/ml
<i>C. tenuissimum</i>	$71.67 \pm 1.52$ % a	$92.83 \pm 0.76$ % b	$100 \pm 0.00$ % c
<i>A. sydowii</i>	$92.83 \pm 3.62$ % a	$100 \pm 0.00$ % b	$100 \pm 0.00$ % b
<i>Aspergillus spp. (APH)</i>	$87.50 \pm 3.46$ % a	$95.33 \pm 2.25$ % b	$100 \pm 0.00$ % c

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre concentraciones del extracto etanólico.

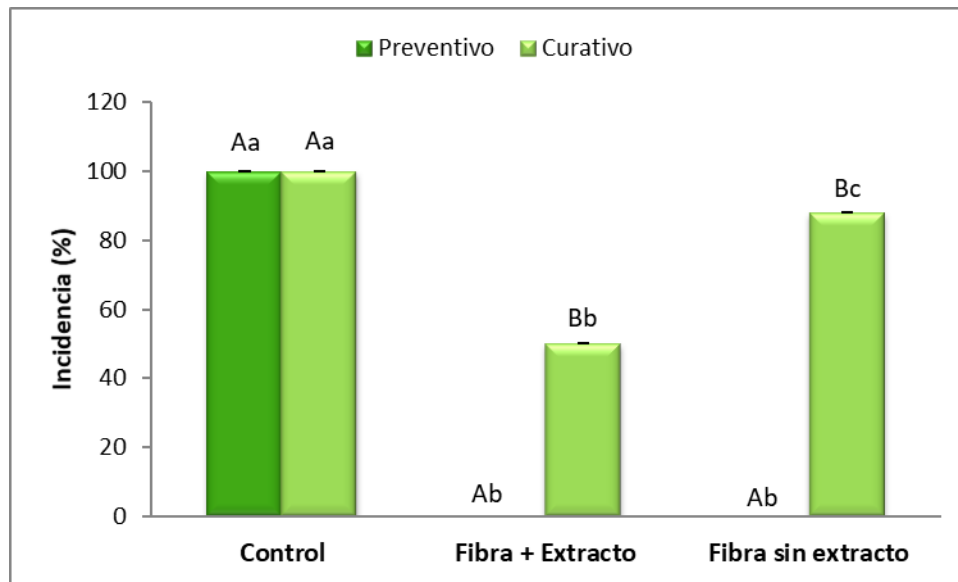


**Cuadro 8. Inhibición en la germinación de esporas de hongos fitopatógenos aislados de carambolo a las 12 h.**

Hongo	Control	2.0 mg/ml	3.5 mg/ml	5.0 mg/ml
<i>C. tenuissimum</i>				
<i>A. sydowii</i>				
<i>Aspergillus</i> spp. (APH)				

### 6.6. Inhibición recubrimiento-fitopatógenos *in vivo*

Se aplicaron efectos preventivos y curativos para los frutos de carambolo, una vez inoculados los frutos fueron almacenados a  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta que presentaron síntomas de la enfermedad. Para los frutos inoculados con *C. tenuissimum* los controles presentaron síntomas de la enfermedad al día 8 para ambos efectos, mientras que, para los tratamientos de fibra con extracto y fibra sin extracto, la enfermedad se empezó a presentar al día 13. Para el efecto preventivo en ambos tratamientos. Se registró una incidencia del 0%, mientras que para el efecto curativo se presentaron incidencias del 50 y 88% para fibra con extracto y fibra sin extracto respectivamente (Fig. 10). Los porcentajes de incidencia obtenidos con respecto al control mostraron diferencia significativa entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) y efectos ( $p > 0.05$ ).



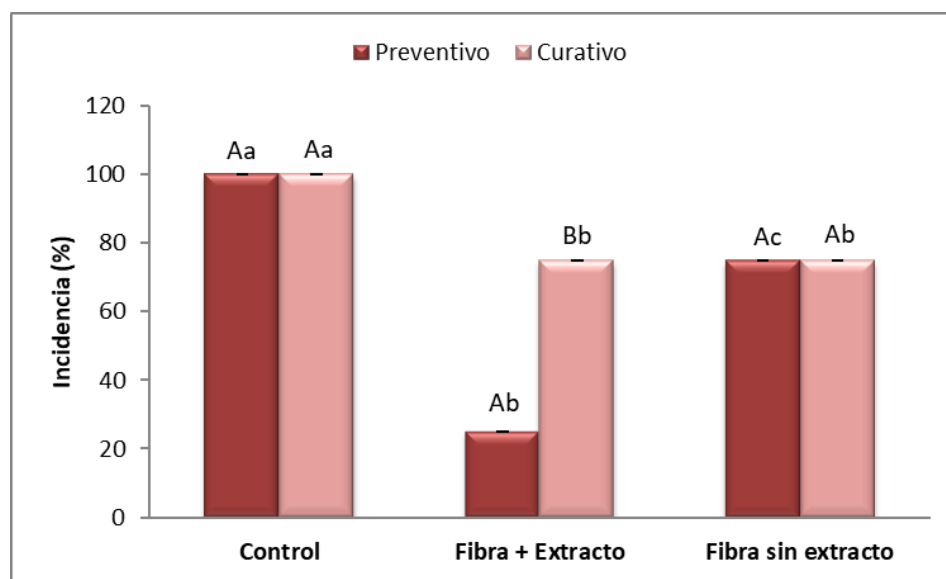
**Figura 10. Incidencia de *Cladosporium tenuissimum* en carambolo al día 14.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  SE, letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre efectos ( $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

En la Fig. 11 se puede observar que para *A. sydowii* se presentó una incidencia del 100% para los controles desde el día 4 mientras que para el tratamiento de fibra sin extracto presentó un 75% de incidencia tanto para los efectos preventivo y curativo. El porcentaje de inhibición más bajo fue de 25% para el tratamiento de fibra con extracto en efecto preventivo mientras que para el efecto curativo fue de 75%. Se observó que existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control ( $p < 0.05$ ), y entre los efectos para el tratamiento de fibra con extracto ( $p < 0.05$ ).

*Aspergillus* spp. mostró porcentajes de incidencia mayores al 25% fibra con extracto en ambos efectos mientras que para la fibra sin extracto se obtuvo un 63% para ambos efectos con respecto a los controles (Fig. 12), la enfermedad se presentó 7 días después del control para fibra, los porcentajes de incidencia para tratamientos y efectos mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Hasta el momento se han estudiado una gran variedad de recubrimientos adicionados con componentes con actividad antimicrobiana como pueden ser aceites esenciales, ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas y extractos vegetales (Solano-Doblado y cols., 2018). Sin embargo, se sabe que la actividad antimicrobiana de estos

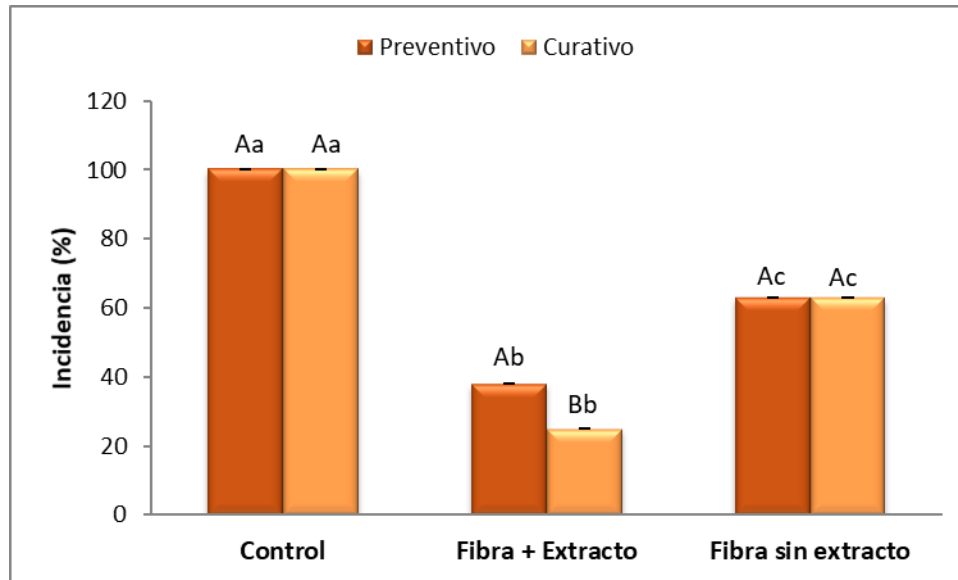
componentes puede variar en función de la materia prima del que se obtiene, método de extracción utilizado, así como al patógeno sobre el que se estudia. Además, de los factores asociados con los alimentos como las condiciones de almacenamiento, madurez de corte, su manipulación y el tipo de microorganismo a controlar (Olivas Orozco y cols., 2012).



**Figura 11. Incidencia de *Aspergillus sydowii* en carambolo al día 14.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  SE, letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre efectos ( $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

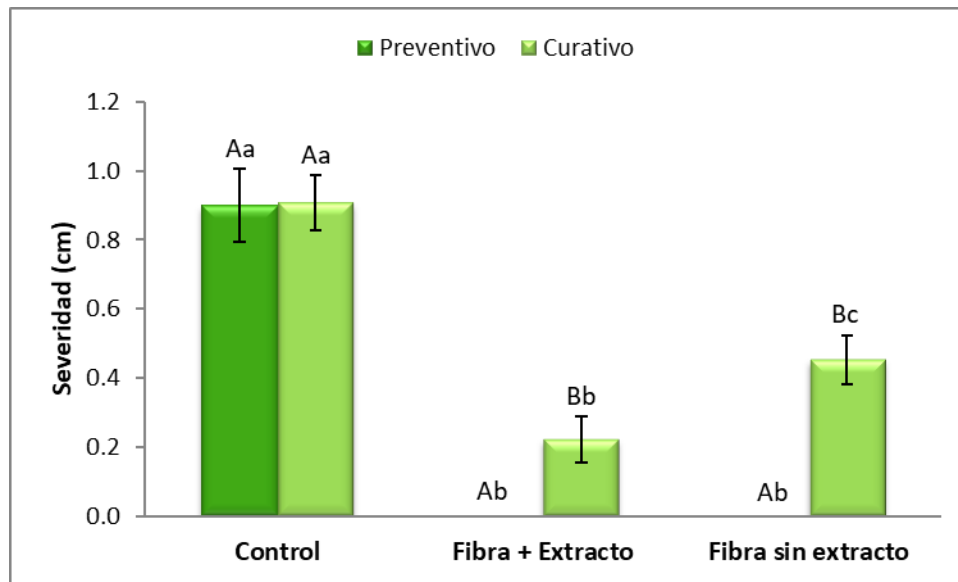
Miss Zacarias (2019) evaluó recubrimientos aplicados mediante electrospinning a partir de fibras de pululano y WPC adicionadas o no con citral. Las fibras se aplicaron sobre plátanos Portalimón y posterior fueron inoculados con *Fusarium* sp. evaluando incidencia y severidad, se obtuvieron reducciones del 55.6% de incidencia para fibras adicionadas con citral y un 11.2% de incidencia para fibras sin citral con respecto al control. Para la severidad, estos autores reportaron disminuciones del 62.5% para fibra con citral y del 12.5% para fibras sin citral. La diferencia en la disminución en la incidencia entre los dos tratamientos puede ser atribuido a la propiedad antifúngica adquirida por los compuestos fenólicos presentes en el extracto, además, los valores más altos de incidencia para la fibra sin extracto se pueden atribuir al carácter propio de los biopolímeros utilizados, los cuales podrían crear condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos (González-Estrada y cols., 2017).



**Figura 12. Incidencia de *Aspergillus* spp. en carambolo al día 14.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  SE, letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre efectos ( $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

En la Figura 13 se muestra la severidad reportada en diámetro de la lesión al día 14 para el control y los tratamientos contra *C. tenuissimum*. Se observó una reducción del diámetro de un 100% para la fibra con extracto y fibra sin extracto con respecto al control para efecto preventivo, mientras que para el efecto curativo se pudo observar una disminución en la severidad del 77% para la fibra con extracto y el 50% para fibra sin extracto, los valores de severidad mostraron diferencia significativa para tratamientos y efectos con respecto al control ( $p < 0.05$ ). En el efecto preventivo se observa (cuadro 9) una notable disminución en la enfermedad para las fibras con y sin extracto. Mientras que para el efecto curativo (cuadro 10) se observa la ausencia de la enfermedad para el tratamiento de fibra con extracto, mientras que para el tratamiento de fibra sin extracto sólo se observa una disminución.

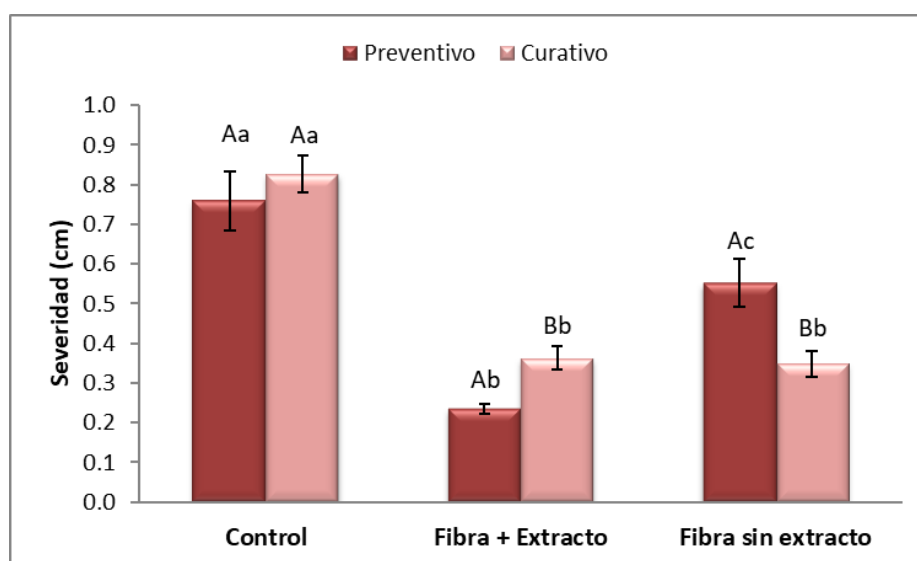


**Figura 13. Severidad de *Cladosporium tenuissimum* en carambolo al día 14.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  SE, letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre efectos ( $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

En la Figura 14 se puede observar la severidad de *A. sydowii*, para el efecto preventivo disminuyó un 70% para la fibra con extracto y un 22% para la fibra sin extracto, observando una apariencia en la lesión más notoria para la fibra sin extracto (cuadro 9), por otro lado, para el efecto curativo se pudo observar una disminución de 70% para ambos tratamientos (cuadro 10), se observan diferencias significativas entre tratamientos y efectos ( $p < 0.05$ ). En los resultados de severidad obtenidos para *Aspergillus* spp. se pudo observar una disminución para el efecto preventivo de hasta un 78% para la fibra con extracto y un 75% para fibra sin extracto y de un 90% y un 75% de disminución respectivamente para el efecto curativo con respecto al control (Fig. 15). Se aprecia una mayor disminución en la severidad para el tratamiento de fibra con extracto sobre los fitopatógenos estudiados. Esta actividad antimicrobiana aumentada se atribuye a los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de hoja de jaca, tales como el ácido cafeico, ácido quínico, ácido clorogénico, kaempferol, catequina entre otros. Se han reportado que estos compuestos afectan la membrana celular fosfolipídica de los microorganismos, causando aumento en la permeabilidad y por tanto salida de citoplasma, además de interactuar con enzimas ubicadas en la pared celular del fitopatógeno causando un desequilibrio de la misma llevándolo a la

muerte celular (Pandía Estrada, 2020). Los materiales de pared como la zeína tienen la propiedad de proteger compuestos de interés como lo son los compuestos fenólicos, lo cual permite la conservación, liberación y adsorción de compuestos y por tanto la actividad antimicrobiana de estos. Características como la composición, el grosor y la estructura de los recubrimientos de nanofibras actúan sobre la pared del alimento, la adsorción de los componentes está controlada por la interacción entre la pared del fruto y la primera capa del recubrimiento las cuales pueden estar unidas mediante interacciones como puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas o interacciones hidrofóbicas, así como factores ambientales como temperatura o humedad de almacenamiento (Solano-Doblado y cols. 2020).

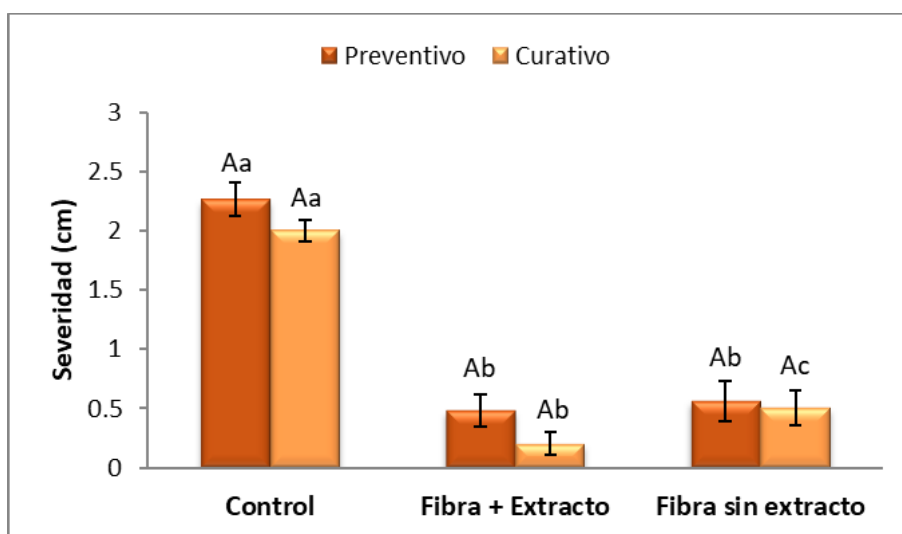


**Figura 14 Severidad de *Aspergillus sydowii* en carambolo al día 14.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  SE, letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre efectos ( $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

Se conocen dos mecanismos antimicrobianos que pueden ser llevados a cabo utilizando recubrimientos, la migración de compuestos activos de las fibras al alimento, que pasan parcial o totalmente al interior del alimento y en la superficie, posteriormente estos compuestos son liberados y ejercen su actividad antimicrobiana y por mecanismos no migratorios, en los cuales los compuestos activos son liberados del interior de las fibras

manteniéndose en la superficie del recubrimiento y ejerciendo ahí su actividad antimicrobiana (Solano-Doblado y cols., 2018).



**Figura 15. Severidad de *Aspergillus* spp en carambolo al día 14.**

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  SE, letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre efectos ( $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

Balbuena Escalona (2017) planteó que los flavonoides como vitexina, isovitexina, isoorientina, orientina, apigenina, ácido ferúlico, ácido cafeico, vicenin y rutina entre otros, debido a su estructura química, estos son responsables de la inhibición microbiana atribuido a la inducción en la ruptura del ADN en un sitio específico, por bloqueo del complejo aminoacil-transferasa, debido a la intercalación entre bases del ADN por la formación de dímeros de timina lo que lleva la alteración de la síntesis del ADN. Además, indico otros mecanismos provocados por los flavonoides, mediante la alteración en la composición de las membranas y el metabolismo celular por la inhibición de la fosforilación de proteínas o la formación de complejos con proteínas solubles de la pared celular. Por otro lado, planteó que la actividad de las flavonas y las quinonas frente a los patógenos se puede atribuir a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared celular.

**Cuadro 9. Carambolos con efecto preventivo al día 14.**

*Cladosporium tenuissimum* AC13

**Control**

**Fibra + Extracto**

**Fibra pura**



*Aspergillus sydowii* AC19

**Control**

**Fibra + Extracto**

**Fibra pura**



*Aspergillus* spp. AK1

**Control**

**Fibra + Extracto**

**Fibra pura**





**Cuadro 10. Carambolos con efecto curativo al día 14.**

*Cladosporium tenuissimum* AC13

**Control**

**Fibra + Extracto**

**Fibra pura**



*Aspergillus sydowii* AC19

**Control**

**Fibra + Extracto**

**Fibra pura**



*Aspergillus* spp. AK1

**Control**

**Fibra + Extracto**

**Fibra pura**



## **6.7. Caracterización de las nanofibras**

### **6.7.1. Espesor del recubrimiento**

Los recubrimientos sin extracto mostraron un espesor de  $0.344 \pm 0.26$  mm a diferencia de los recubrimientos adicionadas con el extracto de hoja de jaca con un espesor de  $0.296 \pm 0.55$  mm, ambas obtenidas después de 4 horas del proceso de electrospinning ( $p < 0.05$ ). Estos valores difieren de los obtenidos por Deng y cols. (2019) quienes formularon fibras a partir de zeína y gelatina y obtuvieron resultados de espesor de 0.100 mm. Por otro lado, Rodríguez-Sánchez y cols. (2020) quienes obtuvieron fibras de PCL con espesor de 0.150 mm para un tiempo de 30 minutos y de pululano con PCL con espesor de 0.200 mm en un tiempo aproximado de 60 min. Las diferencias en el espesor de los recubrimientos obtenidos (Cuadro 11) se atribuyen al tiempo requerido para el proceso de electrospinning, así como el grosor propio de las fibras resultantes las cuales dependen directamente de la solución polimérica utilizada, así como la estructura química de las fibras, las interacciones químicas que se llevan a cabo, como pueden ser interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrogeno, enlaces iónicos, entre otros (Hoque y cols., 2011).

### **6.7.2. Ensayo de tracción**

La resistencia a la tracción es una propiedad mecánica de las películas que impacta en la capacidad para mantener la integridad mecánica (Khazaei y cols., 2016). En el cuadro 11 se pueden observar los valores obtenidos para la resistencia a la tracción, con valores para recubrimiento con extracto de  $5.353 \pm 1.66$  MPa y para el recubrimiento sin extracto de  $4.428 \pm 1.35$  MPa, no se observó diferencia significativa entre ambos tratamientos ( $p > 0.05$ ). Estos valores coinciden con lo reportado por Hoque y cols. (2011) quienes al agregar extractos vegetales a un recubrimiento a base de gelatina y observaron aumentos del 19.3, 19.1 y 16.2% en la resistencia a la tracción cuando se incorporaron extractos vegetales de canela, clavo de olor y anís respectivamente comparadas con el control. Por otro lado, Pandia Estrada (2020) reportó una disminución en la resistencia a la tracción sobre una película comestible formulada a partir de gelatina de pescado al adicionar extracto vegetal de orégano de concentraciones de 2%, esta disminuyó hasta 8% de 8.95 a 0.91 MPa respectivamente. Para el presente proyecto la mayor resistencia es para las fibras con extracto, lo cual puede

atribuirse a la composición de la solución. Se sabe que el aumento o disminución de la resistencia puede deberse a la naturaleza del extracto añadido, esto es, al tipo de diluyente empleado, así como a la combinación entre los compuestos fenólicos de los extractos y las proteínas del biopolímero y los enlaces que pueden generar, como interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrogeno. Los compuestos fenólicos contienen grupos hidrofóbicos que interaccionan en la región hidrofóbica de las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas, además, los grupos OH de los compuestos fenólicos tienen la capacidad de combinarse con los aceptores de hidrógenos mediante enlaces de hidrogeno, favoreciendo así la estructura del recubrimiento proporcionando una mayor estabilidad (Hoque y cols., 2011). Se sabe que el efecto sobre las propiedades mecánicas de los recubrimientos al añadir extractos vegetales u otros componentes a la solución polimérica dependen de varios factores, entre ellos, el origen del polímero, la naturaleza y concentración de los extractos, condiciones de extracción, concentración de plastificantes, etc. Lo que indica que no existe un patrón exacto sobre la variación en estas propiedades (Pandia, 2020). Por lo tanto, la resistencia a la tracción de las fibras se vio ligeramente incrementada por la adición del extracto etanólico a partir de hoja de jaca, esto puede ser atribuido a las interacciones formadas entre los compuestos presentes en el extracto y las proteínas del biopolímero.

### **6.7.3. Permeabilidad de vapor (WVP)**

La permeabilidad de vapor es un factor importante para la conservación de los frutos, las películas microporosas pueden favorecer el intercambio de gases, regular la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> así disminuir la tasa de respiración de los frutos y prolongar su vida útil (Yue y cols., 2018). El agua puede acelerar la velocidad de reacciones como el pardeamiento, la oxidación de lípidos y la actividad enzimática, incluso la velocidad de crecimiento de microorganismos y provocar cambios en la textura (Murrieta-Martínez y cols., 2019). En el cuadro 11 se pueden observar los valores obtenidos para WVP para ambos tratamientos, se puede apreciar que la adición del extracto etanólico de hoja de jaca a la solución polimérica no afectó significativamente en la permeabilidad de las películas obtenidas ( $p > 0.05$ ). Blanco-Pascual y cols. (2013) reportaron valores de WVP desde  $1.35 \times 10^{-7}$  hasta  $1.71 \times 10^{-7}$  g/m·s·Pa para recubrimientos realizados a partir de gelatina, mientras que Xu y cols. (2020) realizaron un estudio sobre una película de zeína y quitosano adicionada con emulsión de aceite de

clavo de olor y obtuvieron valores para WVP desde  $1.66 \times 10^{-4}$  a  $5.56 \times 10^{-4}$  g/m·s·Pa estos valores disminuían mientras se aumentaba la concentración de la emulsión de 0 al 0.6%, esto es atribuido a la mayor hidrofobicidad provocada por la zeína, además de la incorporación de la emulsión, así se tiene un efecto de uniformidad mayor, reduciendo así la permeabilidad de vapor de agua de las películas. Debeaufort y Voilley (2009) mencionan que la transferencia de vapor de agua generalmente ocurre a través de la porción hidrofílica de la red de película siendo por ello dependiente de la proporción hidrofílica e hidrofóbica de los componentes de la película, obteniendo valores deseados ya que proporcionan una baja permeabilidad de vapor de agua a los recubrimientos obtenidos debido a la alta hidrofobicidad de la zeína.

#### **6.7.4. Solubilidad en agua**

La solubilidad es una propiedad de gran importancia para las películas y recubrimientos, debido a que relaciona la interacción que tendrá la película con la variedad de alimentos a recubrir, por lo tanto, determina la aplicación de éstas en los alimentos, por otro lado, la solubilidad que tenga una película o recubrimiento dependerá del tipo de polímero que se utilice para su elaboración, lo cual está relacionado con la composición de cada matriz (Pandía Estrada, 2020). En el cuadro 11 se puede observar la solubilidad para los recubrimientos obtenidos, con valores de 39% para la fibra sin extracto etanólico y de 34% para la fibra con extracto, se puede observar una ligera disminución en la solubilidad, sin embargo, no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). En un estudio realizado por Wu y cols. (2014) reportaron valores bajos de solubilidad en recubrimientos de mezclas de quitosano y gelatina, adicionando aceite esencial de orégano de 1 al 4% provocando una disminución del 32 al 30%. Por otro lado, Pandía Estrada (2020) reportó disminución en la solubilidad de sus películas al añadir extracto vegetal de orégano desde 2 al 8%, observó que al aumentar el porcentaje de extracto disminuía la solubilidad desde un 98% hasta un 91%. Este comportamiento se atribuye a las interacciones químicas entre los polifenoles del extracto y las proteínas del polímero, al interaccionar mediante enlaces hidrofóbicos, así como puentes de hidrogeno a través de los grupos hidroxilo.

**Cuadro 11. Propiedades físicas y mecánicas de fibras**

<b>Tratamientos</b>	<b>Espesor (mm)</b>	<b>Resistencia a la tracción (MPa)</b>	<b>Permeabilidad de vapor ((g/m·s·Pa) × 10<sup>-7</sup>)</b>	<b>Solubilidad (%)</b>
<b>Fibra con extracto</b>	0.296 ± 0.55a	5.353 ± 1.66a	6.79 ± 0.63a	34 ± 7.79a
<b>Fibra sin extracto</b>	0.344 ± 0.26b	4.428 ± 1.35a	6.22 ± 0.77a	39 ± 6.90a

Letras diferentes en misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p≤0.05)

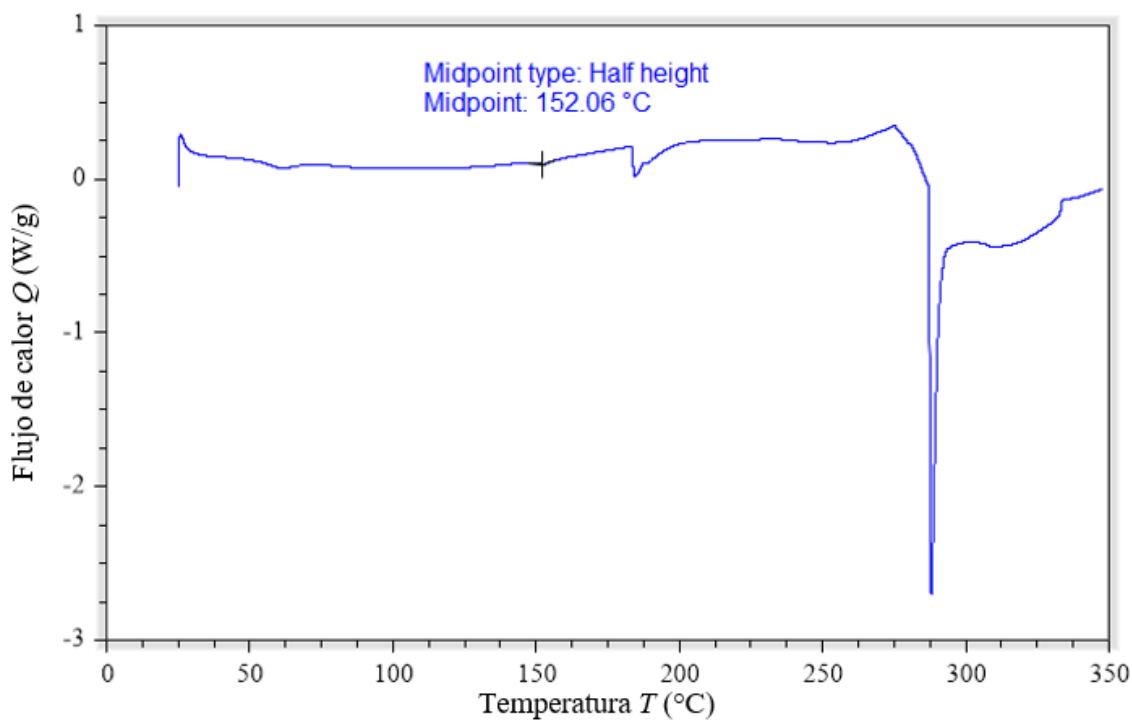
### **6.7.5. Análisis de calorimetría diferencial de barrido**

La temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) es la temperatura a la que un polímero pasa de un estado duro y vítreo a un estado amorfo y gomoso que muestra movilidad y miscibilidad de las moléculas que se encuentran (Karim, 2020). La transición vítrea es el paso de un estado termodinámico metaestable (vítreo), caracterizado por una alta agregación y orden molecular, a otro estado termodinámico conocido como estado gomoso, en el que existe mayor movilidad de las moléculas y por ende menor estabilidad (Miss Zacarías, 2020). Conocer la temperatura a la cual sucede el cambio del estado vítreo al estado desordenado proporciona información importante para predecir y controlar las condiciones de almacenamiento óptimas que requiere un producto alimenticio, con el fin de preservar las propiedades sensoriales y alargar la vida útil (Mosquera y cols., 2015). Se realizó el análisis de DSC para las fibras de zeína con y sin extracto, así como para el polímero de zeína puro. Los valores de T<sub>g</sub> de la nanofibra de zeína pura (Fig. 16) y zeína con extracto (Fig. 17) se mantuvieron en rangos similares con temperaturas de 151.64-152.42°C y 151.56-154.38°C respectivamente, a diferencia de la T<sub>g</sub> mostrada para el polímero de zeína puro (Fig. 18) con temperaturas de 129.31-135.20°C (Cuadro 12), el aumento de temperatura en las nanofibras podría deberse a la estructura cristalina de las nanofibras unidas y generando una forma cristalina continua en todo el material (Rodríguez-Sánchez y cols., 2020), además de los enlaces formados como son enlaces de hidrogeno e interacciones iónicas entre la solución polimérica, el extracto y el Tween 80 proporcionando protección al extracto etanólico. Estos valores pueden ser comparados con los obtenidos por Karim y cols. (2020) quienes evaluaron nanofibras de zeína puras y adicionadas con aldehído cinámico, obteniendo valores de T<sub>g</sub> para las fibras de zeína de 172°C, siendo el valor de la T<sub>g</sub> para las fibras con aldehído

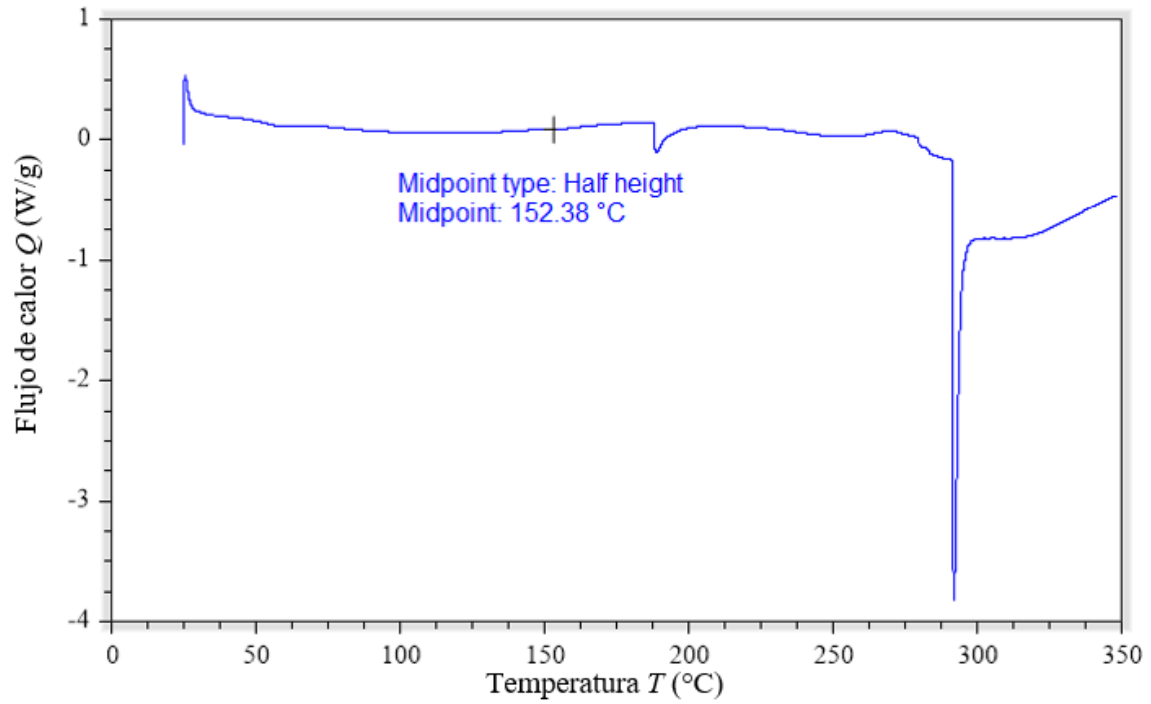
cinámico más alto, lo cual mostró una mayor estabilidad de la nanofibras producidas. Asimismo, Dehcheshmeh y cols. (2019) en la producción de nanofibras de zeína con la adición de extracto de azafrán, obtuvieron una Tg de 172°C, debido a la principal degradación térmica de esta proteína.

**Cuadro 12. Análisis de DSC para fibras de zeína y polímero de zeína**

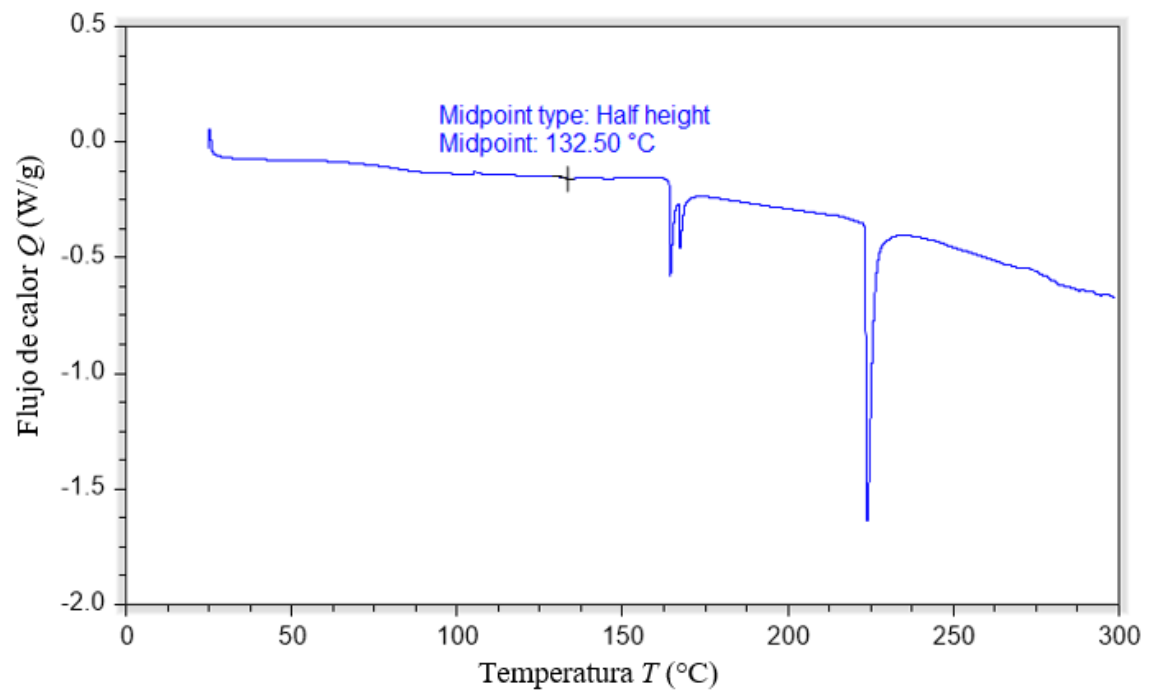
Componente	Tg (°C)	Midpoint (°C)
<b>Fibra de zeína pura</b>	151.64 - 152.42	152.06
<b>Fibra de zeína con extracto</b>	151.56 - 154.38	152.38
<b>Zeína polímero</b>	129.31 - 135.20	132.5



**Figura 16. Análisis de DSC para fibra de zeína sin extracto**



**Figura 17. Análisis de DSC para fibra de zeína con extracto**



**Figura 18. Análisis de DSC para polímero de zeína**

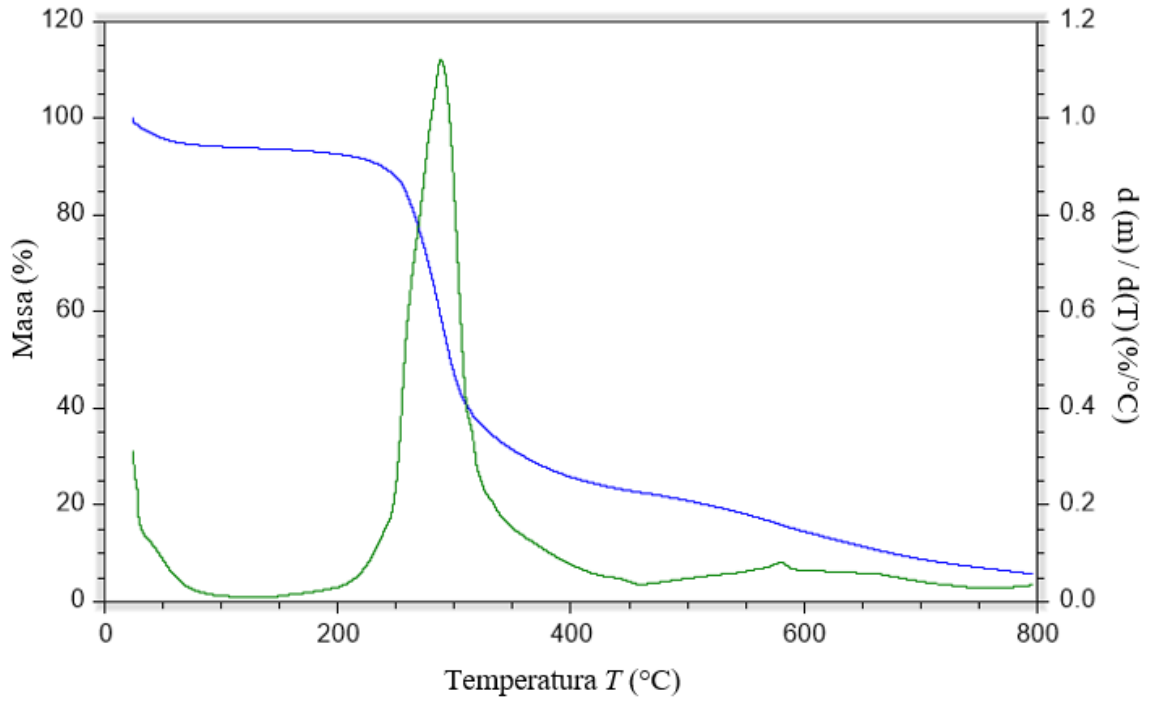
### 6.7.6. Análisis Termogravimétrico

Se realizó el análisis termogravimétrico de las fibras pura y con extracto, así como de cada uno de sus componentes (Cuadro 13), esto permitió estudiar la estabilidad térmica de los compuestos fenólicos dentro de la pared polimérica de zeína. El análisis para el polímero de zeína mostro la primera pérdida de peso entre 25 y 98°C, asociada con la pérdida de humedad y el agua físicamente ligada (Cheng y cols., 2019), la segunda pérdida se mostró entre 148 y 454°C con un valor del 78% en pérdida de masa atribuido a la zeína y con un residual del 5% el cual es atribuido a minerales presentes en la muestra (Fig. 19). Los TGA de fibra con y sin extracto mostraron la primera pérdida entre 27 y 86°C atribuida a la humedad, la segunda pérdida comenzó desde 200°C para ambas fibras, terminando en 349°C para la fibra sin extracto (Fig. 20) y en 500°C para fibra con extracto (Fig. 21), esta diferencia puede estar relacionada con la interacción química que se lleva a cabo entre las proteínas del polímero, los compuestos presentes en el extracto y la interacción con el Tween 80 (Fig. 23), mejorando las interacciones intermoleculares, aumentando la estabilidad química y por tanto térmica del recubrimiento (Abbehausen y cols., 2010), además, se pudo observar que la temperatura de descomposición aumento, se sabe que esto puede deberse al alto contenido de zeína, lo cual está asociado con la degradación de las proteínas de este, por tanto el biopolímero brinda protección térmica a los componentes del extracto etanólico (Shalom y cols., 2021). Finalmente, el análisis térmico del extracto etanólico (Fig. 22) muestra la primera pérdida entre 31 y 67°C la que puede ser atribuida a la descomposición de los compuestos fenólicos los cuales son altamente termosensibles. La segunda pérdida es atribuida a la humedad, la tercer pérdida se lleva a cabo entre 100 y 200°C los cuales están relacionados con la degradación de macromoléculas como polisacáridos (Miss-Zacarias y cols., 2020), además de otros compuestos fenólicos con mayor estabilidad térmica como carvacrol el cual se encuentra presente en el extracto y fibra con extracto, así mismo a causa de pirolisis de enlaces glicosídicos (Yang y cols., 2018), para la cuarta pérdida presentada entre 200 y 489°C se atribuye compuestos fenólicos que son resistentes a altas temperaturas como lo son el ácido cafeico o el ácido cinámico y proteínas presentes en el extracto (O'Neil, 2001), finalmente como residual con temperatura entre 490 y 600°C se atribuye a minerales presentes en el extracto.

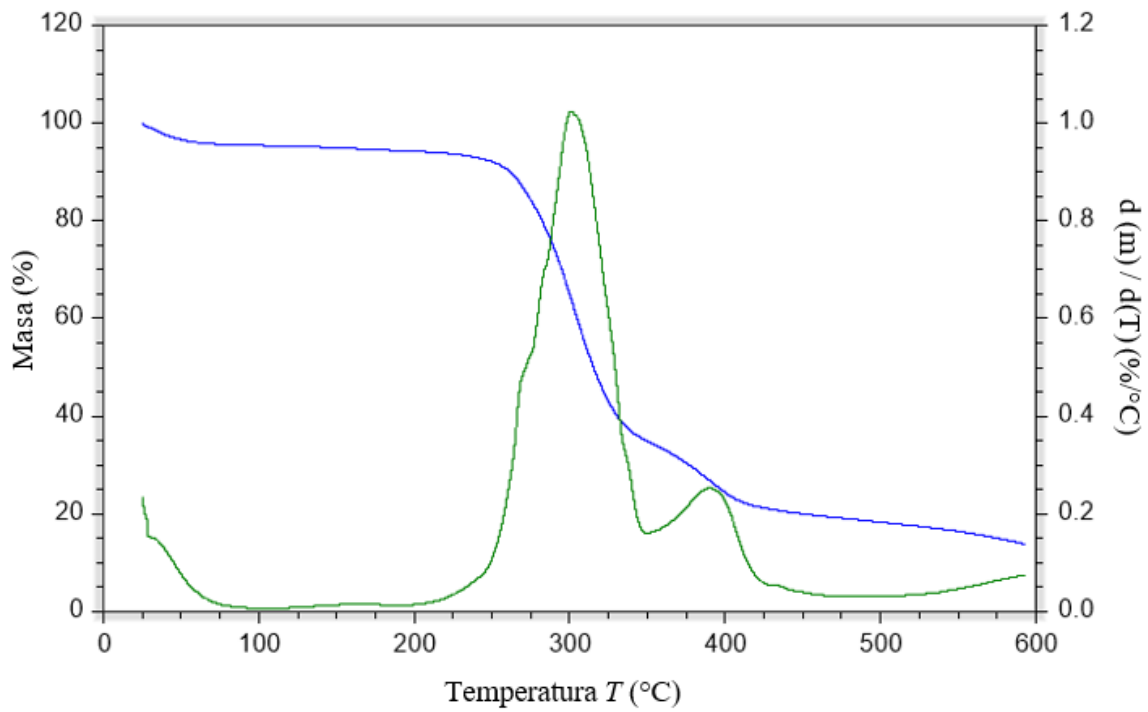


**Cuadro 13. Análisis de TGA para fibras de zeína y sus componentes**

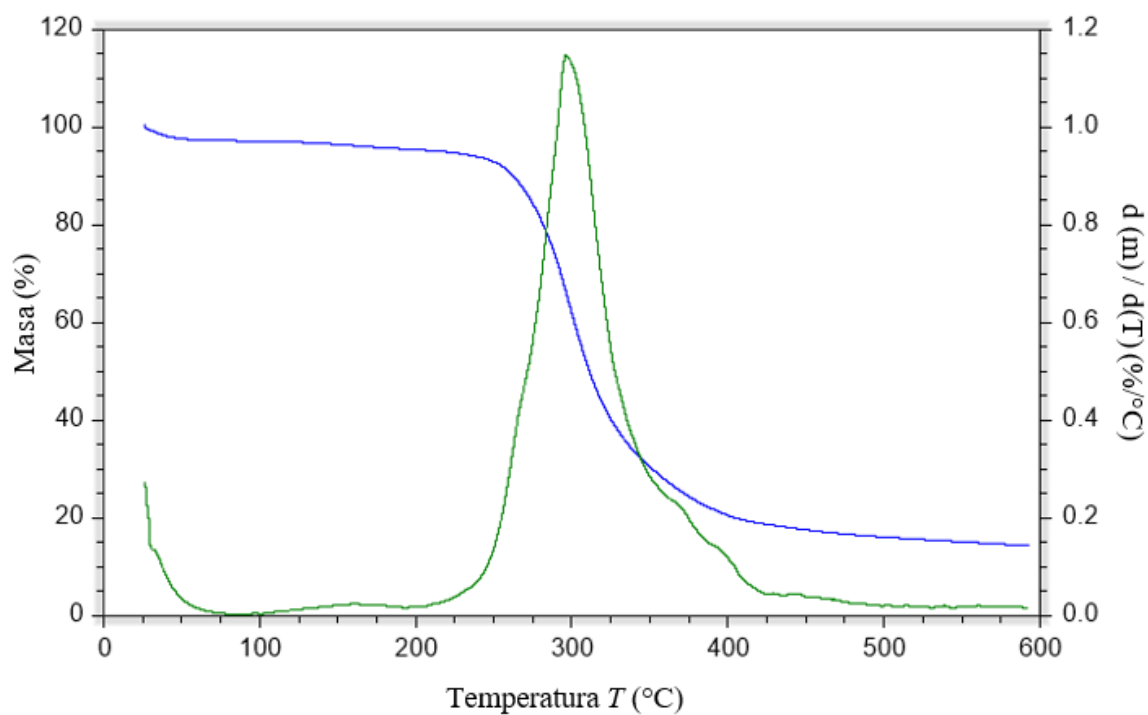
<b>Componente</b>	<b>Variación</b>	<b>Temperatura de descomposición (On - end set °C)</b>	<b>Pérdida de masa (%)</b>	<b>Asignación</b>
<b>Zeína polímero</b>	1 <sup>er</sup> pérdida	25.21 - 98.47	5.82	Pérdida de humedad y agua físicamente ligada
	2 <sup>a</sup> pérdida	148.73 - 454.69	78.08	Descomposición de polímero de zeína
	Residual	455.12 - 598.52	5.72	Minerales presentes en la muestra
<b>Fibra de zeína pura</b>	1 <sup>er</sup> pérdida	29.99 - 86.34	4.48	Pérdida de humedad y agua físicamente ligada
	2 <sup>a</sup> pérdida	200.02 - 348.58	64.49	Descomposición de polímero de zeína
	3 <sup>a</sup> pérdida	348.29 - 433.37	15.35	Descomposición de zeína y compuestos orgánicos restantes
	Residual	439.26 - 592.04	13.84	Minerales presentes en la muestra
<b>Fibra de zeína con extracto</b>	1 <sup>er</sup> pérdida	27.05 - 75.26	2.69	Pérdida de humedad y agua físicamente ligada
	2 <sup>a</sup> pérdida	200.05 - 500 .58	79.31	Descomposición de polímero de zeína y compuestos orgánicos presentes en extracto etanólico
	Residual	501.08 - 599.25	14.24	Minerales presentes en la muestra
<b>Extracto</b>	1 <sup>er</sup> pérdida	31.62 - 66.91	2.48	Descomposición de compuestos fenólicos termosensibles
	2 <sup>a</sup> pérdida	67.94 - 97.62	1.08	Pérdida de humedad y agua físicamente ligada
	3 <sup>a</sup> pérdida	100.37 - 199.73	10.22	Degradación de polisacáridos y compuestos fenólicos termorresistentes
	4 <sup>a</sup> pérdida	199.73 - 489.06	41.49	Descomposición de compuestos fenólicos termorresistentes y proteínas
	Residual	490.81 - 598.49	40.17	Minerales presentes en la muestra
<b>Tween 80</b>	1 <sup>er</sup> pérdida	349.44 - 388.78	93.06	Descomposición de Tween 80



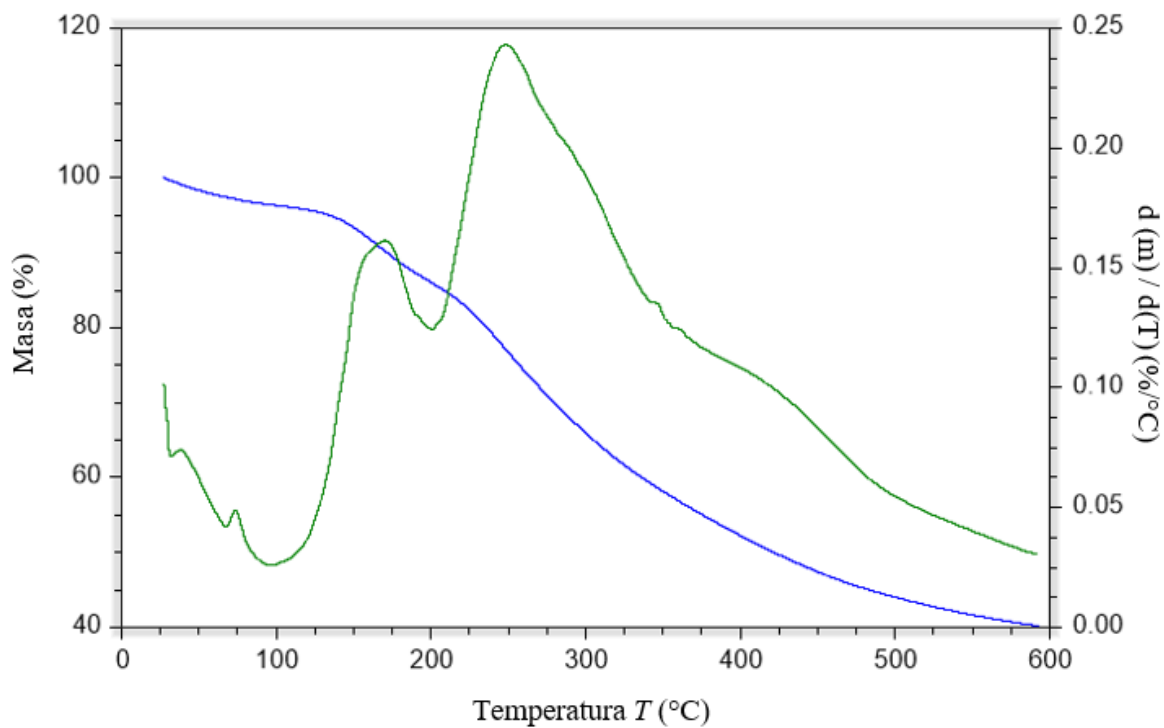
**Figura 19. Análisis de TGA para polímero de zeína**



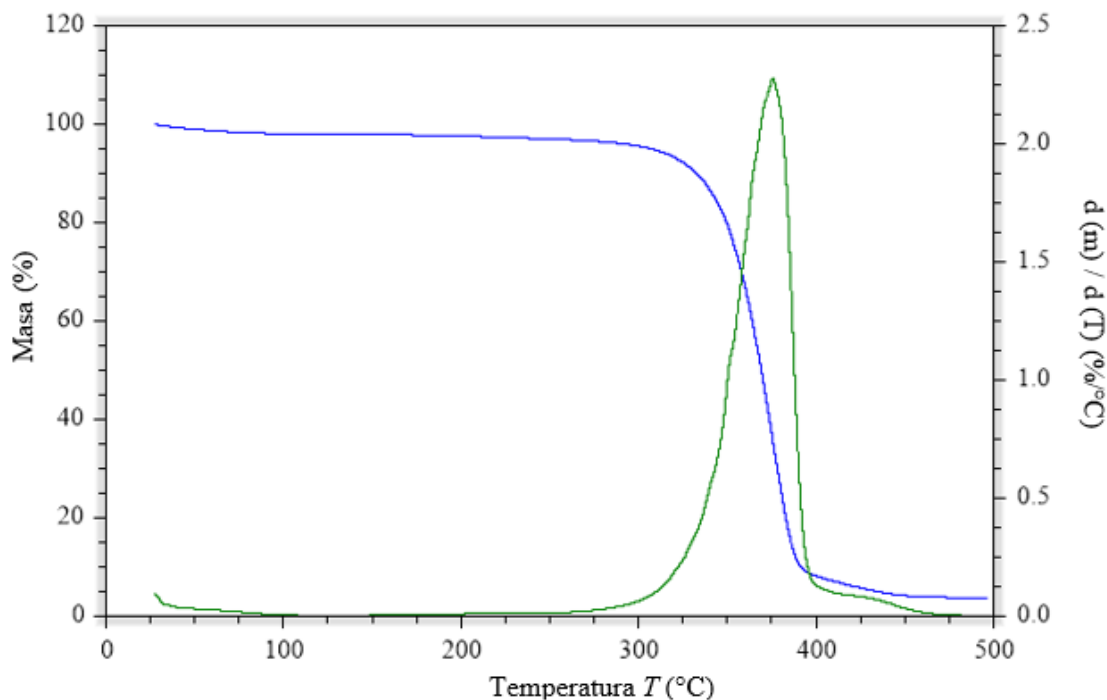
**Figura 20. Análisis de TGA para fibra de zeína sin extracto**



**Figura 21. Análisis de TGA para fibra de zeína con extracto**



**Figura 22. Análisis de TGA para extracto etanólico**

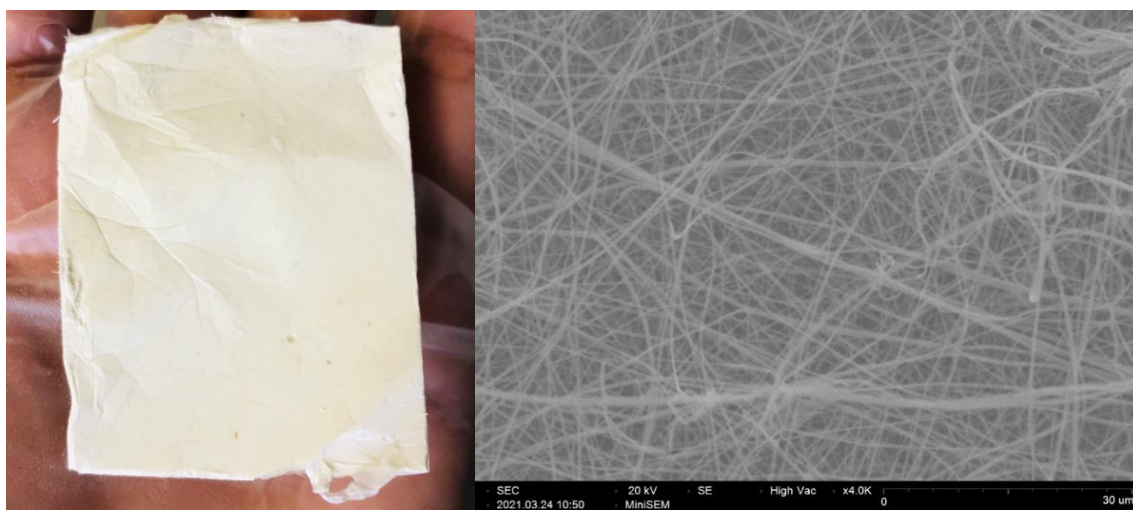


**Figura 23. Análisis de TGA para Tween 80**

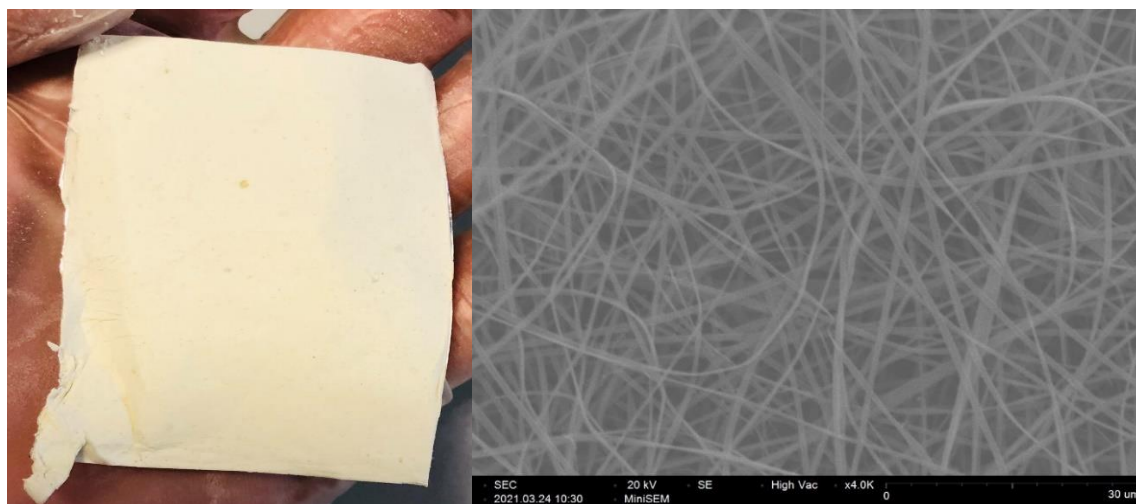
### 6.7.7. Microscopia Electrónica de Barrido

El diámetro y la morfología tienen un papel fundamental en las propiedades finales de las fibras electrohiladas y las propiedades de los materiales que se pueden fabricar (Karim y cols., 2020). En el Figura 24 se puede observar la morfología de las fibras de zeína sin extracto obtenida mediante electrospinning, las fibras se observan lisas, continuas, tubulares, alargadas, sin formación de perlas con tamaños entre 110 – 670 nm con un promedio de  $305 \pm 108$  nm. Las fibras con extracto mostraron una morfología lisa, tubulares, alargada y continua sin formación de perlas; presentan un aumento en el diámetro con tamaños que iban entre los 260 – 1320 nm con un promedio de  $731 \pm 221$  nm (Fig. 25). Este aumento en el diámetro de las fibras con extracto, se puede atribuir a la adición del extracto vegetal. Torres-Gines y cols. (2008) obtuvieron diámetros de fibras entre 150 – 300 nm utilizando zeína al 12% en masa. Estos autores reportaron un aumento de hasta 1000nm para soluciones al 40% en masa de zeína, esto se le atribuye al aumento de la viscosidad de la solución empleada. Es

por esto que la viscosidad del polímero es uno de los parámetros con mayor relevancia para definir el diámetro de la fibra.



**Figura 24. Morfología de fibras sin extracto obtenidas mediante SEM.**



**Figura 25. Morfología de fibras con extracto obtenidas mediante SEM**

Por otro lado, Theron y cols. (2004) reportaron que el contenido de etanol en la mezcla influye en el diámetro de la fibra. En un estudio realizado por González-Cruz y cols. (2021) reportan diámetros entre 300 y 400nm para fibras elaboradas mediante zeína con extracto de blueberry rico en compuestos polifenólicos, comprobaron que al adicionar el extracto polifenólicos las propiedades mecánicas del polímero se favorecían, permitiéndole electrohilar y obtener estructuras tubulares continuas. Karim y cols. (2020) obtuvieron fibras de zeína pura y adicionadas con aldehído cinámico al 10 y 40 %, y observaron que al

aumentar el porcentaje de aldehído aumentaba de diámetro de estas desde diámetros de  $334.2 \pm 0.13$  nm para fibra de zeína pura hasta  $337.0 \pm 2.16$  y  $383.0 \pm 2.14$  nm respectivamente, todas las fibras resultaron libres de perlas. Este aumento en el diámetro de las fibras fue atribuido a la adición de aldehído debido al aumento de la viscosidad de la solución.

#### **6.7.8. Eficiencia de encapsulación**

El desarrollo de recubrimientos para frutas es de gran importancia ya que se busca que sean capaces de estabilizar y liberar compuestos antimicrobianos. La eficiencia de encapsulación (EE) para el extracto etanólico en las fibras elaboradas con zeína fue de un 72%, estos resultados coinciden con los reportados por Dehcheshmeh (2019) quienes reportaron EE desde 60.89 hasta 91.55% para fibras de zeína con extracto de azafrán. Se sabe que la variación en la EE puede deberse a factores como, variaciones morfológicas en las fibras debido a los diferentes parámetros utilizados para su elaboración, como fueron variación en el voltaje, concentración de zeína y concentración del extracto utilizado. En un estudio elaborado por Karim y cols. (2020) reportaron EE de 93 a 99% para fibras de zeína con aldehído cinámico. Estos autores observaron que el aumento de la concentración de aldehído cinámico aumentó la EE, esto también gracias a la alta capacidad de la zeína como vehículo hidrófobo, la hidrofobicidad similar de la zeína y el compuesto a encapsular provoca una distribución homogénea del compuesto en la disolución de zeína antes de electrohilar, esto ayuda en el aumento de la EE. Por otro lado, Gómez-Estaca y cols., (2012) mencionan que la EE depende en gran medida de las interacciones entre el polímero, el extracto y el disolvente orgánico, además, si las interacciones son desfavorables la incorporación de tensioactivos puede mejorar la estabilidad del sistema, aumentando la EE (Suárez y cols., 2019). Los recubrimientos comestibles que integran agentes antimicrobianos tienen como objetivo extender la fase lag, suprimiendo la tasa de crecimiento de los microorganismos, entre los mecanismos por los que son incorporados estos agentes se propone la incorporación de agentes antimicrobianos directamente dentro de polímeros o bien, como capas de adsorbentes antimicrobianos dentro de las superficies de polímeros e inmovilizadores antimicrobianos, unidos por enlaces iónicos o covalentes (Solano Doblado y cols., 2018)

### **6.7.9. Identificación de compuestos en el extracto etanólico y en las fibras con extracto por HPLC-Masas**

Se obtuvieron un total de 26 compuestos en el extracto etanólico de hoja de jaca y fibra de zeína adicionada con el extracto, que se identificaron presuntivamente como ácido cafeico, naringenina, kaempferol 3-O-rutinosido, quercetín-glucurónido, ácido cinámico, catequina, carvacol entre otros (Cuadro 14). Se puede observar que 11 de los compuestos identificados estuvieron presentes tanto en el extracto puro como en la fibra con extracto. Vázquez-González y cols. (2020) obtuvo extracto vegetal a partir de hoja de jaca y reportó la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides (naringenina, kaempferol 3-O-rutinosido, kaempferol 3-O- $\beta$  D-apiofuranosilo, catequina, vicenin 2), ácidos orgánicos (ácido cafeico, ácido cinámico,  $\beta$ -OH-acteosido), los compuestos reportados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, además se evaluó la capacidad antifúngica del extracto contra patógenos como *C. gloeosporioides* y *P. italicum* obteniendo inhibiciones del 52.52 y 40.35% respectivamente, atribuyendo la inhibición a los compuestos fenólicos principalmente los flavonoides como kaempferol 3-O-rutinosido o catequina presentes en el extracto mediante la inducción a la muerte celular o apoptosis al inhibir las bombas de protones de los microorganismos. Por otro lado, Elhawary y cols. (2018) identificaron compuestos como naringenina, kaempferol 3-O-rutinosido y catequina mediante HPLC-ESI-MS/MS de diferentes variedades de *Ficus spp.* y la correlación de estos compuestos con actividades antimicrobianas, confirmando su efecto antimicrobiano. En otro estudio Rosa y cols. (2019) identificaron compuestos fenólicos de extractos de almendra y nuez pecana mediante HPLC-MS/MS, obtuvieron como resultados la presencia de flavonoles, flavononas y taninos hidrolizables, compuestos como ácido cinámico, catequina, quercetina, carvacol, isoramnetina o azaleatina entre otros de los cuales algunos de estos compuestos se encontraron presentes en el extracto de hoja de jaca, así como en el recubrimiento de fibra de zeína con extracto. Es importante mencionar que la presencia de estos compuestos en el extracto y la conservación de los mismos en las fibras de zeína es de gran importancia ya que se sabe los compuestos como naringenina, ácido cafeico, kaempferol, quercetina, catequina, entre otros pueden presentar actividad antimicrobiana, la cual es adquirida por las fibras elaboradas. En este estudio se pueden observar compuestos presentes en la fibra con extracto únicamente, esto puede deberse a las interacciones que existe entre los compuestos presentes

en el polímero y el extracto etanólico, se sabe que compuestos como los taninos hidrolizables por ejemplo el pentósido de ácido elágico, mono galoil-glucosa o la casuarina, son más susceptibles a hidrólisis lo que resulta en transformaciones y cambios de estas moléculas (Olivas-Aguirre y cols., 2015). Estos cambios estructurales pueden darse mediante interacciones débiles (interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals) y fuertes (enlaces iónicos o covalentes), dando como resultado compuestos derivados, estos cambios pueden depender de la temperatura, pH, tipo y concentración de proteína así como el tipo y estructura de compuestos fenólicos presentes (Hagerman, 2012). Además, en las fibras con extracto se encuentran compuestos como la naringenina el cual participa en la síntesis de otros compuestos fenólicos como el kaempferol (Dewick, 2009), o presencia del sulfato de ácido dihidrocafeico el cual es un metabolito derivado de compuestos como ácidos hidroxicinámicos como son el ácido cafeico o el ácido cinámico (Gómez-Juaristi, 2015).



**Cuadro 14. Identificación presuntiva de metabolitos secundarios mediante HPLC-Masas, análisis de extracto etanólico de hoja de jaca y fibra de zeína adicionada con extracto; se indica presencia (+) o ausencia (-) de estos metabolitos.**

No.	m / z experimental	Posible compuesto	Formula molecular	Extracto puro	Fibra con extracto
1	271.24	<sup>1</sup> Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	+	+
2	577.13	<sup>5</sup> Dimero de procianidina tipo B	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	+	-
3	511	<sup>2</sup> Cistanosido	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	+	-
4	179.03	<sup>3</sup> Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	+	+
5	593.15	<sup>1</sup> Kaempferol 3-O-rutinosido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	+	+
6	478.06	<sup>5</sup> Quercetín-glucurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	+	+
7	477.1	<sup>5</sup> Glicosido de isoramnetina	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	+	-
8	164.07	<sup>3</sup> Fenilalanina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	+	-
9	783.06	<sup>5</sup> Di-HHDP-glucosa (pedunculagina o casuarina)	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub>	+	-
10	741.19	<sup>4</sup> Kaempferol 3-O-β D-apiofuranosilo	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>	+	-
11	150.21	<sup>4</sup> Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	+	+
12	147.04	<sup>5</sup> Ácido cinámico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	+	+
13	288.99	<sup>1</sup> Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	+	+
14	433.11	<sup>5</sup> Naringenina-C-hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	-	+
15	434.04	<sup>5</sup> Pentósido de ácido elágico	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>12</sub>	-	+
16	639	<sup>4</sup> β-OH-acteosido	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	+	+
17	636.09	<sup>5</sup> Trigaloil-glucosa	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>	-	+
18	261	<sup>5</sup> Sulfato de ácido dihidrocafeico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> S	-	+
19	487	<sup>4</sup> l-isoleucina, n-pentafluoropropionil, pentadecil éster	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> F <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	+	+
20	331.06	<sup>5</sup> Mono galoil-glucosa (glucogaliina)	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	-	+
21	329.08	<sup>5</sup> Glicósido de ácido vanílico	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	+
22	499.06	<sup>5</sup> Hexósido de delphinidina (Cl <sup>-</sup> )	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> Cl O <sub>12</sub>	-	+
23	315.1	<sup>5</sup> Isómero hidroxitirosol-hexosa	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	+	+
24	315.04	<sup>5</sup> Isoramnetina o azaleatina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	-	+
25	316.02	<sup>5</sup> Metil-ácido elágico	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	-	+
26	593.12	<sup>4</sup> Apigenin 8-C-diglucosido (Vicenin 2)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	+	+

<sup>1</sup> Elhawary y cols. (2018)

<sup>2</sup> Timóteo y cols. (2015)

<sup>3</sup> López-Cobo y cols. (2014)

<sup>4</sup> Vázquez-González (2019)

<sup>5</sup> Rosa y cols. (2019)

## **CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES**

## 7. Conclusiones

- Se aisló e identificó el hongo *Aspergillus* spp. del fruto *Averrhoa carambola* L.
- Se comprobó la patogenicidad de las cepas identificadas como *A. sydowii*, *C. tenuissimum* y *Aspergillus* spp. en el fruto de *Averrhoa carambola* L.
- Se observó la estimulación del crecimiento *in vitro* de *Aspergillus* spp. con el extracto hidroalcohólico obtenido de hoja de uva de mar mediante EAU.
- Se demostró la actividad antifúngica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hoja de jaca obtenido por APH a una concentración de 5 mg / ml contra *A. sydowii*, *C. tenuissimum* y *Aspergillus* spp presentando inhibición total en la germinación de esporas e inhibición micelial superior al 80%.
- Fue posible la obtención de fibras con y sin extracto, de tamaño nanométrico, uniformes, resistentes, y con baja permeabilidad al vapor de agua mediante electrospinning; capaces de estabilizar los compuestos fenólicos del extracto de hoja de jaca, con eficiencia de encapsulación de 72% y efecto termoprotector; las cuales formaron un recubrimiento con propiedades antifúngicas, como una alternativa eficiente para el recubrimiento de frutos de *Averrhoa carambola* L.

## **CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA**

## 8. Bibliografía

- Abdel Hakim, F., Gad, H., Ali Radwan, R., Ayoub, N., & El-Shazly, M. (2019). Biological and phytochemical review on the genus *Coccoloba* (Polygonaceae). *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*, 3(2), 180-194.
- Abbehausen, C. F. (2010). A- $\beta$ -cyclodextrin/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(10), 1867-1876.
- Abu Bakar MF, A. K. (2015). Comparison of phytochemicals and antioxidant properties of different fruit parts of selected *Artocarpus* species from Sabah, Malaysia. *Sains Malaysiana.*, 44(3), 355-363.
- Andrew R, W. I. (2010). Genetic and environmental contributions to variation and population divergence in a broad-spectrum foliar defence of *Eucalyptus tricarpa*. *Annals of Botany*, 105, 707-717.
- Ashmawy, N., Salem, M., El Shanhorey, N., Al-Huqail, A., Ali, H., & Behiry, S. (2020). Eco-friendly Wood-biofungicidal and Antibacterial Activities of Various *Coccoloba uvifera* L. Leaf Extracts: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Compounds. *BioResources*, 15(2), 4165-4187.
- Awuor Ojwang, R., Muge, E., Mbatia, B., Mwanza, B., & Ogoyi, D. (2019). Comparative Analysis of Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of Methanolic Extracts of Leaves, Roots and Bark of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) from Selected Regions in Kenya and Uganda. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 16(1), 1-13.
- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 1-6.
- Balbuena Escalona, V. (2017). Evaluation of the antimicrobial effect of flavonoids obtained from the extracts of leaves of *Tamarindus indica* Lin. *MultiMED*, 16(1), 69-84.

- Barros, B., Braga, A., Dias de Souza, J., & Castro, F. (2003). Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. *Fitoterapia*, 74: 729-731.
- Barros, I. B. (2011). Phytochemical and antifungal activity of anthraquinones and root and leaf extracts of *Coccoloba mollis* on phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3): 535-541. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000300015>.
- Blanco-Pascual, N. F.-M. (2012). Effect of different protein extracts from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 118-131.
- Cascaes Teles, A. S. (2021). Combination of enzyme-assisted extraction and high hydrostatic pressure for phenolic compounds recovery from grape pomace. *Journal of Food Engineering*, 288, 1-8.
- Castañeda Andrade, A. J. (2019). Caracterización del crecimiento fúngico y de la inhibición de hongos fitopatógenos por agentes de biocontrol mediante microcalorimetría isotérmica (IMC). Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit, México.
- Chandra Shekhar T, A. G. (2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1, 244-249.
- Cheng, M. W. (2019). Characterization and application of the microencapsulated carvacrol/sodium alginate films as food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 259-267.
- Chiralt, A., Fabra, M. J., & Sánchez-González, L. (2012). Propiedades de las películas comestibles. Capítulo 2. En G. G.-A.-B.-F. Olivas-Orozco, *En: Películas y recubrimientos comestibles* (págs. 21-58). D.F., México: R. Clave Editorial.

- Cong, B., Wang, N., Lui, S., Lui, F., Yin, X., & Shen, J. (2017). Isolation, characterization and transcriptome analysis of a novel Antarctic *Aspergillus sydowii* strain MS-19 as a potential lignocellulosic enzyme source. *BMC microbiology*, *17*((1)), 129.
- Costa, A., Ribeiro, L., & Koblitz, M. (2011). Uso de atmosfera controlada e modificada em frutos climatéricos e não-climatéricos. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, *11*(1), 1-7.
- Cuervo Salcedo, D., Vanegas Campos, J., Corzo Barragan, D., & Correa Mahecha, F. (2019). Evaluation of the bactericidal capacity of vegetable extracts of *Drimys granadensis* with different polarities. *Revista Peruana de Biología*, *21*(1).
- Debeaufort, F., & Voilley, A. (2009). *Lipid-Based Edible Films and Coatings*. Editorial Springer Science+Business Media.
- Dehcheshmeh, M. A. (2019). Production of core-shell nanofibers from zein and tragacanth for encapsulation of saffron extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 272-279.
- Delgado, G. (2011). Nicaraguan fungi: a checklist of hyphomycetes. *Mycotaxon*, 115-534.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (Vol. 3er Edición). New Jersey, EU: John Wiley and Sons.
- Díaz-Ocaña, R. (Marzo de 2012). Preparación y caracterización de fibras poliméricas por electrohilado para su aplicación en cultivo celular. Hermosillo, Sonora, México: Tesis de Maestría en Ciencia de Materiales. Universidad de Sonora.
- Doilom, M., Taylor, J. E., Bhat, D. J., Chukeatirote, E., Hyde, K. D., To-anun, C., & Jones, E. (2016). Checklist of fungi on teak. *Mycosphere*, *7* (5), 656-678.
- Drosou Christina, K. M. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, *35*(2), pag. 139-162.

- Dukic, D., Maskovic, P., Moracanin, S., Kurcubic, V., Milijasevic, M., & Babic, J. (2017). Conventional and unconventional extraction methods applied to the plant, *Thymus serpyllum* L. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85, 1-5.
- Elhawary, S. S. (2018). LC–MS/MS-based chemometric analysis of phytochemical diversity in 13 *Ficus* spp. (Moraceae): Correlation to their in vitro antimicrobial and in silico quorum sensing inhibitory a. *Industrial Crops and Products*, 126, 261-271.
- Erencia, M., Macanás de Benito, J., & Carrillo, F. (2017). Preparación de soportes biomateriales de naturaleza proteica mediante electrohilatura. *Afinidad*, 75(582), Pag.83-90.
- Escoto García, T., Uribe García, A., Días Ramos, S. G., & García López, P. M. (2016). Evaluación del Rendimiento de Extractos en Hojas de *Ricinus communis* L. *Conciencia Tecnológica*(52), 1-16.
- Fernandez, A., Torres-Giner, S., & Lagaron, J. (2009). Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1427-1432.
- Fernández-Pavía, S., Rodríguez-Alvarado, G., Gómez-Dorantes, N., Gregorio-Cipriano, M., & Fernández-Pavía, Y. (2012). Enfermedades en plantas en el Estado de Michoacán. *Biológicas*, 14 (2): 75-89.
- Girmé, G., Grau, E., Calvo, M., & Leonardo, E. (2014). Clave dicotómica para la identificación de hongos aislados sistemáticamente en ambientes mediterráneos. *Revista de La Sociedad Española de Microbiología*, 57, 69-71.
- Gomez-Estaca, J. B.-M. (2012). Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 82-91.
- Gómez-Juaristi, M. (2015). *Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro de disponibilidad en humanos*. Tesis de



Doctorado en Nutrición y Bromatología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

- González-Cruz, E., Calderón-Santoyo, M., Barros-Castillo, C., & Ragazzo-Sánchez, J. (2021). Evaluation of biopolymers in the encapsulation by electrospraying of polyphenolic compounds extracted from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) variety Biloxi. *Polymer Bulletin*, 78 (7).
- González-Estrada, R. A.-V.-S.-S. (2017). Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen *Penicillium citrinum* on Persian lime. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(2), 114-122.
- González-Estrada, R. C.-S.-S. (2018). Antimicrobial soy protein isolate-based films: physical characterisation, active agent retention and antifungal properties against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 921-929.
- González-Estrada, R., Carvajal-Millán, E., Ragazzo-Sánchez, J., Bautista-Rosales, P., & Calderón-Santoyo, M. (2017). Control of blue mold decay on Persian lime: Application of covalently cross-linked arabinoxylans bioactive coatings with antagonistic yeast entrapped. *Food Science and Technology*, 85, 187-196.
- Goula, A. V. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 821-830.
- Gutierrez Avella, D., Ortiz García, C., & Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología 2008* (págs. 1-5). Santiago de Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Hagerman, A. (2012). Fifty years of polyphenol-protein complexes. *Recent advances in polyphenol research*, 3, 71-91.
- Hansraj, M., Kapil, V., Ankur, P., & Gaurav, S. (21 de Mayo de 2012). A COMPLETE REVIEW ON: Averrhoa carambola. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 1, 17-33.

- Heuchert, B., Braun, U., & Schubert, K. (2005). Morphotaxonomic revision of fungicolous Cladosporium species (Hyphomycetes). *Schlechtendalia.*, 13, 1-78.
- Hoog, G. (2000). *Atlas of Clinical Fungi* (2da. ed.). Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Hoque, M. S. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 1085-1087.
- K.Shanmugapriya, P. H. (2011). A comparative study of antimicrobial potential and phytochemical analysis of *Artocarpus heterophyllus* and *Manilkara zapota* seed extracts. *Journal of Pharmacy Research*, 4 (8): 2587-2589.
- Karim, M. F.-Z. (2020). Nanoencapsulation of cinnamic aldehyde using zein nanofibers by novel needle-less electrospinning: Production, characterization and their application to reduce nitrite in sausages. *Journal of Food Engineering*.
- Khazaei, N. E. (2016). Effect of active edible coatings made by basil seed gum and thymol on oil uptake and oxidation in shrimp during deep-fat frying. *Carbohydrate Polymers*, 137, 249-254.
- Krijghsheld , P., Bleichrodt , R., J. van Veluw , G., Wang, F., Müller , W., Dijksterhuis , J., & Wösten , H. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74, 1-29.
- Li X.C., E. H. (1999). Antifungal Activity of (—)-Epigallocatechin Gallate from *Coccoloba dugandiana*. *Planta Med.*, 65 (8): 780.
- Linares Rivero, C., Quiñones-Gálvez, J., Pérez Martínez, A., Carvajal Ortiz, C., Rivas Paneca, M., Cid Valdéz, G., . . . Capdesuñer Ruiz, Y. (2018). Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Bioteχνología Vegetal*, 18(1), 47-56.
- Lopera, S., Guzmán, C., Cataño, C., & Gallardo, C. (2009). Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado de aspersion, utilizando goma

- arábiga y maltodextrina como material de pared. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 55-65.
- López-Cobo, A. G.-C.-C.-G. (2014). Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and study of their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1-2), 1-11.
- Mateus Cagua, D., Arias C., M. E., & Orduz Rodríguez, J. O. (2015). Growing starfruit (*Averrhoa carambola* L.) and its behavior in the piedmont of Meta (Colombia). . *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 135-148.
- Menezes, C. M. (2020). Citral: antifungal activity and mode of action, against *Cladosporium oxysporum*. *Ciência e Natura*, 42, e54.
- Mengal, H., Abro, M., Jatoi, G., Nawab, L., Poussio, G., Ahmed, N., . . . Ali, A. (2020). Efficacy of different fungicides, botanical extracts and bio-control agents against *Cladosporium cladosporioides*, the causal agent of *Cladosporium* rot in grapes. *Acta Ecologica Sinica*, 40(4), 300-305.
- Mesa, V., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(1), 23-30.
- Mex-Álvarez, R., Garma-Quen, P., Maldonado-Velázquez, M., AguirreCrespo, F., Pantoja-Bolio, F., & Núñez-Pinto, Y. (2018). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de la Uva de Mar (*Coccoloba uvifera*). *Química Viva*, 14(2), 1-10.
- Miss Zacarías, D. M. (2020). Evaluación antimicrobiana de micro y nano estructuras adicionadas con citral. Nayarit, México.
- Miss-Zacarías, D. M., Iñiguez-Moreno , M., Calderón-Santoyo , M., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2020). Optimization of ultrasound-assisted microemulsions of citral using biopolymers: characterization and antifungal activity. *Full Terms & Conditions of access and use can be found*

[athttps://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lis20](https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lis20)  
*Journal of Dispersion Science and Technology*, 1-10.

Moricca, S., Ragazzi, A., & Assante, G. (2005). Biocontrol of Rust Fungi by *Cladosporium tenuissimum*. En A. R. Mc. Cracken, & M. H. Pei, *Rust Diseases of Willow and Poplar* (págs. 213-229). USA: CABI Publishing.

Murrieta-Martínez, C., Soto-Valdez, H., Pacheco-Aguilar, R., Torres-Arreola, W., Rodríguez-Felix, F., Ramírez-Wong, B., . . . Márquez-Ríos, E. (2019). Effect of Different Polyalcohols as Plasticizers on the Functional Properties of Squid Protein Film (*Dosidicus Gigas*). *Coatings*, 77 (9).

Myeong Hyeon Nam, M. S. (2015). *Mycobiology*, 43 (3), 354-359.

Olivas Orozco, G., González-Aguilar, G., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2012). *Películas y recubrimientos comestibles con efecto antimicrobiano*. Ciudad de México, México: Clave Editorial.

Olivas-Aguirre, F., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G., López-Díaz, J., Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L., & Ramos-Jimenez, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 55-66.

O'Neil, M. (2001). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. (13a ed.). Merck and Co., Inc.

Pandia Estrada, S. E. (2020). Obtención de películas comestibles empleando gelatina de pescado con extracto de orégano, y utilización como recubrimiento en filetes de trucha. Lima, Peru: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Pérez-Pérez E, E. G.-P. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, 31, 60-77.

Ramos-Hernández, J. A., Calderón-Santoyo, M., Navarro-Ocaña, A., Barros-Castillo, J. C., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2018). Use of emerging technologies in the extraction of

- lupeol,  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin from sea grape (*Coccoloba uvifera* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 55(4).
- Raybaudi-Massilia, R. M., Tapia, M. S., & Mosqueda-Melgar, J. (2012). Películas y recubrimientos comestibles con efecto antimicrobiano. Capítulo 12. En G. G.-A.-B.-F. Olivas-Orozco, *En: Películas y recubrimientos comestibles* (págs. 329-362). D.F., México: R. Clave Editorial.
- Rofríguez-Sánchez, I., Fuenmayor, C., Clavijo-Grimaldo, D., & Zuluaga-Domínguez, C. (2020). Electrospinningofultra-thinmembraneswith incorporation of antimicrobial agents for applications in active packaging: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-24.
- Rosa, L. A.-P.-F. (2019). Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22 (179).
- Shalom , T., Belsey, S., Chasnitsky, M., & Shoseyov, O. (2021). Cellulose Nanocrystals and Corn Zein Oxygen and Water Vapor Barrier Biocomposite Films. *nanomaterials*, 247.
- Sharma, B., & Kumar, P. (2009). In vitro antifungal potency of some plant extracts against *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Green Pharmacy*, 3(1), 63-65.
- Shaw, P. E., Moshonas, M. G., & Baldwin, E. A. (1992). Volatile constituents of *Coccoloba uvifera*. *Phytochemistry*, 31(10): 3495-3497.
- Sinniah, G. D., Adikaram, N. B., & Abatasekara, C. L. (2012). First report of *Cladosporium* infection of Mango inflorescence in the mid-country of Sri Lanka. *Tropical Agriculturist*, 160. 139-148.
- Solano-Doblado, L. G.-B.-M. (2018). Functionalized edible films and coatings. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21.

- Solano-Doblado, L. G.-B.-M. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21(2).
- Suárez Heredia, M. A., Rosero, J., Morillo Reinoso, Y., Haro Morales, G., & Ichau Espinoza, M. (2019). Encapsulation efficiency of carthenoid extracted from capsicum annuum in zein nanoparticles. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1 (1).
- Suganya, P., Vaseeharan, B., Vijayakumar, S., Balan, B., Govindarajan, M., Alharbi, N., . . . Benelli, G. (2017). Biopolymer zein-coated gold nanoparticles: Synthesis, antibacterial potential, toxicity and histopathological effects against the Zika virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 173, 404-411.
- Theron, S. A. (2004). Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*, 45, 2017-2030.
- Timóteo, P. K. (2015). A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry*, 175, 366-373.
- Torres-Giner, S. G. (2008). Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 601-614.
- Trinetta, V., & Cutter, C. (2016). Pullulan: A Suitable Biopolymer for Antimicrobial Food Packaging Applications. *Antimicrobial Food Packaging*, 385-397.
- Trinidad-ángel, E., Ascencio-valle, F., Ulloa, J., Ramírez-ramírez, J., & Ragazzo Sánchez, J. A. (2017). Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose in avocado Nayarit, Mexico.
- Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majiene, D., Jak, V., Savickas, A., & Toleikis, A. (2006). The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomed Pharmacother*, 60(5), 245-248.
- V., B. E. (2012). Evaluación del efecto antimicrobiano de flavonoides obtenidos de extractos de hojas de *Tamarindus indica* Lin. *RM*, 16(1), 15.

- Vázquez-González. (2019). Extracción de fenoles de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), mediante métodos emergentes: Caracterización y actividad antifúngica. Nayarit, México: Tesis de Maestría en Ciencia de Alimentos. Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tepic.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2): 194-205.
- Volcy , C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.
- Xu, Y., Chu, Y., Feng, X., Gao, C., Wua, D., Cheng, W., . . . Tang, X. (2020). Effects of zein stabilized clove essential oil Pickering emulsion on the structure and properties of chitosan-based edible films. *International Journal edible films*, 156, 111-119.
- Yang, M. S. (2018). Effect of SiO<sub>2</sub> , PVA and glycerol concentrations on chemical and mechanical properties of alginate-based films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2686-2694.
- Yang, S., Zhou, J., Li, D., Shang, C., Peng, L., & Pan, S. (2017). The structure-antifungal activity relationship of 5,7-dihydroxyflavonoids against *Penicillium italicum*. *Food Chemistry*, 224, 26-31.
- Yue, T.-T. ,.-X.-W.-Z. (2018). Electrospinning of Carboxymethyl Chitosan/Polyoxyethylene Oxide Nanofibers for Fruit Fresh-Keeping. *Nanoscale Res Lett*, 13, 239.
- Zhong, J., Mohan, S. D., Bell, A., Terry, A., Mitchell, G., & Davis, F. J. (2018). Electrospinning of food-grade nanofibres from whey protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 764-773.