



“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Tepic, Nayarit, **23/Abril/2021**

CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 04-2021

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. Miguel Antonio Santoyo González** con número de control **M14400294**, cuyo título es **“Nebulización como sistema de aplicación de agentes gras para el control de *Penicillium italicum* en limón persa en postcosecha”**, 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. Rita María Velázquez Estrada
(Presidente)

Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez
(Secretario)

Dr. Ramses Ramón González Estrada
(Vocal)

Dr. Enrique Torres Alonso
(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.

A T E N T A M E N T E
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, **22/04/2021**

No. Oficio: 25-259-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "Nebulización como sistema de aplicación de agentes Gras para el control de *Penicillium Italicum* en Limón Persa en Postcosecha" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos del C. ING. MIGUEL ANTONIO SANTOYO GONZÁLEZ con numero de control M14400294 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 constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican articulos en revistas Indizadas 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 mas por el momento envío saludos cordiales

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®


MANUEL ÁNGEL URIBE VÁZQUEZ
DIRECTOR




OGTM/afk

Cop. Archivo DEPI



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country
C.P.63175

Tepic, Nayarit. Tel. 01 (311) 2119400 y 2119401

e-mail: info@ittepico.edu.mx



Detector de plagio v. 1740 - Informe de originalidad 21/04/2021 03:05:41 p.

Documento analizado: TESIS SANTOYO.docx Licenciado para: Roberto Enriquez_License2

Preajuste de comparación: Palabra a palabra. Idioma detectado: Spanish

Tabla de relaciones:

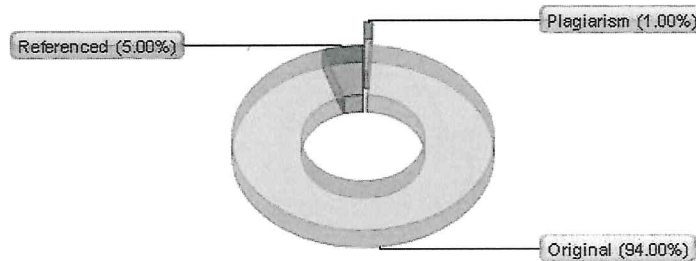


Gráfico de distribución:



Principales fuentes de plagio:

0.9	35	wrds:https://repositorio.tec.mx/bitstream/handle/11285/569184/DocsTec_7154.pdf?sequen...
0.8	36	wrds:https://higieneambiental.com/higiene-alimentaria/buenas-practicas-para-el-contro...
0.6	23	wrds:https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/26482/Los%20espacios%20p%c3%babl...

[Mostrar otras fuentes:]

Detalles de recursos procesados:

126 - Okay / 43 - Ha fallado

[Mostrar otras fuentes:]

Notas importantes:

Wikipedia: [no detectado]	Libros de Google: GoogleBooks detectado!	Servicios de escritura fantasma: [no detectado]	Anti-trampa: [no detectado]
---	---	---	---

Referencias activas (URL extraídas del documento):

No se detectaron URL

URL excluidas:

No se detectaron URL

URL incluidas:

No se detectaron URL

Análisis detallado del documento:



Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **30/Abril/2021**
No. Oficio: 25-276-2021
Asunto: Autorización de impresión

MIGUEL ANTONIO SANTOYO GONZÁLEZ
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 **“Nebulización como sistema de aplicación de agentes gras para el control de *Penicillium italicum* en limón persa en postcosecha”**

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.



SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

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

**NEBULIZACIÓN ULTRASÓNICA COMO SISTEMA DE APLICACIÓN
DE AGENTES GRAS PARA EL CONTROL DE *Penicillium italicum*
EN LIMÓN PERSA EN POSTCOSECHA**

POR:

ING. MIGUEL ANTONIO SANTOYO GONZALEZ

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. Rita María Velázquez Estrada

CO-DIRECTOR:

Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez

Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico de Tepic

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Carta de sesión de derechos

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el día 27 de mayo del 2021, el que suscribe Miguel Antonio Santoyo Gonzalez alumno del Programa de Posgrado en Ciencias en Alimentos con número de control M14400294, manifiesto que todos los resultados derivados de mis estudios de posgrado, realizados bajo la dirección de la Dra. Rita María Velázquez Estrada, pertenecen al 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



Miguel Antonio Santoyo Gonzalez

EL PRESENTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR TECNM, EL CUAL LLEVA POR NOMBRE “**NEBULIZACIÓN ULTRASÓNICA DE ÁCIDO ACÉTICO PARA EL CONTROL IN VITRO DE PENICILLUM ITALICUM**”

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a mi FAMILIA que ha sido y seguirá siendo un pilar importante para formación como investigador.

A mi padre y madre que siempre me apoyaron en las decisiones durante este proceso y me guiaron en cada una de ellas y siempre fueron pilar fundamental para llevar a cabo este primer paso en mi carrera como investigador.

A mi equipo de atletismo GARROCHA NAYARIT que fue un pilar importante para mí desarrollo personal durante mi formación como maestro en ciencias.

A mi entrenador Luis Antonio López Ramírez que siempre mantuvo su compromiso hacia mí, aunque estuviera en los peores momentos tanto deportivos y académicos.

A mis amigos Fernanda, Yareli, Villa, Irlanda, Amira, Brian y entre otros que durante mi crecimiento personal y deportivo aportaron algo para afrontar los diferentes retos y convertirme en lo que soy actualmente e hicieron que mis entrenamientos y actos académicos fueran más felices y amenos.

A la comunidad de atletismos de Tepic desde lanzadores, saltadores y corredores que han estado presente desde mi inicio en la investigación.

A mis amigos Kiabeth, Karla, Héctor, Cristina, Leonardo, Azrael, Georgina del postgrado que siempre me apoyaron y sacaron más de una sonrisa cuando ya estaba cansado.

RECONOCIMIENTOS

A mi directora y asesora de tesis el Dra. Dra. Rita María Velázquez Estrada por la confianza brindada y la orientación durante todo el proceso de mi formación como maestro en ciencias desde el inicio hasta el último momento del mismo.

A mi co-director el Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez por el apoyo y el tiempo dedicado y la guía para la formación de este proyecto.

A mi revisor y amigo el Dr. Dr. Ramsés Ramón González Estrada que fue un gran apoyo antes y durante el proceso para convertirme en maestro en ciencias.

Un agradecimiento al Dr. Enrique Torres Alonso por darme la oportunidad de desarrollarme en una nueva área de las ciencias que fue una idea que se volvió realidad.

Al INSITUTO TECNOLÓGICO DE MORELIA por el apoyo recibido en el desarrollo de este proyecto de investigación y darme herramientas para mi desarrollo como investigador durante mi estancia.

Al POSGRADO EN METALURGIA por brindarme el soporte y herramientas durante mi formación como maestro en ciencias.

Al LABORATORIO DE SIMULACIÓN MATEMÁTICA por el prestamos de equipo durante la investigación realizada.

Al Dr. Héctor Javier Vergara Hernández por el préstamo de la licencia de software ANSYS y apoyo durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC por el apoyo recibido en el desarrollo de este proyecto de investigación y por haberme permitido desempeñarme a nivel profesional dentro de sus instalaciones.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado y en general, se agradece a todas aquellas personas que en forma directa o indirecta contribuyeron a que este trabajo de investigación pudiera llevarse a cabo.

RESUMEN

Santoyo Gonzalez Miguel Antonio. Maestría en ciencias en alimentos (MCA). Instituto Tecnológico de Tepic Nayarit, diciembre del 2021. “NEBULIZACIÓN ULTRASÓNICA COMO SISTEMA DE APLICACIÓN DE AGENTES GRAS PARA EL CONTROL DE *Penicillium italicum* EN LIMÓN PERSA EN POSTCOSECHA”
Director de tesis: Dra. Rita María Velázquez Estrada.

Penicillium italicum es un hongo que causa la pudrición azul en cítricos generando grandes pérdidas económicas. En los últimos años se ha buscado implementar la aplicación de agentes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) para el control de hongos en frutos de postcosecha, evitando así el uso convencional de fungicidas sintéticos. La nebulización ultrasónica surge como un método de aplicación de agentes, donde la niebla se genera con bajos volúmenes de solución, además la dispersión de gotas es homogénea y cubre una mayor área de contacto con el fruto. Por otro lado, la herramienta dinámica computacional de fluidos (CFD, por sus siglas en inglés) ha comenzado a incursionar en el área de postcosecha para simular la distribución de temperatura, dispersión y deposición de partículas, su velocidad y flujo para optimizar los tratamientos o la geometría de los equipos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la nebulización ultrasónica como sistema de aplicación de bicarbonato de sodio y ácido acético para el control de *Penicillium italicum* y en la calidad del fruto de limón persa en etapa de postcosecha.

Los tratamientos para la evaluación *in vitro* consistieron en colocar sobre una caja Petri discos del hongo que fueron tratados con nebulización ultrasónica de bicarbonato de sodio (0, 1, 2, 3%), ácido acético (0, 0.5, 1, 1.5%) y agua destilada como control positivo de manera individual en diferentes tiempos (5, 10 y 15 min) y se evaluaron las pruebas de crecimiento micelial, esporulación y porcentaje de germinación con un diseño factorial 2x3x3 como diseño experimental y un análisis estadístico con una ANOVA y una prueba F de Fisher para la diferencia de medias.

En la parte *in vivo* se usaron limones en madurez de corte y fueron inoculados artificialmente con esporas de *P. italicum*, se dieron tratamientos curativos y preventivos y fueron evaluados con un diseño unifactorial y analizados con una ANOVA como análisis estadístico con una prueba T de Tuckey para diferencias de medias en temperaturas de 25°C y 15°C y se midió la incidencia y severidad de la enfermedad de la pudrición azul. Además, se evaluaron parámetros de calidad (pH, sólidos solubles, acidez, color, pérdida de peso, porcentaje de jugo) a 15°C durante 20 días en los frutos nebulizados. Se realizó una simulación de CFD con el software Fluent 15 de ANSYS con el modelo VOF y el modelo de turbulencia k-épsilon para obtener la dinámica de fluidos de la neblina resolviendo las ecuaciones de continuidad y momento en las 3 direcciones (x, y, z).

Los tratamientos de nebulización ultrasónica de ácido acético mostraron inhibiciones mayores en todas las pruebas de la etapa *in vitro* y logro reducir por completo la germinación. Los tratamientos en la etapa *in vivo* redujeron el desarrollo de la incidencia enfermedad en temperaturas de 25 y 15 °C (50% y 20%) de manera curativa y preventiva. Los parámetros de calidad no se vieron afectados de manera negativa en los frutos tratados con nebulización ultrasónica con respecto de los controles. Mediante CFD se obtuvieron los vectores de velocidad, contornos de fase de la neblina/aire, y la trayectoria de las partículas dentro de sistema en las etapas *in vitro* e *in vivo*. La aplicación por nebulización ultrasónica de los agentes GRAS ha demostrado potencial para el control de *P. italicum* en la etapa *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: Agentes GRAS, *Penicillium italicum*, Poscosecha, Nebulización Ultrasónica

SUMMARY

Santoyo Gonzalez Miguel Antonio. Master of Science in Food (MCA). Technological Institute of Tepic Nayarit, December 2021. "ULTRASONIC NEBULIZATION AS A SYSTEM FOR THE APPLICATION OF GRAS AGENTS FOR THE CONTROL OF *Penicillium italicum* IN PERSIAN LEMON IN POST-HARVEST" Thesis director: Dra. Rita María Velázquez Estrada.

Penicillium italicum is a fungus that causes blue rot in citrus fruits, generating great economic losses. In recent years, it has been sought to implement the application of agents generally recognized as safe (GRAS) for the control of fungi in postharvest fruits, thus avoiding the conventional use of synthetic fungicides. Ultrasonic nebulization arises as a method of applying agents, where the mist is generated with low volumes of solution, in addition, the dispersion of drops is homogeneous and covers a greater area of contact with the fruit. On the other hand, the computational fluid dynamics (CFD) tool has begun to venture into the postharvest area to simulate the temperature distribution, dispersion, and deposition of particles, their speed and flow to optimize treatments or the geometry of the equipment.

The objective of this work was to evaluate the effect of ultrasonic nebulization as a system for applying sodium bicarbonate and acetic acid for the control of *Penicillium italicum* and on the quality of the Persian lemon fruit in the postharvest stage.

The treatments for the *in vitro* evaluation consisted of placing fungus discs on a Petri dish that were treated with ultrasonic nebulization of sodium bicarbonate (0, 1, 2, 3%), acetic acid (0, 0.5, 1, 1.5%) and distilled water as a positive control individually at different times (5, 10 and 15 min) and the tests of mycelial growth, sporulation and germination percentage were evaluated with a 2x3x3 factorial design as experimental design and a statistical analysis with an ANOVA and a Fisher's F test for the difference of means.

In the *in vivo* part, lemons in cut maturity were used and they were artificially inoculated with *P. italicum* spores, curative and preventive treatments were given and they were evaluated with an univariate design and analyzed with an ANOVA as statistical analysis with a Tuckey's T test for mean differences at temperatures of 25°C and 15°C, and the incidence and severity of blue rot disease were measured. In addition, the quality parameters (pH, soluble solids, acidity, color, weight loss, percentage of juice) will be evaluated at 15°C for 20 days in the nebulized fruits. A CFD simulation was performed with ANSYS Fluent 15 software with the VOF model and the k-epsilon turbulence model to obtain the fluid dynamics of the mist by solving the continuity and moment equations in the 3 directions (x, y, z).

Ultrasonic acetic acid nebulization treatments showed greater inhibitions in all *in vitro* tests and achieved to completely reduce germination. The treatments in the *in vivo* stage reduced the development of the disease incidence at temperatures of 25 and 15 °C (50% and 20%) in a curative and preventive manner. The quality parameters have not been negatively affected in the fruits treated with ultrasonic nebulization

with respect to the controls. By means of CFD, the velocity vectors, phase contours of the mist / air, and the trajectory of the system particles were obtained in the *in vitro* and *in vivo* stages. The application by ultrasonic nebulization of GRAS agents has shown potential for the control of *P. italicum* in the *in vitro* and *in vivo* stage.

Keywords: GRAS agents, *Penicillium italicum*, Postharvest, Ultrasonic Nebulization.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1	Nebulización ultrasónica de diferentes agentes en frutos en postcosecha.	18
Cuadro 2.2	Investigaciones realizadas en el área de postcosecha usando técnica de CFD.	31
Cuadro 6.1	Propiedades de los Fluidos Utilizados.	51
Cuadro 7.1	Porcentaje de inhibición micelial de <i>Penicillium italicum</i> por nebulización de bicarbonato de sodio, ácido acético y agua.	59
Cuadro 7.2	Diferencia de medias con prueba de Fisher entre tipo de sanitizante, se destaca que el ácido acético tuvo un mayor efecto en la inhibición micelial que el bicarbonato de sodio y agua destilada.	61
Cuadro 7.3	Tratamientos de ácido acético, bicarbonato de sodio y agua sobre la esporulación de <i>Penicillium italicum</i> .	63
Cuadro 7.4	Diferencia de medias con prueba de Fisher entre tipo de sanitizante, se destaca que el ácido acético tuvo un mayor efecto en la esporulación que el bicarbonato de sodio y agua destilada.	64
Cuadro 7.5	Tratamientos de ácido acético, bicarbonato de sodio y agua sobre la germinación de <i>Penicillium italicum</i> .	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Producción de limón persa en México durante el 2018.	4
Figura 2.2	Morfología de <i>Penicillium italicum</i> .	6
Figura 2.3	Esquema general de nebulización.	12
Figura 2.4	Esquema del mecanismo de cavitación acústica para la generación de nebulización.	12
Figura 2.5	Mecanismo por capilaridad para la generación de nebulización.	13
Figura 2.6	Generación de la nebulización ultrasónica.	14
Figura 2.7	Mecanismo de capilaridad.	14
Figura 2.8	Aplicaciones de CFD en la industria espacial y la automotriz (NASA y formula 1).	21
Figura 2.9	Esquematación de una malla estructurada.	22
Figura 2.10	Esquematación de una malla no estructurada.	23
Figura 2.11	Discretización unidimensional por volumen finito.	26
Figura 6.1	Módulo de soporte para los discos con el hongo	37
Figura 6.2	Diagrama de flujo del sistema de nebulización por medio de CFD.	44
Figura 6.3	Modelo Virtual del Sistema de Nebulización en su vista frontal (a) y vista superior (b).	45
Figura 6.4	Vista superior del sistema de nebulización ultrasónica y medidas de cajas Petri, muestras de hongos y nebulizador	46
Figura 6.5	Vista lateral del sistema de nebulización ultrasónica con frutos de limón (a) y vista superior de sistema (b)	46
Figura 6.6	Mallado del Sistema de nebulización ultrasónica hecho en GAMBIT.	48
Figura 6.7	Mallado del Sistema de nebulización ultrasónica con frutos de limón hecho en GAMBIT	48
Figura 6.8	Partes del sistema de nebulización ultrasónica.	49
Figura 6.9	Condiciones de asignadas del Sistema de Nebulización ultrasónica.	49

Figura 6.10	Condiciones de fronteras del sistema de nebulización ultrasónica virtual.	50
Figura 6.11	Planos para el análisis de resultados a) plano Z central en la entrada del aire y salida de neblina al sistema central b) plano Y 2.5 a la altura de las cajas Petri y las muestras de hongos.	53
Figura 7.1	Crecimiento micelial de <i>P. italicum</i> después de aplicar los tratamientos nebulización de bicarbonato de sodio.	55
Figura 7.2	Crecimiento micelial de <i>P. italicum</i> después de aplicar los tratamientos nebulización de ácido acético.	56
Figura 7.3	Crecimiento micelial de <i>P. italicum</i> después de aplicar los tratamientos nebulización de agua.	57
Figura 7.4	Tratamientos de nebulización ultrasónica de bicarbonato de sodio, ácido acético y agua destilada sobre la germinación de <i>Penicillium italicum</i> .	67
Figura 7.5	Vectores de velocidad en el plano Z central en los tiempos 30 segundos (a), 120 segundos (b), 360 segundos (c) y 600 segundos (d) en el sistema de nebulización ultrasónica.	71
Figura 7.6	Vectores de velocidad en el plano Y a una altura de 2.5cm de la parte inferior del sistema en los tiempos 30 segundos (a), 120 segundos (b), 360 segundos (c) y 600 segundos (d) en el sistema de nebulización ultrasónica	74
Figura 7.7	Contornos de fases de la neblina en el plano Y a 2.5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 30 (a), 120 (b), 360 (c) y 600 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica.	76
Figura 7.8	Trayectorias de partículas y sus velocidades en m/s.	77
Figura 7.9	Trayectorias de partículas y sus diámetros en micras.	78
Figura 7.10	Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica (b) en el tiempo 30 segundo	80
Figura 7.11	Comparación de simulación (a) y modelo real de sistema de nebulización ultrasónica (b) en el tiempo de 120 segundos.	81

Figura 7.12	Comparación de simulación (a) y modelo real de sistema de nebulización (b) durante el tiempo de 360 segundos.	82
Figura 7.13	Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la incidencia de la enfermedad de <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón persa a 25 °C durante 13 días (CNC: control negativo curativo; CPC: control positivo curativo; AA 1% C: ácido acético 1% curativo; AA 1.5% C: ácido acético 1.5% curativo; CNP: control negativo preventivo; CPP: control positivo preventivo; AA 1% P: ácido acético 1% preventivo; AA 1.5% P: ácido acético 1.5% preventivo)	83
Figura 7.14	Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la severidad de la herida de la enfermedad de <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón persa a 25 °C durante 13 días	84
Figura 7.15	Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la incidencia de la enfermedad de <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón persa a 15 °C durante 13 días	86
Figura 7.16	Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la severidad de la herida de la enfermedad de <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón persa a 15 °C durante 13 días	87
Figura 7.17	Frutos de limón inoculados artificialmente con <i>Penicillium italicum</i> y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 25 °C, prueba curativa	88
Figura 7.18	Frutos de limón inoculados artificialmente con <i>Penicillium italicum</i> y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 25 °C, prueba preventiva	89
Figura 7.19	Frutos de limón inoculados artificialmente con <i>Penicillium italicum</i> y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 15 °C evaluados de manera curativa	90

Figura 7.20	Frutos de limón inoculados artificialmente con <i>Penicillium italicum</i> y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 15°C evaluados de manera preventiva	91
Figura 7.21	Acidez titulable de frutos de limón persa tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%)	93
Figura 7.22	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre el pH de frutos de limón persa	94
Figura 7.23	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre sólidos solubles totales (SST) de frutos de limón persa	95
Figura 7.24	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre la firmeza de frutos de limón persa	96
Figura 7.25	Pérdida de peso de frutos tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) almacenados durante 20 días	98
Figura 7.26	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) en el rendimiento de juego de frutos de limón persa almacenados durante 20 días	100
Figura 7.27	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre la luminosidad (L^*) de frutos de limón persa almacenados durante 20 días	101
Figura 7.28	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre el croma (c^*) de frutos de limón persa almacenados durante 20 días	102
Figura 7.29	Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre el ángulo hue (h^*) de frutos de limón persa almacenados durante 20 días	103

Figura 7.30	Efecto sobre el color de frutos tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) y almacenados durante 20 días	104
Figura 7.31	Vectores de velocidad de la neblina en el plano Z a 5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 5 (a), 20 (b), 35 (c) y 120 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica con limones	106
Figura 7.32	Contornos de fases de la neblina en el plano Z a 5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 5 (a), 20 (b), 35 (c) y 120 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica con limones	108
Figura 7.33	Contornos de fases de la neblina en el plano Y a 5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 5 (a), 20 (b), 35 (c) y 120 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica con limones	110
Figura 7.34	Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica con frutos de limón (b) en el tiempo de 5 segundos	112
Figura 7.35	Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica con frutos de limón (b) en el tiempo de 35 segundos	113
Figura 7.36	Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica con frutos de limón (b) en el tiempo de 45 segundos	113

Contenido

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	V
SUMARY	VI
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del Limón Persa (<i>Citrus latifolia</i>).....	3
2.1.1 Producción nacional y estatal	4
2.1.2 Enfermedades postcosecha del limón persa	5
2.2 <i>Penicillium italicum</i>	5
2.3 Sistemas de control de patógenos en etapa postcosecha.....	6
2.3.1 Control físico	6
2.3.2 Control químico	7
2.3.3 Control biológico	8
2.4 Agentes GRAS para el control de patógenos en postcosecha	8
2.4.1 Bicarbonato de sodio	8
2.4.2 Ácido acético.....	9
2.5 Descripción del ultrasonido.....	10
2.6 Nebulización Ultrasónica	11
2.6.1 Sistema de nebulización ultrasónica para el control de patógenos en etapa postcosecha.....	15
2.8 Dinámica de fluidos Computacional (CFD).....	20
2.8.1 Geometría y malla.....	22
2.8.2 Ecuaciones diferenciales de conservación	23
2.8.3 Discretización y método de volumen finito.	25
2.8.4 Algoritmo de segregación basado en la presión	26
2.8.5 Modelo multifásico (VOF).....	27
2.8.6 Modelos de turbulencia	28
2.8.7 Modelo k-épsilon.....	29
2.8.8 El CFD y su aplicación en la postcosecha	30
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	32

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	34
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo General.....	35
5.2 Objetivos Específicos	35
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Plan general	36
6.2 Reactivación del <i>Penicillium italicum</i>	36
6.3 Preparación de agentes GRAS	36
6.4 Sistema de nebulización ultrasónica	36
6.5 Tratamientos de nebulización ultrasónica en <i>P. italicum in vitro</i>	37
6.6 Diseño experimental y análisis estadístico de la etapa <i>in vitro</i>	38
Para la etapa <i>in vitro</i> se utilizó un diseño factorial 2x3x3 como diseño experimental y para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA y una prueba F de Fisher para la diferencia de medias con el software STATISTICA 12. ..	38
6.7 Pruebas <i>in vitro</i>	38
6.7.1 Crecimiento micelial.....	38
6.7.2 Esporulación	39
6.7.3 Porcentaje de germinación	40
6.8 Tratamientos de nebulización ultrasónica en <i>P. italicum in vivo</i>	40
6.8.1 Tratamiento curativo.	41
6.8.2 Tratamiento preventivo.	41
6.9 Diseño experimental y análisis estadístico de la etapa <i>in vivo</i>	41
6.10 Pruebas <i>in vivo</i>	41
6.10.1 Porcentaje de incidencia.	41
6.10.2 Porcentaje de severidad de la enfermedad.....	41
6.11 Parámetros de calidad.....	42
6.11.1 Firmeza.....	42
6.11.2 Porcentaje de pérdida de peso.	42
6.11.3 Sólidos solubles totales.....	42
6.11.4 Acidez titulable.....	43
6.11.5 Determinación de porcentaje de jugo.....	43
6.11.6 Determinación de color.	43
6.11.7 Determinación de pH.	43

6.12 Metodología de dinámica de fluidos por computadora (CFD).....	44
6.12.1 Pre-procesamiento.....	45
6.12.1.1 Creación de la geometría virtual.	45
6.12.1.2 Generación del mallado.	47
6.12.1.3 Condiciones fronteras e iniciales.....	49
6.12.2 Procesamiento	52
6.12.3 Post-procesamiento	53
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
7.1 Efecto de la nebulización ultrasónica de bicarbonato de sodio, ácido acético y agua a nivel “ <i>in vitro</i> ”	54
7.1.2 Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición micelial (%ICM) de <i>Penicillium italicum</i>	54
7.1.3 Esporulación de <i>Penicillium italicum</i>	62
7.1.4 Germinación de <i>Penicillium italicum</i>	64
7.2 Simulación de dinámica de fluidos por computadora del sistema de nebulización a nivel “ <i>in vitro</i> ”.	68
7.2.1 Campos de vectores de velocidad.	68
7.2.2 Contornos de fase.....	75
7.2.3 Inyección de partículas	77
7.2.5 Comparación de simulación <i>in vitro</i> con modelo real.	80
7.3 Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre <i>P.italicum</i> “ <i>in vitro</i> ” y calidad en el limón persa.	83
7.3.1 Porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad.....	83
7.4 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre parámetros de calidad.	92
7.4.1 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre la acidez titulable.....	92
7.4.2 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre el pH.....	94
7.4.3 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre sólidos solubles totales (SST).	95
7.4.4 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre la firmeza.....	96
7.4.5 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre la pérdida de peso.....	97
7.4.6 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre el porcentaje de jugo.	99
7.4.7 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre el color.....	100
7.5 Simulación de dinámica de fluidos por computadora del sistema de nebulización a nivel “ <i>in vivo</i> ”.	105

7.5.1 Vectores de velocidad de flujo <i>in vivo</i>	105
7.5.2 Contornos de fase <i>in vivo</i>	107
7.5.3 Comparación de la simulación <i>in vivo</i> con modelo real.....	111
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....	114
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS.....	116

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En México existen 23, 748, 943 ha dedicadas a la agricultura, de las cuales la superficie cultivada de frutales tropicales y subtropicales es de 1, 483 139 ha, Nayarit cuenta con 370, 512 ha destinadas a la agricultura; de estas, 58, 768.71 ha son ocupadas por cultivos tropicales y subtropicales, de los cuales destacan en mayor proporción: aguacate, mango, café, limón, plátano y guanábana (SIAP, 2019). La producción de limón persa está liderada por los estados de Veracruz y Oaxaca; Veracruz con una producción de 733,632 ton ocupa el primer lugar; mientras que Nayarit ocupa el lugar número trece con una producción de 22,516 ton (SIAP, 2018).

En el limón las heridas producidas desde el campo, en la empacadora, almacenamiento y/o distribución; son vías de entrada de diferentes patógenos que causan pérdidas de 30-50% de la producción (Ismail y Zhang, 2004). *Penicillium italicum* es uno de los patógenos más comunes en enfermedades de cítricos en postcosecha, es el causante de la enfermedad de la pudrición azul. Por la gran producción de esporas, este patógeno se puede encontrar desde el campo, empacadoras, equipos, en el almacenamiento e inclusive en la comercialización.

Los sistemas de control postcosecha son usados para prolongar la vida útil de los frutos, controlar los microorganismos que causan enfermedades, evitar trastornos fisiológicos y mejorar la calidad de productos. Comúnmente se aplican fungicidas sintéticos que aunque eliminan hongos patógenos, al usarse indiscriminadamente, inducen resistencia en los hongos y por su toxicidad perjudican, tanto al medio ambiente, como al consumidor (Yang y cols., 2017). En años recientes se ha buscado implementar la aplicación de agentes de origen natural y que sean considerados GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) para el control de fitopatógenos en frutos en postcosecha (Fallanaj y cols., 2016).

Los métodos de aplicación de agentes incluyen métodos como la inmersión y la aspersion, así como una combinación de ambos. La nebulización ultrasónica surge

recientemente como un método de aplicación de agentes GRAS cuyas ventajas radican en el ahorro de los agentes debido a los bajos volúmenes de solución requeridos para producir neblina que tiene la capacidad de homogenizar la dispersión de gotas y cubrir una mayor área de contacto en el fruto.

El CFD (Computer Fluids Dynamics) o dinámica computacional de fluidos, es una herramienta que se ha comenzado a utilizar en el área de postcosecha para simular la distribución de temperatura, dispersión y deposición de partículas, su velocidad y flujo, esto para optimizar los tratamientos o la geometría de los equipos (Ambaw y cols., 2013; Ambaw y cols., 2013; Delele y cols., 2009, 2012a, 2012b).

Por lo anterior, en el presente estudio se propone evaluar el sistema de nebulización ultrasónica como método de aplicación de agentes GRAS para el control de *Penicillium italicum* en limón persa en postcosecha, además se evalúo la distribución y dispersión de la neblina en el sistema mediante una simulación por CFD para conocer la distribución de la niebla en el sistema y mejorar el sistema de nebulización.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del Limón Persa (*Citrus latifolia*)

El limón persa (*Citrus latifolia*) es un cítrico originario del continente asiático desde donde se diseminó, primero al Medio Oriente y, más adelante, a Europa. En México fue introducido durante la colonización española tomando relevancia en la citricultura nacional (SIAP, 2018).

Este cítrico es de mayor tamaño en comparación de otras variedades de limón, son frutas esféricas y ovaladas de 35-40 mm diámetro y 60mm de largo (Malo y cols., 1994), el árbol de limón crece en climas cálidos tropicales y subtropicales con valores de humedad relativa entre 80-90%, la que resulta ventajosa para su crecimiento, la fruta tiene un peso mínimo de 55 g y 75 g como máximo (SAGARPA, 2012).

Los frutos de limón son cosechados cuando se encuentran en madurez de consumo y después de ser almacenados a temperaturas en un intervalo de 10-12°C, ya que temperaturas inferiores a este intervalo provocan desordenes fisiológicos en el fruto. Otro factor que afecta a limones es la humedad relativa, la cual se debe mantener en niveles de 95% para evitar una deshidratación de la cáscara del fruto. El contenido de jugo es del 40% al 60%, una cantidad de ácido ascórbico de 20 a 40 mg por cada 100 ml de jugo, un índice de acidez del 5 al 6%. Es un fruto que no contiene semillas, pero pueden desarrollar semillas si el árbol crece cerca de otras clases de cítricos, tiene la característica de no ser climatérico, no maduran después de la cosecha y su tasa de respiración y producción de etileno no se ve afectada (Ladanyia, 2008).

2.1.1 Producción nacional y estatal

En México, los estados de mayor producción de limón persa son Veracruz y Oaxaca; Veracruz ocupa el primer lugar en producción a nivel nacional con una producción obtenida en el año 2018 de 733,632 toneladas y un rendimiento de 16 ton/ha, Nayarit ocupa el lugar número 13 con una producción de 22,516 toneladas y un rendimiento de 9.324 ton/ha durante el mismo año (Figura 2.1)(SIAP, 2018)

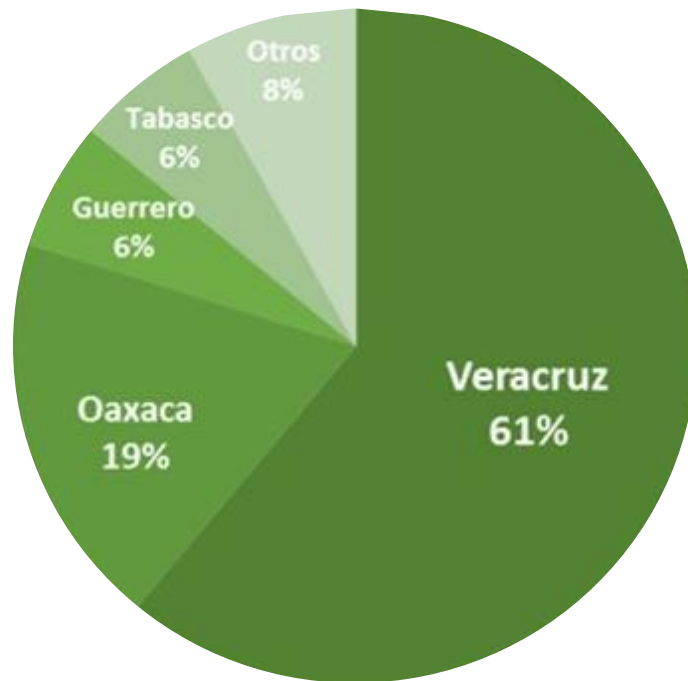


Figura 2.1. Producción de limón persa en México durante el 2018 (SIAP 2018).

2.1.2 Enfermedades postcosecha del limón persa

Las heridas producidas en el limón desde la cosecha, almacenamiento y distribución son foco de infección de diferentes patógenos que causan pérdidas de 30-50% de la producción, entre los patógenos que causan enfermedades se encuentran *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria citri* (Ismail y Zhang, 2004). Durante la época de cosecha del limón persa se debe tener cuidado en el manejo de los frutos desde la forma de cortar hasta el tipo de empaque, esto evitara daños como golpes, rasguños, rupturas por presiones, rajaduras y otras formas que afecten la forma física del limón. Este tipo de daños producirán heridas macro o microscópicas por donde entraran patógenos que causarían pérdidas postcosecha.

2.2 *Penicillium italicum*

P. italicum se caracteriza por ser un patógeno que crece en colonias circulares de tonalidades azul o verde-gris, tiene un periodo de crecimiento de 7 días en un rango de temperatura de 5-37°C. Su morfología se basa en el crecimiento de los conidióforos de la hifa (septada) superficial con una longitud de 200-400 micras con paredes delgadas y lisas, en ella se generan métulas, que son ramificaciones secundarias formadas sobre los conidióforos, las métulas tienen fialides en forma cilíndrica con longitudes de 10-14 micras; por último, se encuentran los conidios de forma redonda con diámetros de 3-5 micras, unicelulares y se observan como cadenas no ramificadas en los extremos (Figura 2.2). Necesita un mínimo de actividad de agua de 0.87 a 25°C para su germinación y un rango de pH de 1.6-9.8 (Pitt y Hocking, 2009).

El método de infección de *P. italicum* es mediante heridas, donde puede encontrar nutrientes disponibles para comenzar la germinación de esporas, una vez que progresa la enfermedad, se desarrolla micelio blanco que genera enzimas, que

logran degradar las células que conforman los tejidos del fruto (Ismail y Zhang, 2004).

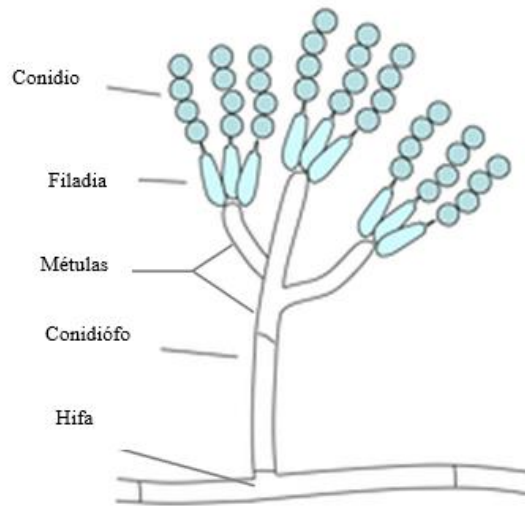


Figura 2.2. Morfología de *Penicillium italicum*

2.3 Sistemas de control de patógenos en etapa postcosecha

Los sistemas de control postcosecha son usados para prolongar la vida útil de los frutos, controlar los microorganismos que causan enfermedades, evitar trastornos fisiológicos y mejorar la calidad de los productos. Los métodos de control que se aplican son: físico, químico y biológico.

2.3.1 Control físico

Referente a los métodos físicos se encuentran aquellos basados en el uso de irradiación, atmosferas controladas, frecuencia ultrasónica, cambios de temperaturas y otros. El uso de atmosferas controladas es utilizado para conservar frutas y verduras en periodos postcosecha, se basa en la reducción de oxígeno e incremento de dióxido de carbono a comparación de la atmosfera ambiental, por lo tanto, es un sistema que implica un monitoreo continuo y ajuste preciso de los gases dentro del contenedor de almacenamiento (Dumont y cols., 2015). En cuanto al método de control por temperatura, los productos en postcosecha se almacenan a

bajas temperaturas para evitar la germinación de esporas y crecimiento de microorganismos, también se logra una reducción de la actividad enzimática, control de cambios metabólicos, disminución en la tasa de respiración y conservación de propiedades de calidad (Tapia Peñafiel, 2015). En el caso de aplicación a temperaturas altas se garantiza una seguridad y libre uso de químicos, reducción de microorganismo, aumento de la vida útil; comúnmente se utilizan temperaturas entre 50 a 60°C, mediante la inmersión de los productos en agua caliente durante tiempos de 5 a 30 minutos (Shafiur Rahman, 2007). Por otra parte, las diferentes radiaciones ionizantes como los rayos X, gamma, haz de electrones y microondas son capaces de producir iones cargados que destruyen patógenos, reducen plagas causadas por insectos, retrasan la maduración y mejoran propiedades del fruto; sin embargo, estos son poco aplicados debido a la percepción de las personas, costo del proceso y efecto fitotóxico (Ramaswamy, 2015).

2.3.2 Control químico

Los métodos químicos aplicados en postcosecha incluyen fungicidas sintéticos, los cuales son eficaces para el control de hongos, pero también son asociados a problemas de salud y riesgos ambientales; además de la proliferación de cepas resistentes. Otros agentes, son los denominados GRAS, como son: el ácido peracético, hipocloritos, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ozono y entre otros. Estos agentes tienen diferentes mecanismos de acción ante los microorganismos en los frutos, pero la mayoría se basan en la disociación de radicales libres o iones que provocan rupturas en membranas celulares. El ácido peracético es un eficaz desinfectante que consiste en una combinación de peróxido de hidrógeno y ácido acético, se ha reportado su efectividad sobre *P. expansum* y *P. italicum* en concentraciones bajas (0.0008%), esto se debe a su poder oxidante y la transferencia de electrones a los lípidos de la membrana celular que tienen afinidad por los peróxidos provocando rupturas en la célula (Kyanko y cols. 2010). Por otro lado, el dióxido de cloro es un compuesto utilizado en forma líquida y/o gaseosa y ha mostrado resultados en la reducción de células vegetativas y esporas

de hongos, se ha reportado su uso sobre *Saccharomyces cerevisiae* demostrando la liberación de iones K⁺, Ca⁺ y Mg⁺ y la inhibición de enzimas en concentraciones de 100mg/L (Zhu y cols., 2013).

2.3.3 Control biológico

El uso de control biológico es una alternativa que consiste en el uso de microorganismos antagónicos, antimicrobianos naturales, empleo de polímeros naturales para la generación de protección a frutos. Dentro de los métodos de control biológico se involucran competencia por nutrientes como carbohidratos, nitrógeno, oxígeno y entre otros (Jamalizadeh y cols., 2011). Otro método es la antibiosis, que se define como la inhibición o destrucción de microorganismos por sustancias metabólicas específicas producidas por el antagonista; por otro lado el parasitismo ocurre cuando el antagonista se alimenta dentro del mismo patógeno resultando en una destrucción directa o lisis de la estructura celular (Narayanasamy, 2013).

2.4 Agentes GRAS para el control de patógenos en postcosecha

2.4.1 Bicarbonato de sodio

En los últimos años ha incrementado el interés por el uso de agentes antifúngicos amigables con el medio ambiente y de baja toxicidad como las sales inorgánicas, entre ellos figura el bicarbonato de sodio (NaHCO₃). Se ha reportado que la aplicación individual de esta sal juega un papel importante en la inhibición de enfermedades postcosecha y se ha reportado su eficacia en el control de patógenos en frutos como plátano, papaya y limón (Alvindhia, 2013; Fallanaj y cols., 2016; Gamagae y cols., 2003; Palou y cols., 2001). Además, el NaHCO₃ es un aditivo en los alimentos que controla el pH, modifica la textura y es reconocido como un agente GRAS. Su efectividad en concentraciones de 1 al 4% se ha demostrado en evaluaciones *in vitro* e *in vivo* contra patógenos causantes de enfermedades en

cítricos. El NaHCO_3 con una concentración de 0.25%, inhibe el crecimiento micelial, la germinación de esporas y el alargamiento del tubo germinativo de *Penicillium italicum* (Lai y cols., 2015). En estudios *in vivo* ha demostrado ser capaz de reducir en un 89% la incidencia de la enfermedad en cítricos, se asegura que existe una posible interacción de esta sal con los residuos en las heridas, generando así un ambiente poco favorable para el patógeno, debido a la presión osmótica (Youssef y cols., 2012). El bicarbonato de sodio tiene la capacidad de inducir el mecanismo de defensa en los cítricos mediante enzimas como la quitinasa, β -1,3- glucanasas, peroxidasa y fenilalanina amonio liasa; estas enzimas desempeñan un papel importante en el sistema de defensa contra patógenos debido a su capacidad de degradar componentes de la pared celular y aumentar propiedades de calidad. Youssef y cols., (2014) reportan en frutos de naranja inoculados con NaHCO_3 (30 μL) una actividad enzimática mayor de la β -1,3- glucanasa, peroxidasa y fenilalanina amoniaco liasa, en comparación con los frutos control, los frutos tratados con NaHCO_3 tuvieron una actividad enzimática 2 veces mayor a las 48 horas. Dore y cols., (2010) reportan que el uso del NaHCO_3 provoca la generación de cristales de bicarbonato de sodio amorfos sobre las heridas, en la cutícula del fruto debido al tratamientos por inmersión, la morfología y tamaños de los cristales se ven influenciados por la concentración utilizada. Recientemente se ha informado que el NaHCO_3 es capaz de remover fungicidas. En este sentido, Yang y cols. (2017) reportaron que con concentración de Fosmet (compuesto organofosforado compuesto de fenilalanina y un éster ditifosfato con grupos de metilo) se logró degradar en un 95.8% con tratamientos de inmersión en tiempos de 15 minutos en soluciones de bicarbonato de sodio.

2.4.2 Ácido acético

El ácido acético es considerado una sustancia GRAS debido a su fácil y rápida degradación y por ser metabolizado por el tejido vegetal, es un ácido empleado en la industria de los alimentos para inhibir el crecimiento microbiano de diversos patógenos, su forma de acción se basa en el cambio del pH (Sholberg, 2009). Las aplicaciones del ácido acético pueden ser por inmersión o aspersion, en

tratamientos de postcosecha también se ha optado la aplicación en forma de fumigación de vapores de ácido acético como una técnica para el control de hongos patógenos en diversos frutos. Venditti y cols., (2017) usaron concentraciones bajas de ácido acético para el control de *Botritis cinerea* en tratamientos repetidos de fumigación, donde los tratamientos de 5 $\mu\text{L/L}$ durante periodos de 0, 24 y 48 horas lograron una reducción en el diámetro micelial (4.9-3.8 cm) y los tratamientos de 10 y 20 $\mu\text{L/L}$ obtuvieron una completa inhibición durante 8 días demostrando que los tratamientos de fumigación son efectivos a nivel *in vitro* en el crecimiento del patógeno. Radi y cols., (2010) reportaron el uso de soluciones de ácido acético a temperaturas de 50°C para el control de *P.expansum* en manzanas, después de 14 días las manzanas sin tratamiento tuvieron una pudrición de 78%, mientras que los frutos tratados con ácido acético a 50°C por 3 minutos tuvieron una pudrición solo del 2.2%.

2.5 Descripción del ultrasonido

El ultrasonido tiene distintas frecuencias de aplicación y va desde 20 kHz a 10 MHz, esto permite que se logre transmitir a través de cualquier sustancia que posea propiedades elásticas. El cuerpo que genera las vibraciones (sonido) se comunica con las moléculas del medio, para líquidos y gases, las oscilaciones de las partículas tienen dirección hacia donde se producen las ondas longitudinales, en cambio, los sólidos que presentan propiedades de elasticidad cortante, presentan tensiones tangenciales que dan paso a ondas transversales, y la las partículas tienen direcciones perpendicular (Manasseh, 2017; T. J. Mason y Lorimer, 2002; T. Mason y Peters, 2002).

La cavitación se presenta en las ondas longitudinales y transversales, las oscilaciones en el líquido, producidas por el ultrasonido, generan presiones que causan la expansión y contracción de las burbujas de gas disueltas, se expanden durante ciclos de presión negativas y se contraen durante ciclos de presión positiva; durante este proceso las burbujas están acompañadas por la difusión de gas/vapor dentro y fuera de las burbujas durante la expansión, respectivamente, sin embargo,

la difusión nunca es igual durante el proceso de acumulación de masa dentro de la burbuja a lo largo del tiempo (Ashokkumar y cols., 2007; Leong y cols., 2017). El mecanismo de la cavitación se da por tres etapas; la nucleación, crecimiento de burbuja y colapso implosivo. Las ondas que se propagan por el medio líquido generan grietas durante la cavitación que sirven como punto de partida para la nucleación de las burbujas de partículas suspendidas en el medio, las cavidades crecen rápidamente a través de efectos de inercia generando un efecto de difusión rectificada durante el proceso de cavitación (Doicrycz y Suslick, 1990).

Dependiendo de la frecuencia utilizada en por el ultrasonido en un medio líquido, el efecto de la cavitación y el colapso de las burbujas producirán suficiente energía para alcanzar temperaturas de 5000 K y presiones de 300 atmósferas en pequeñas regiones de alrededor de la burbuja, los violentos colapsos pueden aumentar a veces hasta la velocidad del sonido en el líquido y como resultado el vapor de agua y gas dentro la burbuja sufrirá una disociación en radicales como OH, NO_x y HNO_x dentro de la burbuja (Mcnamara III y cols., 2003; Yasui y cols., 2005).

El uso del ultrasonido ha sido de gran utilidad para distintas áreas debido a los distintos fenómenos que generan como la cavitación acústica que ya fue descrita, la transmisión acústica y la transferencia de calor (Legay y cols., 2011; Nomura y cols., 2002). Existe otro fenómeno que se genera con ultrasonido, pero solo cuando se utilizan altas intensidades, este es la nebulización o atomización ultrasónica, que consiste en generar neblinas finas con gotas que van desde 1 a 5 micras, usando como cuerpo vibrante elementos piezoeléctricos que generan ondas acústicas a frecuencias mayores de 2 MHz.

2.6 Nebulización Ultrasónica

La nebulización ultrasónica (NU) abarca todos los fenómenos de ondas de sonido que ocurren en frecuencias mayores a las que el oído humano puede percibir (20 kHz), los nebulizadores ultrasónicos generalmente funcionan mediante la aplicación de un campo eléctrico alternativo a un transductor piezoeléctrico en una vibración mecánica periódica en contacto con el líquido a nebulizar (Figura 2.3). Las ondas generadas por los piezoeléctricos se propagan por el medio generando

perturbaciones de la presión oscilatoria en el líquido dando lugar a oscilaciones instantáneas de las moléculas del fluido, lo que resulta en la fluctuación de temperatura y densidad en función de la frecuencia de excitación (Lang, 1962; Nyborg, 1982; Ueha y cols., 1985).

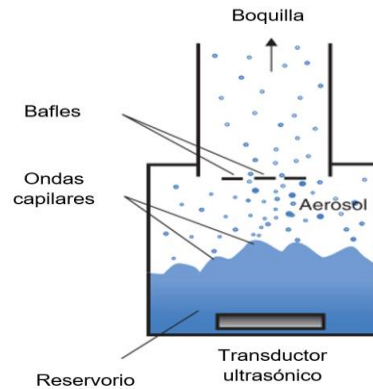


Figura 2.3. Esquema general de nebulización (Yeo y cols., 2010)

Se han propuesto distintos mecanismos para la generación de la nebulización, el primero implica la cavitación acústica (Figura 2.4), está ocurre cuando se forman burbujas de vapor en el líquido a medida que la presión en una región localizada del líquido disminuye repentinamente debido a las perturbaciones periódicas introducidas por la excitación del sonido (Briceño-Gutierrez y cols., 2015; Qi y cols., 2008).

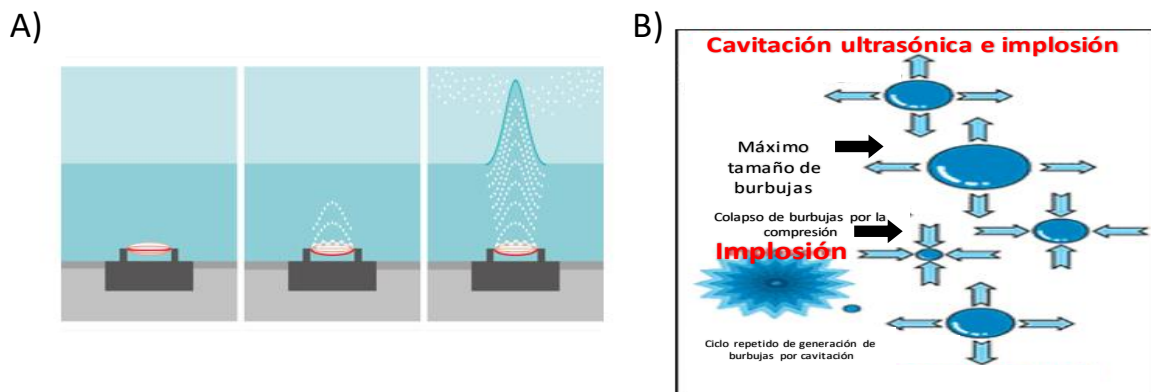


Figura 2.3. A) Ruptura de la superficie del líquido mediante ondas ultrasónicas; B) Mecanismo de cavitación acústica para la generación de nebulización

Otro mecanismo propuesto es la teoría de capilaridad (Figura 2.5), en la que las ondas de choque resultantes de la implosión de las burbujas durante la cavitación, conducen a la excitación de las ondas capilares que dan como resultado la expulsión de gotas, físicamente el borde de la burbuja colapsada, se estira radialmente hacia abajo e inicialmente hacia afuera (Figura 2.5 A y B), posteriormente hacia adentro, hasta que se contrae para formar un hilo alargado que eventualmente se transforma en gotas de aerosol (Figura 2.5 C, D y E) (Kirpalani y Toll, 2002).

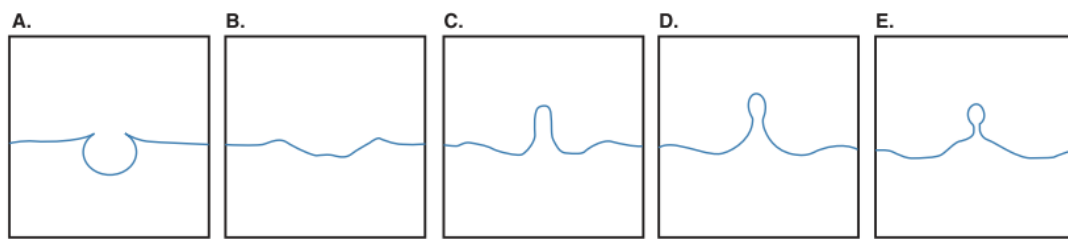


Figura 2.4. Mecanismo por capilaridad para la generación de nebulización (Yeo et al., 2010b)

Estos mecanismos descritos desencadenan la formación de neblina conformada de partículas finas por efecto de las ondas ultrasónicas producidas por el piezoeléctrico. Cuando la amplitud aumenta, aumentan las vibraciones en el medio formando crestas más altas y más profundas, finalmente cuando se alcanza un amplitud crítica, en la cual la altura de las ondas capilares excede la que se requiere para mantener la estabilidad se forman mediante ondas de expulsión pequeñas gotas de líquido desde la parte inferior de la superficie, las aceleraciones de las ondas acústicas son transmitidas a la gota provocando una fase de compresión, que provoca que la gota implosione y emita choques hidráulicos que rompen la interfase (Figura 2.6) (Astefanei y cols., 2017; Deepu y cols., 2017)

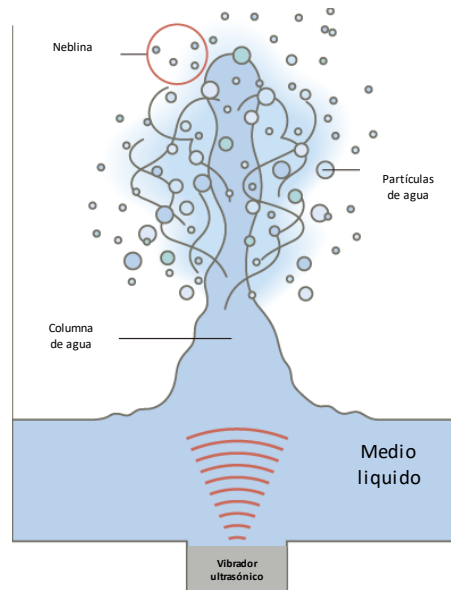


Figura 2.5. Generación de la nebulización ultrasónica (Yeo et al., 2010b)

Diversos autores han sugerido diferentes modelos matemáticos para la nebulización ultrasónica, en donde se proponen variables que intervienen en el diámetro de la partícula nebulizada; principalmente, que el tamaño de las gotas este determinado por el tamaño inicial y la amplitud de las ondas (a). Para nebulizadores ultrasónicos, utilizando el mecanismo de capilaridad, la amplitud de la oscilación es lo suficientemente grande para causar una dispersión de gotas (b) (nebuliza el fluido), demostrando que el tamaño de gota es proporcional a la longitud de onda del nebulizador (c) (Figura 2.7) (Kooij y cols., 2019).

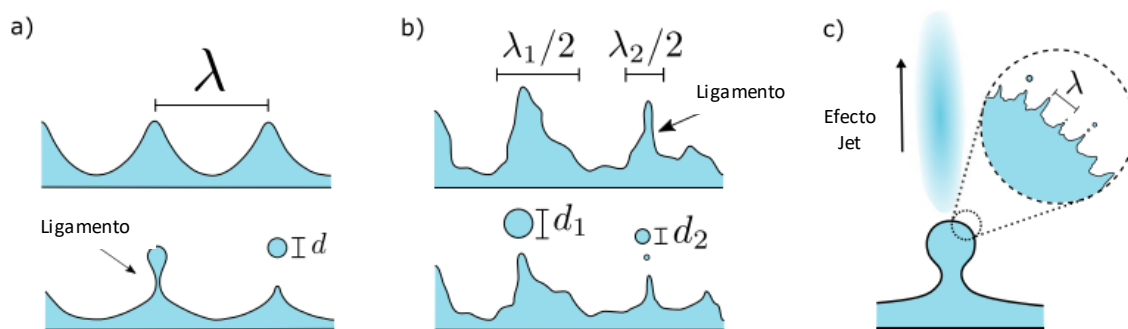


Figura 2.6. Mecanismo de capilaridad (Kooij y cols., 2019)

La nebulización ultrasónica tiene un gran campo de aplicación, tal como en el área clínica, revestimiento de superficies, pulverización de combustibles líquidos,

producción de polvos metálicos y otras aplicaciones (Deepu y cols., 2017). En los últimos años se ha investigado la aplicación de la nebulización y la generación de partículas finas en el área de frutos y hortalizas en periodo de postcosecha.

2.6.1 Sistema de nebulización ultrasónica para el control de patógenos en etapa postcosecha

Los sistemas de nebulización aplicados en la industria alimentaria se fundamentan en la aplicación de sustancias químicas en forma de nebulización que están constituidas por gotas pequeñas para garantizar una mejor dispersión y área de contacto para evitar la proliferación de microorganismos (Brown y Xu, 1999).

En el caso de frutos, la nebulización se ha aplicado en postcosecha en higos, ciruelas, fresas, entre otros; evaluando el control de patógenos y la calidad durante el almacenamiento. Karabulut y cols. (2009) evaluaron la aplicación de dióxido de cloro por nebulización para el control de enfermedades postcosecha en higo, usando concentraciones de 0, 300, 500 y 1000 $\mu\text{L/L}$ de dióxido de cloro durante 60 minutos. La nebulización generó gotas de 1.2 μm de diámetro, este tratamiento se aplicó a charolas con 20 higos, posteriormente fueron almacenados durante 7 días a 1°C. La incidencia natural por el moho gris se redujo significativamente con el dióxido de cloro nebulizado, siendo el mejor tratamiento el de 1000 $\mu\text{L/L}$ en las frutas almacenadas. Además, los microorganismos en el aire fueron completamente inhibidos por el dióxido de cloro en la concentración más alta, demostrando que el tratamiento por nebulización modifica la atmósfera disminuyendo los niveles de CO_2 y O_2 .

En fresas, Vardar y cols., (2012) utilizaron dióxido de cloro, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, y ácido cítrico a concentraciones de 0, 750, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{L/L}$ y concentraciones de 20, 30 y 40% de etanol en un tiempo de nebulización de 60 min (30 min con el nebulizador encendido y 30 min con el nebulizador apagado dejando circular la neblina). Después de los tratamientos las fresas fueron almacenadas durante 5 días a un 1°C. Estos autores reportaron una reducción del 80-90% de la pudrición gris con los agentes mencionados.

Además, se logró la reducción de los microorganismos de la superficie sin afectar la calidad visual y sabor de la fruta. Las concentraciones más eficientes para la reducción de hongos y bacterias fueron de 1500 y 2000 $\mu\text{L/L}$ y de 40% de etanol.

Otro agente que se ha nebulizado es el ácido peracético, De Velde y cols., (2016) reportaron la nebulización del ácido peracético a diferentes concentraciones (3.4, 20, 60, 100 y 116.6 $\mu\text{L/L}$) evaluando la reducción microbiológica, propiedades de calidad del fruto y contenido de compuestos bioactivos. Entre 8-10 frutas colocadas en canastillas fueron nebulizadas estando en contacto con la niebla hasta alcanzar el tiempo necesario (15, 37.5, 60 y 69.3 min), posteriormente se almacenaron a 2°C por 7 días y se realizaron los análisis requeridos. Después de 7 días el recuento de microorganismos aerobios mesófilos no aumentó en las fresas nebulizadas, por otra parte, los hongos y levaduras en fresas sin tratamiento de nebulización aumentaron 1.6 CFU.

El sistema de nebulización también ha sido evaluado en la baya roja por Perkins y cols., (2017), quienes aplicaron agua desionizada como un control positivo y posteriormente ácido clorhídrico (20 mM), ácido cítrico (20 mM) y ácido acético (893 mM) como tratamientos de nebulización aplicados por una hora. En su estudio se utilizaron un diseño vertical para el prototipo de nebulización, en donde 15 frutas fueron introducidas en un cilindro y la nebulización fue de forma ascendente, impulsada por un flujo de aire, posterior al tratamiento, las frutas fueron almacenadas a 5.05°C durante 10 días. En los tratamientos de ácido acético se observó un 18% de incidencia de pudrición después de 10 días de almacenamiento en comparación con el control positivo (72%), el ácido clorhídrico (80%), el ácido cítrico (55%) y el control sin nebulización (70%). Después de 20 días de almacenamiento, el tratamiento de ácido acético mostro un 98% de incidencia, mientras que el resto de ácidos el 100%, estos resultados se atribuyen a las propiedades antimicrobianas de los ácidos orgánicos débiles en la difusión de moléculas no disociadas hacia la célula.

En espárragos como modelo de estudio se realizaron tratamientos con niebla de agua, sin niebla (control) y la combinación de la niebla de agua y bajas

temperaturas. Se observó que, los espárragos del tratamiento control, tuvieron una pérdida de peso de 13.6%, mientras que en los tratados con niebla se disminuyó la pérdida de peso en un 6%; por el contrario, el tratamiento combinado (niebla y bajas temperatura) incrementó el peso del espárrago en un 10% conservando las características de color en comparación a los otros tratamientos después de las 72 horas. A mayor temperatura se observó que había una evaporación en la superficie del producto, en el caso contrario la baja temperatura contribuía a la condensación y la infiltración de la gotas generadas en la niebla mediante los poros abiertos de los estomas y disminuía la pérdida de agua por la baja presión de vapor saturado en la temperatura de la superficie del espárrago (Tirawat y cols., 2017).

La nebulización ultrasónica también ha sido utilizada para generar nano niebla, está se define como como un gas de partículas ultra finas de tamaños de 15 a 600 nm. El estudio del efecto de la nano niebla se realizó en espinaca con el objetivo de evaluar el efecto de la niebla en la tasa de respiración de la espinaca. El tratamiento de niebla de agua destilada fue dado durante 5 horas en un almacén, posterior a este tiempo el sistema se apagó durante 18 horas, durante ese tiempo se evaluó la tasa de respiración por 6 días. No se observó una diferencia significativa entre el tratamiento de nebulización y el control durante los 6 días, se menciona que la tasa de respiración fue ligeramente más baja en los tratamientos de nebulización durante los primeros 3 días con valores de 2.3 y 2.7 mmol/kg en condiciones de nebulización y control, se afirma que la perdida de agua se reduce, y el color no mostró diferencia respecto al control (Saenmuang y cols., 2012) (Cuadro 2.1)

Cuadro 2.1. Nebulización ultrasónica de diferentes agentes en frutos en postcosecha

Fruto	Agentes y concentración	Tiempo de exposición	Almacenamiento y temperatura	Resultados	Referencias
Fresa	Dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, ácido cítrico, etanol (750, 1000, 1500, 2000µL/L)	30min encendido /30min en contacto	5 días/5°C	Reducción del 32.5% microorganismo en la superficie del fruto. Reducción del índice de decadencia de 14.5% a 83.2% con dióxido de cloro y peróxido de hidrógeno	(Vardar y cols., 2012)
Limón	Formaldehido 37% / Ácido acético 99.8% / Ácido peracético 4.9, 6% / Peróxido de hidrógeno 30, 27, 26.5 % / Hipoclorito de sodio 12.5% / Ácido fosfórico 50% /Alcohol etílico 95%	90 min encendido	20-22°C	Reducción de la germinación de <i>Penicillium digitatum</i> con Formaldehido en 95%/ Ácido acético en 98% / Peróxido de hidrógeno en 97%/ Hipoclorito de sodio en 93%	(Joseph L. Smilanick y cols., 2014)
Fresa	Ácido Peracético (5%) con peróxido de hidrógeno(20%)/ 3.4, 20, 60, 100 y 116.6 µL/L	5-10 min encendido / 5.7, 15, 37.5, 60, 69.3 min en contacto	7 días / 2°C	Reducción de microorganismos mesófilos y hongos en la superficie del fruto.	(Vaccari y cols., 2015)

Fresa	Ácido Peracético (3.4, 20, 60, 100 y 116.6 µL/L)	5-10 min encendido / 15,	7 días / 2°C	Reducción en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos y levaduras con concentraciones de 10.1 µL/L	(De Velde y cols., 2016)
Lechuga	Ácido peroxiacético (40ppm)	10, 20, 30 min encendido	22 °C	Reducción de 0.8, 0.3 y 2.5 Log en 10m min; 2.2, 3.3 y 2.7 log en 30 min; 3.4, 4.5 y 3.8 log	(Oh y cols., 2016)
Fresa	Mezcla de Ácido peracético (5%), peróxido de hidrógeno (20%) y agua (3.4, 20, 60, 100 y 116.6 µL/L)	5-10 min encendido / 15, 37.5, 60, 69.3 min en contacto	/-80°C	Antocianinas fueron los compuestos fenólicos más afectados después de la exposición a la nebulización	(De Velde y cols., 2016)
Esparrago	Agua destilada	12 horas al día	20°C y 2°C	Aumento en el peso de espárragos en un 10%	Tirawat y cols. (2017)

2.8 Dinámica de fluidos Computacional (CFD)

El CFD (Computer Fluids Dynamics) o dinámica de fluidos computacional, es una herramienta que consiste en la utilización de computadores y de técnicas numéricas para resolver problemas físicos que se relacionan con el movimiento de los fluidos, involucrando otros fenómenos asociados como la conservación de masa, transferencia de calor, reacción química, etc. (Patankar, 1980).

El CFD comprende un amplio rango de disciplinas científicas en donde destacan la matemática, química, física, programación e ingeniería; tuvo su origen a partir de la combinación de dos disciplinas: mecánica de fluidos y cálculo. Con ayuda de esta herramienta se logra simular procesos de reacciones químicas, análisis aerodinámicos, refrigeración de equipos, simulación de reactores nucleares, diseño de productos, etc. La principal ventaja que proporciona el análisis por CFD es la reducción sustancial de tiempos y costos en los nuevos diseños, posibilidad de analizar sistemas o condiciones difíciles de recrear experimentalmente y a un nivel de detalle ilimitado (Patankar, 1980).

El CFD es ampliamente utilizado en la industria, en la fabricación, optimización y desarrollo de productos y procesos como aviones, automóviles, barcos, plantas eléctricas, metalurgia, procesos alimentarios, farmacéutica, electrónica, etc. Compañías como la Fórmula 1 utilizan esta herramienta para realizar cálculos y estudios rápidamente con costos menores comparados con otras herramientas, desde diseñar automóviles hasta la simulación del túnel de viento de manera virtual es utilizado el CFD. La industria espacial, como la NASA utiliza esta herramienta para el diseño de motores, partes de aeronaves y la simulación de lanzamientos espaciales y su rendimiento aerodinámico de diferentes diseños (Figura 2.8).

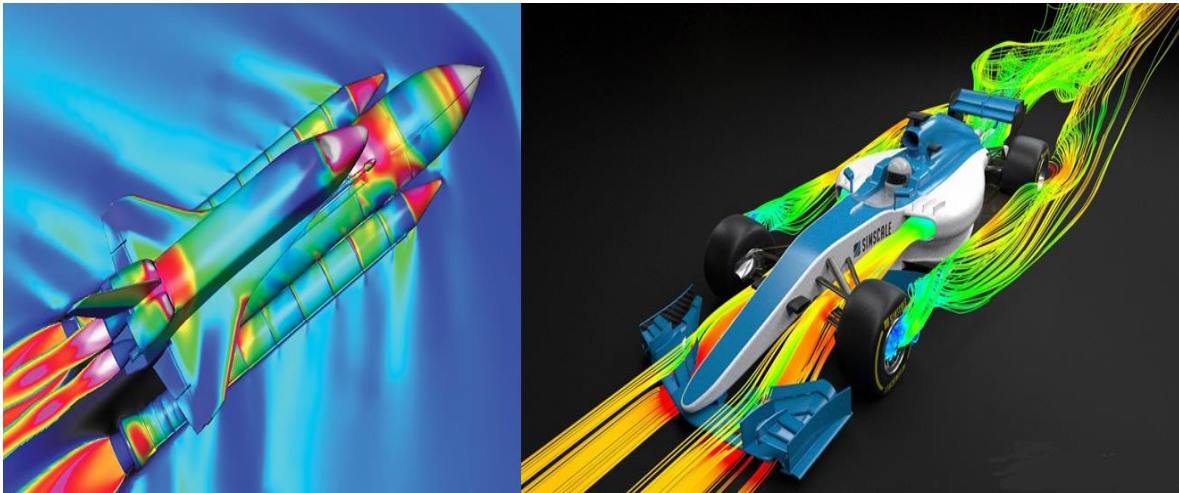


Figura 2.7. Aplicaciones de CFD en la industria espacial y la automotriz (NASA y Fórmula 1) (Schuster, 2008)

Dentro del CFD existe un dominio en donde se debe definir la geometría, mallado, condiciones de frontera, condiciones iniciales, modelos matemáticos y algoritmos de solución. El pre-procesamiento consiste en realizar la geometría virtual utilizando un paquete llamado GAMBIT (Geometry And Mesh Building Intelligent Toolkit), este programa permite la generación de todas las operaciones que se incluyen en el pre-procesamiento para el análisis del CFD. Se caracteriza por la capacidad de poder llevar a cabo la creación de geometrías, generación de mallas, posibilidad de examinar la calidad de la malla y la asignación de condiciones límite y frontera.

El procesamiento es la etapa del procesamiento donde se obtiene la solución al modelo matemático, que consiste en la solución simultánea de las ecuaciones de continuidad, transferencia de momento, transferencia de energía y las ecuaciones que corresponden al modelo multifásico y turbulentos según sea el sistema a analizar.

Finalmente, el post-procesamiento integra diversos procedimientos, que van enfocados a asistir al usuario para un mejor análisis de resultados como: manipulación del dominio geométrico y de la malla, obtención y visualización de planos x-y-z, vectores de velocidad, visualización de contornos, obtención de animaciones.

2.8.1 Geometría y malla

La generación de una malla es una parte muy importante en el diseño de un modelo para simulación por CFD, debido a que ninguna simulación puede realizarse sin haber sido sometido a un pre-procesamiento de mallado con una distribución de celdas apropiadas; todas las mallas empleadas usan un número de celdas, siendo la celda, la unidad fundamental del mallado, cada celda tiene un centroide y también está limitada por un número de superficies o caras que a su vez están ancladas a una serie de nodos y vértices. Cada problema, relacionado con fluidos, tiene diversos sistemas de fenómenos o características como son: vórtices, capas límites, transiciones y regiones de cambios rápidos de presión y velocidad; por lo tanto, la calidad de la malla es definir cada punto para capturar con detalle cada uno de los fenómenos antes mencionados y permitir el modelado de regiones críticas donde estos ocurren. Por esto, se ha diversificado el tipo de conectividad existente entre los diferentes puntos de las celdas en las mallas y se han clasificado dos tipos de categoría; malla estructura y malla no estructurada (Fernandez Oro, 2012).

La malla estructurada es aquella que estará generalmente alineada con las direcciones principales de la malla, las líneas de la malla siguen a las líneas de corriente, las cuales se alinean con los contornos sólidos del dominio, las mallas estructuradas tienen una mejor distribución, lo que permite que, en el CFD, en términos de precisión, tiempo de cálculo y de consumo de memoria computacional tenga mejores resultados (figura 2.9).

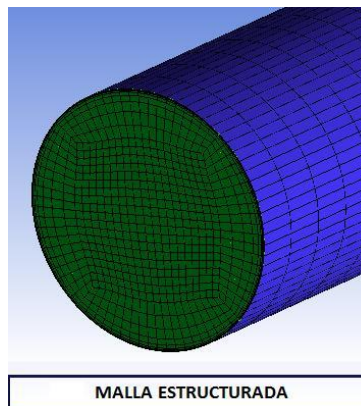


Figura 2.8 Esquematización de una malla estructurada fuente (Utrilla, 2016)

Las mallas no estructuradas son aquellas que contienen celdas, tanto regulares, como irregulares para un mismo dominio; permitiendo cubrir, con celdas tetraédricas, cualquier dominio tridimensional sin necesidad de conocer la topología del mismo. Una de sus principales ventajas es la capacidad de efectuar un refinamiento local de la malla, sin afectar la distribución de celdas fuera de esa zona, y, por lo tanto, la utilización de una malla no estructurada permite incrementar la precisión de los cálculos en regiones con fuertes gradientes del flujo y ahorrar tanto gasto computacional como tiempo de cálculo (Figura 2.10).

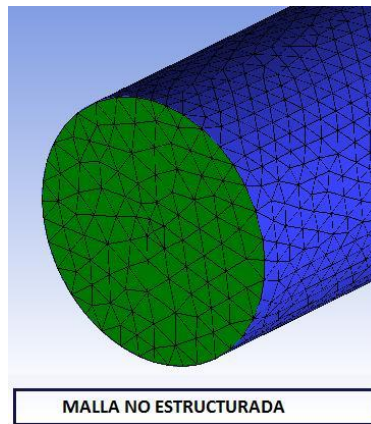


Figura 2.9. Esquematización de una malla no estructurada (Utrilla, 2016)

Por tal motivo, la correcta generación de la malla es uno de los pasos más importantes en el pre-procesamiento, debido a que se debe conocer con detalle el comportamiento del fenómeno que ocurrirá dentro del modelo virtual y en base a eso se generará la malla, también se decidirá la relación de aspectos de elementos en distintas partes de la geometría generada.

2.8.2 Ecuaciones diferenciales de conservación

Las ecuaciones que rigen la mecánica de fluidos están expresadas en términos de variables específicas o intensivas, es decir, de cantidades expresadas por unidad de masa. Las ecuaciones de Navier-Stokes son la herramienta más poderosa para la dinámica de fluidos computacional, sin embargo, son difíciles de resolver en su forma completa. Para describir completamente el movimiento de un fluido deben

conocerse las siguientes cantidades del sistema: temperatura, presión, densidad y velocidades en las direcciones x, y, z (Bertin, 1983).

Debido a la existencia de 6 incógnitas se necesitan 6 ecuaciones para la resolución del flujo tridimensional, para ello se utilizan 6 ecuaciones; la ecuación de continuidad, las 3 ecuaciones de Navier-Stokes, la ecuación de energía y la ley de los gases ideales.

Ecuación de continuidad: La ecuación de conservación de masa o de continuidad, establece que el incremento de masa en el interior de un elemento fluido es resultado del flujo neto de masa hacia dicho elemento, en otros términos, la velocidad de acumulación de masa es igual a la velocidad de entrada de masa, menos la velocidad de salida de masa. Expresada de forma diferencial se tiene:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x}(\rho u_x) + \frac{\partial}{\partial y}(\rho v_y) + \frac{\partial}{\partial z}(\rho w_z) = 0 \quad (ec. 1)$$

Ecuación de cantidad de movimiento (momento): La ecuación de la cantidad de movimiento establece que la velocidad de acumulación de cantidad de movimiento será igual a la velocidad de entrada de cantidad movimiento menos la velocidad de salida de la cantidad de movimiento, más la sumatoria de las fuerzas que actúen sobre el sistema. Esta ecuación es la representación de la cantidad de movimiento, es decir, la representación matemática de la ley de Newton; la cual establece que la fuerza neta que actúa sobre una partícula de fluido, es igual a la razón de cambio en el tiempo, del momento lineal de la partícula. Las principales fuerzas que actúan sobre el sistema son aquellas que actúan sobre la masa del elemento, es decir, las fuerzas de cuerpo y de superficie: fuerzas de presión y corte (cizalla). El componente de cada eje es:

Componente x:

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho(\vec{V} \cdot \nabla)u = \rho f_x - \frac{\partial p}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} \left[2\mu \frac{\partial u}{\partial x} - \frac{2}{3}\mu \nabla \cdot \vec{V} \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[\mu \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z} \right) \right] \quad (ec. 2)$$

Componente y:

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} + \rho(\vec{V} \cdot \nabla)v = \rho f_y + \frac{\partial}{\partial x} \left[\mu \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right) \right] - \frac{\partial p}{\partial y} + \frac{\partial}{\partial x} \left[2\mu \frac{\partial v}{\partial y} - \frac{2}{3}\mu \nabla \cdot \vec{V} \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial z} \right) \right] \quad (ec. 3)$$

Componente z:

$$\rho \frac{\partial w}{\partial t} + \rho(\vec{V} \cdot \nabla)w = \rho f_z + \frac{\partial}{\partial x} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[\mu \left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} \right) \right] - \frac{\partial p}{\partial z} + \frac{\partial}{\partial z} \left[2\mu \frac{\partial w}{\partial z} - \frac{2}{3} \mu \nabla \cdot \vec{V} \right] \quad (ec. 4)$$

2.8.3 Discretización y método de volumen finito

Para realizar los cálculos en CFD se necesita establecer dominios para cada variable (densidad, velocidad, presión y temperatura), este dominio puede ser continuo, donde cada variable mencionada está definida en todos los puntos del espacio; por el contrario, un dominio discreto establece que cada variable será analizada en puntos específicos que son configurados con una malla (nodos). Este proceso se le conoce como discretización espacial, también es necesario realizar una discretización temporal, en donde las ecuaciones que gobiernan el CFD tienen un comportamiento dependiente al tiempo.

La metodología de volumen finito se basa en la división del dominio en diferentes celdas, en donde los valores discretos quedarán descritos por un conjunto de ecuaciones algebraicas que relacionan el valor de la variable en una celda (volumen de control) que será relacionado con los valores de las anteriores y siguientes celdas.

Se debe tomar en cuenta las derivadas en las ecuaciones diferenciales que gobiernan las series de Taylor, para ello se considera la siguiente ecuación (ec. 5)

$$\frac{d\phi}{dx} + \phi; \quad 0 \leq x \leq 1; \quad \phi(0) = 1 \quad (ec. 5)$$

En donde ϕ es una variable fluidodinámica cualquiera en un dominio entre 0 y 1, tomando la ecuación diferencial anterior e integrándola sobre un volumen de control unidimensional P se obtiene la siguiente ecuación (ec. 6).

$$\int_w^e \left(\frac{d\phi}{dx} \right) dx + \int_w^e \phi dx = 0 \quad (ec. 6)$$

Tomando en cuenta la variación lineal entre los centroides de las celdas y la variación de ϕ de cada celda como $\bar{\phi}$ se obtiene que:

$$\frac{\phi_E - \phi_P}{\Delta x} - \frac{\phi_P - \phi_W}{\Delta x} + \bar{\phi} \Delta x = 0 \quad (ec. 7)$$

La ecuación anterior puede ser representada por la figura 2.11, donde la notación de P representa la celda actual, W y E representan las celdas de la izquierda y derecha, reordenando la ecuación anterior considerando los coeficientes de variación lineal se llega a:

$$a_p \phi_p = a_E \phi_E + a_W \phi_W + b \quad (ec. 8)$$

En donde a_p, a_E, a_W son coeficientes de variación lineal en cada celda, de este modo se garantiza una convergencia de la variable sobre la celda, el flujo que entre en la celda debe ser igual a los flujos de salida y se cumple para cualquier tamaño de celda.

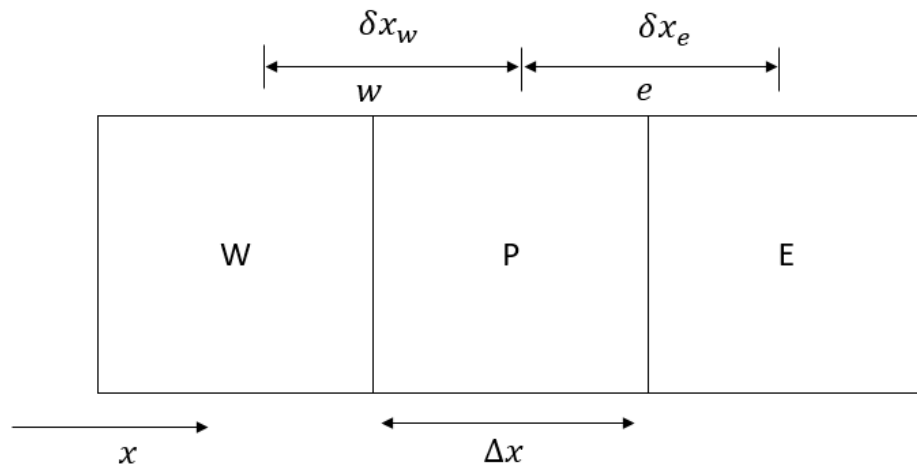


Figura 2.10. Discretización unidimensional por volumen finito

2.8.4 Algoritmo de segregación basado en la presión

El algoritmo es un solucionador con el cual las ecuaciones gobernantes son resueltas secuencialmente, dichas ecuaciones no son lineales y el bucle de solución debe ser llevado de forma iterativa a fin de obtener una solución numérica convergente. Se utilizan diferentes variables para resolver las ecuaciones (u, v, w, p, T, k) y cada vez que es resuelta, también es segregada de otras ecuaciones.

2.8.5 Modelo multifásico (VOF)

El modelo VOF (Launder y Spalding, 1974) permite el modelado de dos o más fluidos inmiscibles, mediante la resolución de un único conjunto de ecuaciones para la conservación de masa, momento y energía. La fracción de volumen de cada una de las fases se resuelve con una ecuación de transporte, a partir de la cual es posible definir la posición y evolución de las interfaces. El VOF se basa en la suposición de que los fluidos participantes no están interpenetrados, por lo que se limita al análisis de flujos estratificados como superficies libres o grandes bolsas de gas atrapadas o transportadas en corrientes fluidas.

Cada fase que se incorpora al modelo introduce su fracción de volumen al cálculo, estas fracciones de volumen cumplen las premisas del modelo euleriano, en donde sus ecuaciones son las más precisas para esquemas multifásicos ya que pueden modelar distintas fases líquidas, sólidas o gaseosas. El modelo euleriano involucra la solución de las ecuaciones de continuidad, cantidad de movimiento y energía en cada fase, lo que permite un acoplamiento entre cada fase; también es posible incluir reacciones heterogéneas que permitan la transferencia de calor y masa entre fases. La fracción de volumen de cada fase q -ésima, se denota como α_q . La fracción de volumen representa el espacio ocupado por cada fase, de modo que:

$$V_q = \int_V \alpha_q dV \quad (ec. 9)$$

De esta forma, para cada fase, se resuelve una ecuación de continuidad y cantidad de movimiento. La fracción de volumen de cada fase vale 0 en aquellas celdas en donde no hay presencia de esa fase, vale 1 en aquellas de dicha fase y solo puede variar entre 0 y 1 en aquellas celdas donde precisamente se encuentre la interfase.

Los campos de todas las variables de un fluido dinámico son compartidos por todas las fases y representan valores promediados en función de las fracciones de volumen en cada celda, en particular la ecuación de momento se aplica, en donde

se muestra que es dependiente de las fracciones de volumen de todas las fases a través de las propiedades de densidad y viscosidad de cada fase.

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho v) + \nabla \cdot (\rho \vec{v}\vec{v}) = -\nabla p + \nabla \cdot (\mu \nabla \vec{v}) + \rho g + \vec{F}_v \quad (ec. 10)$$

Donde \vec{F}_v es la fuerza volumétrica, que sirve para implementar el efecto de la tensión superficial en el cálculo de las interfaces.

2.8.6 Modelos de turbulencia

Las diferentes variables del fenómeno de la turbulencia son descritas mediante las ecuaciones ya desarrolladas, (la ecuación de continuidad, momento y energía). La resolución numérica de los flujos turbulentos puede abordarse desde diferentes puntos de vista en función del número de escalas de la turbulencia que se desea simular. Existen tres aproximaciones diferentes: la simulación numérica directa (DNS), simulación de vórtices grandes (LES) y simulación RANS (ecuaciones de Navier-Stokes promediadas por Reynolds).

Al describir un flujo turbulento es recomendable expresar los componentes de velocidad local como la suma de un movimiento medio más un movimiento de fluctuación.

$$u = \bar{u} + u' \quad (ec. 11)$$

$$v = \bar{v} + v' \quad (ec. 12)$$

Donde los \bar{u} y \bar{v} representan el valor promedio en el tiempo de la componente de velocidad y u' y v' representan la velocidad fluctuante.

El método RANS es el más utilizado para introducir la simulación de la turbulencia en la metodología numérica, este método utiliza la idea del alisado de modo que el operador utilizado (ec. 13) que se emplea para buscar el comportamiento estadístico de las variables del flujo es un promedio temporal sobre las ecuaciones de transporte.

$$\bar{u} = \frac{1}{T} \int_1^{t+T} u dt \quad (ec. 13)$$

Donde T corresponde a un intervalo de tiempo mucho mayor que el anterior, este operador permite descomponer cualquier variable en su valor medio y su parte fluctuante; para que esta operación tenga sentido estadístico, el tiempo de promedio tiene que ser mucho más grande que el periodo característico de las fluctuaciones turbulentas de la escala integral. Al introducir el operador promedio en la ecuación de la continuidad se obtiene:

$$\rho \bar{u} \frac{\partial \bar{u}}{\partial x} + \rho \bar{v} \frac{\partial \bar{u}}{\partial y} = \rho_e u_e \frac{du_e}{dx} + \mu \frac{\partial^2 \bar{u}}{\partial y^2} - \rho \frac{\partial}{\partial y} (\overline{u'v'}) \quad (ec. 14)$$

Donde, el último término representa el esfuerzo cortante turbulento, que al sumarse con los esfuerzos asociados al flujo descritos en la ecuación de movimiento se obtiene:

$$\tau_{xy} = \mu \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right) - \rho \overline{u'v'} \quad (ec. 15)$$

2.8.7 Modelo k-épsilon

El modelo k-épsilon propuesto por Jones y Launder (Colleen D., 2002) utiliza la viscosidad turbulenta que se calcula a través de su relación con la energía cinética (k) y su velocidad de disipación (ϵ):

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho k) + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho k u_i) = \frac{\partial}{\partial x_i} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_i} \right] + G_k + G_b - \rho \epsilon - Y_M + S_k \quad (ec. 16)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho \epsilon) + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho \epsilon u_i) = \frac{\partial}{\partial x_i} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\epsilon} \right) \frac{\partial \epsilon}{\partial x_i} \right] + C_{1\epsilon} \frac{\epsilon}{k} + (G_k + C_3 + G_b) - C_{2\epsilon} \rho \frac{\epsilon^2}{k} + S_\epsilon \quad (ec. 17)$$

La viscosidad turbulenta es la relación entre una escala de velocidad turbulenta y una escala de longitud y se representa por:

$$\mu_t = \rho C_\mu \frac{k^2}{\epsilon} \quad (ec. 18)$$

En las ecuaciones (ec.16) y (ec. 17), k es la energía cinética turbulenta, ε es la tasa de disipación, u_i es la componente de velocidad del vector $u(x)$, G_k es la tasa de generación de energía turbulenta por los gradientes de velocidad, G_b es la tasa de generación de energía turbulenta debida a las fuerzas de flotabilidad, Y_M es la contribución de la dilatación fluctuante en turbulencia a la tasa global de disipación y C_μ es una constante.

Las constantes del modelo son: $C_{1\varepsilon} = 1.44$ y $C_{2\varepsilon} = 1.92$, $C_\mu = 0.09$, $\sigma_k = 1.0$, $\sigma_\varepsilon = 1.3$

El modelo k-épsilon es un modelo semi-empírico que se basa en la modelación de dos ecuaciones de transporte para la energía cinética turbulenta, k , y para su tasa de disipación, ε . La ecuación de transporte para k se obtiene de su ecuación exacta, mientras que la de ε se deduce de razonamientos físicos y analogías diversas con la de k . De este modo la variable ε es la que determina la escala de la turbulencia.

2.8.8 El CFD y su aplicación en la postcosecha

La aplicación del CFD es muy amplia, una de las áreas en la que en los últimos años ha tomado fuerza la utilización de esta herramienta, es en la industria alimentaria. Principalmente se ha utilizado para investigar flujos, transferencia de calor y masa, difusión de gas, cinética y dispersión de gotas en diversos sistemas (Ambaw y cols., 2013; Delele y cols., 2012; Duga y cols., 2017; Park y cols., 2019). Umeno y cols., realizaron un estudio sobre la distribución de la temperatura en refrigeradores usando una simulación por CFD, se utilizó un modelo dependiente del tiempo y el modelo k- ε estándar para la simulación, la simulación consistió en el diseño de dos refrigeradores que eran enfriados con un suministro de niebla ultrasónica y nano niebla y se utilizaron ventiladores axiales y radiales para impulsar la neblina en los refrigeradores, se destacó la obtención de la distribución de los vectores de velocidad y los contornos de temperatura a lo largo del tiempo, demostrando que la niebla ultrasónica logra enfriar en menor tiempo que la nano niebla, esto debido al tamaño de partícula (Ambaw y cols., 2013).

El presente estudio pretende evaluar la nebulización ultrasónica a nivel *in vitro* e *in vivo* y obtener sus vectores de velocidad, diversos estudios se han realizado utilizando el CFD para optimizar almacenes con frutos y usando nebulización ultrasónica. Delele y cols. (2012b) evaluaron un sistema de termonebulización sobre el almacenamiento de frutos en postcosecha, usando un modelo en CFD, donde utilizaron el modelo Reynolds-averaged para obtener la distribución de partículas, velocidades y deposición de partículas sobre los frutos. Estos autores obtuvieron una simulación en donde se observaba que las partículas no lograban fluir a lo largo del estante y no llegaban a la superficie de los frutos, además las partículas se depositaban sobre el termonebulizador lo cual podría ocasionar un daño en el equipo. Por lo que, se optimizó la geometría agregando deflectores en las paredes para lograr el cambio en la distribución de las partículas, obteniendo así una mejora en el flujo y la trayectoria de las partículas sobre el estante, y por lo tanto, alcanzando a llegar a la superficie del fruto y evitar que se depositaran sobre el equipo. En el Cuadro 2.3 se muestra un resumen de algunos trabajos en postcosecha donde se involucra el CFD.

Cuadro 2.2. Investigaciones realizadas en el área de postcosecha usando el CFD

Sistema Modelado	Modelo de turbulencia	Técnica Numérica	Referencia
Almacén y estante de frutas	Reynolds-averaged	Volumen Finito	(Delele y cols., 2012b)
Cajas de plástico con frutas de manzana	Reynolds-averaged	Volumen Finito	(Ambaw y cols., 2013)
Almacén enfriando por nano niebla y niebla ultrasónica	Standard k- ϵ	Volumen Finito	(Umeno y cols., 2015)
Fila de caja de frutas en almacenaje en 2D	Reynolds-averaged	Volumen Finito	(Delele y cols., 2009)
Manzanas	Flujo laminar	Volumen Finito	(Martins y cols., 2011)
Sistema de Desinfección	Flujo laminar	Elemento Finito	(Park y cols., 2019)
Cambio de gases en peras en cajas de transporte	Reynolds-Averaged	Método de Elemento Discreto	(Delele y cols., 2018)

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

El estado de Nayarit como productor de diversos frutos se enfrenta a pérdidas económicas en la etapa postcosecha a causa de hongos patógenos causantes de enfermedades. Por otra parte, los problemas derivados por uso de fungicidas en agricultura justifican la búsqueda de nuevos compuestos activos y estrategias de control que los sustituyan de una manera eficaz y segura. Por lo que se están estudiando sistemas alternativos para el control de patógenos en la etapa postcosecha. El bicarbonato de sodio es un agente GRAS que ha presentado efecto inductor de mecanismos de defensa en los frutos y efecto inhibidor para el control de dichos patógenos, especialmente por su propiedad antifúngica, obteniendo buenos resultados en frutos como guanábana, papaya, mango y entre otros. El ácido acético es también un agente GRAS que ha demostrado ser efectivo en bajas concentraciones para el control de hongos en frutos. Los sistemas de aplicación de agentes comúnmente son por inmersión o por aspersión.

La nebulización ultrasónica es una tecnología poco explorada en México, su beneficio primordial se basa en la reducción del agente que se requiera nebulizar para el control de patógenos en periodos postcosecha, su forma de aplicación es sencilla, versátil y escalable a diferentes sistemas, las partículas finas generadas en la nebulización optimizan la dispersión y homogeniza el área de contacto en los frutos, económicamente es un sistema viable y amigable con el medio ambiente.

Es por eso que en este estudio de investigación se busca obtener nueva información sobre el potencial de la nebulización como sistema de aplicación usando bicarbonato de sodio y ácido acético como agentes de control de hongos patógenos en frutos en etapa postcosecha. Por lo que se contempló evaluar el efecto de la nebulización para el control del *Penicillium italicum* mediante el diseño de un prototipo de nebulización donde se buscó optimizar el tiempo de exposición y la concentración del bicarbonato de sodio y ácido acético realizando análisis *in vitro* e *in vivo* para evaluar el efecto de la nebulización de los agentes sobre la inhibición

del hongo y calidad del fruto de limón persa. Además, para conocer el comportamiento de la niebla en el sistema de nebulización (distribución, velocidad, flujo), obtener información de su alcance e interacción con el hongo durante los tratamientos y poder realizar una validación se incluyó un análisis por CFD.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

La nebulización de bicarbonato de sodio y ácido acético causará un efecto inhibitorio de *Penicillium italicum* a nivel *in vitro* e *in vivo* en el limón persa y con el uso de CFD se logrará obtener la fluidodinámica de la neblina dentro del sistema de nebulización ultrasónica, para poder asegurar la deposición homogénea de dichos agentes sobre los frutos.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la nebulización ultrasónica como sistema de aplicación de bicarbonato de sodio y ácido acético para el control de *Penicillium italicum* y en la calidad del fruto de limón persa en etapa de postcosecha.

5.2 Objetivos Específicos

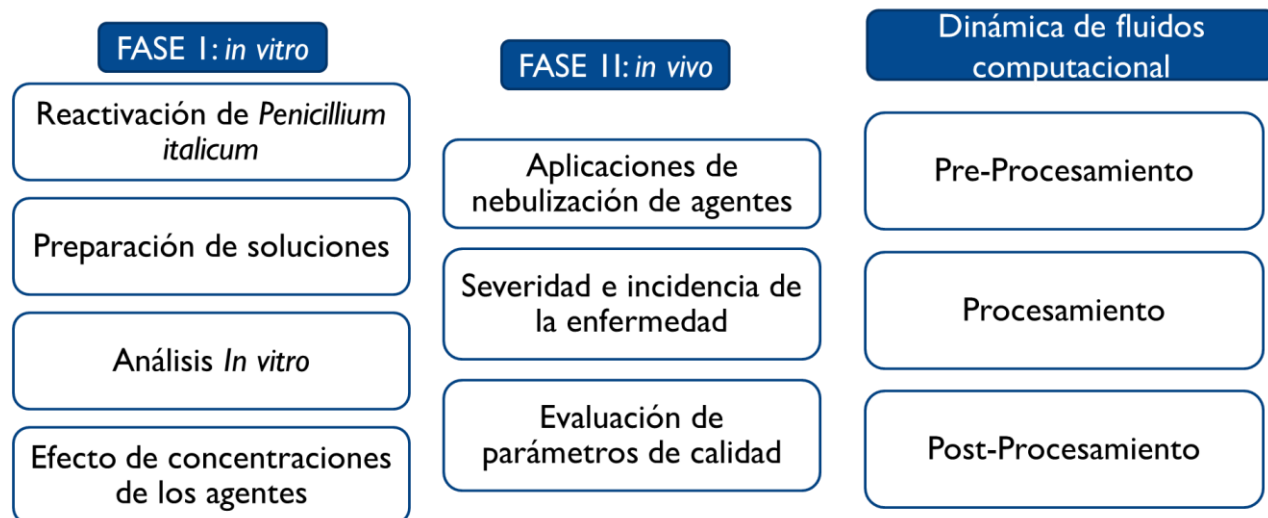
- Diseñar el sistema de nebulización ultrasónica para la aplicación de los agentes de control (bicarbonato de sodio y ácido acético).
- Establecer las concentraciones de bicarbonato de sodio y ácido acético para su nebulización con base en pruebas *in vitro* (porcentaje de Inhibición, porcentaje de germinación y esporulación) del hongo *Penicillium italicum*.
- Obtener la dinámica de fluidos del sistema de nebulización ultrasónica mediante CFD, para evaluar la homogeneidad del flujo y la distribución de la velocidad de la neblina dentro del sistema.
- Evaluar el efecto de los tratamientos de nebulización ultrasónica de los agentes utilizados sobre el porcentaje de incidencia y severidad de la pudrición azul en limón persa.
- Evaluar el efecto de los tratamientos de nebulización ultrasónica de los agentes sobre algunos parámetros de calidad (porcentaje de pérdida de peso, firmeza) del limón persa durante su almacenamiento a 6°C.
- Validar el comportamiento del sistema de nebulización ultrasónica experimental en las pruebas *in vitro* e *in vivo* mediante los resultados de la simulación de la neblina utilizando CFD.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Plan general

En los siguientes esquemas se muestran las dos etapas del plan de trabajo



6.2 Reactivación del *Penicillium italicum*

La cepa conservada a -80°C de *P. italicum* aislada de frutos de limón, se sometió a descongelación y se colocó en papel filtro dentro de una campana de flujo laminar hasta eliminar completamente el exceso de humedad. Posteriormente, se colocaron discos del hongo en cajas Petri con PDA (agar papa dextrosa) previamente preparadas y se incubaron a 25°C hasta el desarrollo del hongo (González-Estrada, 2017).

6.3 Preparación de agentes GRAS

Se prepararon soluciones de bicarbonato de sodio grado reactivo en concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 % (v/v) y las soluciones de ácido acético fueron en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5% (Perkins y cols., 2017).

6.4 Sistema de nebulización ultrasónica

La cámara de nebulización se diseñó y construyó con dos depósitos para colocar las soluciones a nebulizar, se usó un piezoeléctrico de nebulización (2MHz, 240V, 300W), en donde, el volumen de solución a nebulizar en cada depósito fue de 235 ml (volumen necesario para cubrir el piezoeléctrico). La dimensiones de la cámara

donde se colocaron los limones para la parte *in vivo* son de 50x30x15cm respectivamente. La capacidad de la cámara fue para 15 limones, de acuerdo a las medidas de la cámara, el volumen de niebla fue de 22.5 litros, el material utilizado para fabricar el equipo fue de acrílico de 3mm de espesor.

6.5 Tratamientos de nebulización ultrasónica en *P. italicum in vitro*.

Se tomó una caja Petri con el patógeno *P. italicum* y mediante un sacabocados se tomaron discos del hongo de un diámetro de 5.2 mm, los cuales que fueron colocados sobre varios módulos; cada módulo esta provisto de un portaobjetos sostenido por una base de algodón dentro de una caja Petri y en cada módulo se colocaron 5 discos del patógeno (Figura 6.1). Todo el material del módulo fue previamente esterilizado para evitar contaminación.

Los tratamientos de nebulización consistieron en la aplicación de los agentes GRAS bicarbonato de sodio en concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0% (v/v) y ácido acético en concentraciones de 0.5, 1 y 1.5% (v/v). Como control positivo se nebulizó agua destilada y como control negativo el hongo sin nebulizar. Para los tratamientos de nebulización se colocaron 3 módulos para los 3 tiempos de exposición 5, 10 y 15 minutos. Una vez concluido el tiempo de exposición, con ayuda de una aguja de disección y pinzas estériles, se tomaron los discos del patógeno y se colocaron en cajas Petri con medio PDA, al que previamente se le habían hecho huecos de 5 mm en la parte central; posteriormente las cajas se incubaron a 25°C durante 4 días. Este mismo procedimiento se realizó para cada concentración de bicarbonato de sodio, ácido acético y el control positivo.

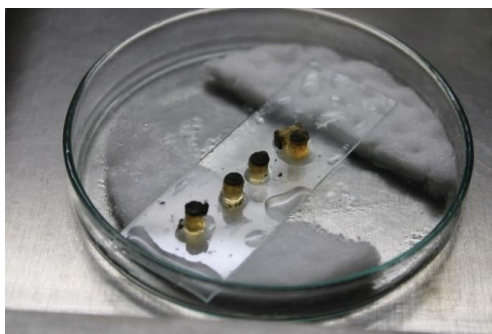


Figura 6.11. Módulo de soporte para los discos con el hongo.

6.6 Diseño experimental y análisis estadístico de la etapa *in vitro*.

Para la etapa *in vitro* se utilizó un diseño factorial 2x3x3 como diseño experimental y para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA y una prueba F de Fisher para la diferencia de medias con el software STATISTICA 12.

6.7 Pruebas *in vitro*.

6.7.1 Crecimiento micelial.

El crecimiento micelial de los hongos sometidos a los tratamientos de nebulización con los agentes GRAS fueron comparados con el control positivo y negativo a los 4 días de inoculación (Shao y cols., 2015). Debido a que el crecimiento de *P. italicum* no es homogéneo se tomaron fotografías de las cajas Petri y fueron procesadas mediante el software ImageJ para obtener el área del hongo. Las mediciones fueron cada 24 horas y se calculó el %ICM mediante la ecuación (19).

$$\%ICM = \left(\frac{dc - dt}{dc} \right) * 100 \text{ (ec. 19)}$$

En donde:

ICM= Porcentaje de inhibición micelial

dt= Diámetro del tratamiento

dc= Diámetro de control.

6.7.2 Esporulaci3n

Despu3s de evaluar el crecimiento micelial del hongo, se determin3 la esporulaci3n de *P. italicum* usando las cajas Petri con el micelio en desarrollo, brevemente, se a1adieron 10 ml de agua destilada est3ril y se removió el micelio con ayuda de una varilla de vidrio est3ril. La suspensi3n fue filtrada con ayuda de gasas est3riles en tubos falc3n, la soluci3n de esporas se coloc3 en una c3mara de Neubauer en un microscopio 3ptico (Motic BA300, EEUU) con un objetivo 40x. Para determinar la concentraci3n de esporas se us3 la ecuaci3n siguiente (20).

$$\frac{Celulas}{ml} = \frac{N}{10} * 25 * 10^4 * F \text{ (ec. 20)}$$

Donde:

F: Factor de diluci3n

25: N3mero total de cuadrantes

N: Suma total de c3lulas contadas en 5 cuadrantes

10⁴: Factor de conversi3n (n3mero de c3lulas por cuadrante a n3mero de c3lulas por ml)

6.7.3 Porcentaje de germinación

Para la determinación del porcentaje de germinación se realizó una suspensión de esporas de 1×10^6 esporas/ml. Después se tomaron alícuotas de 100 μ l y se colocaron en un disco de PDA con un diámetro de 20 mm, el disco fue sometido a los tratamientos de nebulización anteriormente mencionados. Los discos se ubicaron en un microscopio y se observó la germinación durante 12 horas con un objetivo 40x, se consideró como germinada una espora cuando el tubo germinativo es el doble del tamaño de la espora. Se usó la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de germinación (21).

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{No.de esporas germinadas}}{\text{No.de esporas totales}} \times 100 \text{ (ec. 21)}$$

6.8 Tratamientos de nebulización ultrasónica en *P. italicum* *in vivo*.

Para este estudio, los frutos de limón persa fueron provenientes de huertos del municipio de Tepic del estado de Nayarit, seleccionados en madurez de consumo, libres de daños por patógenos e insectos, sin golpes o heridas. Los frutos fueron enjuagados en una solución de hipoclorito de sodio al 2% y enjuagados con agua durante 1 minuto.

Los frutos fueron colocados en la parte central dentro de la cámara de nebulización (15 limones) para ser sometidos a los tratamientos que mostraron con base en las pruebas *in vitro* los mejores resultados. Como control positivo se nebulizó agua y como control negativo los frutos sin nebulizar.

La aplicación de la nebulización ultrasónica *in vivo* se realizó empleando dos modalidades, un tratamiento curativo y uno preventivo, para lo cual se usó una caja Petri del hongo *P. italicum* de 7 días de crecimiento y se preparó una suspensión de esporas colocando 10 ml de agua destilada, posteriormente se ajustó la suspensión a 1×10^5 esporas/ml.

Además de la modalidad curativa y preventiva de los tratamientos ante *P. italicum*, se evaluó la calidad de los limones expuestos a los tratamientos de nebulización.

6.8.1 Tratamiento curativo.

Se procedió a realizar la inoculación de 10 µl de la suspensión de esporas de *P. italicum* mediante heridas generadas con un punzón, después de inocular los frutos se dejaron secar por 30 minutos en área estéril con el fin de que las esporas se establezcan, posteriormente se aplicaron los tratamientos de nebulización.

6.8.2 Tratamiento preventivo.

Para el tratamiento preventivo, los frutos fueron sometidos primeramente a los tratamientos de nebulización, posteriormente se dejaron secar durante 1 hora y por último se llevó a cabo inoculación de 10 µl de la suspensión de esporas *P. italicum* mediante heridas generadas con un punzón.

6.9 Diseño experimental y análisis estadístico de la etapa *in vivo*.

Para la etapa *in vivo* se utilizó un diseño unifactorial como diseño experimental y para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA con una prueba de Tucky para la diferencia de medias con el software STATISTICA 12.

6.10 Pruebas *in vivo*.

Las pruebas *in vivo* se evaluaron por durante 20 días a dos temperaturas de almacenamiento: 15 y 25 °C

6.10.1 Porcentaje de incidencia.

Se evaluó el porcentaje de incidencia de la enfermedad en los frutos mediante la siguiente ecuación (22).

$$\%incidencia = \frac{\# \text{ de heridas infectadas}}{\# \text{ de heridas totales}} \times 100 \text{ (ec. 22)}$$

6.10.2 Porcentaje de severidad de la enfermedad.

El porcentaje de severidad de la enfermedad producida por el hongo se evaluó tomando fotografías del avance de la infección cada día, midiendo el crecimiento del desarrollo micelial sobre las heridas donde fueron inoculadas. Para calcular el porcentaje de severidad se usó la siguiente ecuación (23).

$$\%severidad = \frac{DLA}{DLC} \times 100 \text{ (ec. 23)}$$

Donde:

DLA: Diámetro promedio de las lesiones de las heridas control

DLC: Diámetro promedio de las lesiones de las heridas tratadas

6.11 Parámetros de calidad.

Con el objetivo de verificar que la calidad de postcosecha de los frutos no se viera comprometida, después de los tratamientos de nebulización, se realizaron las siguientes pruebas de calidad por 20 días a una temperatura de almacenamiento de 15°C.

6.11.1 Firmeza.

Se determinó la firmeza mediante un texturometro modelo TA-XT Plus empleando la prueba de penetración a lo largo del fruto con cáscara, se hizo una medición por fruto hasta la perforación de la corteza. Los resultados fueron expresados en Newtons (N) utilizando el software del equipo.

6.11.2 Porcentaje de pérdida de peso.

La pérdida de peso se midió cada 24 horas, se colocó una caja de plástico sobre una balanza analítica para calibrar el peso, posteriormente se colocaron los frutos en la caja y se tomó el peso (Tirawat y cols., 2017). El porcentaje de pérdida de peso fue calculado usando la siguiente ecuación (24).

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \text{ (ec. 24)}$$

Donde:

Wo: peso inicial de fruto (gr).

Wt: peso del fruto a través del tiempo (gr).

6.11.3 Sólidos solubles totales.

Los sólidos solubles totales se analizaron con ayuda de un refractómetro digital marca Atago. Los resultados serán expresados en °Brix (AOAC, 2000).

6.11.4 Acidez titulable.

La acidez titulable fue determinada usando 5 gramos de muestra homogénea, fue diluida en 5 ml de agua destilada y se añadieron 3 gotas de fenolftaleína como indicador, fue titulado con NaOH al 0.1 N. Los cálculos fueron reportados en el porcentaje de ácido predominante del fruto con la ayuda de la siguiente ecuación (25) (AOAC, 2000):

$$\% \text{ de acidez} = \frac{\text{Normalidad de NaOH} \times \text{Vol. de NaOH gastados (ml)} \times \text{Meq}}{\text{cantidad de muestra (gr)}} \times 100 \text{ (ec. 25)}$$

6.11.5 Determinación de porcentaje de jugo.

El porcentaje de jugo se midió usando la metodología de Nasrin y cols., (2020) con algunas modificaciones. Se uso el jugo de limón extraído y fue dividido entre su peso total y expresado en porcentaje.

6.11.6 Determinación de color.

El color de los frutos se evaluó con un colorímetro High-Quality Colorimeter, Focus on color (Shanghai, China) basado en CIE ($L^*a^*b^*$). Donde L^* es la luminosidad y los valores de a^* y b^* se usaron para determinar el croma (c) y el ángulo hue (h).

6.11.7 Determinación de pH.

La determinación de pH se realizó utilizando un potenciómetro marca Hanna Instruments HI 2210 previamente calibrado, sumergiendo el electrodo en la muestra y tomando la lectura correspondiente (AOAC, 2000).

6.12 Metodología de dinámica de fluidos por computadora (CFD).

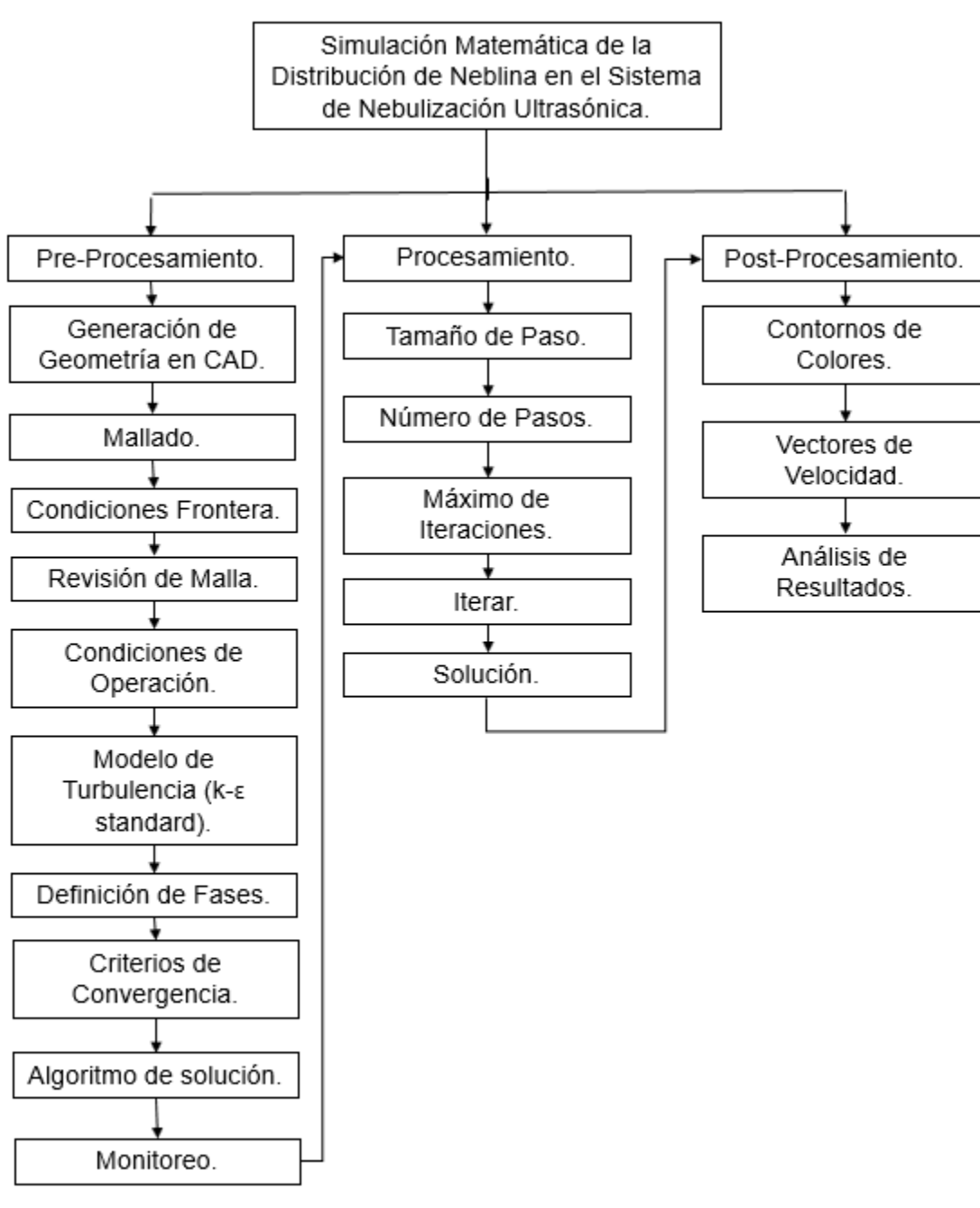


Figura 6.2 Diagrama de flujo del sistema de nebulización por medio de CFD.

6.12.1 Pre-procesamiento.

6.12.1.1 Creación de la geometría virtual.

La simulación matemática reproduce la representación del comportamiento fluidodinámico de la neblina, generada por el nebulizador ultrasónico, dentro del sistema diseñado para las pruebas *in vitro*. La geometría se compone de dos columnas laterales, (de las cuales, la izquierda contiene un nebulizador y una entrada de aire), una parte central (donde se encuentran las estructuras dentro del sistema que representan cajas Petri y sus dimensiones) y una columna derecha (para agregar un nebulizador de ser necesario), para motivos de esta investigación solo se utilizó la columna izquierda (figura 6.2) y (figura 6.3).

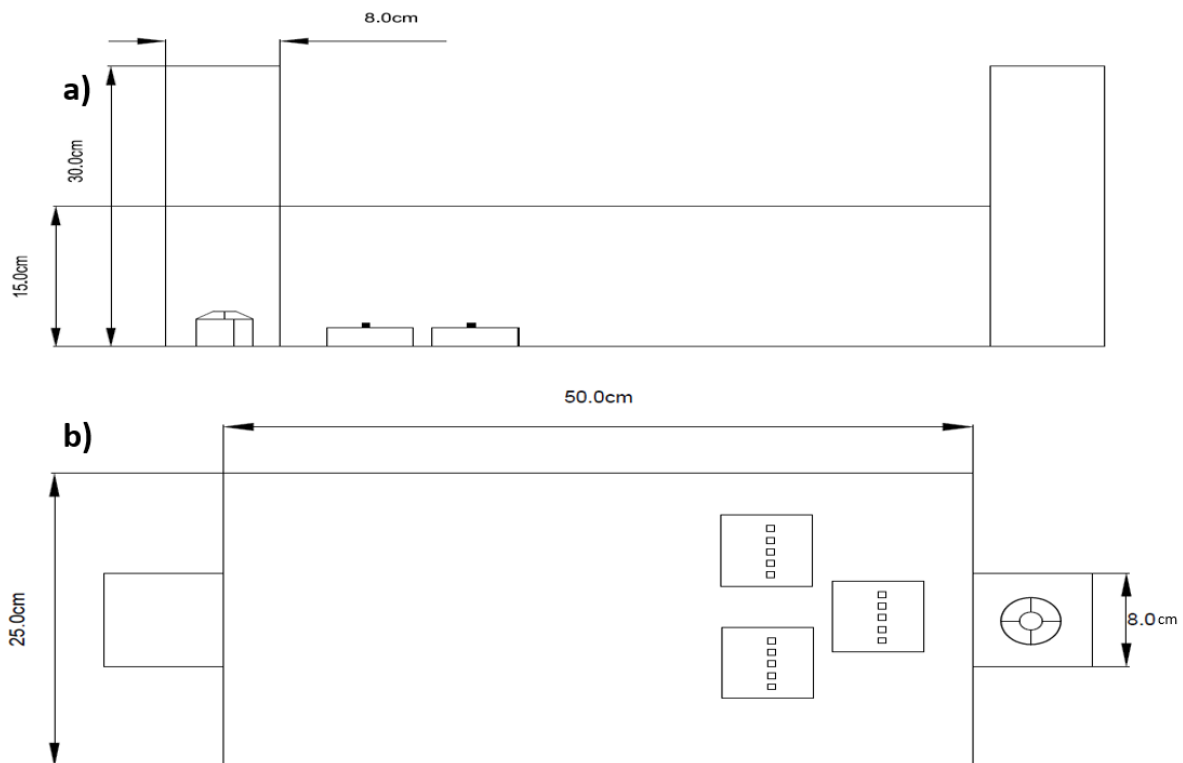


Figura 12.3 Modelo Virtual del Sistema de Nebulización en su a) vista frontal y b) vista superior.

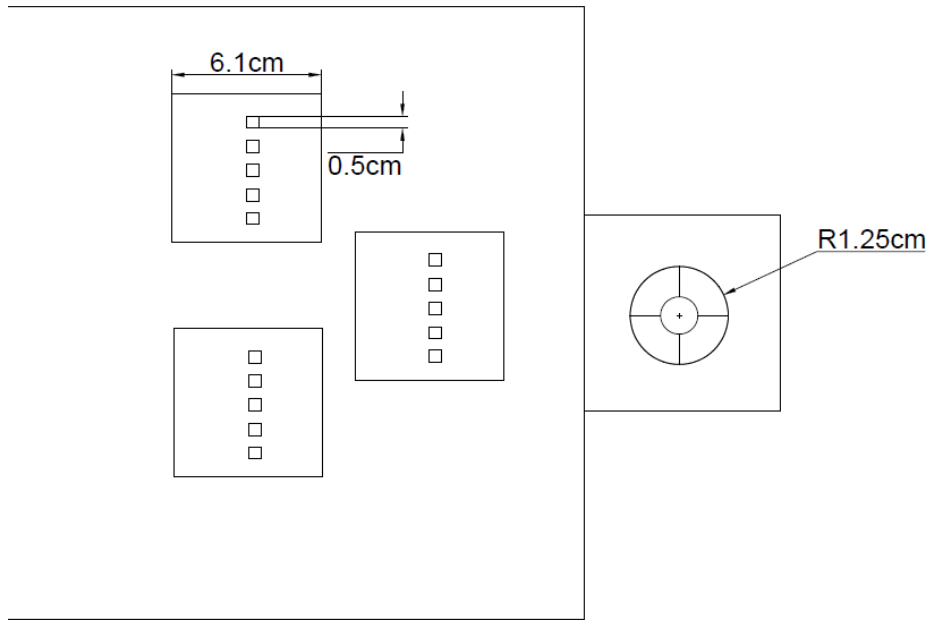


Figura 13.4 Acercamiento del sistema de nebulización ultrasónica y dimensiones de las cajas Petri, muestras de hongos y nebulizador, desde una vista superior.

La simulación del sistema de nebulización con los frutos utilizó el mismo sistema indicado anteriormente, pero se añadieron 15 esferas de 5 cm ubicadas en la parte inferior que son la representación de los frutos de limón persa (figura 6.5).

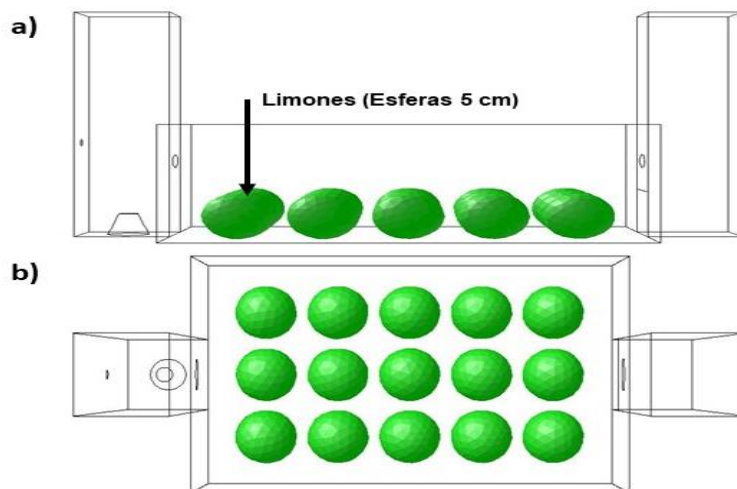


Figura 14.5 Sistema de nebulización ultrasónica con frutos de limón, a) Vista lateral y b) vista superior de sistema.

6.12.1.2 Generación del mallado.

Posterior a la generación de la geometría, se debe realizar la segunda etapa del pre-procesamiento, la generación de la malla. Se debe discretizar el espacio del dominio del fluido en pequeñas celdas llamadas elementos o volúmenes finitos que formaran parte de la malla. La calidad de la malla determinará, en gran medida, la simulación y la calidad de los resultados obtenidos, debido a que la convergencia del problema depende principalmente de la misma.

En la figura 6.6 y 6.7 podemos observar la malla que se desarrolló en la geometría y con la cual se realizó la simulación, la malla fue una combinación que consta de 300,000 elementos, y con una deformación de 0.75 que es aceptable para llevar a cabo las condiciones de simulación. La principal característica de la malla es su composición, se compone de malla híbrida con la mayor parte de los elementos estructurados. El uso de este acoplamiento evita más elementos en la malla y que se requiera un mayor gasto computacional. Se observa una vista frontal (a) mostrando la distribución de los elementos en la malla, en la parte inferior, donde se encuentran las cajas Petri, se usó malla híbrida para obtener un mejor acoplamiento, la columna del nebulizador tiene una parte híbrida donde se ubica la salida del flujo de neblina. Lo que resta del sistema se compone de malla estructurada. Se comenzó a mallar la columna izquierda con el nebulizador con una parte estructurada y una parte híbrida debido a su condición de interior y la entrada de velocidad del aire, posteriormente se realizó el mallado de la parte central del sistema con una combinación de malla híbrida y estructurada; la parte inferior de la base hasta una altura de 2.5 cm está conformada por malla híbrida debido a la presencia de las cajas Petri y el resto se compone por malla estructurada. Por último, la columna derecha fue completamente estructurada.

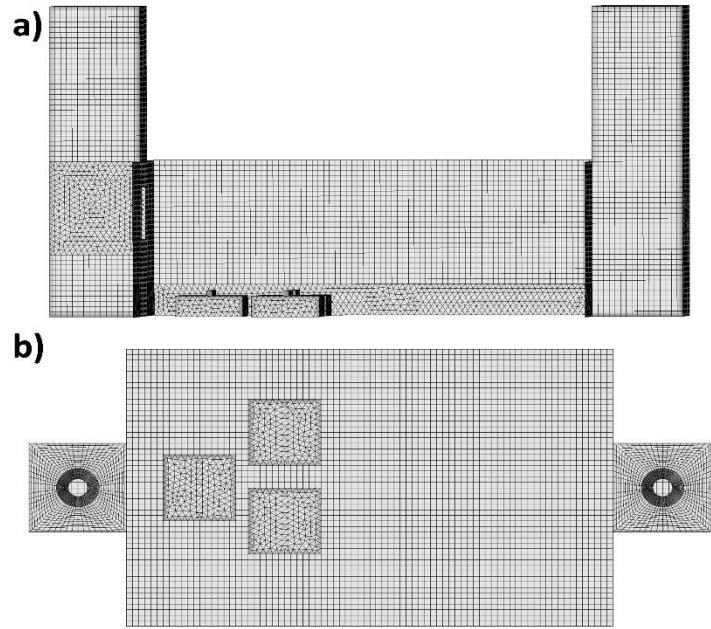


Figura 6.6 Malla del Sistema de nebulización ultrasónica hecho en GAMBIT a) y b).

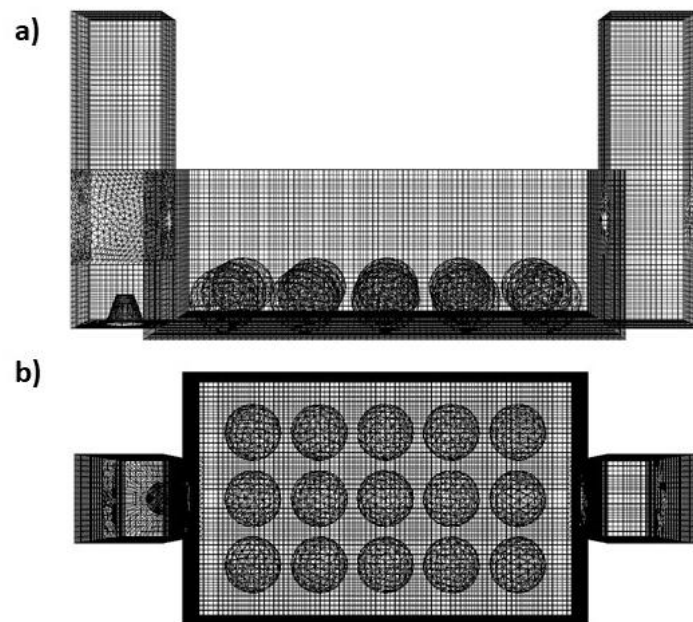


Figura 6.7 Malla del Sistema de nebulización ultrasónica con frutos de limón hecho en GAMBIT a) y b).

6.12.1.3 Condiciones fronteras e iniciales.

El sistema de nebulización ultrasónica se compone de tres partes, columna del nebulizador a), parte central b), columna derecha c) y cajas Petri d) (figura 6.8)



Figura 6.8 Sistema de nebulización ultrasónica

Las condiciones de frontera se asignaron con base en las condiciones de operación en el laboratorio, el sistema es cerrado, por lo que se le dio una condición de entrada de velocidad del aire en un costado de una columna del nebulizador, se dio una condición de entrada de velocidad de la neblina en el nebulizador y se dio una condición de interior al sistema central entre la columna y la parte central, las condiciones asignadas se muestran en la figura 6.9.

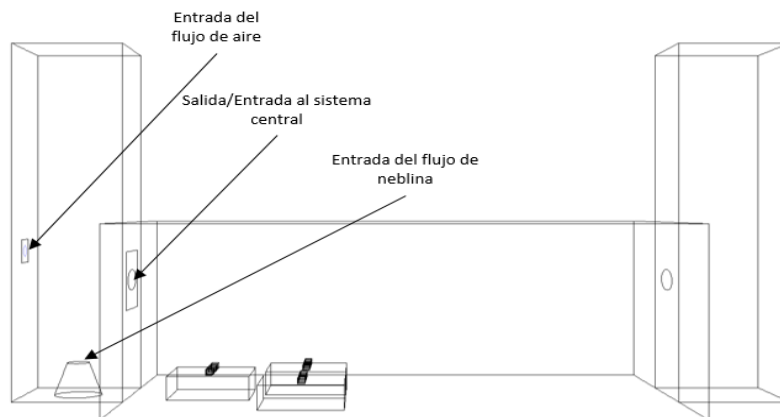


Figura 6.9 Condiciones de frontera asignadas del Sistema de Nebulización ultrasónica.

Para obtener la velocidad de entrada del aire se tomaron medidas con un anemómetro y se calculó el promedio, dando un resultado de 0.60 m/s, el anemómetro marca STEREN con precisión de $0.80-3000 \pm (2\%+50D)$, una resolución de 0.01 m/s y un rango de medición de 0.8-40 m/s. Para el caso del nebulizador, se tomó como velocidad de entrada la misma que la entrada de aire, pero se tomó como flujo másico, mediante el software FLUENT se obtuvo el reporte en kg/s de una velocidad de 0.60 m/s.

Se definieron como paredes las caras frontales, traseras, laterales, inferiores; la entrada del flujo de aire, el orificio de la columna del nebulizador al sistema central y alrededor del nebulizador se definieron como interiores (figura 6.10)

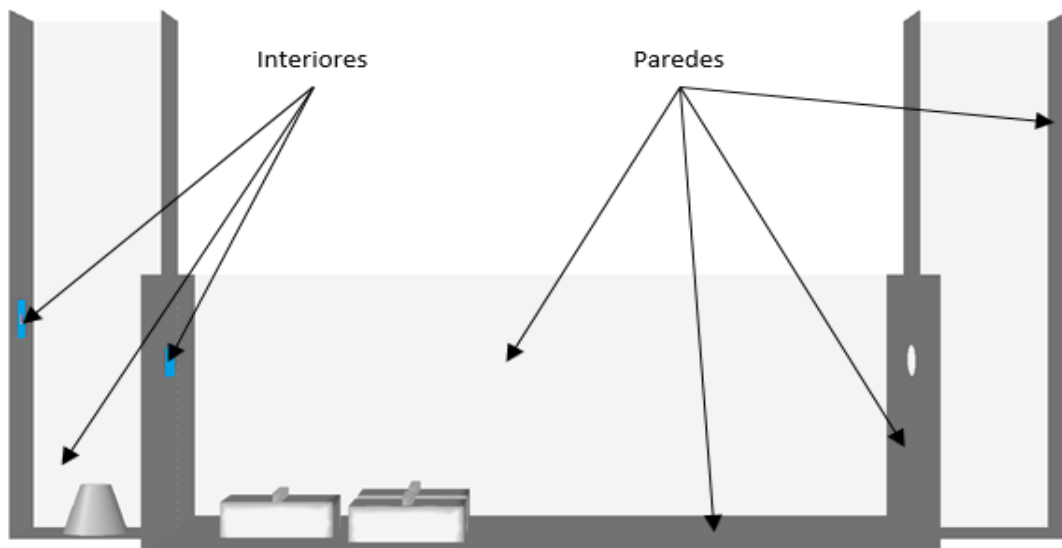


Figura 6.10 Condiciones de fronteras del sistema de nebulización ultrasónica virtual.

Una vez terminada la malla en GAMBIT y definidas las condiciones fronteras e iniciales, se exporta la malla y se inicializa el caso en FLUENT.

Para la simulación hecha con frutos de limón, se utilizaron las mismas condiciones de frontera e iniciales, únicamente a las esferas se les asignó que fueran sólidos.

En el cuadro 6.1 se muestran las propiedades físicas del fluido que fue simulado, se asume que la densidad de la neblina es de 1.299 kg/m^3 (Santati y cols., 2019).

Cuadro 6.1. Propiedades de los Materiales Utilizados.

	Densidad (ρ) kg/m ³	Viscosidad (μ) kg/m*s
Aire	1.22	1.7894e-05
Neblina	1.299	1.34e-05

6.12.2 Procesamiento

En este caso no se tomó en cuenta la ecuación de transferencia de energía debido a que se asumió que la temperatura era constante a 25°C. Por lo tanto, es necesario definir los modelos de solución y criterios de convergencia necesarios para el sistema de ecuaciones antes mencionadas.

Se simuló en estado de estado transitorio, con un tamaño de paso de 0.001 s. Para simular la nebulización ultrasónica y la entrada de aire se empleó el modelo multifásico VOF, en el cual se emplearon las fases de neblina-aire.

El algoritmo de acoplamiento de presión-velocidad empleado fue el SIMPLE, finalmente la convergencia del problema se alcanzó cuando los residuales alcanzaban valores por debajo de 1×10^{-3} .

Se consideraron las siguientes simplificaciones y suposiciones en la Simulación Matemática para facilitar la resolución de las ecuaciones gobernantes

1. Un flujo completamente turbulento dentro del sistema.
2. El fluido es newtoniano.
3. Estado dependiente del tiempo.
4. Densidad, viscosidad y temperatura constante.
5. Un sistema bifásico: neblina-aire.
6. La acción de la gravedad se da en el eje "Y" negativo.
7. Presión atmosférica a 1 atm.
8. Dos entradas de velocidad de aire y de neblina en el nebulizador, ambas en m/s.

6.12.3 Post-procesamiento

Al igual que en el pre-procesamiento, el post-procesamiento tiene diversos procedimientos. Para el análisis del campo vectorial y los contornos de fase, se plantea hacer el estudio en diferentes planos (figura 6.10), a cada plano se le asignará un nombre con el cual se identificará, se decide hacer el análisis en estos planos porque abarcan las zonas de mayor interés para ver la distribución de fluido en el sistema de nebulización ultrasónica.

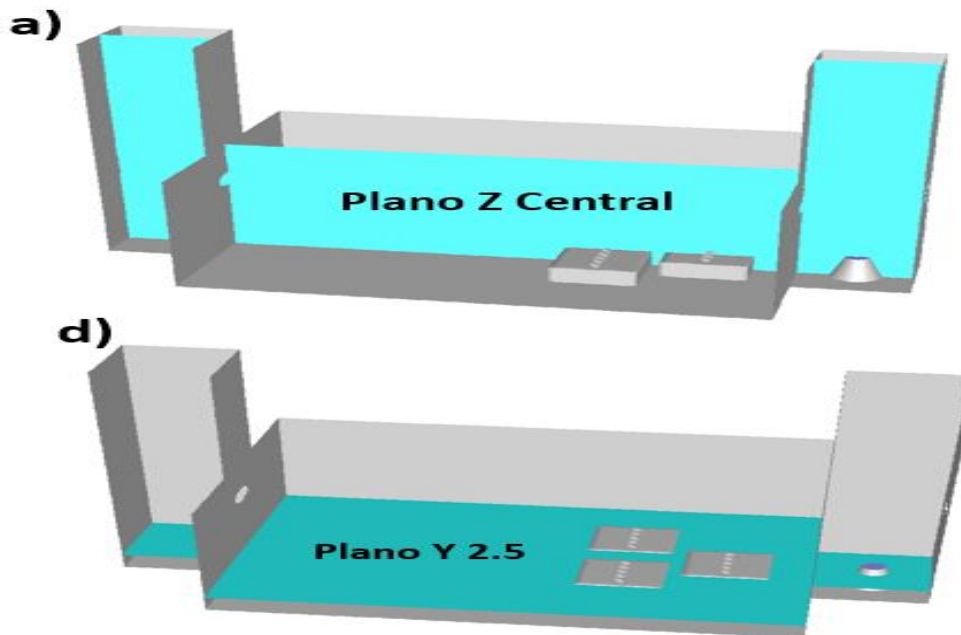


Figura 6.11 Planos para el análisis de resultados, a) plano Z central en la entrada del aire y salida de neblina al sistema central, b) plano Y 2.5 a la altura de las cajas Petri y las muestras de hongos.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la nebulización ultrasónica de bicarbonato de sodio, ácido acético y agua a nivel “*in vitro*”

7.1.2 Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición micelial (%ICM) de *Penicillium italicum*

La infección por el hongo *P. Italicum* sobre el fruto de limón es mediante el micelio que crecerá conforme avanza el tiempo; por lo que evitando el crecimiento de micelio se detendrá la propagación de la enfermedad y se evitarán pérdidas.

En las Figuras 7.1, 7.2 y 7.3 se observa el efecto de la nebulización de los agentes GRAS en el crecimiento micelial en caja Petri de *P. italicum* a lo largo de 4 días de incubación. Los tratamientos nebulizados con ác. acético (Figura 7.2) mostraron un crecimiento del micelio en forma radial a diferencia del tratamiento control negativo que tuvo un crecimiento no uniforme y en forma dispersa en toda la caja Petri. En el caso de los tratamientos con bicarbonato de sodio (Figura 7.1) mantuvieron el radio del micelio menos disperso que el tratamiento control, pero no en forma radial como los de ácido acético; y en el control positivo de agua destilada nebulizada (Figura 7.3) el tratamiento de 10 minutos mostró una inhibición micelial en forma radial. Respecto al control positivo se puede observar el crecimiento micelial se vio afectado los días 2 y 3; mientras que en el día 4 los tratamientos nebulizados con ác. acético a concentraciones superiores del 0.5 % muestran aún efecto en el crecimiento micelial respecto a los tratamientos de bicarbonato de sodio.





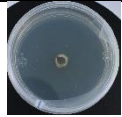
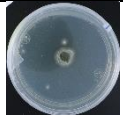
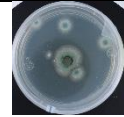
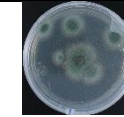
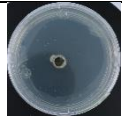
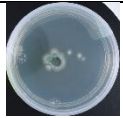
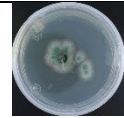

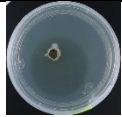
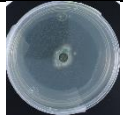
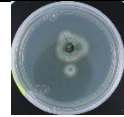
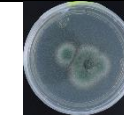

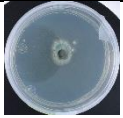
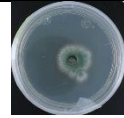
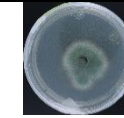
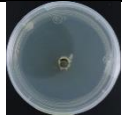
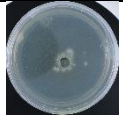


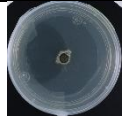
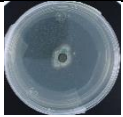
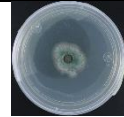
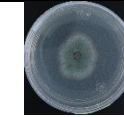
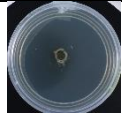
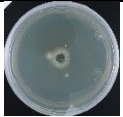
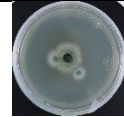
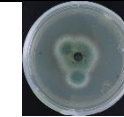
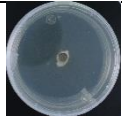
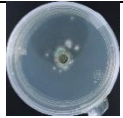
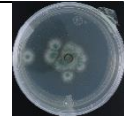
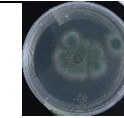
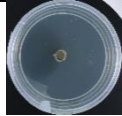
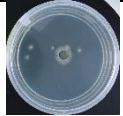
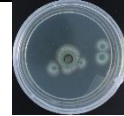
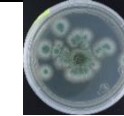
Tratamientos/Tiempo	1 día	2 días	3 días	4 días
Control negativo				
BS 1% 5 minutos				
BS 1% 10 minutos				
BS 1% 15 minutos				
BS 2% 5 minutos				
BS 2% 10 minutos				
BS 2% 15 minutos				
BS 3% 5 minutos				
BS 3% 10 minutos				
BS 3% 15 minutos				

Figura 7.1. Crecimiento micelial de *P. italicum* después de aplicar los tratamientos nebulización de bicarbonato de sodio.





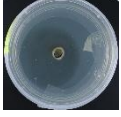
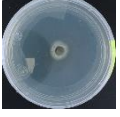
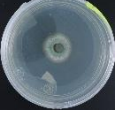
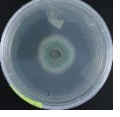
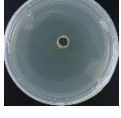
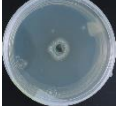
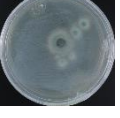

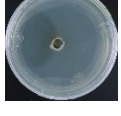
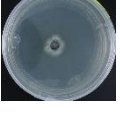
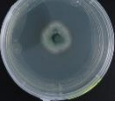
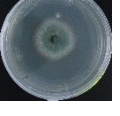
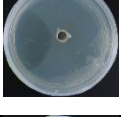



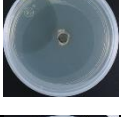
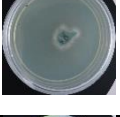


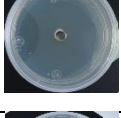
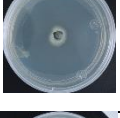

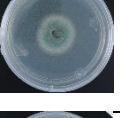
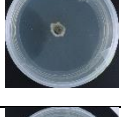
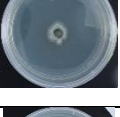
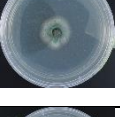
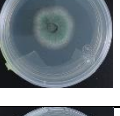
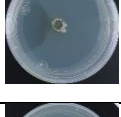
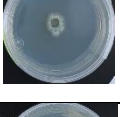
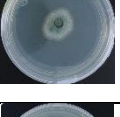
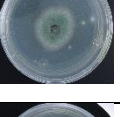
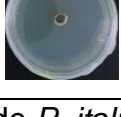



Tratamientos/Tiempo	1 día	2 días	3 días	4 días
Control negativo				
AA 0.5% 5 minutos				
AA 0.5% 10 minutos				
AA 0.5% 15 minutos				
AA 1% 5 minutos				
AA 1% 10 minutos				
AA 1% 15 minutos				
AA 1.5% 5 minutos				
AA 1.5% 10 minutos				
AA 1.5% 15 minutos				

Figura 7.2. Crecimiento micelial de *P. italicum* después de aplicar los tratamientos nebulización de ácido acético.

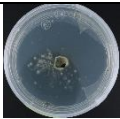

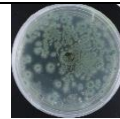
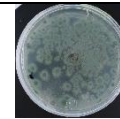
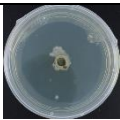
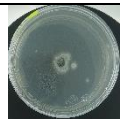
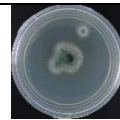
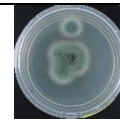
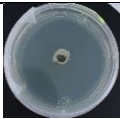
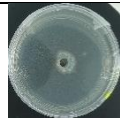
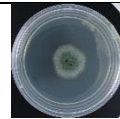
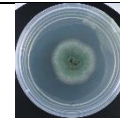
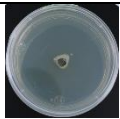
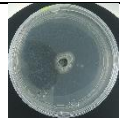
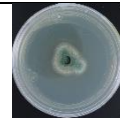
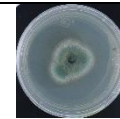
Tratamientos/Tiempo	1 día	2 días	3 días	4 días
Control negativo				
Agua 5 minutos				
Agua 10 minutos				
Agua 15 minutos				

Figura 7.3. Crecimiento micelial de *P. italicum* después del control positivo (nebulización de agua).

La nebulización ultrasónica se conforma de partículas pequeñas en un sistema gaseoso con una mayor capacidad de contacto y homogeneidad en comparación con otros sistemas de aplicación. Se ha estudiado la nebulización ultrasónica y sistemas semejantes, reportando que la nebulización genera gotas altamente cargadas con iones y cationes, durante su dispersión en el ambiente se genera un mecanismo de residuo de iones en donde el solvente (medio líquido) se evapora de la gota (Forbes, 2010; Forbes y cols., 2010; Iribarne y Thomson, 1976), este mecanismo se refiere a que la gota aumenta la densidad de carga hasta alcanzar a romper la tensión superficial y finalmente liberar las moléculas cargadas, además la gota que al estar en contacto debido a los choques comienzan un fenómeno de difusividad iónica de los compuesto nebulizados (Liu y cols., 2009). Especies ionizadas como H^+ , OH^- , H_2O^- , O_2^- al combinarse con el agua del ambiente forman iones de menor tamaño y pueden tener una vida media de 30 segundos aproximadamente (Forney y cols., 2001).

Diversos autores sugieren mecanismos de bicarbonato de sodio por reacciones sonoquímicas que se producen al estar en contacto con las ondas ultrasónicas subrayando la generación de ion carbonato (CO_3^{2-}) y ion bicarbonato (HCO_3^-). El ion bicarbonato y carbonato reaccionan con el hidroxilo durante el proceso de

ultrasonido dando formación al radical carbonato ($\bullet\text{CO}_3^-$), este radical es un fuerte agente oxidante que puede reaccionar con compuestos inorgánicos y orgánicos mediante la transferencia de electrones (Merouani y cols., 2010; Pétrier y cols., 2010).

El mecanismo de acción del ác. acético para inhibir el crecimiento micelial de *P. italicum* se asocia al cambio de pH intracelular y la alteración del metabolismo celular (Caldwell, 2009). El efecto disociativo del ácido acético en nebulización puede ser el modo de acción contra el patógeno *P. italicum*, la permeabilidad de la membrana permite el acceso diversas moléculas en espacios pequeños entre los lípidos y los carbohidratos de la membrana, los ácidos débiles como el acetato difunden entre la célula de forma neutra y se transportan mediante protones que llegan a la vesícula, una vez dentro se acidifica el medio intracelular e inhibe el crecimiento micelial y germinativo (Gabba y cols., 2020; Orij y cols., 2011).

El Cuadro 7.1 muestra el efecto de los diferentes tratamientos de nebulización y sus interacciones entre el tipo de agente GRAS, concentración y tiempo de exposición en el porcentaje de inhibición micelial de *P. italicum*. Los tratamientos de bicarbonato de sodio en concentración de 1% en tiempo de exposición de 5, 10 y 15 minutos mostraron una inhibición micelial en un rango de 52.19 - 62.50%, en cambio la concentración al 2% mostro un rango de 58.22 - 53.87%, mientras que en los tratamientos con una concentración del 3% los porcentajes de inhibición fueron de 57.43 - 53.53 %. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el porcentaje de inhibición micelial entre los tratamientos a las tres diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio. Los resultados obtenidos con el control positivo de agua destilada muestran un porcentaje de inhibición de 56.38 - 67.87% similares a los obtenidos con el bicarbonato de sodio.

Cuadro 3.1. Porcentaje de inhibición micelial de *Penicillium italicum* por nebulización de bicarbonato de sodio, ácido acético y agua (control positivo).

Tratamientos	% de Inhibición
BS 1% 5 minutos	52.19 ± 7.84 ^{ab}
BS 1% 10 minutos	57.36±6.38 ^{ab}
BS 1% 15 minutos	62.50±3.33 ^{ab}
BS 2% 5 minutos	58.22±6.39 ^{ab}
BS 2% 10 minutos	50.36±8.79 ^a
BS 2% 15 minutos	53.87±14.66 ^{ab}
BS 3% 5 minutos	57.43±5.53 ^{ab}
BS 3% 10 minutos	55.96±7.85 ^{ab}
BS 3% 15 minutos	53.53±13.04 ^{ab}
AA 0.5% 5 minutos	70.48±9.82 ^{ab}
AA 0.5% 10 minutos	72.63±11.13 ^{ab}
AA 0.5% 15 minutos	70.59±7.90 ^{ab}
AA 1% 5 minutos	75.48±10.1 ^b
AA 1% 10 minutos	67.86±15.34 ^{ab}
AA 1% 15 minutos	70.06±5.8 ^{ab}
AA 1.5% 5 minutos	71.77±9.80 ^{ab}
AA 1.5% 10 minutos	72.76±4.88 ^{ab}
AA 1.5% 15 minutos	70.19±7.37 ^{ab}
Agua 5 minutos	71.77±9.80 ^{ab}
Agua 10 minutos	72.76±4.88 ^{ab}
Agua 15 minutos	70.19±7.37 ^{ab}

Los datos se presentan como el valor promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las interacciones de agente GRAS, concentración y tiempo (P <0.05).

Respecto a los tratamientos de ác. acético, estos mostraron porcentajes mayores de inhibición micelial que los tratamientos de bicarbonato de sodio. Los tratamientos de nebulización al 0.5% de ác. acético mostraron porcentajes de inhibición en un rango de 70.48 - 70.59%, para la concentración de 1% obtuvieron porcentajes de inhibición en un rango de 75.48 - 70.06%, mientras que en la concentración de 1.5% fueron de 71.77 - 70.19%. Al igual que en los tratamientos con bicarbonato de sodio no se observaron diferencias significativas (p>0.05) en los tratamientos.

Investigaciones con bicarbonato de sodio en aplicación líquida directa sobre *Penicillium expansum* reportaron inhibir el crecimiento micelial en un 60% con 0.6% de bicarbonato de sodio (Lai y cols., 2015); para *P. italicum* se alcanzó este porcentaje de inhibición (60 %) a concentraciones de 1, 2 y 3% de bicarbonato de sodio. Fallanaj y cols., (2016) probaron el bicarbonato de sodio sobre *Penicillium digitatum* y mostraron porcentajes de inhibición micelial de 50-56%. Este estudio menciona la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando un colapso en la membrana mitocondrial y una modificación en el pH, lo que lleva a una alteración en las hifas y esporas. Nuevamente se obtuvieron valores similares con la nebulización ultrasónica del bicarbonato de sodio indicando que en el presente estudio se aplicó sobre *Penicillium italicum*.

En el caso del ácido acético, Sholberg y cols. (2009) evaluaron el efecto de la fumigación de ácido acético en cuartos de almacenamiento contra el patógeno *P. expansum*, estos autores reportaron una reducción del micelio en un rango del 74 al 96% pero a un tiempo de exposición de 2 horas en tratamiento continuo. Los valores obtenidos en el presente estudio con nebulización ultrasónica mostraron un porcentaje de inhibición micelial del 75.48% de *P. italicum* a una concentración de 1% pero con un tiempo de 5 minutos. Así mismo, Venditti y cols., (2017) evaluaron diferentes concentraciones de ácido acético (5, 10, 15 y 20 µl/l) en *Botrytis cinerea* mediante fumigaciones en tiempos de inoculación (0, 24, 48 hrs) durante 15 minutos, demostraron que concentraciones de 10 µl/l inhiben completamente el hongo en el tiempo 0, reportan que en el tiempo 48 es requerida una aplicación nueva con concentraciones de 20 µl/l; estos estudios demuestran que *B. cinerea* es más sensible a tratamientos de ácido acético de fumigación en concentraciones de 1-4 µl/l.

Las interacciones entre el tipo de agente GRAS, concentración y tiempo de exposición no mostraron alguna diferencia significativa, sin embargo, si presentaron una diferencia entre el tipo de agente GRAS empleado ($P < 0.05$) (cuadro 7.2).

Cuadro 4.2. Diferencia de medias con prueba de Fisher entre tipo de sanitizante, se destaca que el ácido acético tuvo un mayor efecto en la inhibición micelial que el bicarbonato de sodio y agua destilada (control positivo)

Sanitizante	Inhibición Micelial
bicarbonato de Sodio	55.71 ± 9.73 ^a
Ácido Acético	71.31 ± 9.99 ^b
Agua Destilada	62.61 ± 12.02 ^a

Los datos se presentan como el valor promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las interacciones de sanitizante (P <0.05).

Los resultados de %ICM muestran que la aplicación por nebulización de los agentes GRAS, así como del agua destilada (control positivo), tienen efecto en el hongo *P. Italicum*. Es conocido que, tanto el bicarbonato de sodio, como el ácido acético, tienen efectos antifúngicos en diversos patógenos; sin embargo, no existen reportes de aplicación de nebulización ultrasónica de estos agentes contra el patógeno *Penicillium italicum* en pruebas *in vitro*. Además, a un tiempo de 5 minutos tuvo %ICM mayores, comparado con los tiempos de 10 y 15 minutos en algunos tratamientos, esto se debe a que las cajas Petri están cercano a la entrada de neblina del nebulizador y tienen un contacto directo con las gotas cargadas de iones momentos antes de que se agrupen y formen gotas de mayor tamaño de agua como ocurrió en los tiempos de exposición mayores.

7.1.3 Esporulaci3n de *Penicillium italicum*

En el Cuadro 7.3 se muestra el n3mero de esporas y porcentaje de reducci3n de esporas despu3s de los tratamientos nebulizados y sus interacciones entre el tipo de agente GRAS, concentraci3n y tiempo de exposici3n; mientras que en las figuras 7.7, 7.8 y 7.9 se puede observar el efecto de la nebulizaci3n de los agentes GRAS en la esporulaci3n de *P. italicum*. Los tratamientos nebulizados con bicarbonato de sodio en concentraci3n de 1% en tiempos de 5, 10 y 15 minutos mostraron una reducci3n en la esporulaci3n en un rango de 73.57 – 78.05%, mientras que en la concentraci3n de 2% un rango de 68.82 – 75.89%, por 3ltimo, los de 3% mostraron un rango de 82.78 – 86.22%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de bicarbonato de sodio y los tiempos de exposici3n ($p>0.05$).

Los tratamientos de 3c. ac3tico, mostraron mayores porcentajes de reducci3n que los tratamientos de bicarbonato de sodio. Los tratamientos de nebulizaci3n al 0.5% de 3c. ac3tico mostraron una reducci3n de 80.68 – 81.75%, en concentraci3n de 1% mostraron un rango de 84.59 – 89.66%, mientras que los tratamientos de 1.5% fueron de 85.96 – 90.44%. No se muestra diferencia significativa entre los tiempos de exposici3n ($p<0.05$) pero si una diferencia entre los tratamientos, en donde los tratamientos con 0.5% son diferentes al resto ($p>0.05$). En la concentraci3n de 1% los porcentajes de reducci3n fueron mayores a los de 0.5% con 86.85 - 84.59 % sin diferencia entre los tiempos de exposici3n, los tratamientos de 3c. ac3tico con concentraci3n de 1.5% mostraron la mayor reducci3n entre todos los tratamientos. El control positivo con agua destilada mostr3 un porcentaje de reducci3n de esporas de 71.10 – 75.01%, muy similares con los de bicarbonato de sodio.

Finalmente, se observa que los tratamientos con una mayor diferencia significativa entre todos fueron los de bicarbonato de sodio al 1% durante 5 minutos y 3c. ac3tico al 1.5% durante 10 minutos, siendo este 3ltimo el que mostr3 una mayor reducci3n del porcentaje de esporas en comparaci3n del resto (Cuadro 7.3).

Cuadro 5.3. Tratamientos de ácido acético, bicarbonato de sodio y agua sobre la esporulación de *Penicillium italicum*

Tratamientos	Número de Esporas (esporas/ml)	% de Reducción
Control	1.36x10 ⁰⁷	
BS 1% 5 minutos	2.94x10 ⁰⁶	78.05 ± 10.28 ^{abcdef}
BS 1% 10 minutos	3.57x10 ⁰⁶	73.57 ± 4.88 ^{abcde}
BS 1% 15 minutos	3.54x10 ⁰⁶	73.89 ± 2.43 ^{abcde}
BS 2% 5 minutos	4.14x10 ⁰⁶	69.59 ± 4.38 ^{ab}
BS 2% 10 minutos	3.31x10 ⁰⁶	75.89 ± 11.72 ^{abcdef}
BS 2% 15 minutos	4.31x10 ⁰⁶	68.82 ± 8.68 ^a
BS 3% 5 minutos	2.24x10 ⁰⁶	83.55 ± 2.01 ^{abcdef}
BS 3% 10 minutos	1.84x10 ⁰⁶	86.22 ± 4.06 ^{cdef}
BS 3% 15 minutos	2.39x10 ⁰⁶	82.78 ± 5.36 ^{abcdef}
AA 0.5% 5 minutos	2.69x10 ⁰⁶	80.68 ± 6.61 ^{abcdef}
AA 0.5% 10 minutos	2.52x10 ⁰⁶	81.75 ± 3.97 ^{abcdef}
AA 0.5% 15 minutos	2.27x10 ⁰⁶	81.17 ± 2.48 ^{abcdef}
AA 1% 5 minutos	1.83x10 ⁰⁶	86.85 ± 3.71 ^{def}
AA 1% 10 minutos	1.41x10 ⁰⁶	89.66 ± 0.61 ^f
AA 1% 15 minutos	2.13x10 ⁰⁶	84.59 ± 3.57 ^{bcdef}
AA 1.5% 5 minutos	1.96x10 ⁰⁶	85.96 ± 4.78 ^{cdef}
AA 1.5% 10 minutos	1.32x10 ⁰⁶	90.44 ± 2.69 ^f
AA 1.5% 15 minutos	1.57x10 ⁰⁶	88.65 ± 4.04 ^{ef}
Agua 5 minutos	3.51x10 ⁰⁶	75.01 ± 12.78 ^{abcdef}
Agua 10 minutos	4.01x10 ⁰⁶	71.10 ± 13.35 ^{abc}
Agua 15 minutos	3.79x10 ⁰⁶	72.03 ± 5.32 ^{abcd}

Los datos se presentan como el valor promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre agente GRAS, concentración y tiempo (P <0.05).

Nuevamente no existe alguna diferencia significativa entre las interacciones del tipo de agente GRAS, concentración o tiempo; se observa que el solo el tipo de agente GRAS muestra diferencia significativa (P <0.05), reiteradamente el ácido acético tuvo un mayor efecto a comparación del bicarbonato de sodio y el control positivo de agua destilada (cuadro 7.4).

Cuadro 6.4. Diferencia de medias con prueba de Fisher entre tipo de sanitizante, se destaca que el ácido acético tuvo un mayor efecto en la esporulación que el bicarbonato de sodio y agua destilada

Sanitizante	Esporulación
Bicarbonato de Sodio	76.92 ± 9.13 ^a
Ácido Acético	85.52 ± 5.36 ^b
Agua Destilada	72.71 ± 11.44 ^a

Los datos se presentan como el valor promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las interacciones de sanitizante (P <0.05).

7.1.4 Germinación de *Penicillium italicum*.

La germinación es una de las pruebas de mayor importancia para este estudio, la espora es la fase inicial de los hongos y da paso al desarrollo de filamentos llamados hifas que proliferan y dan lugar al micelio del hongo; por ello si la espora resulta dañada el hongo no lograra su desarrollo y reproducción.

En el Cuadro 7.5 se muestra el porcentaje de germinación de esporas por los tratamientos nebulizados y sus interacciones entre el tipo de agente GRAS, concentración y tiempo de exposición. Los tratamientos de bicarbonato de sodio (figura 7.11) en la concentración al 1% tuvieron un porcentaje de germinación en un rango de 0 - 15.3%, siendo el tratamiento de 15 minutos de exposición el que mostró un mejor efecto. Para la concentración de bicarbonato de sodio al 2% se tuvo un rango de 9 – 13.6%, nuevamente el mejor tratamiento fue el de 15 minutos y los de 3% de bicarbonato de sodio mostraron un rango de 0.4 – 6.4% donde el tratamiento de 5 minutos mostró el mejor resultado. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de bicarbonato de sodio y los tiempos de exposición (p>0.05).

Los tratamientos de ác. acético tuvieron los menores porcentajes de germinación, donde los tratamientos al 0.5% mostraron un rango de 0 – 3.8% de porcentaje de germinación, siendo el de 15 minutos el mejor tratamiento. Los tratamientos

restantes de ác. acético al 1 y 1.5% mostraron una inhibición completa en la germinación de *P. Italicum* durante las 12 horas de evaluación. Esto explicaría que el tratamiento de ác. acético a concentraciones de 1 y 1.5% logra un efecto fungistático por lo que se sugiere hacer un tratamiento repetido para mejorar su efectividad como anteriormente se había discutido. No se muestran diferencias significativas entre los tiempos de exposición ($p < 0.05$) o entre los tratamientos de ác. acético y bicarbonato de sodio (figura 7.12).

El control positivo con agua destilada a los diferentes tiempos de exposición (figura 7.4) mostraron un rango que va desde 4 – 52.4% de porcentaje de germinación, siendo el tratamiento de 15 minutos el que mostró la mayor inhibición con un porcentaje de 4% de germinación del total de esporas. En el control de agua se encuentra una diferencia significativa con respecto al ác. acético y bicarbonato de sodio ($p < 0.05$), en su composición, tiempo de exposición y la combinación que existe entre el tiempo de exposición*agente utilizado ($p < 0.05$).

Cuadro 7.5. Tratamientos de ácido acético, bicarbonato de sodio y agua (control positivo) sobre la germinación de *Penicillium italicum*.

Tratamientos	% Germinación	%Inhibición
Control	100 ± 0 ^a	0 ± 0
BS 1% 5 minutos	8.7 ± 6.17 ^{bcd}	91.3 ± 5.92%
BS 1% 10 minutos	5.9 ± 4.20 ^{bcd}	94.7 ± 3.99%
BS 1% 15 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0 %
BS 2% 5 minutos	10.3 ± 3.95 ^{bd}	89.7 ± 3.74%
BS 2% 10 minutos	9.3 ± 3.98 ^{bcd}	92.9 ± 3.74%
BS 2% 15 minutos	9 ± 4.31 ^{bcd}	91 ± 4.12%
BS 3% 5 minutos	0.4 ± 0.92 ^b	99.6 ± 0.88%
BS 3% 10 minutos	3.1 ± 4.09 ^{bc}	96.9 ± 3.90%
BS 3% 15 minutos	5.2 ± 7.09 ^{bcd}	93.6 ± 6.94%
AA 0.5% 5 minutos	3.8 ± 7.19 ^b	96.2 ± 3.92%
AA 0.5% 10 minutos	1.4 ± 3.88 ^b	98.6 ± 3.71%
AA 0.5% 15 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
AA 1% 5 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
AA 1% 10 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
AA 1% 15 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
AA 1.5% 5 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
AA 1.5% 10 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
AA 1.5% 15 minutos	0 ± 0 ^b	100 ± 0%
Agua 5 minutos	23.8 ± 8.33 ^e	47.6 ± 8.37%
Agua 10 minutos	49.7 ± 8.58 ^f	44.2 ± 8.05%
Agua 15 minutos	4 ± 4.20 ^{bcd}	96 ± 4.13%

Los datos se presentan como el valor promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre agente GRAS, concentración y tiempo (P <0.05).

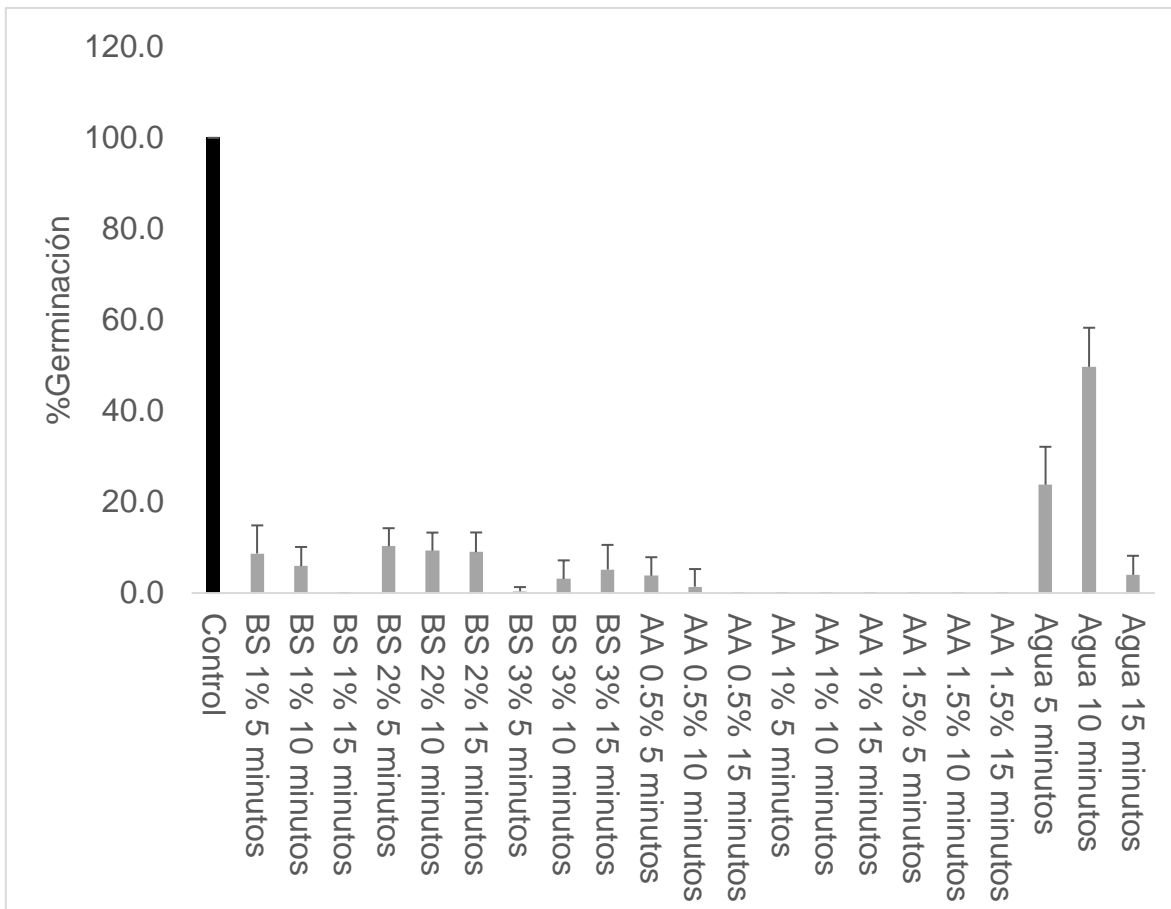


Figura 7.4 Tratamientos de nebulización ultrasónica de bicarbonato de sodio, ácido acético y agua destilada (control positivo) sobre la germinación de *Penicillium italicum*.

La aplicación de bicarbonato de sodio (70 mM) ha demostrado ser efectiva para alcanzar la máxima inhibición de germinación de esporas de *Penicillium digitatum*, este efecto se atribuye principalmente al cambio de pH que provoca el ion carbonato y sodio en el ambiente de la espora (Smilanick y cols., 2005).

Reducciones en la germinación de esporas de 95% también se han reportado para *Penicillium digitatum* usando soluciones de bicarbonato sodio (1.25%). Fallanaj y cols., (2016) reportaron que existe una acumulación de especies reactivas de oxígeno en 55% más que en el control sin tratamiento, y mencionan que el bicarbonato de sodio induce la presencia de aniones superóxidos (O_2^-) y peróxido

de hidrógeno que ocasionan la muerte en el patógeno debido a los cambios estructurales que generan.

Los datos de ác. acético concuerdan con lo investigado por Smilanick y cols., (2014), quienes reportan que el uso de neblina para desinfección de cuartos de almacenamiento con ácido acético, peracético y peróxido de hidrógeno logra una inhibición en la germinación de esporas de *Penicillium digitatum* en su totalidad después de aplicar durante 10 minutos. El efecto de la nebulización en las esporas y su germinación se atribuye a la generación de radicales de hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), ion hidronio (H^+), radicales hidroperóxidos ($\bullet\text{OOH}$) y átomos de oxígeno (O) que se forman en la burbuja durante la cavitación (Pang, Abdullah y cols., 2001).

7.2 Simulación de dinámica de fluidos por computadora del sistema de nebulización a nivel “*in vitro*”.

En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos con la herramienta de CFD, se obtuvo la fluidodinámica de la neblina dentro del sistema de nebulización ultrasónica, con estos resultados se logró determinar los tiempos de saturación del sistema y los lugares donde existe la mayor concentración de neblina y, por lo tanto, tener una mejor distribución de las muestras o frutos que se deseen colocar dentro del sistema.

7.2.1 Campos de vectores de velocidad.

En la figura 7.5 se muestra el campo de vectores de velocidad en el plano Z central a diferentes tiempos de simulación. En la figura 7.5 (a) se observa que en el tiempo de 30 segundos la neblina se genera en la columna del nebulizador donde se concentran velocidades de 0.03 m/s, esto debido a la colisión entre el flujo de neblina y de aire. Además, se genera una recirculación en la parte superior de la columna debido al choque de la neblina con las paredes (ver 1), la neblina al mismo tiempo entra en el sistema central y cae sobre los módulos con los discos de hongo a velocidades de 0.015 – 0.03 m/s (ver 2), luego el aire es desplazado por la neblina hacia la derecha y se mueve junto con la neblina que se desplaza por la parte inferior del sistema a velocidades de 0.015 – 0.02 m/s (ver 3).

Existe una gran recirculación ocasionada por el impacto de la neblina con la pared derecha, provocando un cambio en el sentido de los vectores y dirección en la parte superior y posteriormente hacia la columna del nebulizador (4) con velocidades de 0.015 m/s mayormente.

Conforme avanza la neblina se generan cambios en su comportamiento dentro del sistema, a los 120 segundos, como se muestra en Figura 7.5 b), se observa un cambio de sentido y dirección de los vectores en la parte media del sistema central conforme avanza el tiempo, los vectores dentro de la columna del nebulizador mantienen un comportamiento constante. En la parte central superior del sistema se observa un avance de la neblina justo en la zona donde se encuentran los módulos (ver 1) a velocidades de 0.005 – 0.03 m/s, esto podría deberse a la salida de neblina y su choque con los módulos. Por otro lado, en el otro extremo del sistema se observan velocidades mínimas y un cambio de sentido y dirección de los vectores en la parte inferior de la pared derecha (ver 2) ocasionando que en la parte inferior del sistema los vectores tengan un sentido hacia la pared del nebulizador y la neblina tenga un avance mínimo (ver 3), en la parte superior del sistema se muestra una recirculación, pero con el mismo comportamiento descrito anteriormente (ver 4); además la columna derecha muestra vectores con velocidades entre 0.005 – 0.03 m/s que describen el movimiento de la neblina en dicha área en donde anteriormente no se encontraba (ver 5).

Durante el tiempo de 360 segundos en la figura 7.5 (c) los vectores provenientes de la salida de la columna del nebulizador han aumentado su velocidad y su avance es a través de la parte central y superior del sistema a velocidades mayormente de 0.03 m/s (ver 1) hasta impactarse a la pared derecha, esto ocasiona un cambio en el sentido de los vectores (ver 2) que hace que se dirijan hacia la parte inferior del sistema en la velocidad mínima (ver 3 y 4). Se observa que la neblina en la parte inferior está con la menor velocidad, esto indicaría que la neblina se encuentra en una zona de estancamiento en donde no existe movimiento, los módulos con las muestras se encuentran en esta zona por lo que se afirma que tienen un contacto directo con la neblina. La columna derecha muestra vectores que indican un nulo

movimiento de la neblina (ver 5) por lo que se podría pensar en una acumulación de ella dentro de la parte inferior de la columna mencionada.

En el tiempo de 600 segundos como muestra la figura 7.5 (d), el sentido y dirección de los vectores en el sistema cambiaron nuevamente, el flujo de neblina que sale de la columna del nebulizador se mueve en sentido hacia la derecha por la parte superior del sistema con velocidades de 0.015 – 0.03 m/s (1), al estar en contacto con la pared derecha se genera una recirculación hacia la parte inferior del sistema (2) donde las velocidades disminuyen la velocidad (0.005 – 0.015 m/s). La zona de estancamiento ahora se concentra en la parte inferior derecha (3), debido a la recirculación generada anteriormente esta zona comienza a tener desplazamiento mínimo (0.005 m/s) (4) con sentido hacia la columna del nebulizador; este flujo al estar en contacto con el flujo de salida de la columna ocasionará una recirculación (5) que será la causante de dirigir el flujo de salida hacia la parte superior del sistema (1).

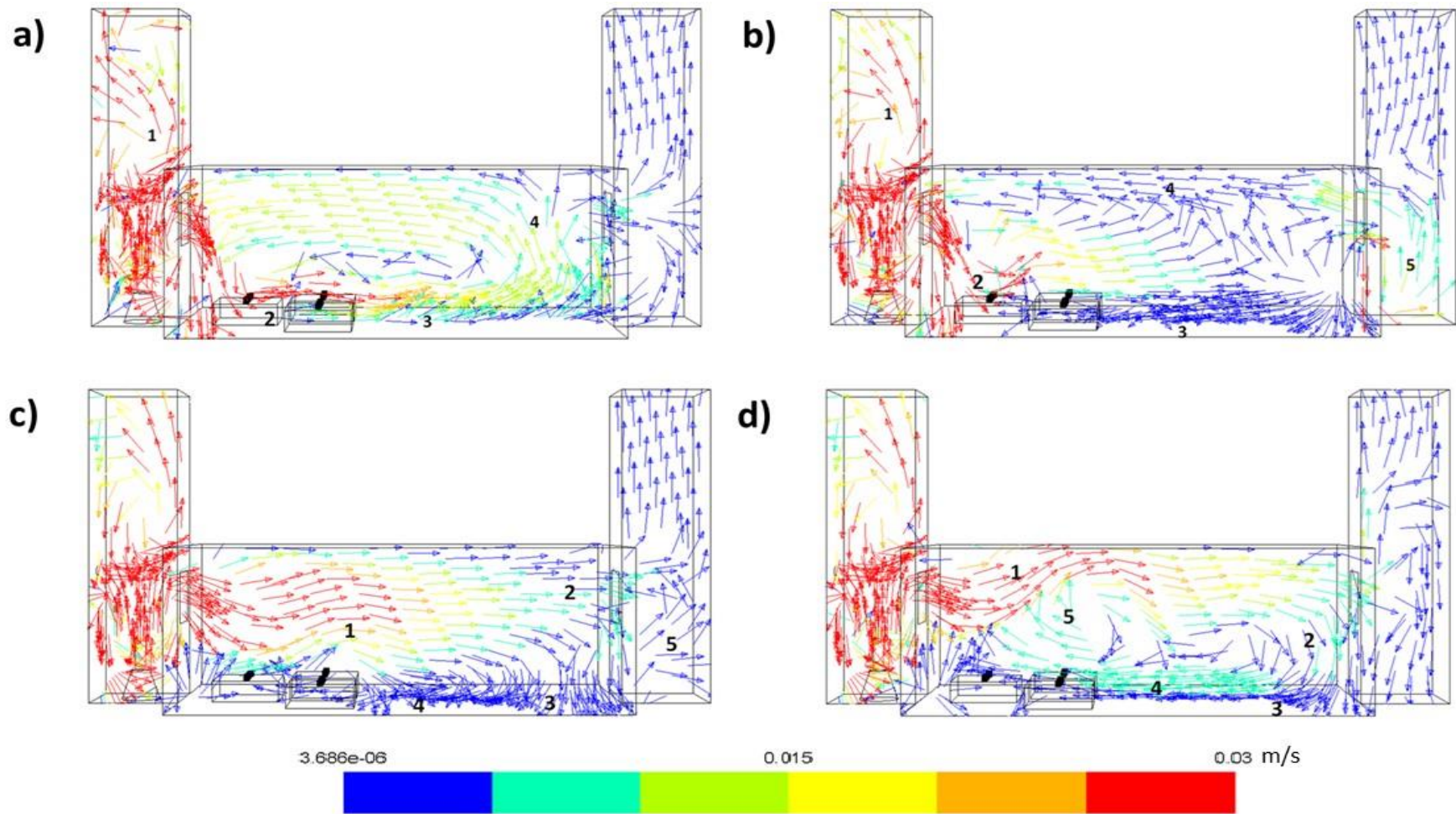


Figura 7.5 Vectores de velocidad en el plano Z central en los tiempos 30 segundos (a), 120 segundos (b), 360 segundos (c) y 600 segundos (d) en el sistema de nebulización ultrasónica

En la figura 7.6 se muestran el campo de vectores de velocidad del flujo de neblina en el plano Y a una altura de 2.5 cm de la base del sistema de nebulización en los tiempos de 30, 120, 360 y 600 segundos, respectivamente. En la figura 7.6 (a) se observa la entrada de la neblina al sistema (ver 1) con velocidades de 0.06 m/s y su distribución hacia los laterales con la misma velocidad (ver 2 y 3), el flujo de neblina avanza con mayor velocidad por los laterales mientras que por la parte media del sistema las velocidades son de 0.02 – 0.03 m/s con un sentido hacia la pared derecha (ver 4). Se observa una zona de baja velocidad en la pared derecha (ver 5 y 6) en donde los vectores han cambiado su sentido hacia el contrario, esto se debe al impacto de la neblina con la pared y su acumulación.

El sentido de los vectores se mantiene constante en el tiempo de 120 segundos como muestra la figura 7.6 (b) y el flujo continua desplazandose por los laterales (ver 1 y 2) a velocidades de 0.006 – 0.01 m/s, sin embargo, la dirección de los vectores alrededor de los módulos muestra el desplazamiento del flujo alrededor de los módulos (ver 3) y el flujo se mantiene estable en el resto del sistema (4) hasta llegar a la pared derecha donde impacta la neblina y se genera una zona de estancamiento (ver 5 y 6).

Se han formado grandes recirculaciones en el plano Y 2.5 en el tiempo de 360 segundos como muestra la figura 7.6 c), un flujo de neblina impulsado por el aire entrante se desplaza hacia la derecha (ver 1) al momento del impacto en la pared la neblina tiende a acumularse y posteriormente comienza a disiparse hacia los costados en sentido contrario (ver 2 y 3) al que se había observado en las imágenes anteriores. Las dos nuevas recirculaciones generadas se desplazan por los laterales y alcanzan velocidades de 0.01 m/s (ver 5 y 6) debido a que tienen interacción con el flujo de neblina entrante al sistema y se genera una nueva recirculación que se acumula sobre y entre los módulos (ver 6) con velocidades mínimas.

Los vectores de velocidad cambiaron su sentido en el playo Y 2.5 en el tiempo de 600 segundos como se muestra en la figura 7.6 d), estos están en sentido contrario en comparación a los mostrados en la figura 7.5. Debido a la recirculación mostrada anteriormente en la pared derecha los vectores se dirigen hacia la columna del nebulizador (ver 1 y 2) desplazándose por los laterales en velocidades de 0.01 m/s (ver 3 y 4) hasta que impacta con la pared izquierda y se generan nuevamente una recirculación sobre los módulos (ver 5 y 6). Se observa que sobre los módulos el flujo tiene baja velocidad y zonas de estancamiento debido a que el sistema ya está completamente lleno y el movimiento se concentra en la parte superior como se observa en la imagen 7.6.

Durante los primeros 30 segundos el sistema de nebulización ultrasónica comienza su saturación y las microgotas generadas tiene un contacto directo con las muestras de hongos de *P. italicum*, sin embargo, conforme avanza el tiempo en la parte inferior del sistema comienza a saturarse de neblina que tiene un nulo movimiento y esto provoca una aglomeración de microgotas y formación de gotas de mayor tamaño hasta formar una capa de agua que aumenta su volumen conforme avanza el tiempo, en el inciso (c) y (d) de la figura 7.6 se muestra que los vectores de velocidad del flujo de neblina tiene un movimiento nulo en la parte que rodea los módulos con los hongos, se especula que la concentración de iones de AA y BS no logran penetrar la capa de agua formada alrededor de los hongos y por ellos los tratamientos de 15 minutos en las prueba de %IMC mostraron en algunos casos menores reducciones que los tratamientos de 5 minutos. Se muestra que alrededor de los hongos existe movimiento del flujo, sin embargo, después de 360 segundos se forma una zona de velocidad nula (figura 7.6 inciso c y d) lo que estaría generando una condensación de gotas y formación de capas de agua que reducen la concentración de AA y BS.

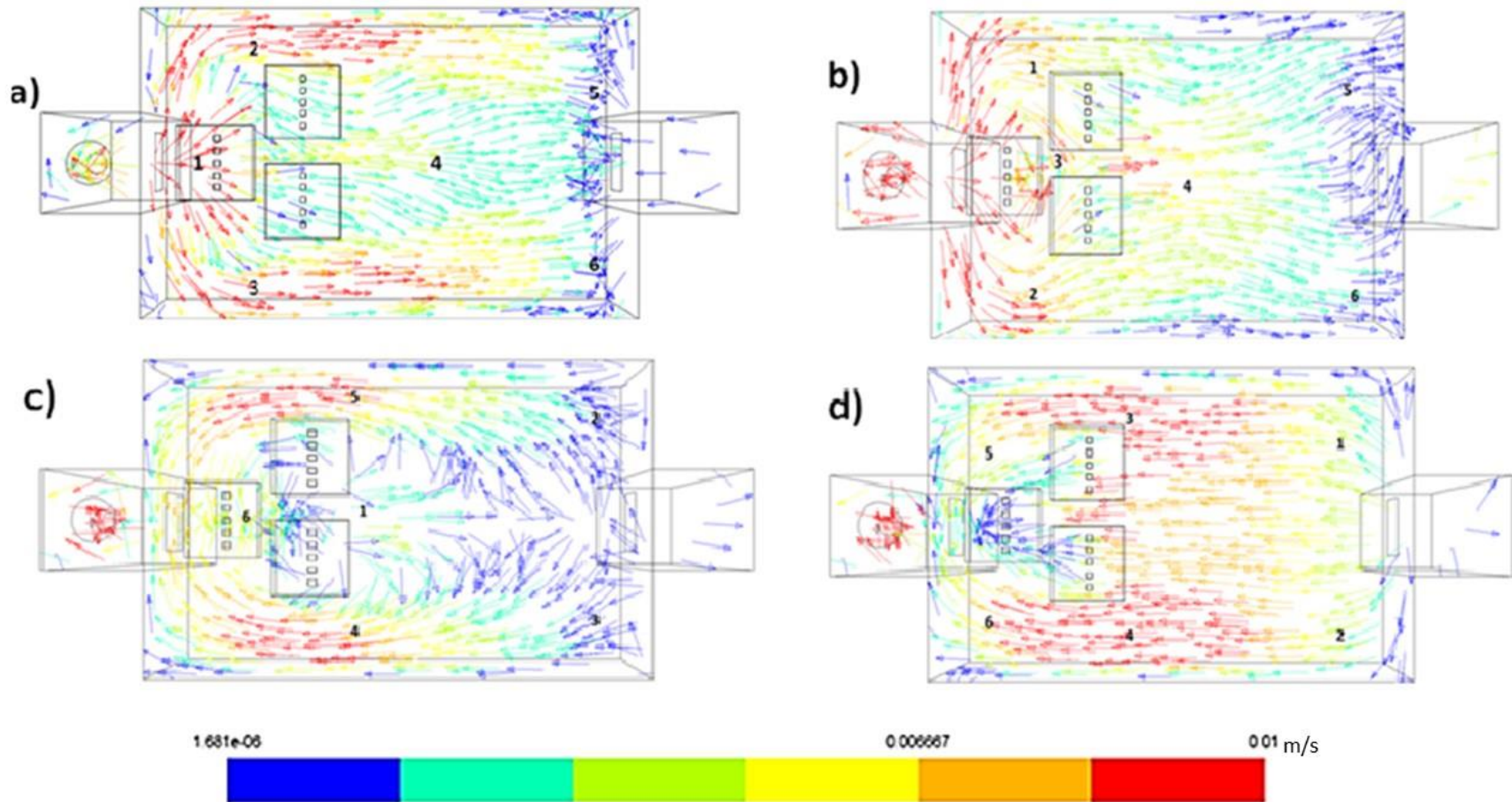


Figura 7.6 Vectores de velocidad en el plano Y a una altura de 2.5cm de la parte inferior del sistema en los tiempos 30 segundos (a), 120 segundos (b), 360 segundos (c) y 600 segundos (d) en el sistema de nebulización ultrasónica

7.2.2 Contornos de fase

En la figura 7.7 se muestra el plano Z central en los tiempos de 30, 120 y 360 segundos con los diferentes contornos de fase, como fase primaria se utilizó la neblina (rojo) y como secundaria el aire (azul). La figura 7.7 (a) muestra la separación de las fases, la columna del nebulizador se encuentra de color rojo lo que indica una saturación de neblina, con el impulso que obtiene por el flujo de aire se observa el avance a lo largo del sistema central, los módulos quedan completamente cubiertos y la neblina toca la pared derecha (1) lo que provoca una ligera recirculación de la neblina.

El sistema se muestra completamente lleno de neblina en el tiempo de 120 segundos donde se concentra en la columna izquierda como se muestra en la figura 7.7 (b), a partir de este tiempo ya no se observará cambios significativos debido a que el nivel de la neblina seguirá en aumento hasta tocar la parte superior del sistema central.

Como se mencionó anteriormente, los contornos de fases están casi en el límite de la parte superior en el tiempo de 360 segundos como se muestra en la figura 7.7 (c), los módulos con las muestras se encuentran completamente cubiertas por la neblina al igual que la parte media del sistema. La columna derecha comenzó a llenarse debido al flujo que existe por el movimiento de la neblina en todo el sistema, sin embargo, en las figuras 7.5 se indica que los vectores de velocidad se mueven por la parte superior del sistema debido al flujo que existe de aire como se muestran en los contornos.

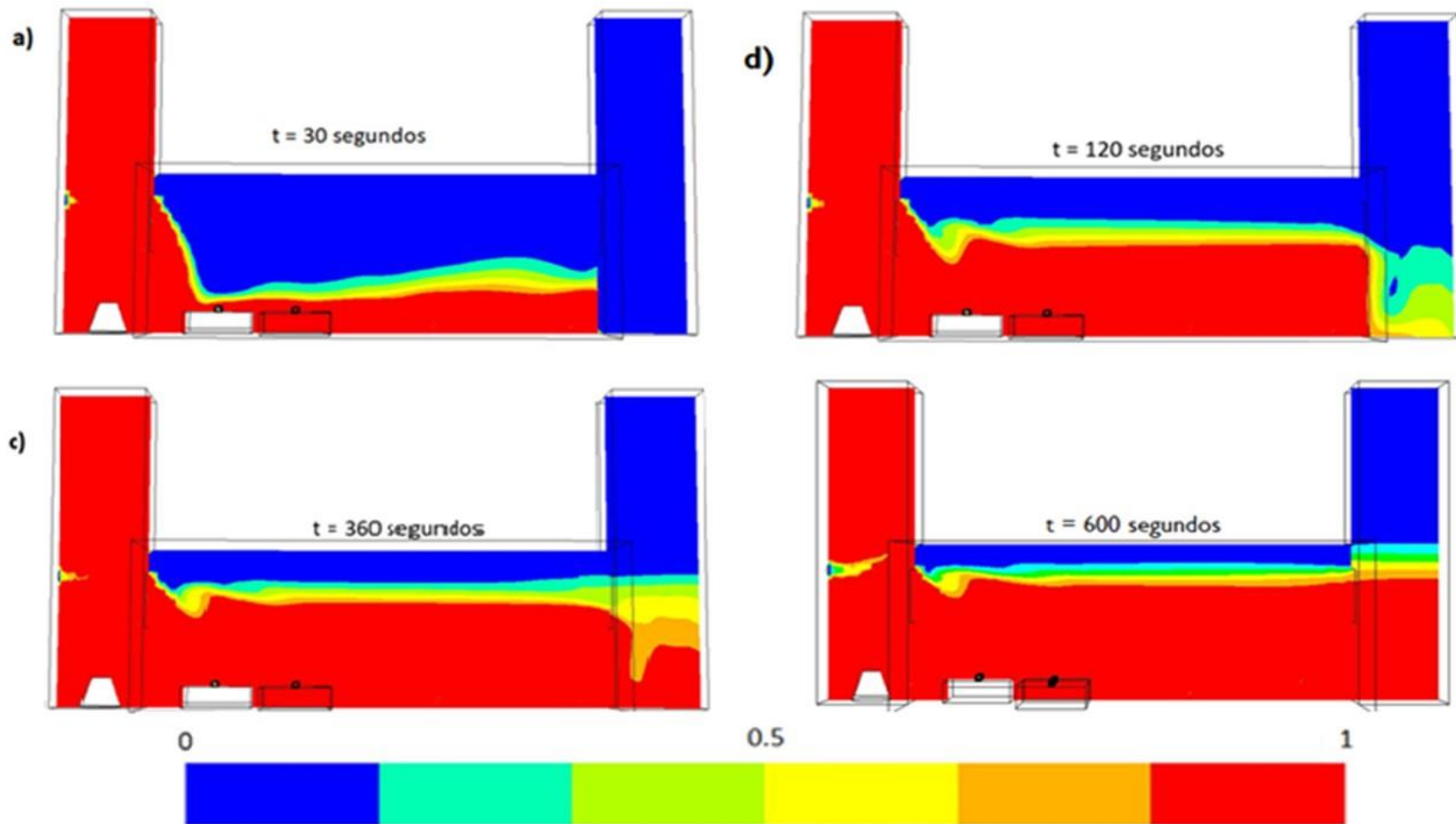


Figura 7.7 Contornos de fases de la neblina en el plano Y a 2.5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 30 (a), 120 (b), 360 (c) y 600 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica

7.2.3 Inyección de partículas

Se realizó una simulación para predecir el flujo de la neblina y los perfiles de flujo de partículas mediante un modelo de fase discreta, el tiempo de estancia y los diferentes diámetros que se generan dentro del sistema de nebulización ultrasónica *in vitro*. La trayectoria de las partículas y sus distintas velocidades se muestran en la figura 7.8, el rango de velocidades es de $3.6e-06 - 0.03$ m/s; una gran parte de la neblina circulante se coloca sobre los módulos y sus alrededores con velocidades mínimas, mientras que en la parte superior se concentran la mayor parte de ellas con velocidades de 0.03 hasta llegar a la pared derecha y generar una recirculación hacia la parte de los módulos.

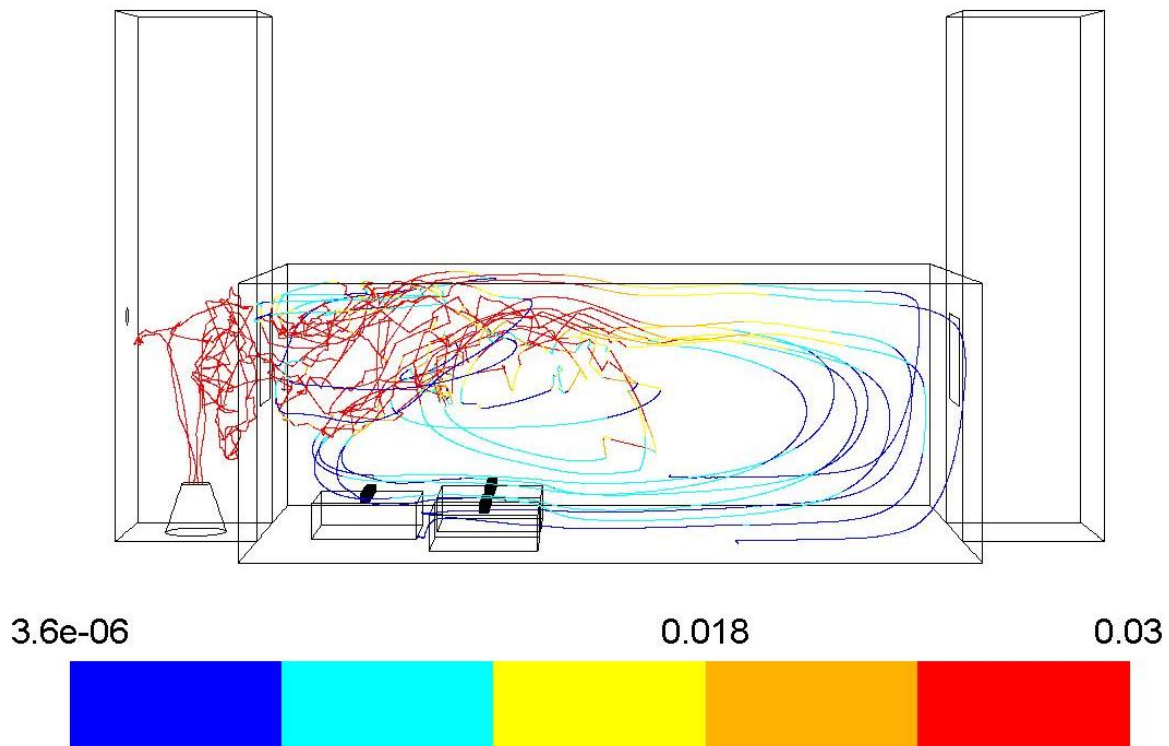


Figura 7.8 Trayectorias de partículas y sus velocidades en m/s.

La figura 7.9 muestra la trayectoria de las partículas nuevamente y su coloración representa el diámetro de las partículas inyectadas. La mayor cantidad de partículas están en un rango de tamaño de 2 – 3µm, concentrándose en la parte superior de los módulos y la parte inferior del sistema. Las partículas son afectadas por el choque en las paredes del sistema, debido a que es un sistema pequeño se provoca una recirculación constante en todo el tiempo de nebulización, una gran porción de partículas se encuentra en la parte donde no se colocaron los módulos y en la parte superior, esto representa una pérdida de área efectiva de contacto, sin embargo con base en las pruebas preliminares *in vitro* realizadas se determinó que se obtiene una mayor efectividad cuando los módulos con las muestras de hongos están lo más cercano a la salida del flujo de neblina, por lo que para la etapa *in vivo* se consideró aprovechar el espacio con los frutos de limón.

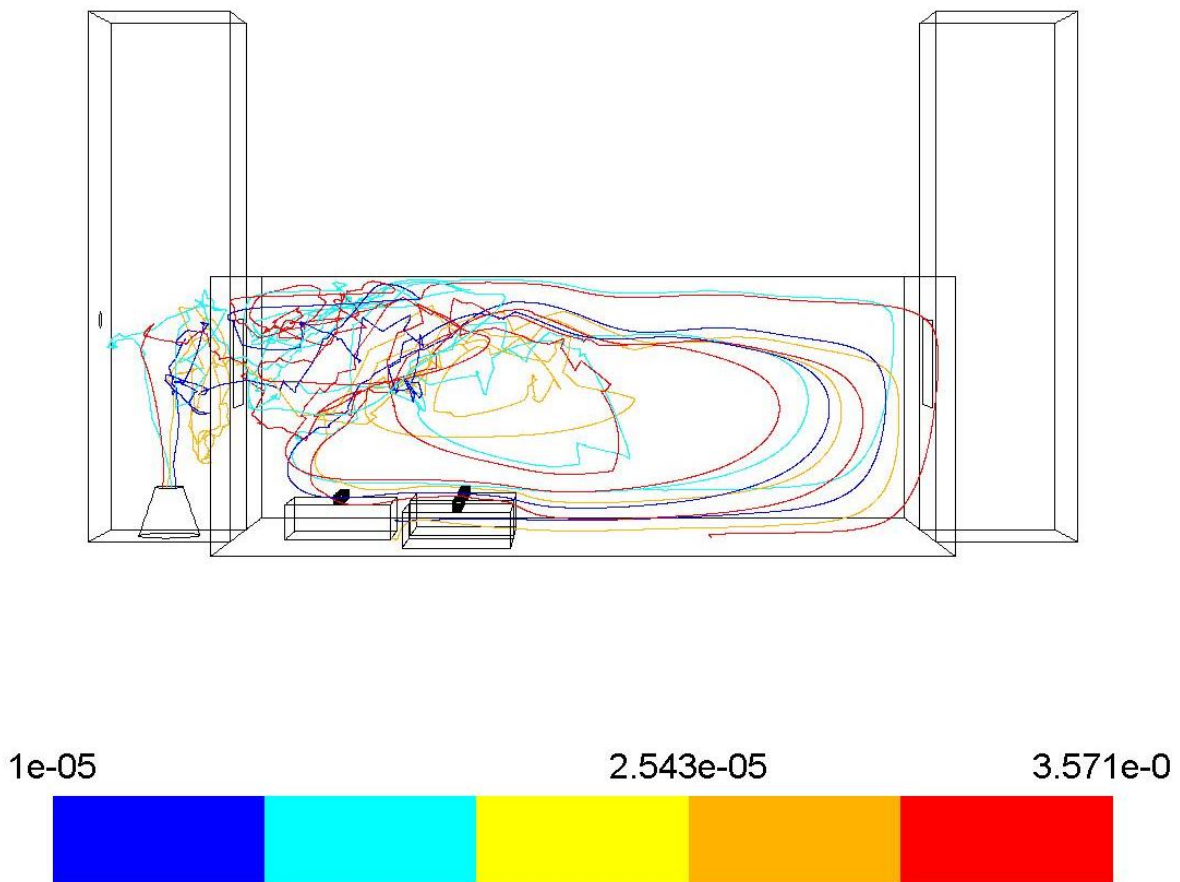


Figura 7.9 Trayectorias de partículas y sus diámetros en micras.

Delele y cols. (2012) realizaron un análisis de un modelo de CFD para un termonebulizador, utilizaron igualmente un modelo de fase discreta para investigar la dirección y penetración de las partículas en un almacén con cajas de madera conteniendo esferas que representaban frutas. Los diámetros de las partículas de este estudio y del reportado por Delele y cols (2012) son similares; estos autores reportan que los flujos de partículas se ven afectados por la velocidad del aire impulsor, por la gravedad que influye poco sobre las partículas de menor diámetro ($<5\mu\text{m}$) y porque las fuerzas de flotación tienen una gran presencia en las paredes debido al cizallamiento del flujo.

Los movimientos flotantes de las partículas también actúan sobre la dispersión de la niebla y su flotabilidad en el sistema, sin embargo debido a la presencia del flujo de aire y su circulación la neblina tiende a dispersarse hacia la parte inferior del sistema, la flotabilidad de la neblina comienza una vez que la parte inferior esta completamente llena y el flujo del aire que se introduce eleva la neblina hasta llenar el sistema de nebulización; este fenómeno está en función de la posición del flujo aire, velocidad y la posición del nebulizador.

7.2.5 Comparación de simulación *in vitro* con modelo real.

Para validar la simulación se compararon con las imágenes en tiempo real del sistema de nebulización. La figura 7.10 representa el comportamiento de la neblina cuando comienza el flujo de neblina a un tiempo de 30 segundos, la simulación muestra la caída del flujo de la neblina similar al sistema real justo en la zona de los módulos (ver 1 y 2), posteriormente el flujo avanza por la parte inferior y hasta llegar a la pared derecha donde impacta y se genera una pequeña onda de neblina (ver 3 y 4).

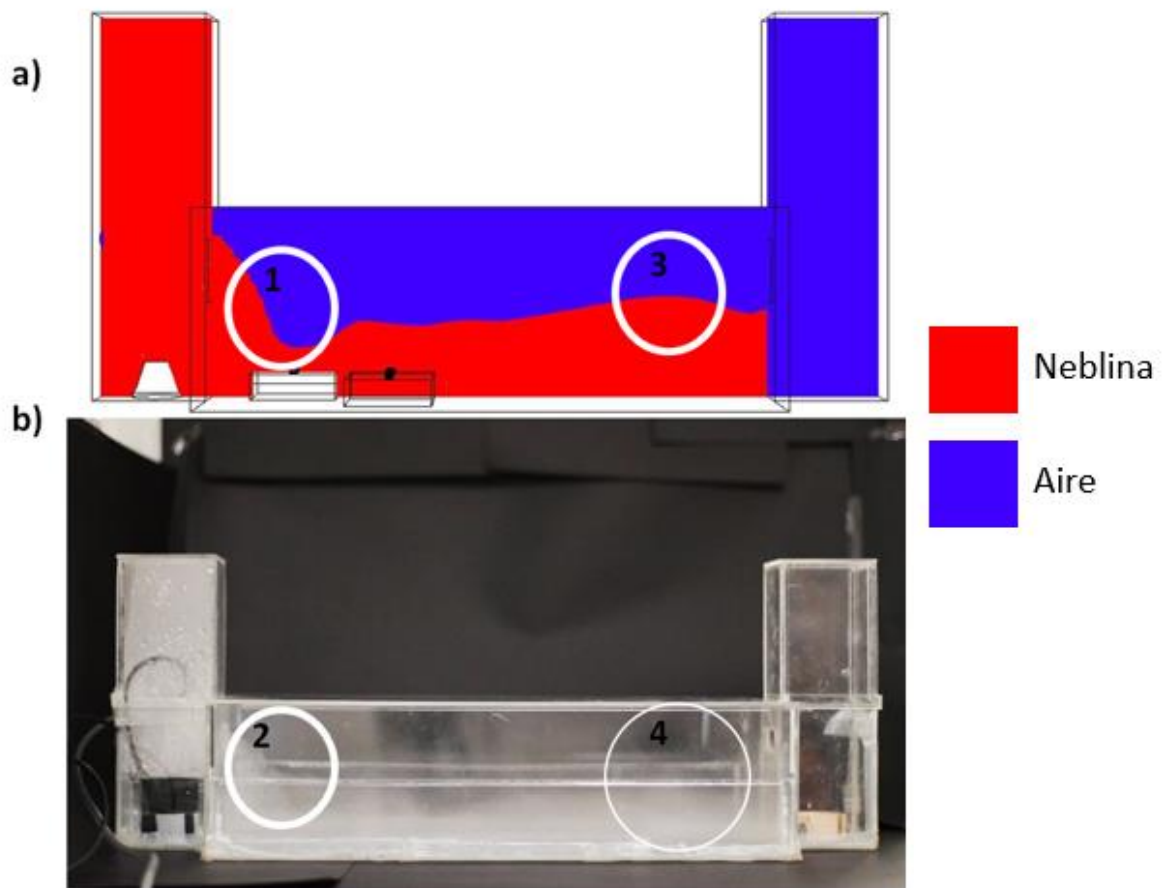


Figura 7.10 Comparación de simulación por CFD a) y sistema real de nebulización ultrasónica b) en el tiempo 30 segundos.

En el tiempo de 120 segundos (figura 7.11), como se indicó en los contornos de fases, el sistema está completamente lleno, se observa el flujo de aire en la parte superior del sistema (ver 1 y 2) por donde circula el aire y da movimiento a la neblina, en la columna derecha se observa que la neblina ha comenzado a llenar esa parte del sistema (ver 3 y 4) en donde existe muy poca circulación de aire. En la figura 7.30 se muestra la comparación en el tiempo de 360 segundos, se observa que el sistema central mantiene constante el nivel de neblina con la corriente de aire en la parte superior, el único cambio visible es en la columna izquierda donde la parte inferior se ha comenzado a llenar de neblina por la caída que existe, pero con nulo movimiento (ver 1 y 2).

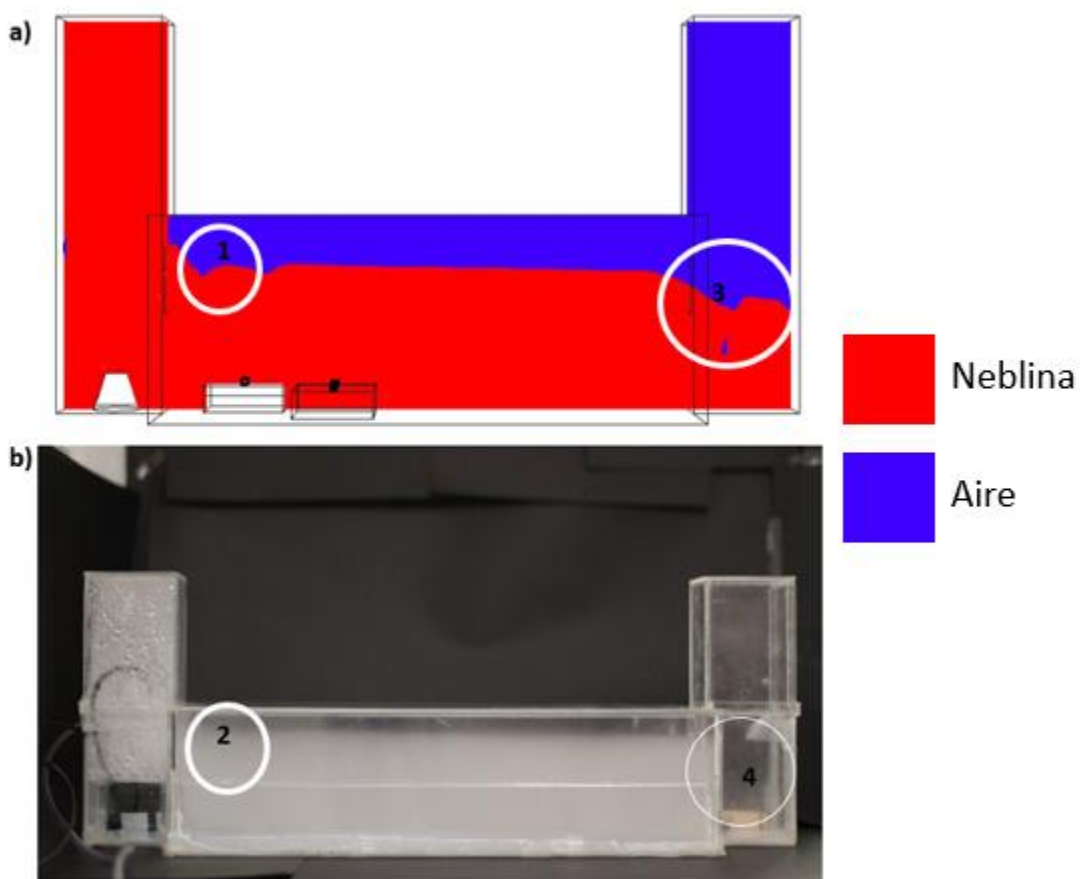


Figura 7.11 Comparación de simulación a) y modelo real de sistema de nebulización ultrasónica b) en el tiempo de 120 segundos.

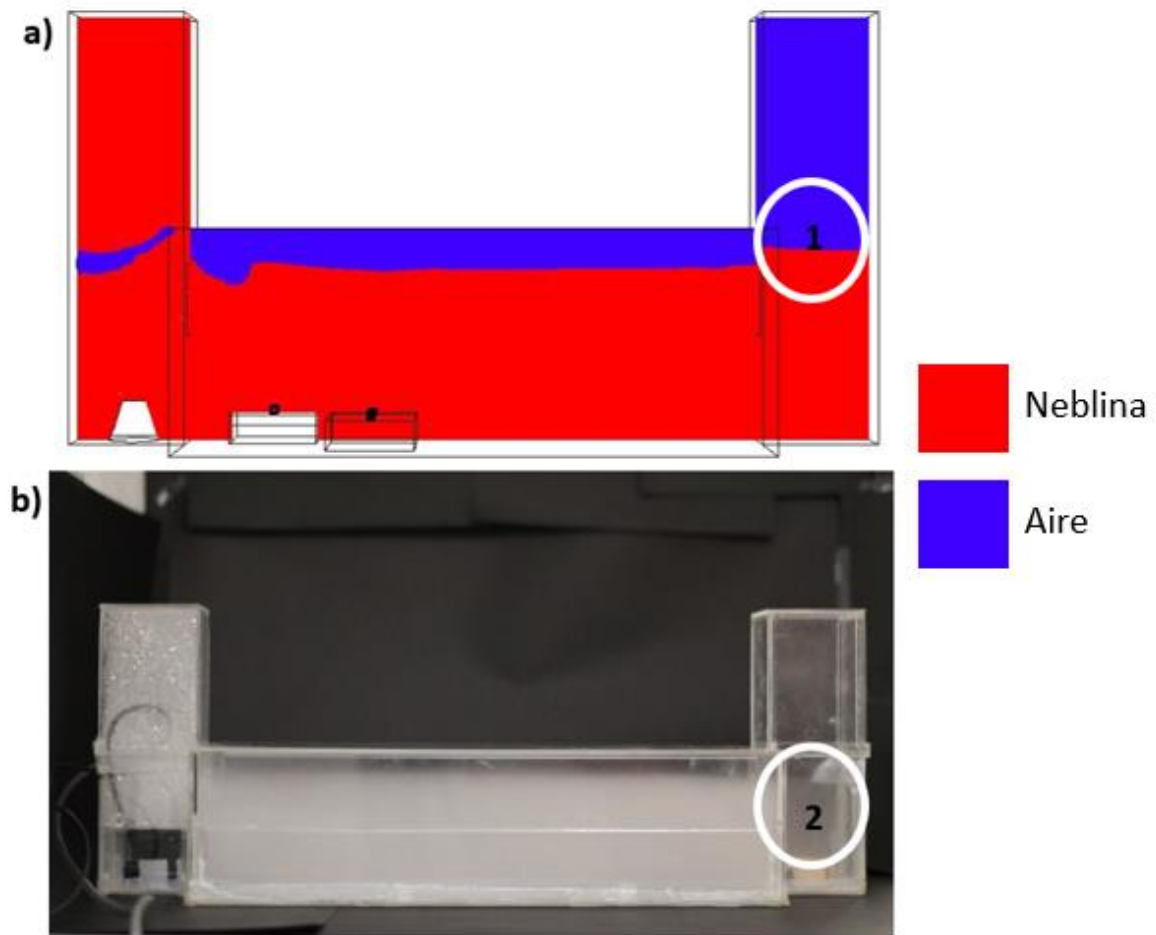


Figura 7.12 Comparación de simulación (a) y modelo real de sistema de nebulización (b) durante el tiempo de 360 segundos

7.3 Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre *P.italicum* “*in vitro*” y calidad en el limón persa.

7.3.1 Porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad.

Para la etapa *in vivo* de este estudio, con base a los resultados *in vitro*, se seleccionaron las concentraciones de ácido acético al 1% (AA 1%) y 1.5% (AA 1.5%) en un tiempo de 10 minutos para evaluar el porcentaje de incidencia y severidad de la pudrición azul en frutos de limón persa comparando con un control negativo (CN) y un control positivo de agua destilada (CP) de manera curativa (C) y preventiva (P). En las figuras 13 y 14 se muestran los resultados de la incidencia y severidad, respectivamente, a 25°C. Ambos tratamientos de ác. acético tuvieron un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la incidencia y severidad de la enfermedad por *Penicillium italicum* en frutos de limón persa inoculados artificialmente de manera curativa y preventiva.

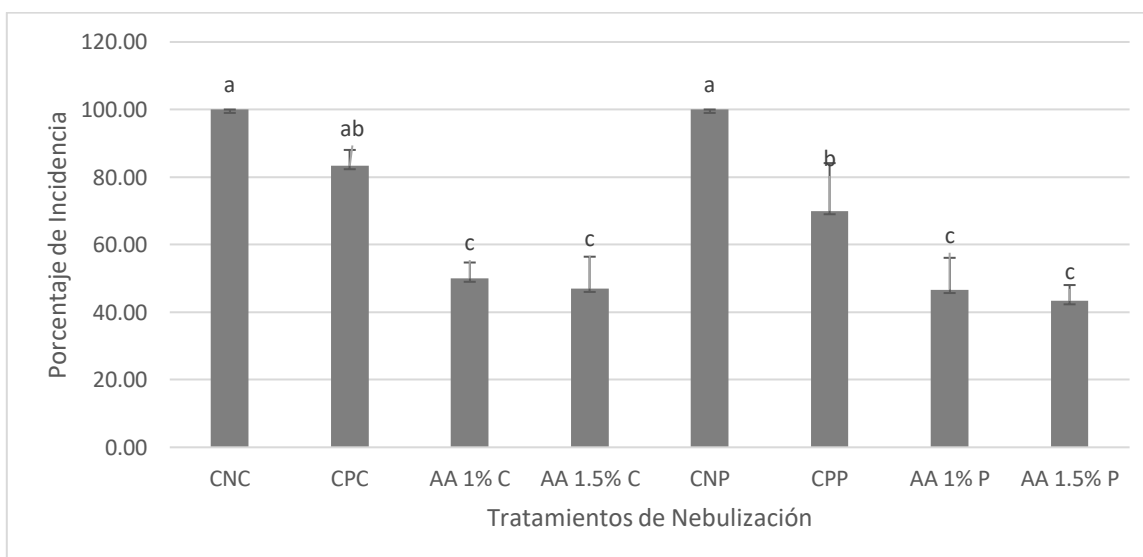


Figura 7.13 Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la incidencia de la enfermedad de *Penicillium italicum* en frutos de limón persa a 25 °C durante 13 días (CNC: control negativo curativo; CPC: control positivo curativo; AA 1% C: ácido acético 1% curativo; AA 1.5% C: ácido acético 1.5% curativo; CNP: control negativo preventivo; CPP: control positivo preventivo; AA 1% P: ácido acético 1% preventivo; AA 1.5% P: ácido acético 1.5% preventivo).

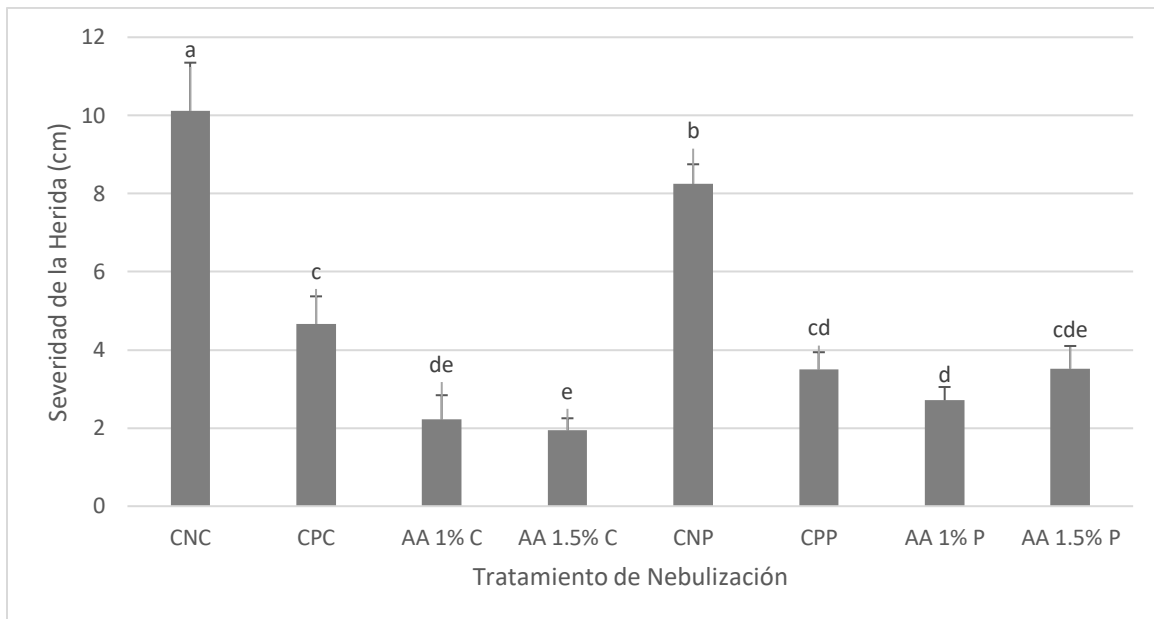


Figura 7.14 Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la severidad de la herida de la enfermedad de *Penicillium italicum* en frutos de limón persa a 25 °C durante 13 días.

Los tratamientos de ácido acético mostraron una reducción y diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al control negativo en ambas formas de aplicación (curativo y preventivo). El tratamiento de AA a 1.5% mostró los mejores resultados en la incidencia y severidad de la enfermedad de manera curativa; sin embargo, de manera preventiva el tratamiento de AA a 1.0% mostró los mejores resultados en la severidad. Por otro lado, el tratamiento de agua destilada (control positivo) en forma curativa y preventiva ocasionó reducciones en comparación con el control negativo, pero no se encontró una diferencia significativa en la incidencia ($P > 0.05$), sin embargo, en la prueba de severidad si mostraron una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Zhang y cols. (2018) evaluaron el ácido acético (10, 100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) sobre frutos de pera inoculados con *P. expansum*, encontraron que las concentraciones entre 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$ redujeron el diámetro de la herida y la incidencia en el fruto. Los autores atribuyen este efecto a que el ácido acético induce la producción de las enzimas glucanasa y quitinasa como mecanismo de defensa contra patógenos. Además se ha reportado que también induce la activación de la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa) 12 horas después de aplicar el tratamiento

de ácido acético sobre los frutos (Mei y cols., 2014; J. Zhang y cols., 2018). Otras enzimas estimuladas en los frutos por el ác. acético son la catalasa, peroxidasa y polifenol oxidasa que benefician el mecanismo de defensa (Yu y Zheng, 2007).

Karin Hassenberg y cols., (2018) evaluaron la aplicación de fumigación de vapores de ácido acético (9 mg/l) en cerezas dulces durante 30 minutos, reportando la reducción de 1.78 log CFU/cm² de bacterias mesofílicas aerobias totales y 3 log CFU/cm² de hongos y levaduras. Debido a que micro heridas pueden facilitar la adherencia y penetración de microorganismos, Karin Hassenberg y cols., (2018) indican que la aplicación de vapor debe realizarse en sistemas donde se logre que toda la superficie del fruto esté expuesta al vapor de ácido acético.

En otro estudio K. Hassenberg y cols., (2010) evaluaron la infección de *B. cinérea* sobre fresas durante 4 días de almacenamiento con tratamientos de vapor de ácido acético durante 30 minutos de exposición y no se observó crecimiento del patógeno en el fruto a una temperatura de 16°C. Por otro lado, a una temperatura de 22°C se mostró una incidencia del 56% con una concentración de 4 mg/l. Por lo que los autores concluyen que combinar esta técnica con niveles altos de humedad relativa y temperaturas bajas aumenta la efectividad del ácido acético, ya que disociado y no disociado puede penetrar la célula microbiana provocando un ambiente tóxico para su desarrollo.

Por otro lado, las figuras 7.15 y 7.16 muestran los resultados de incidencia y severidad, respectivamente, a una temperatura de 15°C de forma curativa y preventiva, respecto al control negativo los tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$). La incidencia de la enfermedad en frutos tratados con agua destilada (control positivo) en forma de nebulización mostraron resultados similares tanto de manera curativa como preventiva (43.33 ± 14.14). Los tratamientos de AA a 1.0 y 1.5% de manera curativa mostraron una incidencia similar en los frutos (20 ± 0); mientras que de manera preventiva se observó una menor incidencia con los frutos expuestos a AA 1.5% (26.67 ± 9.43), que los tratados con AA 1.0% (36.67 ± 9.43); este comportamiento se observó también en las pruebas a 25°C. Por lo que se sugiere que el efecto de la nebulización debido a la deposición de gotas es mayor

cuando el hongo se encuentra en el fruto, ya que tiene contacto directo con el agente; además, se ha reportado que los radicales libres formados por la nebulización tienen una vida útil de 30 segundos después de ser expulsados del nebulizador (Fan y cols., 2020).

La severidad de la enfermedad en los frutos expuestos a agua destilada (control positivo) y AA al 1.0 y 1.5% mostró una gran reducción en comparación del control negativo; sin embargo, se observó una menor severidad de manera curativa en los frutos expuestos a una concentración de 1.0% (0.89 ± 0.86) a diferencia de una manera preventiva a la misma concentración (1.57 ± 0.739). La concentración de 1.5% de manera curativa mostró severidades similares (1.52 ± 0.57) que los tratamientos de manera preventiva (1.26 ± 0.20); y no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos de AA tanto de manera curativa, como preventiva ($P > 0.05$).

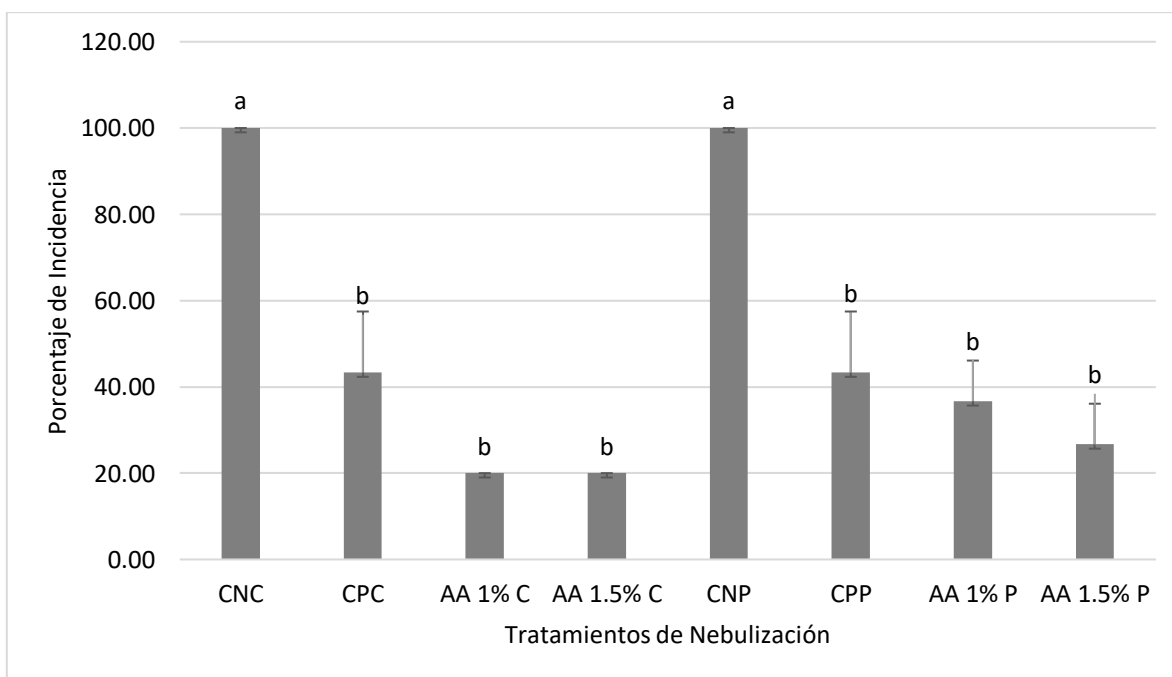


Figura 7.15 Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la incidencia de la enfermedad de *Penicillium italicum* en frutos de limón persa a 15 °C durante 13 días.

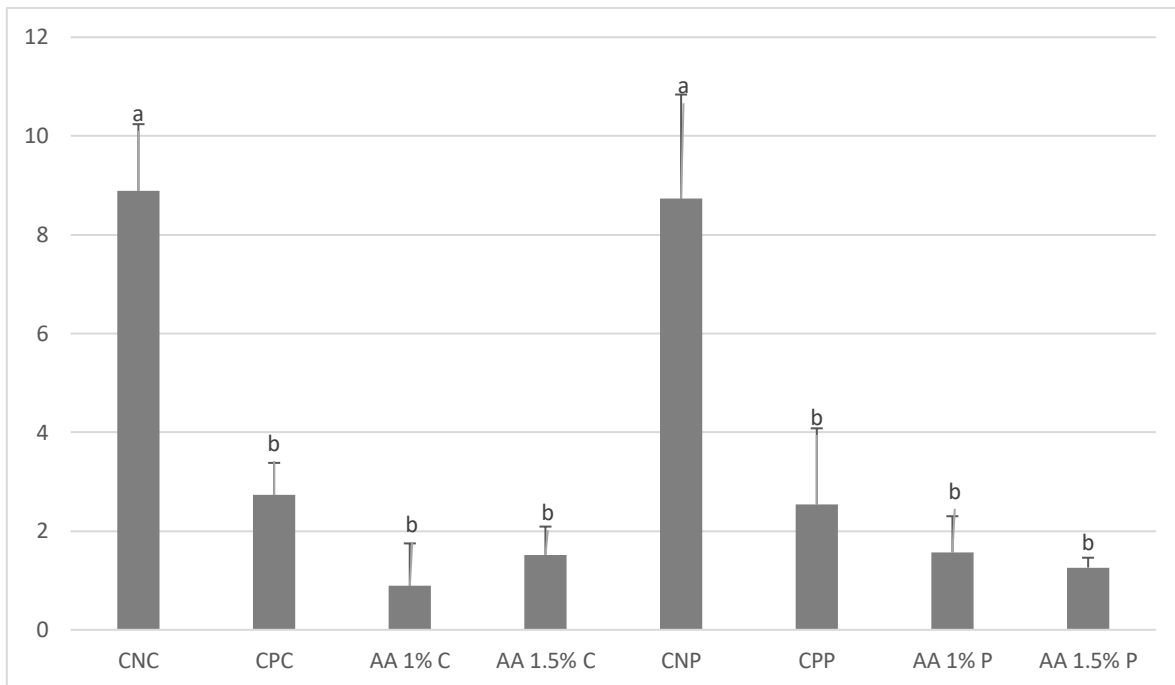


Figura 7.16 Efecto de la nebulización ultrasónica de ácido acético sobre la severidad de la herida de la enfermedad de *Penicillium italicum* en frutos de limón persa a 15 °C durante 13 días.

En las figuras 7.17, 7.18, 7.19 y 7.20 se observa el avance de la enfermedad a lo largo de los 13 días de almacenamiento en las pruebas de patogenicidad. Los controles negativos mostraron un crecimiento de la herida a diferencia de la mayoría de los tratamientos.





















Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13
Control Negativo					
Control Positivo					
AA 1.0%					
AA 1.5%					

Figura 7.17. Frutos de limón inoculados artificialmente con *Penicillium italicum* y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 25 °C, prueba curativa

















Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 6	Día 13
Control Negativo				
Control Positivo				
AA 1.0%				
AA 1.5%				

Figura 7.18. Frutos de limón inoculados artificialmente con *Penicillium italicum* y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 25 °C, prueba preventiva.





















Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13
Control Negativo					
Control Positivo					
AA 1.0%					
AA 1.5%					

Figura 7.19 Frutos de limón inoculados artificialmente con *Penicillium italicum* y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 15 °C evaluados de manera curativa.





















Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13
Control Negativo					
Control Positivo					
AA 1.0%					
AA 1.5%					

Figura 7.20 Frutos de limón inoculados artificialmente con *Penicillium italicum* y tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (control positivo) y ácido acético (AA 1.0% y AA 1.5%) a una temperatura de 15 °C evaluados de manera preventiva.

7.4 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre parámetros de calidad.

7.4.1 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre la acidez titulable.

La acidez titulable es un parámetro que mide el número total de hidrógeno de los ácidos, ya sea que se encuentren libres en la solución como iones H⁺ o sin disociar y manifiesta el grado de acidez del fruto (Segurondo y cols., 2013). Con base en la norma mexicana NMX-FF-077-1996 para limón persa, la acidez titulable no debe ser inferior al 7%. En la figura 7.21 se muestra la acidez titulable de los limones tratados con nebulización de ác. acético en almacenamiento por 20 días. Los frutos al día 0 y hasta el día 4 mostraron los menores valores de acidez; sin embargo, a partir de este día comenzó a aumentar y se mantuvieron dentro del rango establecido por la norma. Los frutos con el tratamiento de AA 1% en el día 14 mostraron el mayor porcentaje de ácido cítrico (9.15 ± 0.11). En limón se ha reportado un rango entre 5 – 8% de acidez, donde el limón persa mexicano tiene un porcentaje alto (8.25%) en comparación de otros cítricos (Magalhães Machado y cols., 2017; Mumtaz Khan y cols., 2017). Además, no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos durante los días de almacenamiento ($P > 0.05$).

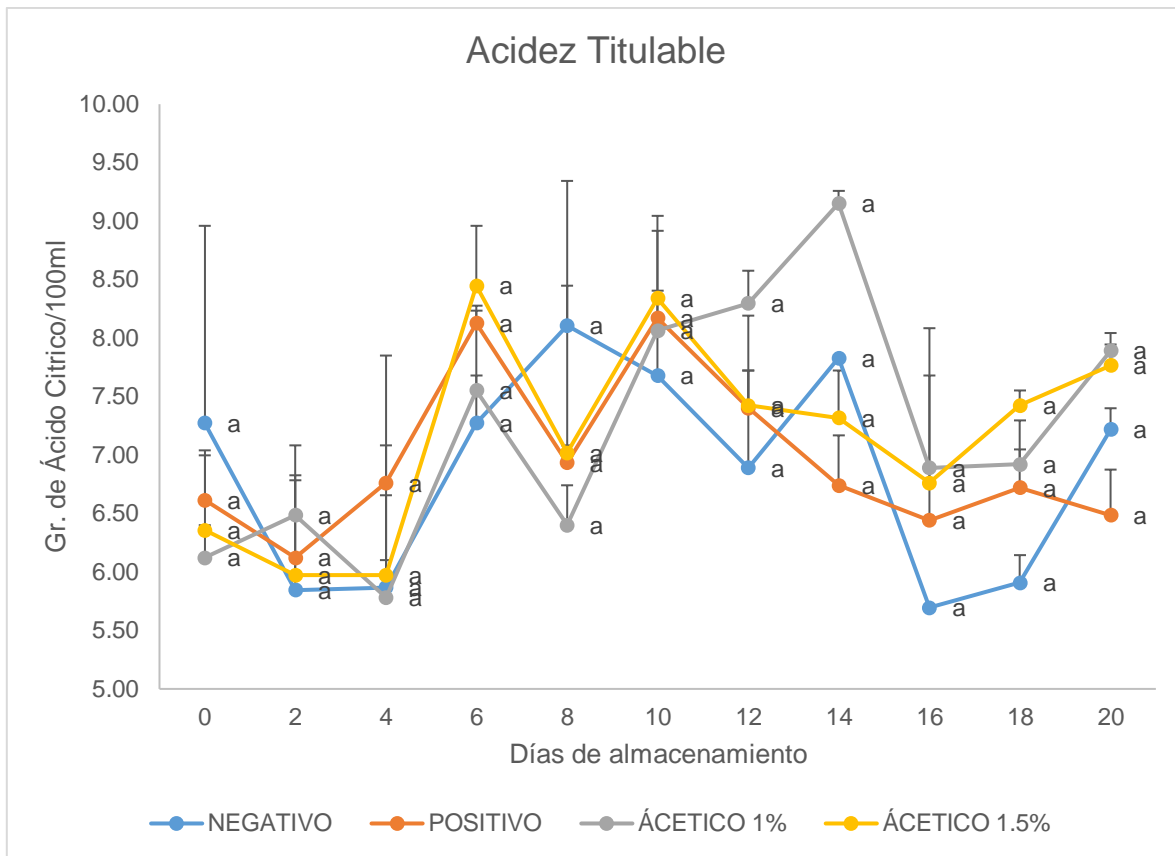


Figura 7.21 Acidez titulable de frutos de limón persa tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%).

7.4.2 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre el pH.

El pH o acidez iónica es un parámetro que mide solamente los iones hidrógeno libres; se ha señalado que las mediciones de pH se vinculan estrechamente con el sabor de los jugos cítricos dado que los iones H⁺ libres son los que interactúan con las papilas gustativas de la lengua (Segurondo, Pantoja y Rocha, 2013). En la figura 7.22 se muestra el pH de los limones tratados con nebulización de ácido acético, donde el rango del pH en los frutos tratados con nebulización se encontró entre 1.58 – 2.14 durante los 20 días de almacenamiento. Durante los primeros 4 días de almacenamiento el pH tuvo un comportamiento descendente, con excepción de los frutos tratados con ácido acético que tuvieron un incremento el 6 día, posteriormente presentaron valores similares a los demás tratamientos. En el día 14 ocurrió un incremento en todos los frutos y posteriormente se dio un decremento, sin embargo, no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos durante los días de almacenamiento ($P > 0.05$).

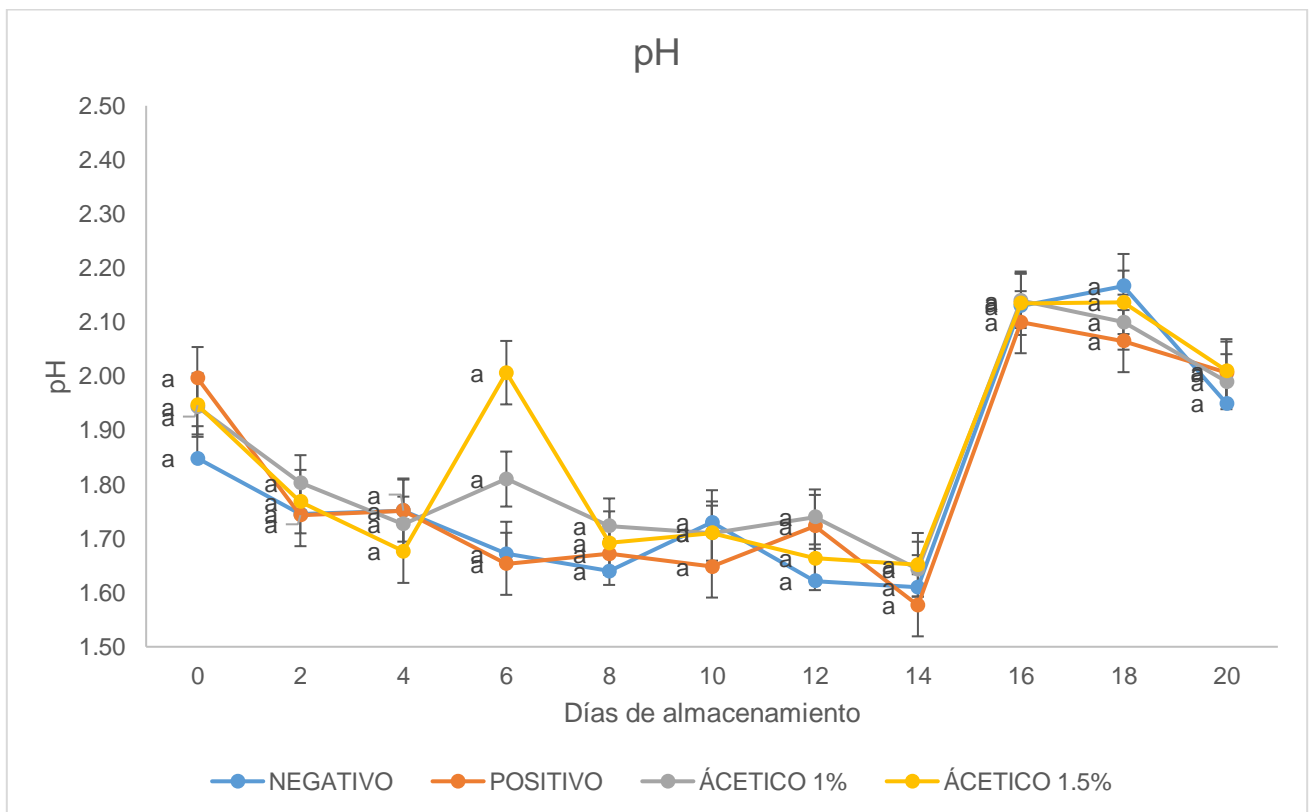


Figura 7.22 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre el pH de frutos de limón persa.

7.4.3 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre sólidos solubles totales (SST).

La concentración de sólidos solubles totales de los zumos se expresan en °Brix, los grados °Brix son una medida de densidad de una solución de sacarosa al 1% en 100 ml de jugo. Con base en la norma mexicana NMX-FF-077-1996 para limón persa los sólidos solubles totales deben tener un valor mínimo de 6.8%. La figura 7.23 muestra los °Brix de los frutos tratados con nebulización de ácido acético donde los valores se observaron en un rango de 6.47 – 8.00% a lo largo de los 20 días de almacenamiento y no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos durante los días de almacenamiento ($P > 0.05$).

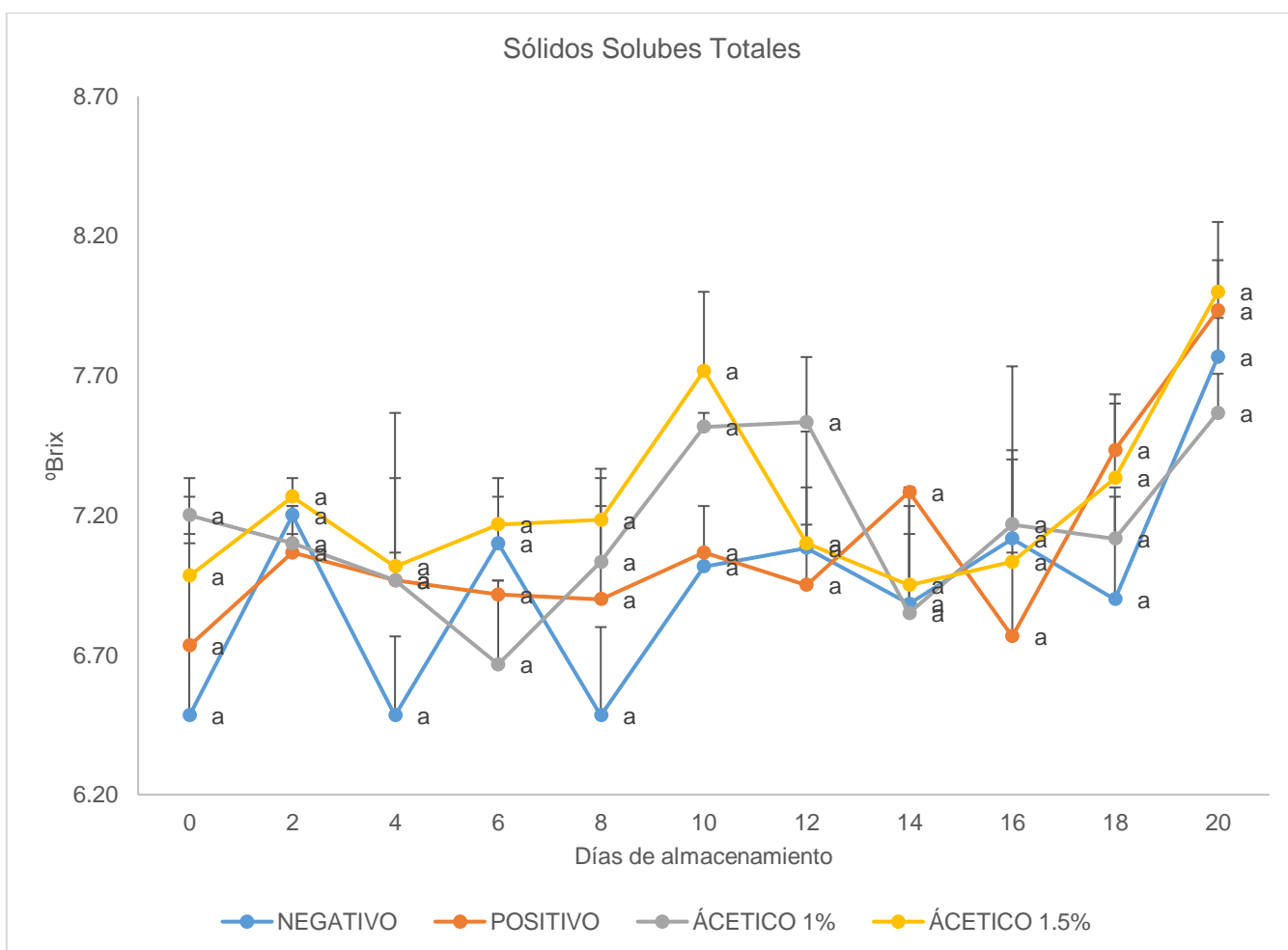


Figura 7.23 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre sólidos solubles totales (SST) de frutos de limón persa.

7.4.4 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre la firmeza.

La firmeza en los frutos de limón es un parámetro de calidad importante en el mercado. Debido a la degradación de la pectina en la cutícula del fruto hay una disminución en la firmeza, otro factor que causa una disminución en la firmeza es la presión del ambiente y la senescencia (Nasrin y cols., 2020). En la figura 7.24 se muestra la firmeza de los frutos tratados con nebulización de ácido acético, los limones tratados con nebulización ultrasónica mostraron valores similares de firmeza a lo largo de los 20 días. Se observó una diferencia significativa ($P > 0.05$) en los frutos tratados con ácido acético al 1.5% con respecto a los frutos control negativo, conjuntamente, los frutos con nebulización de agua destilada (control positivo) y ácido acético 1% y 1.5% mostraron similitudes entre ellos (figura 7.24). Además, existió una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los días de almacenamiento 0 y 16 del experimento.

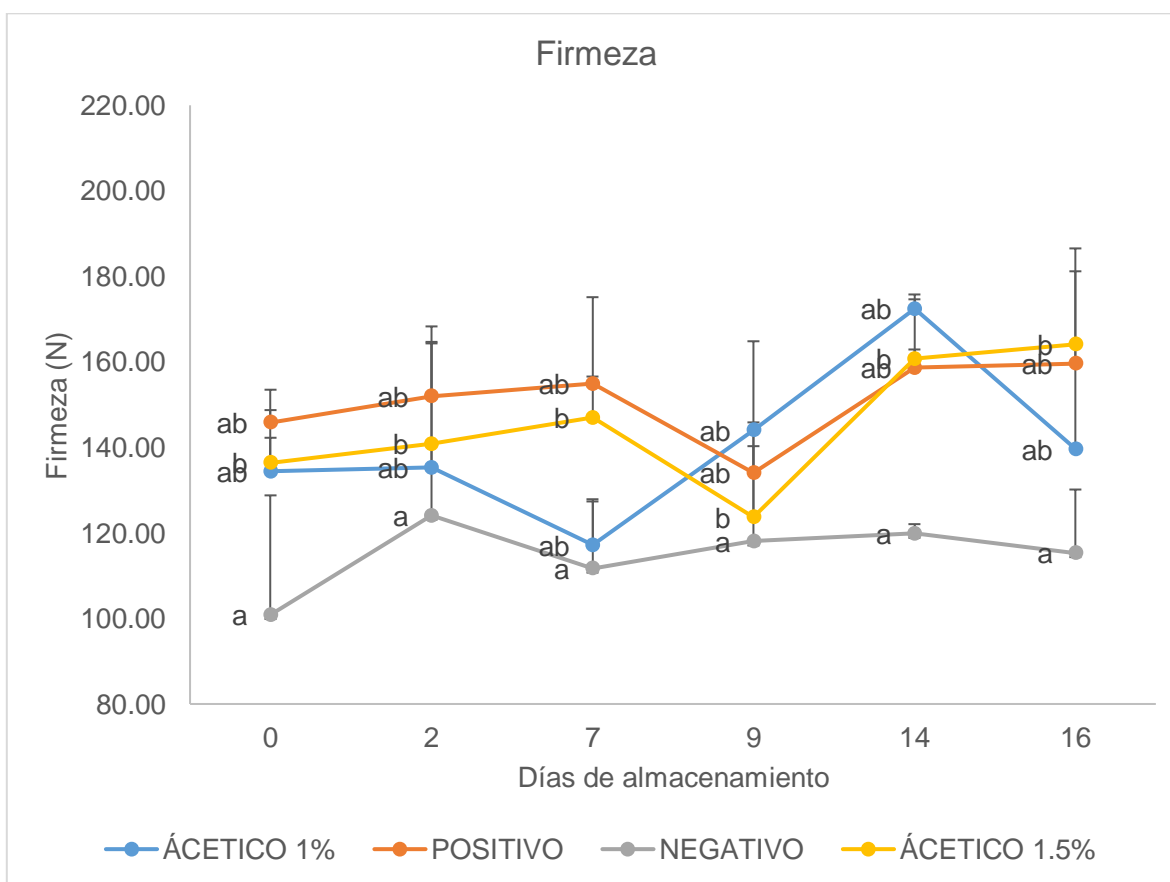


Figura 7.24 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre la firmeza de frutos de limón persa.

7.4.5 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre la pérdida de peso.

La figura 7.25 muestra la pérdida de peso de los frutos tratados con nebulización de ác. acético tras 20 días de almacenamiento a 15°C. La pérdida de peso fue más severa conforme pasaba los días de almacenamiento, sin embargo, se observó una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el control negativo y los tratamientos de nebulización ultrasónica. Los frutos tratados con nebulización de agua destilada (control positivo), ácido acético a 1% y 1.5% mostraron porcentajes de pérdida de peso similares a lo largo de los 20 días de almacenamiento. Los frutos que no fueron tratados con nebulización, después de 20 días perdieron un 16.54% de peso; de forma contraria, los frutos con tratamiento de agua destilada (control positivo), ácido acético al 1.0% y 1.5% perdieron un 6, 6.60 y 4.97%, respectivamente, durante el almacenamiento.

Diversos autores han mencionado las ventajas de la nebulización ultrasónica sobre los frutos en el periodo postcosecha (Daus y cols., 2011; Karabulut y cols., 2009; Joseph L. Smilanick y cols., 2014; Timmons y cols., 2018; Vardar y cols., 2012; V. De Velde y Pirovani, 2016), por lo tanto, se ha sugerido que en frutos se aplique más de una ocasión la neblina durante su periodo de almacenamiento. Venditti y cols., (2017) reportaron que no existe una diferencia significativa en las pruebas de calidad (pH, AT, SST) y reportaron que la pérdida de peso se redujo significativamente con una segunda aplicación a las 48 horas en frutos de cereza (Venditti y cols., 2017).

Además, se ha reportado que en los frutos (cuando están en un ambiente con humedad relativa arriba del 90%, temperaturas de 0-10°C y con un sistema de nebulización ultrasónica o nano-nebulización) la tasa de respiración puede ser suprimida durante el tiempo que la neblina esté en contacto con los mismos (Saenmuang y cols., 2012). La interacción entre los frutos y las gotas de nebulización ultrasónica aún no es completamente conocida, se ha propuesto la siguiente interacción, donde las gotas de la neblina que se encuentran dentro del sistema tienen contacto y se depositan sobre la cutícula de los frutos, posteriormente las gotas que están sobre una superficie sin estoma sufren una evaporación debido a que la presión de vapor saturado (cutícula) es más alta que

la presión de vapor del aire. Otras gotas se depositan sobre un estoma abierto, una fracción del agua se evapora y otra se infiltra por el poro; la evaporación de las gotas será proporcional al diferencial de la presión de vapor de la superficie y la del aire (en este caso, la presión de vapor del aire es mayor que la de la superficie) y de esta manera se evita la evaporación de agua del fruto a lo largo del tiempo, además, se observa una condensación en la superficie de los frutos debido al impacto de miles de gotas en todas direcciones (esto ocurre cuando la temperatura de la superficie es más baja que la del punto de rocío del aire) (Tirawat y cols., 2017). La interacción de las gotas sobre el fruto concuerda con lo reportado por Hung y cols., (2011), quienes evaluaron la aplicación de neblina y nanoneblina ultrasónica de agua reportando que cuando se utiliza nanoneblina la apertura de los estomas es menor debido a que las gotas contienen menos agua por el diámetro de la gota, contrario a esto, la apertura de los estomas es ligeramente mayor con neblina ultrasónica debido a que existe una mayor cantidad de agua en el aire (Hung y cols., 2011).

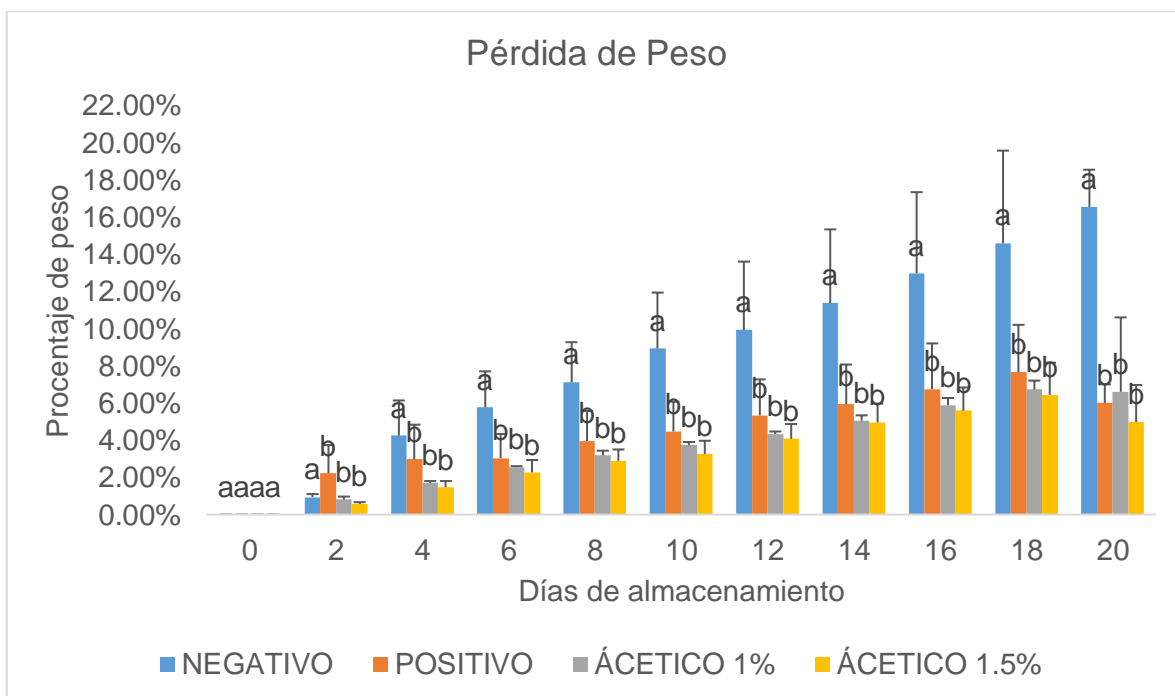


Figura 7.25 Pérdida de peso de frutos tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) almacenados durante 20 días.

7.4.6 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre el porcentaje de jugo.

Con base en la norma mexicana NMX-FF-077-1996 para limón persa, el porcentaje de jugo no debe ser menor a 45% en base a la masa. La figura 7.26 muestra los porcentajes de jugo de los frutos tratados con nebulización de ácido acético, los limones tratados al 1% mostraron el mayor porcentaje (49.96%) de jugo en el día 14 con respecto a los demás tratamientos. Aunque el control negativo mostró valores similares a los tratamientos durante los primeros 14 días, después se observó un decremento en el porcentaje de jugo el día 16 (31.51%), este suceso podría estar relacionado con la pérdida de peso que se observó durante ese día de almacenamiento (12.97%). Nasrin y cols., (2020) reportan valores de 48.66% de jugo de limón en el día 12 de almacenamiento a una temperatura de 21°C. Estos resultados también concuerdan con lo reportado por Soriano-Melgar y cols., (2019), con valores de 35-45% de jugo de limón durante un almacenamiento de 10 días a temperatura de 7.5°C.

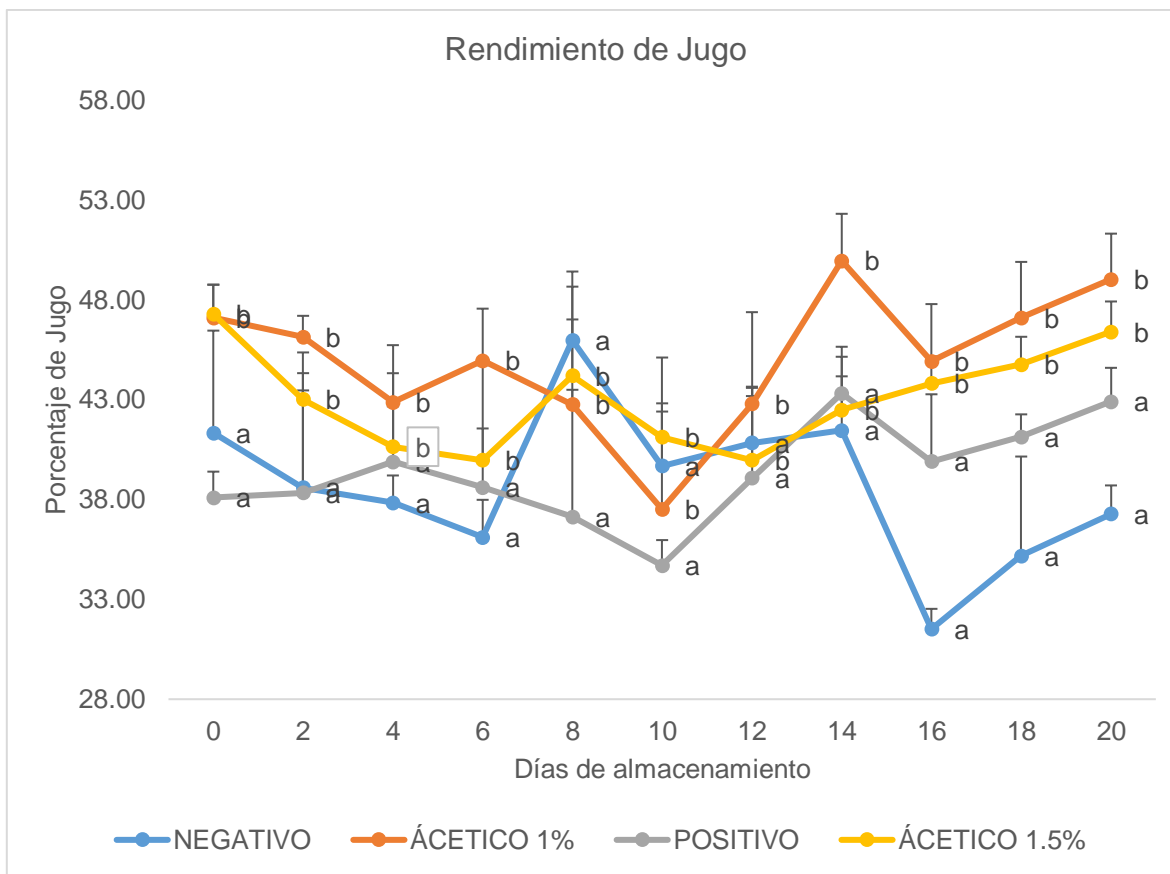


Figura 7.26 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) en el rendimiento de jugo de frutos de limón persa almacenados durante 20 días.

7.4.7 Efecto de la nebulización ultrasónica sobre el color.

Uno de los parámetros de mayor importancia y que puede ser crítico para el consumidor durante la selección de frutos es el color, este parámetro puede influir en la estimulación de la ingesta alimentaria y valores sensoriales (Vadiveloo y cols., 2019). Compuestos como carotenoides y flavonoides son los encargados del color de los frutos, el limón persa se caracteriza por tener un color verde oscuro en su corteza (P. Zhang y Zhou, 2019).

Las figuras 7.27, 7.28 y 7.29 muestran los resultados de color en los frutos tratados con nebulización de ác. acético y almacenados a 15°C durante 20 días, los frutos que fueron nebulizados con agua destilada (control positivo) mostraron una diferencia significativa ($P > 0.05$) en los parámetros de luminosidad (L^*), chroma (c^*)

y ángulo h^* ; mientras que, entre los frutos del control negativo y los frutos tratados con ácido acético al 1% y 1.5% no se mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$)

Nasrin y cols., (2020) reportan valores en el parámetro h^* entre $109^\circ - 112^\circ$ en frutos de limón con recubrimiento en el día 18 de almacenamiento, los resultados obtenidos con la nebulización de ácido acético a 1% y 1.5% mostraron valores de 111.52° y 112.05° en el día 20 y concuerdan con los reportado por el autor anteriormente. El decremento observado en el ángulo h^* se adjudica principalmente a que los limones comienzan el proceso de respiración y senescencia; lo que provoca que pasen de un color verde a uno amarillo durante su almacenamiento, este proceso se da debido a la degradación de la clorofila y la presencia de diversos carotenoides (Raddatz-Mota y cols., 2019; P. Zhang y Zhou, 2019).

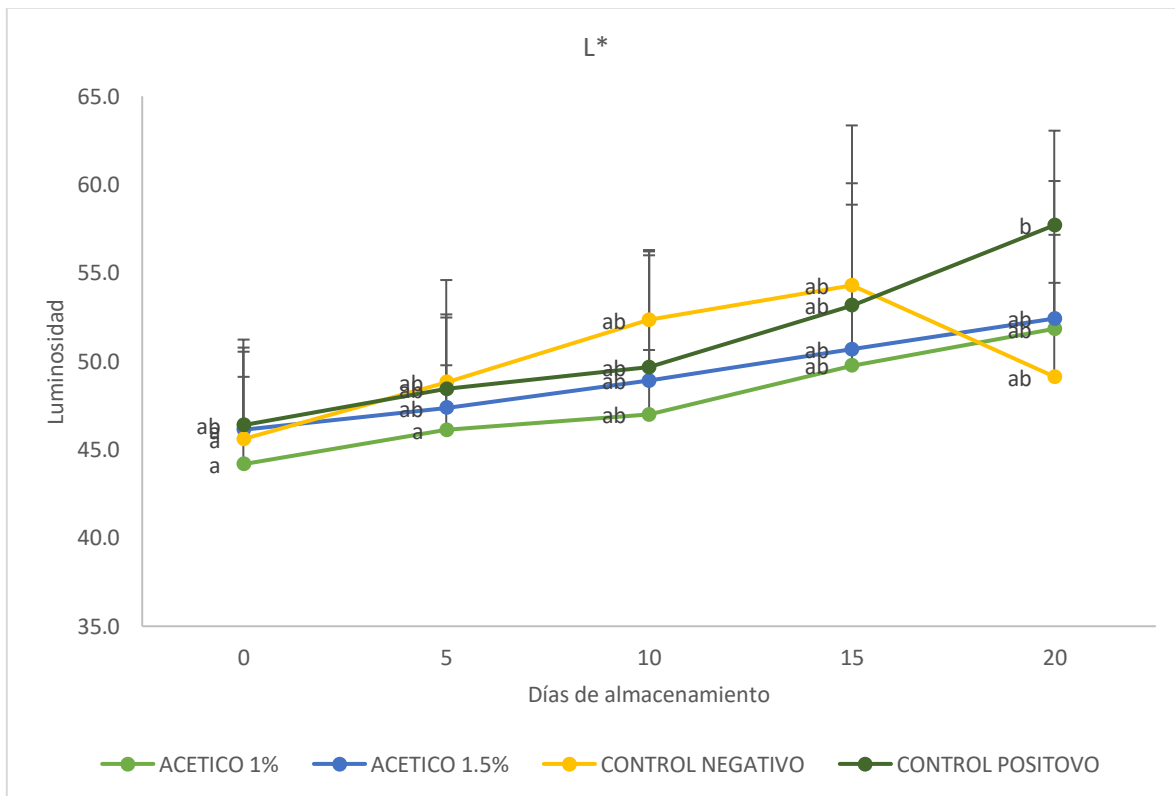


Figura 7.27 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre la luminosidad (L^*) de frutos de limón persa almacenados durante 20 días.

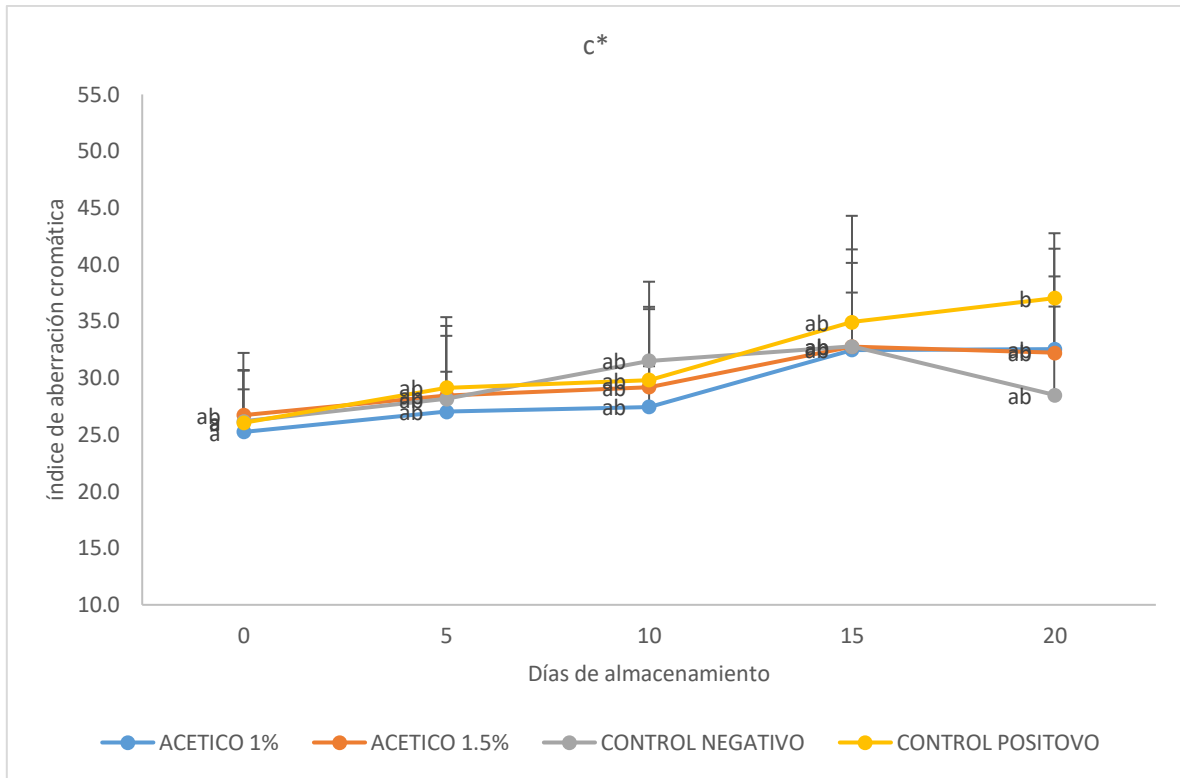


Figura 7.28 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre el croma (c^*) de frutos de limón persa almacenados durante 20 días.

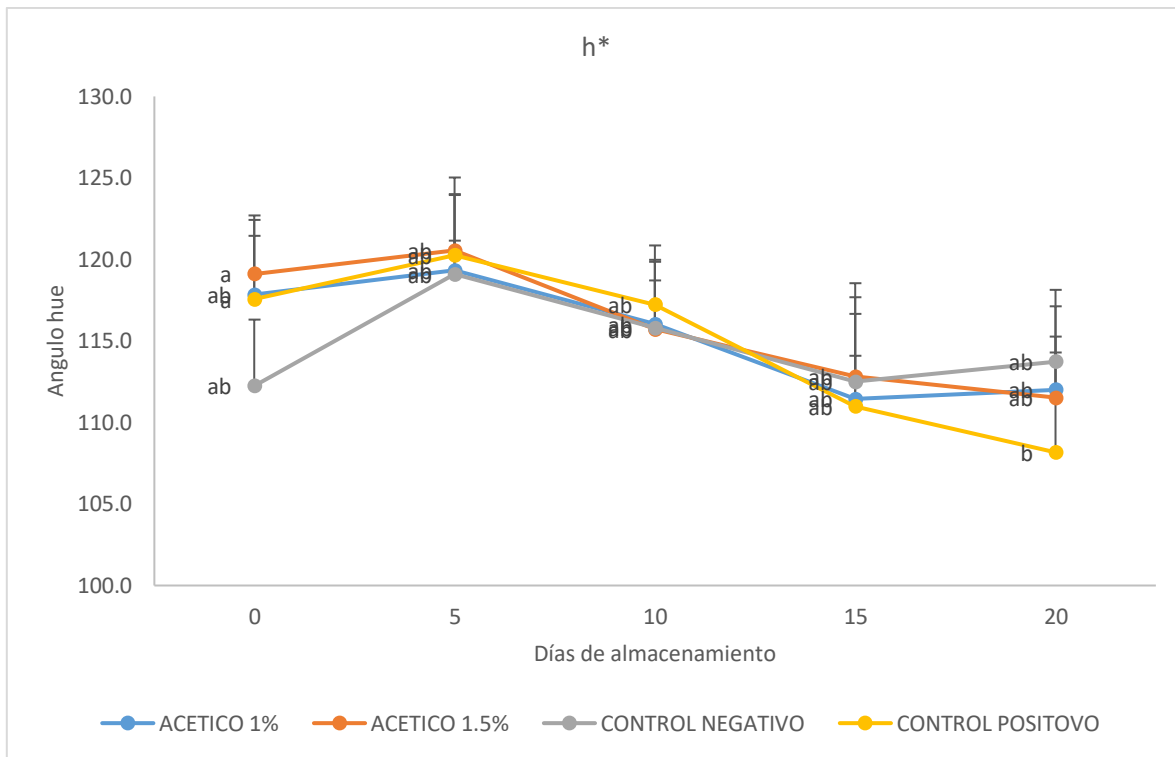


Figura 7.29 Efecto de la nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) sobre el ángulo hue (h^*) de frutos de limón persa almacenados durante 20 días.





















Tratamiento	Día 0	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20
Control Negativo					
Control Positivo					
AA 1.0%					
AA 1.5%					

Figura 7.30 Efecto sobre el color de frutos tratados con nebulización ultrasónica de agua destilada (positivo) y ácido acético (1.0 y 1.5%) y almacenados durante 20 días a 15°C.

7.5 Simulación de dinámica de fluidos por computadora del sistema de nebulización a nivel “*in vivo*”.

En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos con la herramienta de CFD en la fase *in vivo*, con la cual se obtuvo la fluidodinámica de la neblina dentro del sistema de nebulización ultrasónica, con ayuda de estos resultados se observan las áreas que tienen menos neblina y se logre optimizar el sistema para que sea más homogénea la neblina con frutos que fueron representados como esferas.

7.5.1 Vectores de velocidad de flujo *in vivo*

En la figura 7.31 se muestra el campo de vectores de velocidad del flujo de neblina en el plano Y a una altura de 5 cm de la base del sistema de nebulización para los tiempos de 5, 20, 35 y 120 segundos, respectivamente. Se observa en el tiempo 5 según la figura 7.31 a) que los vectores con mayor velocidad (0.1m/s) se concentran principalmente sobre los frutos más cercanos a la entrada de neblina al contenedor, los vectores tienen sentido y dirección hacia los costados y comienzan su avance por la parte central. Debido a que el plano analizado está 5 cm sobre la parte inferior del sistema, los vectores tienen mayor velocidad únicamente en la parte izquierda provocado por la entrada del flujo de neblina al contenedor, la parte derecha muestra un avance mínimo y se sugiere que esta parte representa una zona de estancamiento de la neblina y de poco movimiento, sin embargo, el comportamiento de los vectores en un plano Y en la parte inferior es similar a los vectores observados en la figura 7.31. En el tiempo de 20 segundos como muestra la figura 7.31 (b) el flujo de neblina comienza a desplazarse por los costados y la parte media de todo el sistema, se observa que se han generado recirculaciones en la parte izquierda del sistema debido a que la neblina impacta con los limones y una parte de flujo se redirecciona hacia la dirección de la pared izquierda. Los tiempos de 35 y 120 segundos según la figura 7.31 (c y d) muestran como el flujo de neblina avanzó por todo el sistema, sin embargo, en el tiempo de 35 segundos se observa que el flujo de neblina tiene una velocidad nula y se generó una zona de estancamiento; esta zona se siguió observando hasta el tiempo de 120 segundos en donde el flujo de neblina avanzó por los laterales entre los limones hasta impactar en la pared derecha y generar recirculaciones por los laterale

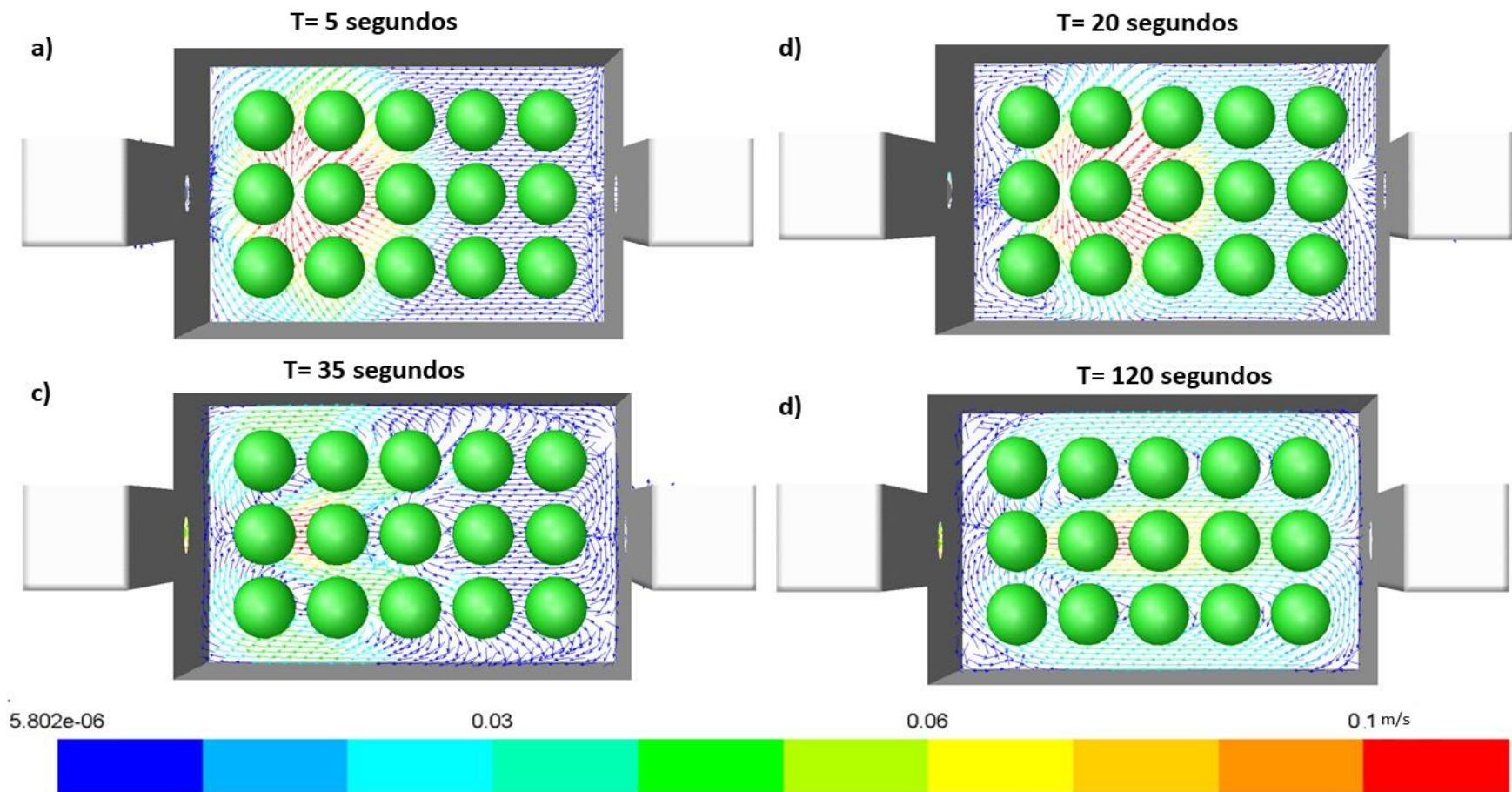


Figura 7.31 Vectores de velocidad de la neblina en el plano Z a 5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 5 (a), 20 (b), 35 (c) y 120 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica con limones

7.5.2 Contornos de fase *in vivo*.

En la figura 7.32 se muestran los diferentes contornos de fase de neblina y aire en el sistema de nebulización ultrasónica con limones (que son representados como esferas), el plano Z, para los tiempos de 5, 20, 35 y 120 segundos, respectivamente.

La figura 7.32 (a) muestra la entrada de la neblina, proveniente de la columna del nebulizador. El flujo de neblina, al estar en contacto con el flujo de aire, provoca su desplazamiento hacia la parte central del sistema donde se encuentran los frutos. Entonces, el flujo de neblina es desplazado principalmente por la parte inferior del sistema, sin embargo, hay que resaltar que los primeros 5 segundos los frutos están en contacto directo con la neblina debido que se encuentran en una zona con un flujo continuo.

En el tiempo de 20 segundos, el avance de la neblina es por la parte inferior hasta la pared derecha, se observa que, el impacto del flujo provoca una recirculación del flujo en sentido contrario, como se muestra en la figura 7.32 (b). Posteriormente, durante el tiempo de 35 segundos el sistema comienza a saturarse de neblina desde la parte inferior como ya se había indicado anteriormente, según se observa en la figura 7.32 (c), en este tiempo los frutos muestran un contacto continuo con de flujo de neblina.

A un tiempo de 120 segundos el sistema se ha saturado completamente y el flujo de neblina ha comenzado a introducirse a la columna derecha, como se observa en la figura 7.32 (d); los frutos tienen un contacto continuo con el flujo de neblina, sin embargo, la neblina tiene mayor impacto en los frutos más cercanos a la entrada del flujo. El ácido acético, en ambas concentraciones, mostró tener mayor efecto en los frutos próximos a la entrada del flujo, esto se debe a que existe mayor movimiento de neblina en esta área que en la parte derecha, como se observó en los vectores de velocidad del plano Y (figura 7.3).

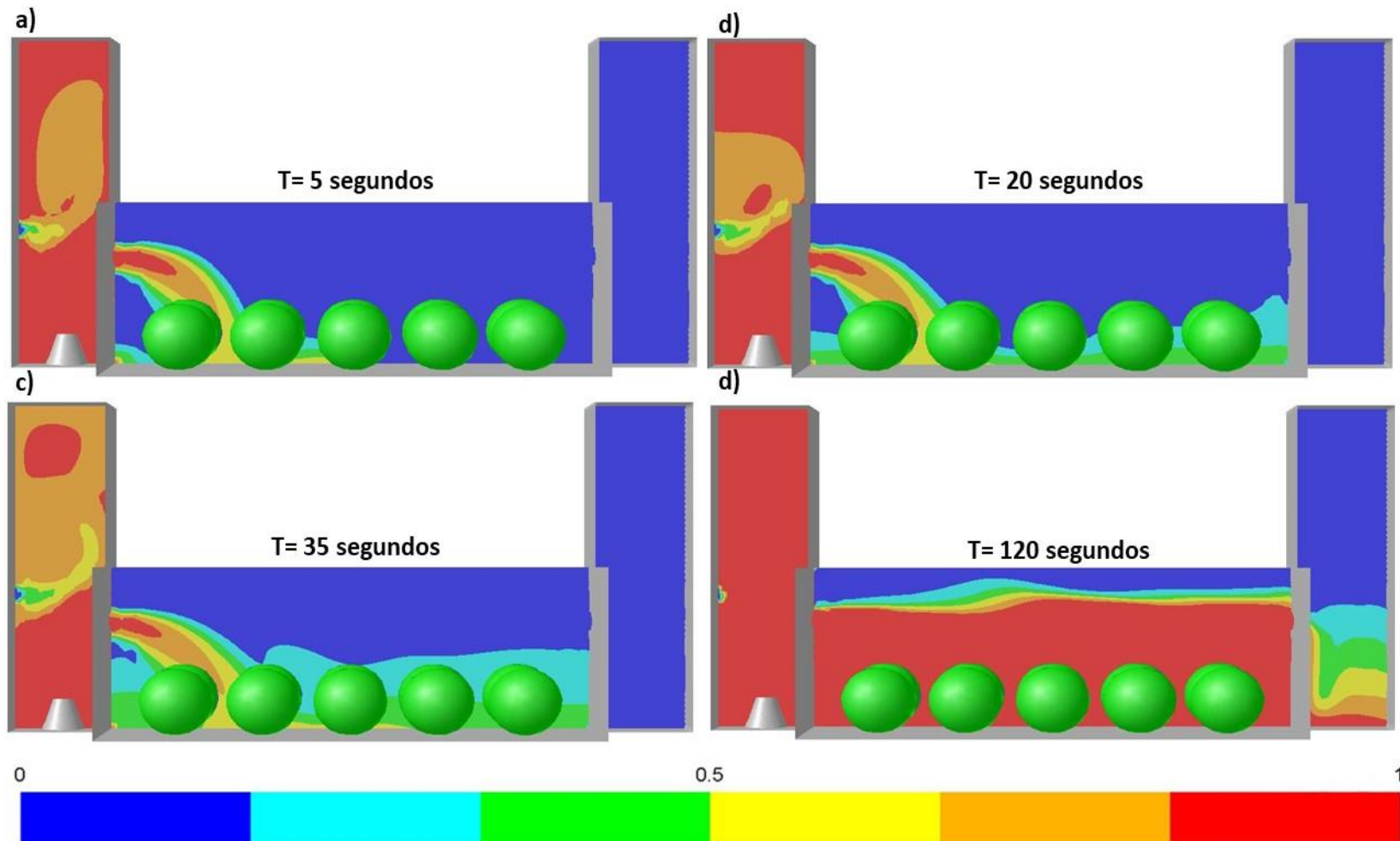


Figura 7.32 Contornos de fases de la neblina en el plano Z a 5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 5 (a), 20 (b), 35 (c) y 120 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica con limones

En la figura 7.33, se muestran los diferentes contornos de fase de neblina y aire en el sistema de nebulización ultrasonica con limones (que son representados como esferas) en el plano Y a 5 cm; para los tiempos de 5, 20, 35 y 120 segundos, respectivamente.

A un tiempo de 5 segundos se observa como el flujo de neblina se concentra en la parte media entre los limones cercanos y se expande a los costados, como se observa en la figura 7.33 (a); este comportamiento es similar a lo observado en los vectores de velocidad de la figura 7.31, para los mismos 5 segundos. Es obvio que el sentido y dirección de la neblina se ve influenciado por la presencia de los frutos en el sistema de nebulización.

En el tiempo de 20 segundos se observa que la neblina ha cubierto la parte inferior y alrededor de los frutos, existiendo una zona con poca neblina dentro del sistema, esto debido a que la neblina impacta con los frutos próximo y se desplaza a los laterales, como se muestra en la figura 7.33 (b).

En el tiempo de 35 segundos la zona con poca neblina comienza a reducirse y el sistema se homogeniza de neblina, los frutos siempre tienen contacto directo con la niebla del agente, como se observa en la figura 7.33 (c). A partir de este tiempo, el sistema comienza a saturarse hasta estar completamente lleno, como se observa en el tiempo de 120 segundos en la figura 7.33 (d).

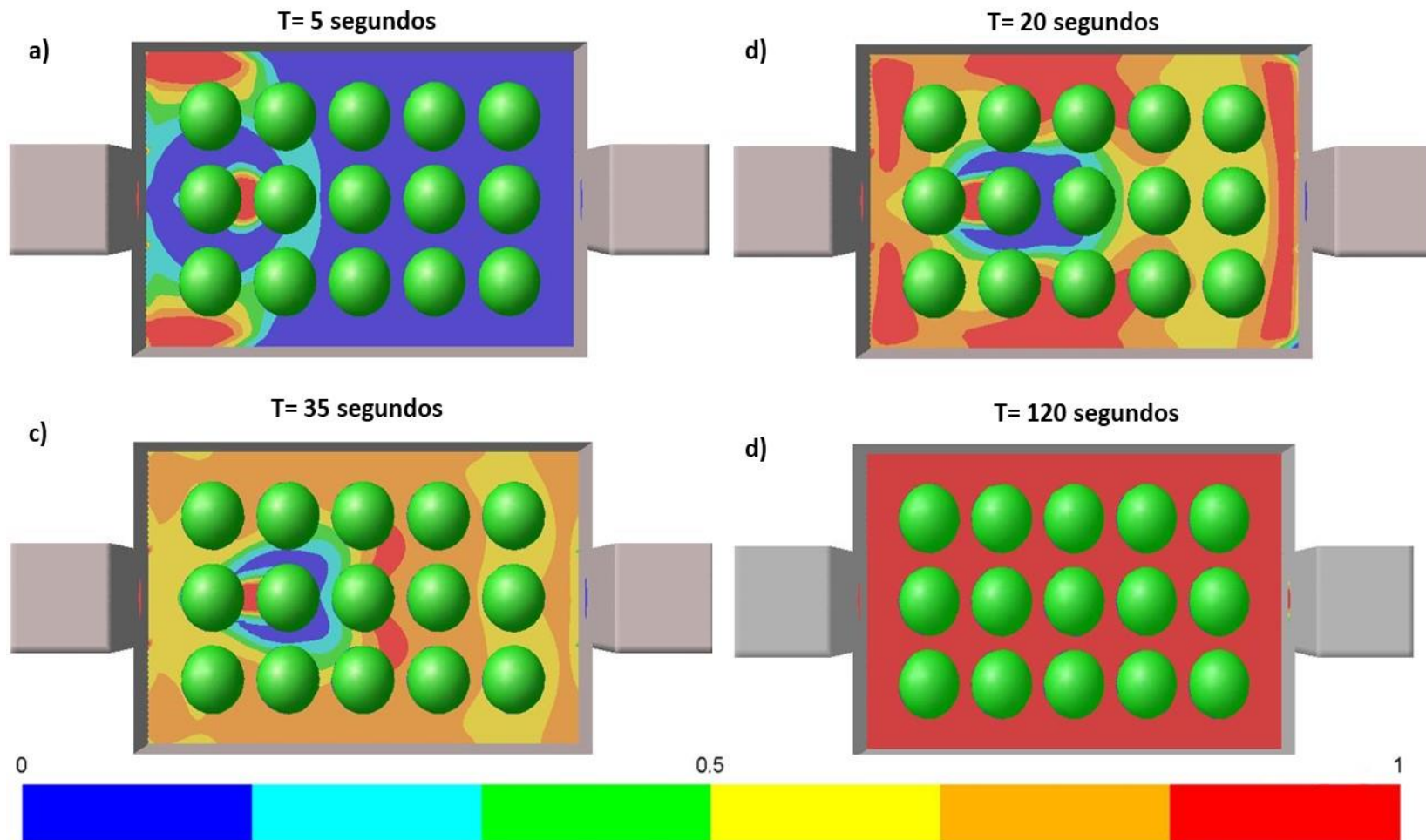


Figura 7.33 Contornos de fases de la neblina en el plano Y a 5 cm de la parte inferior del sistema en los tiempos de 5 (a), 20 (b), 35 (c) y 120 (d) segundos en el sistema de nebulización ultrasónica con limones

7.5.3 Comparación de la simulación *in vivo* con modelo real.

Se realizó una comparación entre la simulación y el experimento real para validar los resultados obtenidos mediante la herramienta de CFD. La figura 7.34 muestra el plano Y en el tiempo de 5 segundos (a) comparándolo con el experimento al mismo tiempo (b), un flujo de baja densidad avanza entre los frutos de limón. Como se observó en los vectores de velocidad (figura 7.34), la neblina se desplaza por los costados y la parte central debido a los impactos que se generan por el choque con los limones.

La figura 7.35 a un tiempo de 35 segundos, muestra que el sistema comienza a saturarse con una neblina con mayor densidad que al comienzo del experimento; un espacio con poca neblina se observa en la simulación, ver figura 7.35 (a) y del mismo modo se observa también, en el experimento, ver figura 7.35 (b), posteriormente el avance de la neblina continúa hasta tocar la pared derecha donde comienza a generarse una zona de estancamiento.

Se realizó la comparativa en el plano Z central en el tiempo de 45 segundos (figura 7.35) donde se observa una recirculación y que en el sistema existe una saturación de neblina, sin embargo, los limones que tienen un mayor contacto y tienen mayor movimiento a sus alrededores son los primeros 9 limones. El resto de limones tienen contacto, pero con un flujo de neblina con velocidades nulas y que se consideran como zona de estancamiento, además, las pruebas de patogenicidad mostraron que los limones numerados de 1-9 y 16-24 tuvieron menores diámetros de lesiones de la enfermedad a comparación de los limones numerados de 10-15 y 25-30.

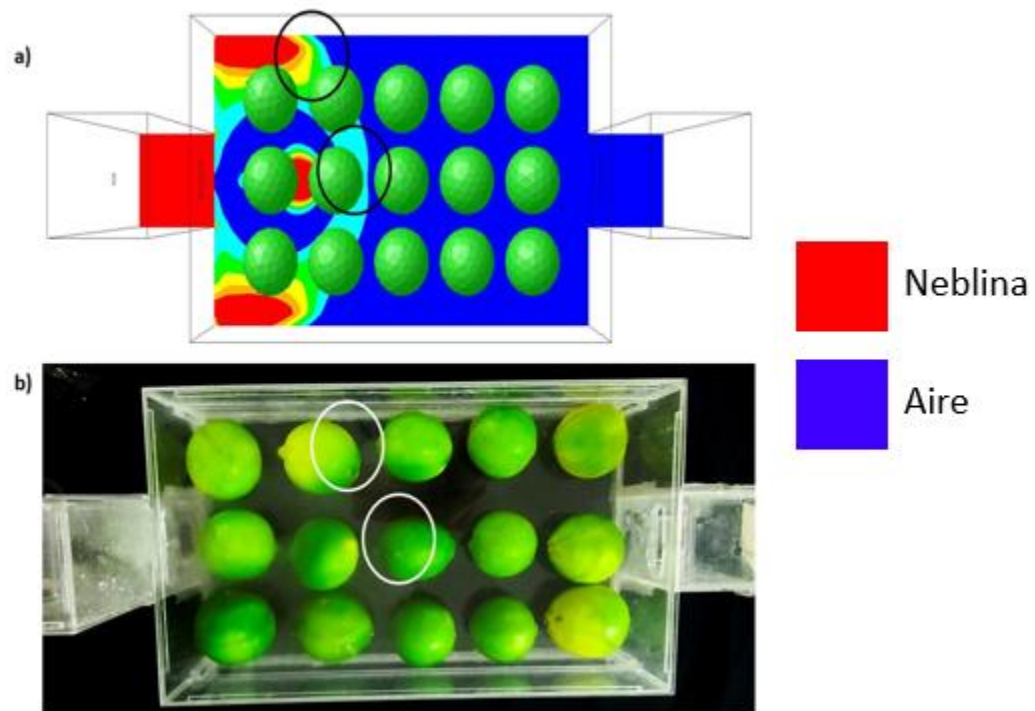


Figura 7.34 Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica con frutos de limón (b) en el tiempo de 5 segundos.

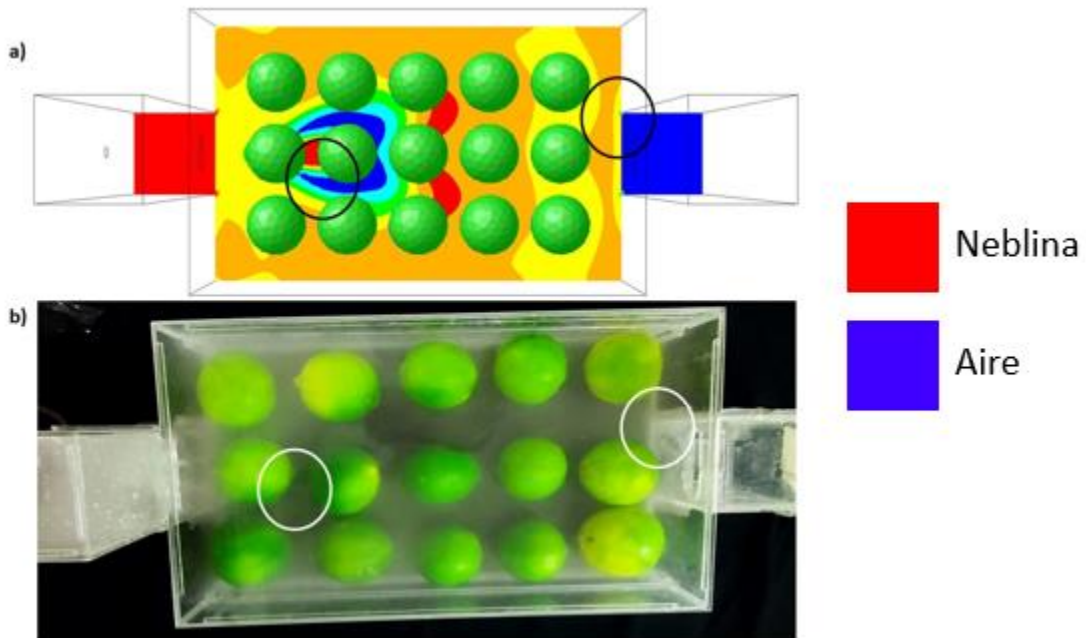


Figura 7.35 Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica con frutos de limón (b) en el tiempo de 35 segundos.

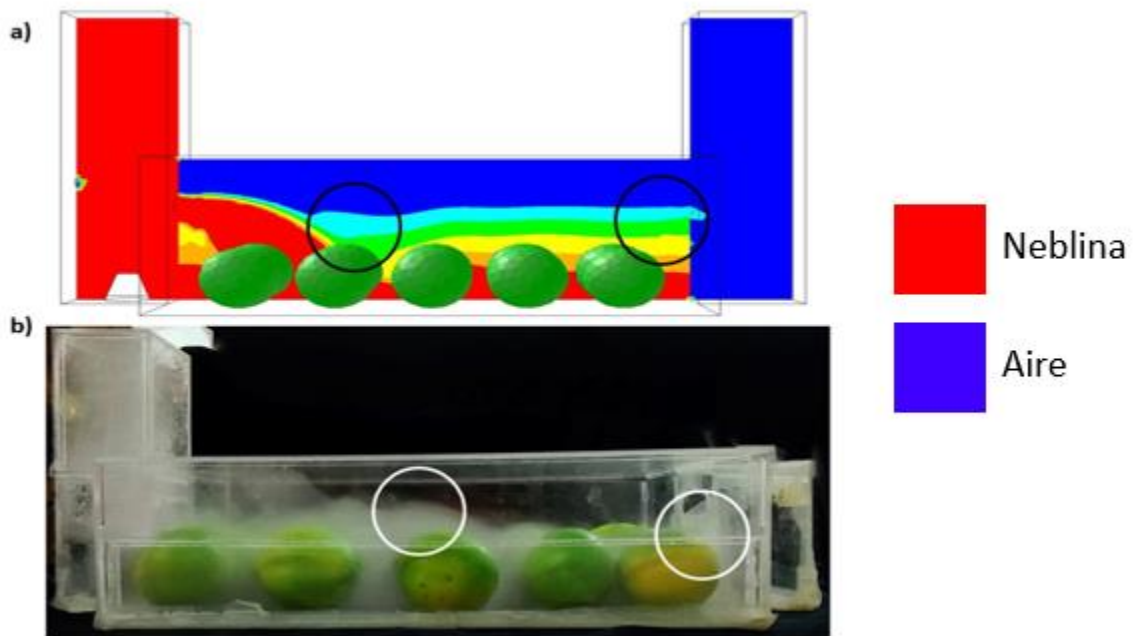


Figura 7.36 Comparación de simulación por CFD (a) y sistema real de nebulización ultrasónica con frutos de limón (b) en el tiempo de 45 segundos.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

La aplicación por nebulización de los agentes GRAS bicarbonato de sodio y ácido acético demostraron su utilidad para el control de *P. italicum* en la etapa *in vitro*. El crecimiento micelial, el porcentaje de reducción de esporas y la germinación de esporas de *P. italicum* se vieron afectados por la aplicación en fase de niebla de los agentes GRAS, siendo los tratamientos de ácido acético los que mostraron los mayores porcentajes de inhibición micelial (70 %). Además, el menor número de esporas se logró también con los tratamientos con ácido acético, alcanzando porcentajes de reducción de esporas superiores al 80 %. Una total inhibición de la germinación se alcanzó con los tratamientos nebulizados con ácido acético. Por lo anterior para la etapa *in vivo*, se aplicaron los tratamientos nebulizados con ácido acético de 10 minutos en concentraciones de 1% y 1.5%.

La aplicación de ácido acético por nebulización ultrasónica en frutos de limón persa demostró ser un buen sistema para el control del patógeno *P. italicum*. Se logró reducir la severidad y la incidencia de la enfermedad de la pudrición azul en frutos de limón persa inoculados artificialmente con el patógeno de manera curativa y preventiva, además, el gasto en volumen del agente fue mínimo para su aplicación. Por otro lado, los parámetros de calidad no fueron afectados negativamente con la aplicación de ácido acético en forma de neblina, por lo que la nebulización ultrasónica es una técnica que mantiene las propiedades de calidad, logrando reducir la pérdida de peso en los frutos de limón en una aplicación temprana.

Mediante la simulación por CFD, en la etapa *in vitro*, se concluyó que, la mayor saturación del sistema se obtiene a los 120 y 360 segundos de generación de la niebla, por lo que para la parte *in vivo* se dejó el sistema encendido hasta la saturación y luego se colocaron los frutos de limón. También se observó que existen zonas de estancamiento en la parte inferior del sistema, en donde la concentración de neblina es mayor, por lo que este sitio es el adecuado para colocar los frutos y así garantizar un mayor contacto con la niebla.

Además, se realizó una simulación de CFD con el sistema de nebulización ultrasónica y los frutos de limón, donde se observó que el mayor movimiento se encuentra cerca de la entrada de la neblina al contenedor de los frutos, por lo que se sugiere que, para optimizar el sistema, habrán de implementarse dos nebulizadores ultrasónicos para evitar zonas de baja movilidad de neblina en el mismo y que todos los frutos se encuentren en un ambiente con un flujo de neblina en movimiento.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Alvindia, D. G. (2013). Sodium bicarbonate enhances efficacy of *Trichoderma harzianum* DGA01 in controlling crown rot of banana. *Journal of General Plant Pathology*, 79(2), 136–144.
- Ambaw, A., Delele, M. A., Defraeye, T., Ho, Q. T., Opara, L. U., Nicolai, B. M., y Verboven, P. (2013). The use of CFD to characterize and design post-harvest storage facilities: Past, present and future. *Computers and Electronics in Agriculture*, 93, 184–194.
- Ambaw, Alemayehu, Verboven, P., Delele, M. A., Defraeye, T., Tijssens, E., Schenk, A., y Nicolai, B. M. (2013). CFD Modelling of the 3D Spatial and Temporal Distribution of 1-methylcyclopropene in a Fruit Storage Container. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2235–2250.
- AOAC. (2000). *Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the AOAC International*.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Kentish, S., y Grieser, F. (2007). Bubbles in an acoustic field: An overview. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(4), 470–475.
- Astefanei, A., van Bommel, M., y Corthals, G. L. (2017). Surface Acoustic Wave Nebulisation Mass Spectrometry for the Fast and Highly Sensitive Characterisation of Synthetic Dyes in Textile Samples. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(10), 2108–2116.
- Bertin, J. J. (1983). *Mecánica de Fluidos para Ingenieros*. University of Texas At Austin.

- Briceño-Gutierrez, D., Salinas-Barrera, V., Vargas-Hernández, Y., Gaete-Garretón, L., y Zanelli-Iglesias, C. (2015). On the Ultrasonic Atomization of Liquids. *Physics Procedia*, 63, 37–41.
- Brown, K., y Xu, Y. (1999). Fogging for the disinfection of food processing factories and equipment. *Trends in Food Science and Technology*, 10(6–7), 205–210.
- Caldwell, L. (2009). *The Use of Vinegar Vapor and Post-Harvest Biological Control to Reduce Patulin in Apple Cider* (Issue August 2009). The University of Maine.
- Colleen D., S.-P. (2002). *The K-Epsilon Model in the Theory of Turbulence*. University of Pittsburgh.
- Daus, A., Horev, B., Dvir, O., Ish-Shalom, S., y Lichter, A. (2011). The efficacy of ultrasonic fumigation for disinfestation of storage facilities against postharvest pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 62(3), 310–313.
- Deepu, P., Peng, C., y Moghaddam, S. (2017). Dynamics of ultrasonic atomization of droplets. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 17(November).
- Delele, M. A., Gruyters, W., Rogge, S., Bessemans, N., Schenk, A., Hertog, M. L., Vanmaercke, S., Ramon, H., Verboven, P., y Nicolai, B. M. (2018). Computer aided analysis of gas exchange in pear fruit packages during long distance transport. *Acta Horticulturae*, 1201, 229–235.
- Delele, M. A., Schenk, A., Tijskens, E., Ramon, H., Nicolai, B. M., y Verboven, P. (2009). Optimization of the humidification of cold stores by pressurized water atomizers based on a multiscale CFD model. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 228–239.

- Delele, M. A., Vorstermans, B., Creemers, P., Tsige, A. A., Tijskens, E., Schenk, A., Opara, U. L., Nicolai, B. M., y Verboven, P. (2012a). CFD model development and validation of a thermonebulisation fungicide fogging system for postharvest storage of fruit. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 59–68.
- Delele, M. A., Vorstermans, B., Creemers, P., Tsige, A. A., Tijskens, E., Schenk, A., Opara, U. L., Nicolai, B. M., y Verboven, P. (2012b). Investigating the performance of thermonebulisation fungicide fogging system for loaded fruit storage room using CFD model. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 87–97.
- Doicrycz, S. J., y Suslick, K. S. (1990). *Interparticle Collisions Driven by Ultrasound*. 2(67), 1987–1989.
- Dore, A., Molinu, M. G., Venditti, T., y Dhallewin, G. (2010). Sodium bicarbonate induces crystalline wax generation, activates host-resistance, and increases imazalil level in rind wounds of oranges, improving the control of green mold during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7297–7304.
- Duga, A. T., Delele, M. A., Ruysen, K., Dekeyser, D., Nuyttens, D., Bylemans, D., Nicolai, B. M., y Verboven, P. (2017). Development and validation of a 3D CFD model of drift and its application to air-assisted orchard sprayers. *Biosystems Engineering*, 154, 62–75.
- Dumont, M. J., Orsat, V., y Raghavan, V. (2016). Reducing Postharvest Losses. In *Emerging Technologies for Promoting Food Security: Overcoming the World Food Crisis* (pp. 135–156). Woodhead Publishing.
- Fallanaj, F., Ippolito, A., Ligorio, A., Garganese, F., Zavanella, C., y Sanzani, S. M. (2016). Electrolyzed sodium bicarbonate inhibits *Penicillium digitatum* and induces defence responses against green mould in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 18–29.

- Fan, X., Sokorai, K. J. B., y Gurtler, J. B. (2020). Advanced oxidation process for the inactivation of Salmonella typhimurium on tomatoes by combination of gaseous ozone and aerosolized hydrogen peroxide. *International Journal of Food Microbiology*, 312(September 2019), 108387.
- Fernandez Oro, J. M. (2012). *Técnicas Numéricas en Ingeniería de Fluidos, Introducción a la Dinámica de Fluidos Computacional (CFD) por el método de Volúmenes Finitos*. Editorial Revere.
- Forbes, T. P. (2010). Electrohydrodynamics and ionization in the Array of Micromachined UltraSonic ElectroSpray (AMUSE) ion source [Georgia Institute of Technology]. In *ProQuest Dissertations and Theses* (Issue May).
- Forbes, T. P., Degertekin, F. L., y Fedorov, A. G. (2010). Electrochemical ionization and analyte charging in the Array of Micromachined UltraSonic ElectroSpray (AMUSE) ion source. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 645(2), 167–173.
- Forney, C. F., Fan, L., Hildebrand, P. D., y Song, J. (2001). Do negative air ions reduce decay of fresh fruits and vegetables? *Acta Horticulturae*, 553(June), 421–424.
- Gabba, M., Frallicciardi, J., van 't Klooster, J., Henderson, R., Syga, Ł., Mans, R., van Maris, A. J. A., y Poolman, B. (2020). Weak Acid Permeation in Synthetic Lipid Vesicles and Across the Yeast Plasma Membrane. *Biophysical Journal*, 118(2), 422–434.
- Gamagae, S. U., Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R. S., y Wijesundera, R. L. C. (2003). Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protection*, 22(5), 775–779.

- González-Estrada, R. R. (2017). *Elaboración y Caracterización Parcial de Películas y Recubrimientos Comestibles Adicionados con Agentes de Biocontrol y Antimicrobianos*. Instituto Tecnológico de Tepic.
- Hassenberg, K., Schuhmann, F., Ulrichs, C., Herppich, W. B., y Huyskens-keil, S. (2018). Effects of acetic acid vapour on the microbial status of ‘ Merchant ’ and ‘ Oktavia ’ sweet cherries (*Prunus avium* L .). *Food Control*, 90, 422–428.
- Hung, D. Van, Tong, S., Tanaka, F., Yasunaga, E., Hamanaka, D., Hiruma, N., y Uchino, T. (2011). Controlling the weight loss of fresh produce during postharvest storage under a nano-size mist environment. *Journal of Food Engineering*, 106(4), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.027>
- Iribarne, J. V., y Thomson, B. A. (1976). On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6), 2287–2294.
- Ismail, M., y Zhang, J. (2004). Post-harvest Citrus Diseases and their control. *Outlooks on Pest Management*, 15(1), 29–35.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., y Alizadeh, A. (2011). A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin*, 41(1), 65–71.
- Karabulut, O. A., Ilhan, K., Arslan, U., y Vardar, C. (2009). *Postharvest Biology and Technology Evaluation of the use of chlorine dioxide by fogging for decreasing postharvest decay of fig. 52*, 313–315.
- Kirpalani, D. M., y Toll, F. (2002). Revealing the physicochemical mechanism for ultrasonic separation of alcohol-water mixtures. *Journal of Chemical Physics*, 117(8), 3874–3877.

- Kooij, S., Astefanei, A., Corthals, G. L., y Bonn, D. (2019). Size distributions of droplets produced by ultrasonic nebulizers. *Scientific Reports*, 9(April).
- Kyanko, M. V., Russo, M. L., Fernández, M., y Pose, G. (2010). Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición poscosecha de frutas y hortalizas. *Informacion Tecnologica*, 21(4), 125–130.
- Ladanyia, M. (2008). Fruit morphology, anatomy, and physiology. In *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation* (Firts, pp. 103–124). Elsevier Inc.
- Lagopodi, A. L., Cetiz, K., Koukounaras, A., y Sfakiotakis, E. M. (2009). Acetic acid, ethanol and steam effects on the growth of *Botrytis cinerea* in vitro and combination of steam and modified atmosphere packaging to control decay in kiwifruit. *Journal of Phytopathology*, 157(2), 79–84.
- Lai, T., Bai, X., Wang, Y., Zhou, J., Shi, N., y Zhou, T. (2015). Inhibitory effect of exogenous sodium bicarbonate on development and pathogenicity of postharvest disease *Penicillium expansum*. *Scientia Horticulturae*, 187, 108–114.
- Lang, J. R. (1962). Ultrasonic Atomization of Liquids. *The Acoustical Society of America*, 28, 22–24.
- Lauder, B. E., y Spalding, D. B. (1974). The Numerical Computation of Turbulent Flow. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 3(10), 269–289.

- Legay, M., Gondrexon, N., Le Person, S., Boldo, P., y Bontemps, A. (2011). Enhancement of Heat Transfer by Ultrasound: Review and Recent Advances. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1–17.
- Leong, T. S. H., Martin, G. J. O., y Ashokkumar, M. (2017). Ultrasonic encapsulation – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 605–614.
- Liu, R., Liu, L., y Liu, J. (2009). Massive production of nanoparticles via mist reaction. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 41(7), 1197–1200.
- Magalhães Machado, D. L., Lopes De Siqueira, D., Chamhum Salomão, L. C., Cecon, P. R., y Pereira Da Silva, D. F. (2017). Evaluation of Rootstocks for “Tahiti” Acid Lime in northern State of minas Gerais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(1).
- Malo, S. E., y Campbell, C. W. (1994). *El limón persa en Florida*.
- Manasseh, R. (2017). *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry* (A. M. (ed.); Firts). Springer Science.
- Martins, M. A., de Oliveira, L. S., y Saraz, J. A. O. (2011). Numerical study of apple cooling in tandem arrangement. *DYNA (Colombia)*, 78(166), 158–165.
- Mason, T. J., y Lorimer, J. P. (2002). Applied Sonochemistry. In T. J. Mason y J. P. Lorimer (Eds.), *Practical Sonochemistry* (Firts). Wiley-VCH.
- Mason, T., y Peters, D. (2002). Practical Sonochemistry: Uses and Applications of Ultrasound. In T. Mason y D. Peters (Eds.), *Practical Sonochemistry* (Second, pp. 1–48). Woodhead Publishing.

- Mcnamara III, W. B., Didenko, Y. T., y Suslick, K. S. (2003). Pressure during Sonoluminescence. *The Journal of Chemical Physics*, 107, 7303–7306.
- Mei, L., Liang, Y., Zhang, L., Wang, Y., y Guo, Y. (2014). Induced systemic resistance and growth promotion in tomato by an indole-3-acetic acid-producing strain of *Paenibacillus polymyxa*. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 270–279.
- Mumtaz Khan, M., Al-Yahyai, R., y Al-Said, F. (2017). *The Lime: Botany, Production and Uses* (M. Mumtaz Khan, R. Al-Yahyai, y F. Al-Said (eds.); Firts). CABI.
- Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of Action of Bacterial Biological Control Agents. In *Biological Management of Diseases of Crops: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents* (pp. 1–673).
- Nasrin, T. A. A., Rahman, M. A., Arfin, M. S., Islam, M. N., y Ullah, M. A. (2020). Effect of novel coconut oil and beeswax edible coating on postharvest quality of lemon at ambient storage. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2(October 2019), 100019.
- Nomura, S., Sasaki, Y., Murakami, K., Nomura, S., Yamamoto, A., Murakami, K., Nomura, S., Murakami, K., y Sasaki, Y. (2002). Effects of Turbulence by Ultrasonic Vibration on Fluid Flow in a Rectangular Channel. *Japanese Journal of Applied Physics*.
- Nyborg, W. L. (1982). Ultrasonic microstreaming and related phenomena. *British Journal of Cancer*, 45(Suppl. 5), 156–160.
- Oh, S.-W., Dancer, G. I., y Kang, D.-H. (2016). Efficacy of Aerosolized Peroxyacetic Acid as a Sanitizer of Lettuce Leaves. *Journal of Food Protection*, 68(8), 1743–1747.

- Orij, R., Brul, S., y Smits, G. J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1810(10), 933–944.
- Palou, J., Smilanick, J. L., Usall, J., y Viñas, I. (2001). Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease*, 85(4), 371–376.
- Park, S. H., Choi, W., Kim, S. S., y Kang, D. H. (2019). CFD simulation for designing a chlorine gaseous sanitizer treatment system. *Food and Bioprocess Processing*, 117, 388–395.
- Perkins, M. L., Yuan, Y., y Joyce, D. C. (2017). Ultrasonic fog application of organic acids delays postharvest decay in red bayberry. *Postharvest Biology and Technology*, 133(June), 41–47.
- Pitt, J. I., y Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*.
- Qi, A., Yeo, L. Y., y Friend, J. R. (2008). Interfacial destabilization and atomization driven by surface acoustic waves. *Physics of Fluids*, 20(7).
- Raddatz-Mota, D., Franco-Mora, O., Mendoza-Espinoza, J. A., Rodríguez-Verástegui, L. L., Díaz de León-Sánchez, F., y Rivera-Cabrera, F. (2019). Effect of different rootstocks on Persian lime (*Citrus latifolia* T.) postharvest quality. *Scientia Horticulturae*, 257(July), 108716.
- Radi, M., Jouybari, H. A., Mesbahi, G., Farahnaky, A., y Amiri, S. (2010). Effect of hot acetic acid solutions on postharvest decay caused by *Penicillium expansum* on Red Delicious apples. *Scientia Horticulturae*, 126(4), 421–425.

- Ramaswamy, H. S. (2015). Post-harvest technologies of fruits and vegetables. In *McGill University* (Firts Edit, Issue I). DEStech Publications, Inc.
- Saenmuang, S., Al-Haq, M. I., Makino, Y., Kawagoe, Y., y Oshita, S. (2012). Particle size distribution of nano-mist in a spinach-storage atmosphere and its effect on respiration and qualities. *Journal of Food Engineering*, 112(1–2), 69–77.
- SAGARPA. (2012). *Información Técnica Complementaria para Exportar Limón Persa (Citrus latifolia Tanaka) de México a China*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2_82
- Santati, S., Thongsri, J., y Sarntima, P. (2019). Modified Small-Volume Jet Nebulizer Based on CFD Simulation and Its Clinical Outcomes in Small Asthmatic Children. *Journal of Healthcare Engineering*, 2019.
- Schuster, D. M. (2008). *NASA Perspective on Requirements for Development of Advanced Methods Predicting Unsteady Aerodynamics and Aeroelasticity*. March.
- Segurondo Loza, R. (2013). *Determinación de la genuinidad en jugos de naranja comercializados en los supermercados de la ciudad de La Paz*. 1, 105–112.
- Shafiur Rahman, M. (2007). *Handbook of Food Preservation* (M. Shafiur Rahman (ed.); Second Edi). Taylor y Francis Group.
- Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., y Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 37–43.

- Sholberg, P. (2009). Control of Postharvest Decay by Fumigation with Acetic Acid or Plant Volatile Compounds. *Fresh Produce*, 3(1993), 80–86.
- SIAP. (2018). *Avance de Siembras y Cosechas Resumen nacional por estado*. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Margosan, D. A., Mlikota Gabler, F., y Goodwine, W. R. (2005). Influence of pH and NaHCO₃ on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant Disease*, 89(6), 640–648.
- Smilanick, Joseph L., Mansour, M., y Sorenson, D. (2014). Performance of fogged disinfectants to inactivate conidia of *Penicillium digitatum* within citrus degreening rooms. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 134–140.
- Soriano-Melgar, L. de A. A., Raddatz-Mota, D., Díaz de León-Sánchez, F., Rodríguez-Verástegui, L. L., y Rivera-Cabrera, F. (2019). Effects of under-water cutting treatments on oleocellosis development, quality and shelf-life of minimally processed Persian lime fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 156(April).
- Tapia Peñafiel, C. A. (2015). *Estudio de la Aplicación de Tratamientos Físicos y Químicos en la Calidad de Col Blanca (Brassica oleracea var. capitata) Mínimamente Procesada con Dos Tipos de Empaque* [Escuela Politécnica Nacional].
- Timmons, C., Pai, K., Jacob, J., Zhang, G., y Ma, L. M. (2018). Inactivation of *Salmonella enterica*, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* by a novel surface discharge cold plasma design. *Food Control*, 84, 455–462.

- Tirawat, D., Flick, D., Mérendet, V., Derens, E., y Laguerre, O. (2017). Combination of fogging and refrigeration for white asparagus preservation on vegetable stalls. *Postharvest Biology and Technology*, 124, 8–17.
- Ueha, S., Maehara, N., y Mori, E. (1985). Mechanism of ultrasonic atomization using a multipinhole plate. *Journal of the Acoustical Society of Japan (E)*, 6(1), 21–26.
- Umeno, Y., Hung, D. Van, Tanaka, F., Hamanaka, D., y Uchino, T. (2015). The use of CFD to simulate temperature distribution in refrigerated containers. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 8(4), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2015.03.002>
- Utrilla, P. (2016). *Validación De Resultados Mediante CFD*. <https://docplayer.es/67496041-8-validacion-de-resultados-mediante-cfd.html>
- V. Patankar. (1980). *Numerical Heat Transfer and Fluid Flow*. Taylor and Fransis Publisher since 1789.
- Vaccari, C., Velde, F. Van De, y Piagentini, A. M. (2015). Optimization of strawberry disinfection by fogging of a mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide based on microbial reduction , color and phytochemicals retention. *Food Science and Techonology International*, 1, 1–11.
- Vadiveloo, M., Principato, L., Morwitz, V., y Mattei, J. (2019). Sensory variety in shape and color influences fruit and vegetable intake, liking, and purchase intentions in some subsets of adults: A randomized pilot experiment. In *Food Quality and Preference* (Vol. 71).

- Vardar, C., Ilhan, K., y Karabulut, O. A. (2012). The application of various disinfectants by fogging for decreasing postharvest diseases of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 66, 30–34.
- Velde, V. De, y Pirovani, A. M. (2016). Nueva tecnología postcosecha de desinfección por nebulización con ácido peracético en frutillas. 1(88), 36–49.
- Velde, F., Grace, M. H., Élida, M., y Ann, M. (2016). Postharvest Biology and Technology Impact of a new postharvest disinfection method based on peracetic acid fogging on the phenolic profile of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 117, 197–205.
- Venditti, T., Ladu, G., Cubaiu, L., Myronycheva, O., y D'hallewin, G. (2017). Repeated treatments with acetic acid vapors during storage preserve table grapes fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*, 125, 91–98.
- Yang, T., Zhao, B., Kinchla, A. J., Clark, J. M., y He, L. (2017). Effectiveness of Commercial and Homemade Washing Agents in Removing Pesticide Residues on and in Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9744–9752.
- Yasui, K., Tuziuti, T., Sivakumar, M., Iida, Y., Yasui, K., Tuziuti, T., Sivakumar, M., y Iida, Y. (2005). Theoretical study of single-bubble sonochemistry Theoretical study of single-bubble sonochemistry. *The Journal of Chemical Physics*, 122.
- Yeo, L. Y., Friend, J. R., McIntosh, M. P., Meeusen, E. N., y Morton, D. A. (2010a). Ultrasonic nebulization platforms for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(6), 663–679.
- Yeo, L. Y., Friend, J. R., McIntosh, M. P., Meeusen, E. N., y Morton, D. A. (2010b). Ultrasonic nebulization platforms for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(6), 663–679.

- Youssef, K., Ligorio, A., Sanzani, S. M., Nigro, F., y Ippolito, A. (2012). Control of storage diseases of citrus by pre- and postharvest application of salts. *Postharvest Biology and Technology*, 72, 57–63.
- Youssef, K., Sanzani, S. M., Ligorio, A., Ippolito, A., y Terry, L. A. (2014). Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 61–69.
- Yu, T., y Zheng, X. D. (2007). Indole-3-acetic acid enhances the biocontrol of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear fruit by *Cryptococcus laurentii*. *FEMS Yeast Research*, 7(3), 459–464.
- Zhang, J., Jiang, L., Sun, C., Jin, L., Lin, M., Huang, Y., Zheng, X., y Yu, T. (2018). Indole-3-acetic acid inhibits blue mold rot by inducing resistance in pear fruit wounds. *Scientia Horticulturae*, 231(October 2017), 227–232.
- Zhang, P., y Zhou, Z. (2019). Postharvest ethephon degreening improves fruit color, flavor quality and increases antioxidant capacity in 'Eureka' lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). *Scientia Horticulturae*, 248(January), 70–80.
- Zhu, C., Chen, Z., y Yu, G. (2013). Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 63(2), 495–502.