

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Aplicación de Quitosano con Aceites Esenciales
contra *Botrytis cinerea* Pers. “Moho Gris” en
Lycopersicon esculentum P. Mill “Tomate”.**

Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciado en Biología

Mario Ricardo Ruiz Burga

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

*A Dios,
en quien vivimos,
nos movemos y existimos*

*A mi mamá,
que ha dado todo por mí,
por su aliento y amor.*

A la memoria de mi papá.

“Nada conquista excepto la verdad y la victoria de la verdad es el amor”

San Agustín, Sermones 358, 1. “Victoria veritatis est caritas.”

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña, por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su asesoría, por su orientación, enseñanzas, paciencia y amistad en todo este tiempo.

A los miembros de mi jurado calificador: al profesor Alcides Guerra, profesor Enzo Foy y al profesor Franco Ceino.

A la empresa Farmex, en especial al Sr. Carlos Melgar Vargas, con quien tuve el contacto e hizo posible que se me ceda una muestra de Botridum®. ¡Muchas gracias!

A los alumnos del curso de biología (primer ciclo) y del electivo de Microbiología de los alimentos, los cuales aceptaron muy amablemente y con entera disposición ser parte de esta investigación.

A mis amigos de la universidad, a mi promoción “Runa Hamutay”, a Matia, Víctor Anderson, Nadia, Angela, Eunice, Franklin, Claudia, Fiorella y Ricardo. Muchas gracias a todos por el tiempo compartido, su amistad y el aliento para realizar mi tesis.

A Mariella, quien me visitaba en el laboratorio y aprovechaba en ayudarme con mis experimentos, por su interés, consejos en la parte de la evaluación sensorial que abarca la psicología experimental y sobre todo darme ánimos cuando lo necesitaba.

Al Dr. David Talledo, que lo considero mi mentor dentro de mi carrera y a quien debo mucho, por su apoyo brindado en mi formación académica.

Y no menos importante, a toda mi familia, mi mamá, mi hermana Gina, al Padre Ernesto, a la Comunidad Apostólica Tierra Santa, por su interés y aliento. Fueron la motivación que me ayudó para culminar con éxito mi tesis.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ABREVIACIONES	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	13
1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
1.4 OBJETIVO GENERAL.....	15
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
II. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 Generalidades de <i>Lycopersicon esculentum</i> “tomate”	16
2.1.1 Descripción taxonómica (D’Arcy, 1972; I. Peralta et al., 2008)	16
2.1.2 Origen.....	16
2.1.3 Breve descripción botánica	17
2.1.4 Hongos fitopatógenos del tomate.....	18
2.2 Generalidades de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. “moho gris”	18
2.2.1 Descripción taxonómica (Garcés de Granada, 1992; García, 2017). 18	
2.2.2 Breve descripción botánica	18
2.2.3 Síntomas de la infección por <i>B. cinerea</i>	19
2.3 Quitosano	20
2.4 Aceites esenciales.....	20
2.4.1 Aceite esencial de <i>O. vulgare</i> “orégano”,	20
2.4.2 Aceite esencial de <i>C. aurantifolia</i> “limón sutil”.....	21
III. ANTECEDENTES.....	22
IV. HIPÓTESIS.....	25

4.1	Hipótesis general.....	25
4.2	Hipótesis específicas	25
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1	Lugar de ejecución	26
5.2	Material Biológico	26
5.3	Reactivos	26
5.4	Preparación del material biológico.....	27
5.5	Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de QUI y AECA o AEOV en el crecimiento micelial.....	27
5.6	Preparación del revestimiento compuesto por quitosano y aceites esenciales de limón y orégano y formación de la biopelícula.....	28
5.7	Aplicación de revestimientos compuestos de QUI, AECA y AEOV en frutos de tomate.....	28
5.8	Efecto de los revestimientos combinados de QUI y AECA o AEOV sobre la severidad de infección de <i>B. cinerea</i> en frutos de tomate.....	29
5.9	Análisis sensorial del tomate.....	30
5.10	Análisis estadístico.....	30
VI.	RESULTADOS.....	32
6.1	Efectos del QUI, AECA y AEOV en el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y en el porcentaje de inhibición.	32
6.2	Formación de la biopelícula compuesta por combinaciones de QUI, AECA y AEOV	32
6.3	Efecto del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en el área y porcentaje de infección en frutos de tomate	32
6.4	Efecto del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en la severidad de infección en frutos de tomate.	33
6.5	Efecto del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en el análisis sensorial, intención de compra y preferencias de consumo en frutos de tomate.	34
VII.	DISCUSIÓN	35
VIII.	CONCLUSIONES	38
IX.	RECOMENDACIONES	40

XI. ANEXOS	48
Figuras.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i> _____	60
<i>%ICM de Botrytis cinerea después de quince días de exposición de QUI, AECA o AEOV en medio sólido (Agar extracto de malta)</i> _____	60
<i>Tabla 2</i> _____	60
<i>Valores de las medias en el análisis sensorial, intención de compra y preferencias de consumo del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en frutos de tomate</i> _____	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura química del carvacrol (García & Palou, 2008)	48
Fig. 2 Estructura química del limoneno (García & Palou, 2008)	48
Fig. 3 Infección característica de <i>B. cinerea</i> en frutos de tomate. (Harrison, 2010)	49
Fig. 4 Estructura molecular del quitosano (Xing et al., 2016)	49
Fig. 5 Inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> in vitro.	50
Fig. 6 Preparación de la biopelícula de quitosano y aceites esenciales de <i>Citrus aurantifolia</i> y <i>Origanum vulgare</i> .	51
Fig. 7 Aplicación de los revestimientos y formación de la biopelícula en tomates.	52
Fig. 8 Empaque y almacenamiento de los tomates (a – e) y <i>Botrydium</i> ® (f)	53
Fig. 9 Comparación de la infección entre los tomates sin recubrimientos, tratados con <i>Botrydium</i> ® y con la biopelícula.	54
Fig. 10 Análisis sensorial – Encuesta de degustación	55
Fig. 11 Efecto del aceite esencial de limón (AECA 20 μ L/mL) en la inhibición del diámetro de crecimiento de <i>B. cinerea</i> en Agar EM.	55
Fig. 12 Efecto de las diferentes combinaciones de AEOV, AECA y QUI en el área de infección de <i>B. cinerea</i> en frutos de tomate.	56
Fig. 13 Efecto de las diferentes combinaciones de AEOV, AECA y QUI en el porcentaje de infección de <i>B. cinerea</i> en frutos de tomate.	56
Fig. 16 Valores promedio de los parámetros sensoriales en frutos de tomate sin recubrimiento y recubiertos con QUI, AECA y AEOV en diferentes concentraciones	58
Fig. 17 Intención de compra de los tomates con distintos recubrimientos	58
Fig. 18 Preferencia de los consumidores en los tomates con diferentes recubrimientos	59

ABREVIACIONES

QUI – Quitosano

CHI – (Inglés) Chitosan

AEOV – Aceite esencial de *Origanum vulgare*

OVEO – (Inglés) *Origanum vulgare* essential oil

AECA – Aceite esencial de *Citrus aurantifolia*

CAEO – (Inglés) *Citrus aurantifolia* essential oil

EM – Extracto de malta

%ICM – Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

%MGI – (Inglés) Mycelial growth inhibition

%SI – Severidad de infección

%IS – (Inglés) Infection severity

Cil. – Cilindro

μL – Microlitro

mL – Mililitro

mg – Miligramo

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de la aplicación de quitosano y aceites esenciales de *Citrus aurantifolia* y *Origanum vulgare* para prevenir infecciones por *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre gris en *Lycopersicon esculentum* “tomate”. Los efectos de los recubrimientos sobre las características sensoriales de los tomates también fueron evaluados. Todas las concentraciones probadas *in vitro* de AEOV (10 µL/mL, 5 µL/ml, 2.5 µL/mL y 1.25 µL/mL) y QUI (4 mg/mL y 8 mg/mL) resultaron en un 100% ICM para *B. cinerea*. Por otro lado, AECA 20 µL/mL originó valores entre 40-47% ICM. La aplicación de los revestimientos de QUI 4 µL/mL + AEOV 5 µL/mL disminuyeron significativamente la severidad de infección de la podredumbre gris en tomates artificialmente contaminados por *B. cinerea*. La SI en tomates tratados con los recubrimientos de quitosano y aceites esenciales fue similar o menor que la observada en los tomates tratados con fungicida sintético (Iprodione 0.8mg/mL + Myclobutanil 0.1 mg/mL). Los recubrimientos de quitosano y aceites esenciales preservaron la calidad sensorial de los tomates. Estos resultados sugieren que los recubrimientos compuestos por QUI y AEOV pueden llegar a ser un tratamiento alternativo prometedor para diversos frutos y alimentos debido a su carácter natural, la actividad antimicrobiana mejorada y al no desarrollar resistencia en los patógenos.

Palabras clave: Quitosano, aceites esenciales, *Citrus aurantifolia*, *Origanum vulgare*, *Botrytis cinerea*, *Lycopersicon esculentum*.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the efficacy of the application of chitosan and essential oils of *Citrus aurantifolia* and *Origanum vulgare* to prevent infections by *Botrytis cinerea*, which causes gray rot in tomato. The effects of the coatings on the sensory characteristics of the tomatoes were also evaluated. All concentrations tested *in vitro* of AEOV (10 $\mu\text{L} / \text{mL}$, 5 $\mu\text{L} / \text{mL}$, 2.5 $\mu\text{L} / \text{mL}$ and 1.25 $\mu\text{L} / \text{mL}$) and QUI (4 mg / mL and 8 mg / mL) resulted in 100% MGI for *B. cinerea*. Otherwise, AECA 20 $\mu\text{L} / \text{mL}$ originated values between 40-47% ICM. The application of coatings comprising QUI 4 $\mu\text{L} / \text{mL}$ + AEOV 5 $\mu\text{L} / \text{mL}$ significantly decreased the infection severity of gray rot in tomatoes artificially contaminated with *B. cinerea*. The IS in tomatoes treated with the combinations of chitosan and essential oils was similar or lower than that observed in the tomatoes treated with synthetic fungicide (Iprodione 0.8mg / mL + Myclobutanil 0.1 mg / mL). The coatings comprising chitosan and essential oils preserved the sensorial quality of the tomatoes. These results suggest that the coatings composed of QUI and AEOV could become a promising alternative treatment for various fruits and foods due to their natural character, the improved antimicrobial activity and to not develop resistance in pathogens.

Keywords: Chitosan, essential oils, *Citrus aurantifolia*, *Origanum vulgare*, *Botrytis cinerea*, *Lycopersicon esculentum*.

I. INTRODUCCIÓN

El tomate, (*Lycopersicon esculentum* Mill.), es una planta perteneciente a la familia Solanáceas, cuyo centro de origen se ubica en los andes peruanos. En el Perú, el tomate es ampliamente cultivado todo el año principalmente en la costa, dentro de las regiones de La Libertad, Barranca, Chancay, Huaral, Huacho, Lima, Mala, Cañete, Ica, Arequipa, Lambayeque, entre otros.

En cuanto al hongo *Botrytis cinerea* “moho gris”, causa serias pérdidas económicas en la etapa de postcosecha del tomate. Usualmente, este problema se enfrenta rociando fungicidas sintéticos, lo que genera que el patógeno aumente su resistencia y, por tanto, se aumente la dosis. Mas aún, se conoce que el uso indiscriminado de agroquímicos fungicidas ocasiona daños sobre la salud humana y genera impacto ambiental negativo en los suelos.

En los últimos diez años, se ha estado investigando el desarrollo de revestimientos basados en biopolímeros y aceites esenciales como conservantes de alimentos para controlar el crecimiento de hongos y bacterias en frutas y verduras. Así, los investigadores han encontrado sustancias alternativas seguras para disuadir el uso de productos sintéticos en los frutos. Por el contrario, el uso de películas comestibles de quitosano con aceites esenciales es un método natural para preservar la calidad de las frutas y hortalizas. Los aceites esenciales pueden añadirse a los revestimientos de quitosano para retardar el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos durante el almacenamiento y en la distribución. En efecto, ha sido considerado como una tecnología ecológica de valor agregado para controlar la descomposición fúngica debido a su biodegradabilidad, baja fitotoxicidad y ser comestible. Esta combinación sinérgica o aditiva entre el quitosano y aceites esenciales se ha convertido en un tratamiento alternativo prometedor para diversos frutos y alimentos debido a su carácter natural, la actividad antimicrobiana mejorada y al no desarrollar resistencia en los patógenos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la eficacia de la aplicación combinada de quitosano y aceites esenciales de *C. aurantifolia* y *O.*

vulgare como revestimiento para controlar infecciones causadas por *B. cinerea*, en tomate.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tomate es susceptible al hongo *B. cinerea* “moho gris” (Liu et al., 2007; Shao et al., 2015), lo que da lugar a importantes pérdidas económicas (Guerra et al., 2015). Por esta razón, es muy importante que se controle esta enfermedad, sobre todo durante el transporte en frío, almacenamiento y en los anaqueles de mercados, porque las esporas se desarrollan a temperaturas bajas y tienden a propagarse rápidamente, generando contaminación cruzada entre otras frutas y verduras (Badawy et al., 2009; Mohammadi et al., 2015b).

Usualmente, este problema se enfrenta rociando fungicidas sintéticos (por ejemplo, benzamidazoles, hidrocarburos aromáticos e inhibidores de la biosíntesis de esteroides). Sin embargo, esto genera que el organismo desarrolle resistencia al antifúngico, lo que resulta que se aumente la dosis del agroquímico, induciendo el uso indiscriminado de una mayor dosis de antifúngicos en la agricultura y por ello la aparición de mayores cantidades de residuos tóxicos en los alimentos (Daniel et al., 2015; Guerra et al., 2015; Munhuweyi et al., 2017; Sangsuwan et al., 2016).

Por estas razones, existe una mayor conciencia de la naturaleza potencialmente dañina de estos compuestos químicos sobre la salud humana e impacto ambiental negativo que produce el uso indiscriminado de agroquímicos fungicidas (Barreto et al., 2016; Daniel et al., 2015).

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe una alternativa de solución que pueda evitar y/o reducir infecciones producidas por *B. cinerea* en *L. esculentum* (tomate), que sea natural, que no cause daño al ser consumidos y sea amigable con el medio ambiente disminuyendo el uso de agroquímicos?

1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En la actualidad, la preferencia de los consumidores se ha enfocado hacia alimentos que contengan los más bajos niveles de conservantes sintéticos y que presenten características más naturales. En este contexto, el uso de películas comestibles o recubrimientos de quitosano con aceites esenciales es un método natural alternativo para preservar la calidad de las frutas y hortalizas. Ha sido considerada como una tecnología ecológica para controlar infecciones postcosecha debido a su biodegradabilidad y baja fitotoxicidad. La reducción de las pérdidas resultantes de la pudrición fúngica es un objetivo fundamental de la tecnología postcosecha, que busca utilizar métodos eficaces para controlar la contaminación y el crecimiento de hongos fitopatógenos. (Guerra et al., 2015, 2016).

La presión de los consumidores por alimentarse de productos que no presenten agroquímicos sintéticos para tratar las infecciones ha llevado a los investigadores a desarrollar nuevas películas naturales comestibles. Estos recubrimientos son considerados como una biotecnología respetuosa con el ambiente para prolongar la vida útil de las frutas. Por lo tanto, cada vez se hace más hincapié en las tecnologías que no impacten negativamente al ambiente, y la búsqueda de alternativas más seguras a los fungicidas químicos tóxicos (Fagundes et al., 2013).

Por consiguiente, en este trabajo se realizó la combinación entre el quitosano y aceites esenciales de *C. aurantifolia* y *O. vulgare*, ya que es un tratamiento alternativo, natural y prometedor para el tomate debido a su carácter anti-fúngica y de no desarrollar resistencia. De hecho, el quitosano es un revestimiento ideal para conservar las frutas y hortalizas frescas debido a sus propiedades bioquímicas y les confiere una vida prolongada de almacenamiento y al reducir las pérdidas en la postcosecha. (Badawy et al., 2009). También, la demostrada capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano, por sus principios activos como el timol y el carvacrol (J. Dos Santos et al., 2017; García et al., 2008; Haberbeck et al., 2012) y del aceite esencial de limón, cuya capacidad antifúngica es mediada principalmente por el limoneno (Perdones et al., 2012; Simas et al., 2017; Vitoratos et al., 2013).

1.4 OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la aplicación combinada de quitosano y aceites esenciales de *C. aurantifolia* “limón sutil” y *O. vulgare* “Orégano” como tratamiento postcosecha contra infecciones causadas por *B. cinerea*, en *L. esculentum* “tomate”.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar *in vitro* por separado el %ICM del quitosano, aceite de *O. vulgare* y *C. aurantifolia*.

Preparar diferentes revestimientos combinados de quitosano con aceites esenciales de *O. vulgare* y *C. aurantifolia*.

Comprobar la formación de la biopelícula con quitosano, y aceites esenciales de *O. vulgare* y *C. aurantifolia*.

Evaluar y comparar *in vivo* el efecto de los revestimientos de QUI, AECA y AEOV y un fungicida sintético en la severidad de infección producida por *B. cinerea* en frutos de tomate.

Verificar la influencia de los revestimientos en las características sensoriales de los frutos de tomate mediante una encuesta de degustación al público.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Lycopersicon esculentum* “tomate”

2.1.1 Descripción taxonómica (D’Arcy, 1972; I. Peralta et al., 2008)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i>
Subgénero:	<i>Potatoe</i>
Sección:	<i>Lycopersicon</i>
Especie:	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (= <i>Solanum lycopersicum</i> L.)

Número de cromosomas: $2n = 24$ (Blancard, 2012).

2.1.2 Origen

El centro de origen del tomate se ubica en los andes peruanos, sin embargo, su centro de diversificación es mesoamericano y fue domesticado por los Aztecas. Luego fue introducido en España e Italia y luego al resto de Europa en la primera mitad del siglo XVI (Blancard, 2012).

En 1544, el botánico italiano Pietro Matthioli Andreas hace la primera mención del tomate en el viejo mundo, el cual los describió como frutas aplanadas, acanaladas y con colores que van del verde al dorado, luego, diez años más tarde, menciona que existen también tomates rojos. Cabe destacar que el nombre italiano del tomate “pomodoro”, “pomi d’oro” – manzana dorada – confirma que los

primeros tomates llevados a Europa fueron amarillos (Blancard, 2012; I. E. Peralta et al., 2006).

Una hipótesis propuesta en 1886 por Alfonso De Candolle, basándose en evidencia lingüística como los nombres “mala peruviana” o “pommi del peru” (manzana peruana), sugiere un origen peruano. Por otro lado, se tiene la hipótesis mexicana, que fue propuesta en 1948 por Jenkins, el cual también empleó evidencia lingüística, ya que la palabra tomate viene del nahuátl “tomatl”, sin embargo, Jenkins no estaba seguro si se hacía referencia a la especie *Physalis philadelphica*, una especie nativa conocida como “tomate” o “tomatillo” o al “jitomatl” en referencia a las plantas cultivadas *Lycopersicon esculentum*. Es en este punto donde Jenkins coincide con De Candolle sobre el origen sudamericano de *L. esculentum* pero difiere en que Perú fue el centro de diversificación (Knapp et al., 2016; I. E. Peralta et al., 2006).

2.1.3 Breve descripción botánica

En cuanto el tallo, este es simpódico con un patrón de crecimiento indeterminado. Las hojas son imparipinnadas con los folíolos peciolados y con bordes mellados. Por otro lado, las flores se presentan en grupos de 5 a 12 flores. Puede ser pentámera y el ovario contiene de 2 a 10 carpelos. Los estambres son conniventes y presentan dehiscencia longitudinal introrsa. Con respecto a los frutos, dichos son de tipo baya; varían en tamaño, color y textura dependiendo de la variedad. La forma varía mucho, llegando a ser achatados, cilíndricos, elipsoides, periformes, etc. Asimismo, cabe resaltar que el color es predominantemente rojo (Blancard, 2012).

Por su parte, el tomate (*L. esculentum* P. Mill) es un fruto con excelentes fuentes de precursores de vitaminas (por ejemplo, licopeno, betacaroteno, polifenoles y quercetina) con reconocidas capacidades antioxidantes y potenciales beneficios para la salud. El tomate tiene una vida de anaquel relativamente corta, generalmente limitada por la humedad, transpiración, enfermedades postcosecha y el aumento de la velocidad de maduración. Estos frutos son susceptibles a

enfermedades causadas por diferentes hongos patógenos, lo que da lugar a importantes pérdidas económicas (Guerra et al., 2015).

2.1.4 Hongos fitopatógenos del tomate

Los hongos fitopatógenos que más causan enfermedades en tomate son: *B. cinerea* (moho gris) *Penicillium expansum* (moho azul), *Aspergillus niger* (moho negro) y *Rhizopus stolonifer* (moho suave) (Liu et al., 2007; Shao et al., 2015).

2.2 Generalidades de *Botrytis cinerea* Pers. “moho gris”

2.2.1 Descripción taxonómica (Garcés de Granada, 1992; García, 2017)

	Estado sexual	Estado asexual
Reino:	Fungi	Fungi
División:	Ascomycota	Ascomycota
Clase:	Discomycetes	Hyphomycetes
Orden:	Heliotales	Moniliales
Familia:	Sclerotineaceae	Botrydiaceae
Género:	<i>Botryotinia</i>	<i>Botrytis</i>
Especies:	<i>B. fuckeliana</i> (de Bary)	<i>B. cinerea</i> Pers.

2.2.2 Breve descripción botánica

B. cinerea Pers. es la forma asexual del hongo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, que es la forma sexual poco común en la naturaleza. Si bien se suele designar a los hongos el estado teleomorfo, en este caso, el estado *B. cinerea* es el más reconocido por los micólogos y fitopatologías (Benito, 2010; García, 2017). *B. cinerea* posee un micelio tabicado, con hifas de aspecto algodonoso, con un tamaño de 11-23 µm de diámetro. En cuanto a los conidióforos, son de 1-3 mm de

largo. Con respecto a los conidios, son ovoides, con un tamaño de 10-12 μm por 8-10 μm , unicelulares y ligeramente grisáceos. En un cultivo in vitro, el micelio crece profusamente, con un color blanco que cambia luego a un marrón oliva grisáceo (Benito, 2010; García, 2017).

2.2.3 Síntomas de la infección por *B. cinerea*

La podredumbre gris, causada por *B. cinerea* “moho gris” exhibe como síntoma más característico la aparición de un “algodón” peludo grisáceo (fig. 3), que son masas de esporas, cubriendo el área infectada. A menudo comienza en partes dañadas o en cualquier tejido en descomposición. Cuando se sacuden, las nubes de esporas se liberan de estas áreas infectadas. Pueden expandirse rápidamente cubriendo tallos, hojas o pétalos (Harrison et al., 2010; Zitter, 1986).

Las infecciones pueden provocar defoliación severa, muerte de las flores, reducción del valor comercial de las frutas, quebrar el vástago entero cuando la infección por el moho gris es severa y causar el marchitamiento de las plantas sobre el área infectada. Los pétalos de flores caídos y las heridas de mal manejo en la poda en los tallos son ejemplos de puntos de infección (Borges et al., 2014; Harrison et al., 2010). Las flores son particularmente susceptibles. El polen y las partes de la flor pueden actuar como un estimulante de las esporas de *B. cinerea*, no sólo estimulando la germinación, sino también aumentando su virulencia. En el campo, el hongo aparece sobre flores moribundas y sobre el cáliz de la fruta (Zitter, 1986). Otro síntoma de moho gris es la producción de halos plumizos en la fruta (fig. 9). Estos son causados por infecciones parciales que dejan de desarrollarse antes de que la fruta se pudra. Estas máculas blancas a manera de halo aparecen en la fruta y persisten hasta cuando el fruto madura. En ese momento el color de los halos cambia de blanco a amarillo. Este síntoma resulta de la germinación y penetración de las esporas en la fruta. La penetración del micelio de *B. cinerea* en la fruta produce alelopatía, que impide cualquier crecimiento micelial adicional y da lugar a la localización del patógeno. El halo se forma alrededor del punto de entrada (Harrison et al., 2010; Zitter, 1986).

2.3 Quitosano

El quitosano (fig. 4) es un polisacárido lineal derivado de la desacetilación de la quitina, un abundante biopolímero natural que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, paredes celulares de hongos y otros materiales biológicos, la cual se compone unidades de N-acetil-glucosamina, o poli $\beta - (1 - 4) - 2 - \text{acetamido} - D - \text{glucosa}$ (Guerra-Sánchez et al., 2009). El quitosano se considera un producto no tóxico, biodegradable, funcional y biocompatible, con propiedades antimicrobianas (Badawy et al., 2009; Sathivel et al., 2007).

2.4 Aceites esenciales

Por otra parte, los aceites esenciales se sintetizan naturalmente en diferentes plantas como metabolitos secundarios a partir de terpenos, caracterizándose como líquidos aromáticos (volátiles) y aceitosos (Asbahani et al., 2015). Los aceites esenciales han sido objeto de estudio por su conocida y demostrada actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de la diversidad de hongos fitopatógenos y generalmente son seguros de consumir junto con los alimentos en pequeñas dosis (de Souza, 2016). Además, las bacterias u hongos no desarrollan resistencia ante los principios activos (J. Dos Santos et al., 2017; Marinelli et al., 2012).

2.4.1 Aceite esencial de *O. vulgare* “orégano”,

El aceite esencial de *O. vulgare* está constituido en un 67 –86 % por carvacrol, y otros aceites como timol, p-cimeno, linalol, α -pineno, mirceno, trans- β -cariofileno, σ -cimol y γ -terpineno (Barreto et al., 2016; Boskovic et al., 2015; J. Dos Santos et al., 2017), que actúan en sinergia para producir el efecto antimicrobiano. Su principal componente, el carvacrol, o 2-metil-5-(1-metiletil) fenol), presenta una estructura química conformada por un anillo aromático (fenol), el cual le otorga propiedades hidrofóbicas (fig. 1).Éste mecanismo de acción ha llamado la atención por sobre todos los agentes microbianos naturales: es capaz de disociar el peptidoglicano de las membranas externas de microorganismos, generando que se pierda lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la

membrana citoplasmática, con esto, se pierde ATP y el microorganismo muere (García et al., 2008).

2.4.2 Aceite esencial de *C. aurantifolia* “limón sutil”

El aceite esencial de *C. aurantifolia*, está compuesto principalmente por limoneno (31 – 85.5%), y otros aceites como el timol, mirceno, α -pineno, linalol, sabineno β -pineno. α -terpineol, γ -terpineno, γ -ter-pinen-7-al, p-cimeno (Fouad & da Camara, 2017; Gamarra et al., 2006; Razzaghi-Abyaneh et al., 2009; Simas et al., 2017) que actúan en sinergia para producir el efecto antimicrobiano. Al igual que en el caso del carvacrol, el mecanismo de acción del limoneno es similar, debido a su estructura química semejante (fig. 2).

La aplicación de aceites esenciales en la etapa de pre o postcosecha ha sido considerada como un tratamiento alternativo al uso de fungicidas sintéticos para prevenir la descomposición, ampliando la vida de anaquel de las frutas y vegetales. Aunque los aceites esenciales han demostrado ser buenos agentes antimicrobianos, presentan compuestos volátiles que se degradan a causa del calor, presión, luz y oxígeno, limitando su uso para mantener la calidad de la fruta y reducir la descomposición por mohos. Además, son insolubles en agua, y para ciertas aplicaciones es necesaria una liberación controlada. Es por esta razón que, al emplear quitosano como vehículo para los aceites esenciales, le proporciona más área superficial y posiblemente mejora la solubilidad, biodisponibilidad y los compuestos de los aceites se liberan controladamente con el fin de mejorar sus actividades antimicrobianas (Mohammadi et al., 2015b).

III. ANTECEDENTES

En la última década, varios estudios se han centrado en el desarrollo de revestimientos basados en biopolímeros y aceites esenciales como conservantes naturales de alimentos para controlar el crecimiento microbiano en frutas y verduras (Fagundes *et al.*, 2013). Precisamente, los investigadores han estado en la búsqueda de sustancias alternativas más seguras para reducir el uso de fungicidas sintéticos en los frutos (C. De Oliveira *et al.*, 2014; N. Dos Santos *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2007). Los aceites esenciales pueden añadirse a los revestimientos comestibles de películas de quitosano para retardar el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos durante el almacenamiento y en la distribución de productos frescos (Khalili *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2015). Estos tratamientos han sido eficaces para retrasar el crecimiento de microorganismos contaminantes y mantener la calidad de productos hortícolas.

El siguiente punto trata acerca de la evaluación de diferentes tratamientos para controlar la infección por mohos en la postcosecha de los tomates. Los aceites esenciales de *O. vulgare* y *C. aurantifolia*, incluyendo los de tomillo, salvia y romero, mostraron una actividad inhibitoria contra patógenos fúngicos como *Alternaria alternata* o *Aspergillus spp* (Feng *et al.*, 2007; Khalili *et al.*, 2015; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2009; Vitoratos *et al.*, 2013; Znini *et al.*, 2011). Algo semejante ocurre con el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” para el control de *R. stolonifer* en frutos de tomate. Al igual que el aceite esencial de *C. aurantifolia*, el aceite esencial de hierba luisa se compone de limoneno (Athayde *et al.*, 2016).

Al emplear el quitosano, se crea un vehículo para los aceites esenciales, permitiendo reducir la permeabilidad al agua, mejorando la eficacia antimicrobiana, porque los principios activos de los aceites esenciales son liberados en la superficie de la fruta con el transcurrir del tiempo, además de las propiedades antimicrobianas inherentes del biopolímero (Athayde *et al.*, 2016; Barreto *et al.*, 2016; N. Dos Santos *et al.*, 2012).

. De la misma manera, los tratamientos con quitosano proporcionaron un control efectivo de las enfermedades del tomate causadas por *B. cinerea* y *P. expansum* (Badawy et al., 2009; Liu et al., 2007; Sangsuwan et al., 2016) y aún mejor, se verificó que los tratamientos combinados mostraron alta actividad antimicrobiana al reducir la pudrición negra causada por *A. alternata*, y en general, muchos trabajos reportan que la sinergia entre quitosano y aceites esenciales inhiben mejor el crecimiento fúngico. (Athayde et al., 2016; Sabaghi et al., 2015; Shao et al., 2015).

Por otro lado, este tratamiento combinado para tratar diversos tipos de hongos, incluido *B. cinerea*, no es exclusivo para tomate, sino también es aplicado a las manzanas, uvas, fresas, granadas, frutos cítricos, entre otras. Se logró inhibir *B. cinerea* en fresas con un tratamiento compuesto por perlas de quitosano, más aceites esenciales de lavanda y tomillo rojo. Se encontró que el tratamiento de quitosano con aceite esencial de romero logró inhibir a *B. cinerea*, tanto en altas como en bajas concentraciones. La eficacia del tratamiento se ensayó también con fresas envasadas, las cuales se almacenaron a 7°C durante 10 días. En el día 10, se observó que los tratamientos combinados retrasaron mejor la descomposición de la fresa, a comparación con los tratamientos de sólo quitosano. Asimismo, el aceite de romero resultó ser más eficiente que el de lavanda. (Sangsuwan et al., 2016). Este comportamiento fue igual en otro ensayo con aceite esencial de limón, el cual potenció la actividad antifúngica del quitosano tanto en ensayos in vitro como durante el almacenamiento en frío en fresas inoculadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea* (Perdones et al., 2012).

Todas las observaciones se relacionan también con los efectos de los revestimientos con quitosano con aceite esencial de menta (*Mentha piperita* o *M. villosa*) y aceite esencial de orégano (*O. vulgare* L.) para controlar las infecciones por *A. niger*, *B. cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer* en uva de mesa “Isabella” (*Vitis labrusca* L.). Los revestimientos que contenían quitosano y aceite esencial de menta u orégano retrasaron el crecimiento del moho en las uvas durante el almacenamiento a temperatura ambiente y temperaturas bajas. Hay que mencionar, además, que el aceite esencial de *O. vulgare* inhibió la germinación de esporas, causando cambios morfológicos. La actividad antifúngica se dio incluso al aplicar

concentraciones sub inhibitorias. Asimismo, los tratamientos no afectaron el sabor de las uvas. A partir de estos resultados, los tratamientos que contenían aceite esencial de menta potenciaron la actividad antifúngica del quitosano. (N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2016).

Para finalizar, estos resultados indican que los revestimientos de quitosano con los diversos aceites esenciales mejoraron los atributos sensoriales a lo largo del tiempo de almacenamiento; esto demuestra el potencial de emplear los revestimientos combinados como tratamientos poscosecha prometedores para prevenir infecciones comunes en tomate durante el almacenamiento, sin afectar la calidad del fruto. (Athayde et al., 2016; Barreto et al., 2016; N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2015). Los tomates sin recubrimiento y tratados con las películas recibieron resultados similares para el sabor, textura, y sabores residuales (Barreto et al., 2016). En general, no se observaron diferencias entre los valores de todos los parámetros de calidad evaluados en los frutos tratados con revestimientos. Inclusive, los frutos recubiertos con aceite esencial de orégano y limón recibieron puntuaciones más altas en cuanto a apariencia, sabor y color, probablemente por su sabor afín con el tomate (Athayde et al., 2016; Barreto et al., 2016).

IV. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis general

Al aplicar los revestimientos compuestos por quitosano y aceites esenciales de *C. aurantifolia* “limón sutil” y *O. vulgare* “Orégano” a distintas concentraciones, será eficaz contra *B. cinerea*, en *L. esculentum* “tomate”.

4.2 Hipótesis específicas

- 4.2.1 El %ICM será menor por las distintas concentraciones de QUI, AECA o AEOV.
- 4.2.2 Se logrará formar una biopelícula con quitosano y aceites esenciales
- 4.2.3 Si el quitosano es capaz de formar una biopelícula en una superficie plástica, lo hará de la misma manera sobre el tomate.
- 4.2.4 Los tratamientos con QUI + AE serán iguales o menores que los tratados con Iprodione 40% + Myclobutanil 10%
- 4.2.5 Los revestimientos con QUI + AE no influenciarán en las características sensoriales de los tomates.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución

Se realizó en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LA77) y Laboratorio de Parasitología (LA79) de la Facultad de Biología - Universidad Ricardo Palma (Av. Benavides 5440 Urb. Las Gardenias, Santiago de Surco).

5.2 Material Biológico

Se emplearon tomates de la variedad “italiano” de similares características y estado de maduración, que no presentaron magulladuras o signos de descomposición; de tamaño, color y forma homogénea. Éstos fueron obtenidos de mercado Magdalena (12° 05' 24.67" S; 77° 4' 25.73 O). La cepa de *B. cinerea* se obtuvo del laboratorio de micología de la Universidad Agraria La Molina (boleta de venta fig. 5c).

5.3 Reactivos

El quitosano de caparazón de camarones (75% deacetilado) fue adquirido de Sigma-Aldrich – USA, fabricado en Islandia a partir de caparazones de *Pandalus borealis*; El aceite esencial de *Citrus aurantifolia*, fue comprado de la empresa Esstential oils Perú (<http://www.eopperu.com>, fig 6h) y el aceite de *Origanum vulgare* se adquirió de Zane Hellas, Grecia (<https://www.zanehellas.com>, fig 6e, min 86% de carvacrol). Se empleó ácido acético 1M, Tween 80 (Insuquimica) y Glicerol (Farmacia Universal) para elaborar los recubrimientos. Se utilizó alcohol etílico de 70° e hipoclorito de sodio al para la desinfección los tomates y los hongos fueron cultivados en agar EM (Difco®). El fungicida comercial fue cedido amablemente por la empresa FARMEX (fig. 9f) con los principios activos Iprodione 40% y Myclobutanil 10% (Botridium®, dosis recomendada 300-400g/cil; cilindro de 200L).

5.4 Preparación del material biológico.

Las cepas de *B. cinerea* se reactivaron de la muestra adquirida en agar EM y se incubaron a 25°C por 7 días (fig. 5a, b). Los tomates se lavaron con detergente y agua destilada estéril, y seguidamente se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y en etanol 70% por 1 minuto (Badawy et al., 2009; Barreto et al., 2016; Guerra et al., 2015).

5.5 Efecto inhibitorio *in vitro* de QUI y AECA o AEOV en el crecimiento micelial

Se determinó el %ICM de QUI, AECA y AEOV mediante la técnica del sustrato envenenado (fig. 5d). Para este fin, se sembró por picadura un inóculo (< 1 mm, de un cultivo de 7 días) con micelios de *B. cinerea* en el centro de placas Petri con agar EM suplementado con diferentes concentraciones de QUI (8 mg/mL y 4 mg/mL), AECA (20 µL/mL) o AEOV (10 µL/mL, 5 µL/ml, 2.5 µL/mL y 1.25 µL/mL). En el caso los aceites esenciales, se agregó al agar aún líquido (~45°C) Tween 80 1% (agente emulsificante), y seguidamente la cantidad deseada de AECA (20 µL/mL) o AEOV (10, 5, 2.5 y 1.25 µL/mL). Para la preparación con QUI (4 mg/mL y 8 mg/mL), el agar EM fue preparado con una solución de ácido acético al 1% (pH 4.7-5.6), ya que el QUI se disuelve en medio ácido (Athayde et al., 2016; K. De Oliveira et al., 2017; Guerra et al., 2015, 2016). Las preparaciones se agitaron manualmente con vigorosidad por 15 minutos y luego en un vortex mixer (XH-D) a máxima potencia por 20 minutos, hasta homogenizar y como control, se empleó agar EM sin suplementar. Luego, se incubaron a 25°C durante 15 días. El crecimiento radial del micelio fue medido (fig. 5i) cada 3 días por 15 días con un vernier (de Oliveira et al., 2017). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (ICM%) (Barreto et al., 2016; Feng et al., 2007; Guerra et al., 2015). El %ICM se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%ICM = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde “C” es el diámetro de la colonia control y “T”, el diámetro de los tratamientos con QUI, AECA o AEOV. (K. De Oliveira et al., 2017; N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2015; Munhuweyi et al., 2017).

5.6 Preparación del revestimiento compuesto por quitosano y aceites esenciales de limón y orégano y formación de la biopelícula.

Para los tratamientos combinados se disolvió QUI (4 mg/mL; 8 mg/mL) en ácido acético al 1% con agua destilada estéril (fig. 6a, b), y se homogenizó con una batidora de inmersión (3600 rpm, Oster® - FPSTHB2610R-053) por 10 minutos (fig. 6c). Luego se añadió Tween 80 al 1%, como agente emulsificante, seguidamente, se añadió AECA (20 µL/mL) o AEOV (5µL/mL), repitiéndose el mismo proceso de homogenización. Por último, se añadió glicerol 2% como agente plastificante para la aplicación directa en los tomates (fig. 6d, e), volviéndose a homogeneizar. (Barreto et al., 2016; N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2015; Ojagh et al., 2010). Luego, para comprobar si se formaba la biopelícula, se sirvió 10 mL de cada preparado en placas petri y se dispusieron en el deshidratador, como se observa en la figura 6f (Munhuweyi et al., 2017).

5.7 Aplicación de revestimientos compuestos de QUI, AECA y AEOV en frutos de tomate

Se seleccionaron las combinaciones de QUI 4mg/mL+ AEOV 5 µL/mL, QUI 4mg/mL+ AECA 20 µL/mL y QUI 4mg/mL + AECA 20 µL/mL + AEOV 5 µL/mL para su uso en ensayos para evaluar su eficacia en el control de la infección por *B. cinerea* en tomates. Se emplearon 5 tomates por cada grupo: Control (control positivo: Iprodione 0.8mg/mL + Myclobutanil 0.1 mg/mL; Control negativo: Inoculado con *B. cinerea*) y en los tratamientos (Tratamiento 1: QUI 4 µL/mL + AECA 20 µL/mL; tratamiento 2: QUI 4 µL/mL + AEOV 5 µL/mL; tratamiento 3: QUI 4 µL/mL + AECA 20 µL/mL + AEOV 5 µL/mL) Los tomates se examinaron

en diferentes tiempos de almacenamiento (3, 6, 9, 12 y 15 días), para detectar signos de infección fúngica (aspecto de moho) (Feng et al., 2007; Liu et al., 2007).

A cada tomate se le infectó artificialmente colocando un explante (>5mm, fig. 7b) de un cultivo maduro (7 días) de *B. cinerea*, el cual fue situado cerca del corte del pedúnculo floral (fig. 7d), donde es más susceptible de infectarse (Borges et al., 2014). Seguidamente, los frutos se sumergieron (fig. 7c, e) en 100 mL de las soluciones de recubrimiento con diferentes concentraciones de QUI y AECA o AEOV, con ayuda de una pinza estéril (Guerra et al., 2016). Los frutos se secaron con un deshidratador (Blanik® BDA020) previamente desinfectado a una temperatura de 55°C, donde se propició la formación de la biopelícula (fig. 7f, g). Posteriormente se almacenaron a T° amb (~25°C) en recipientes de polietileno por 15 días (fig. 8 a-e), sellándolos con Parafilm® para reducir la pérdida de vapores de los aceites (Khalili et al., 2015).

5.8 Efecto de los revestimientos combinados de QUI y AECA o AEOV sobre la severidad de infección de *B. cinerea* en frutos de tomate.

Se midió el área de infección en tomates producida por *B. cinerea* en cada tratamiento y control, aproximando la superficie de infección a una elipse y tomando los valores de largo x ancho x π . Previamente, se halló el área de superficie promedio de tomate, considerando su forma geométrica aproximada (esferoide prolato) tomando medidas de altura y anchura con ayuda de un vernier, siguiendo esta fórmula (Tee, 2004):

$$2\pi b \left(a \times \frac{\arcsin \sqrt{\delta}}{\sqrt{\delta}} + b \right); \delta = 1 - \frac{b^2}{a^2}$$

Donde a es la altura y b es el ancho del tomate. Luego, se halló el porcentaje de la superficie dañada $\left(\frac{\text{Superficie de infección}}{\text{superficie del tomate}} \times 100 \right)$ y se puntuó el daño según la siguiente escala: 1=0 -1%; 2=1-5%; 3=5-10%; 4=10-50% y 5= 50-100%. El %SI se halló mediante la siguiente fórmula (K. De Oliveira et al., 2017; Sefu et al., 2015):

$$\frac{\sum(\# \text{ de frutas en la escala de valoración} \times \text{grado de la escala})}{\# \text{ de frutas por tratamiento} \times \text{valor máximo de la escala}} \times 100$$

5.9 Análisis sensorial del tomate

Se realizó una encuesta de degustación y preferencia de los tomates al público, tratados sólo con los diferentes recubrimientos de QUI, AECA y AEOV o sin tratar (control), refrigerados y sin haberlos expuesto a los hongos (para garantizar la salud a los panelistas) (fig. 10).

Se contó con 30 voluntarios, que muy amablemente aceptaron formar parte de la investigación, previamente firmando una carta de consentimiento informado, asegurando anonimato y confidencialidad (anexo: Carta de consentimiento). El análisis se desarrolló en los ambientes comunes de la Facultad de Ciencias Biológicas. A continuación, cada voluntario recibió una cartilla de encuesta con los parámetros a evaluar (anexo: Cartilla de encuestas) y aproximadamente 1/4 de tomate sin tratar y tratados con los diferentes revestimientos de QUI, AECA y AEOV, servidos en platos codificados con un número aleatorio de tres dígitos (control = 395; QUI + AEOV = 649; QUI + AECA = 448; QUI + AECA + AEOV = 938). Las muestras de tomate se sirvieron de manera aleatoria y simultánea a ciegas (ningún voluntario conocía a cuál tratamiento correspondía la muestra). Se indicó a los voluntarios que comieran una galleta de soda y que bebieran agua entre cada muestra para evitar los efectos del regusto. Luego, se les pidió a los voluntarios que valoren el grado de aceptabilidad de la muestra (escala de 1 al 9, donde 1, no me gustó para nada y 9, me gustó muchísimo) que evalúen su intención de compra (escala de 1 a 5, donde 1 es no compraría y 5 es definitivamente compraría) y que ordenen las muestras de mayor a menor aprecio (Athayde et al., 2016; Barreto et al., 2016; N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2015).

5.10 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes, y los resultados se expresaron como el promedio de los datos

obtenidos en cada repetición. Previamente, los datos se evaluaron a través del análisis descriptivo (promedio, desviación estándar y pruebas de normalidad y varianza) Posteriormente, se realizaron análisis inferenciales (No paramétricas: U de Mann – Whitney; paramétricas: T de student y ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey) para determinar las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados obtenidos (Athayde et al., 2016; K. De Oliveira et al., 2017; N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2015). El análisis estadístico y ploteo de gráficos se realizó con los programas SPSS versión 21 y GraphPad Prism 5 respectivamente.

VI. RESULTADOS

6.1 Efectos del QUI, AECA y AEOV en el crecimiento de *B. cinerea* y en el porcentaje de inhibición.

Los valores del diámetro de crecimiento y del %ICM están descritos en la figura 11 y en la tabla 1, respectivamente. Todas las concentraciones probadas de AEOV (10, 5, 2.5 y 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y ambas concentraciones de QUI (8 y 4 mg/mL) resultaron en un 100% ICM para *B. cinerea* después de 15 días de exposición al tratamiento (fig. 5e). Por otra parte, AECA 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ originó valores entre 40-47% de ICM. Se observó un diámetro de crecimiento (fig. 5f, g) y un porcentaje de inhibición menor en medios de cultivo suplementados con AECA 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a diferencia de los medios sin suplementar ($p < 0.05$).

6.2 Formación de la biopelícula compuesta por combinaciones de QUI, AECA y AEOV

Se obtuvo una biopelícula de QUI y AECA o AEOV de translúcida, flexible y ligeramente resistente al estiramiento luego del secado (fig. 6g, h).

6.3 Efecto del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en el área y porcentaje de infección en frutos de tomate

Los efectos de los recubrimientos de la combinación de QUI, AECA y AEOV y el tratamiento con Iprodione 0.8 mg/mL + Myclobutanil 0.1 mg/mL (Botridium®) en el área y porcentaje de infección provocada por *B. cinerea* en frutos de tomate durante 15 días de almacenamiento están resumidas en las figuras 12 y 13 respectivamente. El crecimiento del moho gris recién evidenció al sexto día (fig. 9a), sin embargo, los tomates presentaron áreas de infección similares ($p >$

0.05). Luego de 9 días de exposición al moho y a los aceites esenciales, los tomates sin recubrimiento presentaron mayor superficie de infección ($p < 0.05$) en comparación con los tomates recubiertos y tratados con Iprodione 0.8mg/mL + Myclobutanil 0.1 mg/mL. Luego de 12 días de exposición los tomates presentaron áreas de infección similares y a los 15 días de exposición el patrón de diferenciación de la infección del grupo control fue más notorio ($p < 0.05$), ya que los tomates desprovistos de biopelícula presentaron mayor porcentaje (fig. 9g – h) y área de infección ($p < 0.05$) al compararlos con los tomates con recubrimiento y los tratados con el fungicida sintético (fig. 9c – f). Para finalizar, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

6.4 Efecto del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en la severidad de infección en frutos de tomate.

Los efectos de los recubrimientos de la combinación de QUI, AECA, AEOV y el tratamiento con Iprodione 0.8mg/mL + Myclobutanil 0.1 mg/mL (Botridium®) en la severidad de infección provocada por *B. cinerea* en frutos de tomate durante 15 días de almacenamiento están presentadas en las figuras 14 y 15. La severidad de infección fue menor ($p < 0.05$) en los tomates recubiertos con QUI-AEOV, llegando a un 24% y presentaron valores similares ($p > 0.05$) comparado con los tomates tratados con Iprodione-Myclobutanil, con un 20% de severidad de infección. Por el contrario, los tomates recubiertos con QUI-AECA (40%) o QUI-AECA-AEOV (36%) no evidenciaron suficiente disminución de la severidad de infección ($p > 0.05$) con relación a los tomates sin biopelícula, los cuales presentaron un 76% de severidad de infección

6.5 Efecto del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en el análisis sensorial, intención de compra y preferencias de consumo en frutos de tomate.

Los frutos de tomate, descubiertos o recubiertos con QUI-AECA, QUI-AEOV y QUI-AECA-AEOV, que fueron sometidos a pruebas de aceptación, recibieron puntajes similares ($p > 0.05$) con una media entre 5.57 – 6.12 (Tabla 2) para todos los parámetros sensoriales evaluados (apariencia, color, sabor, aroma, sabor residual y evaluación global). Los parámetros más escogidos fueron “Neutral” y “Me gustó ligeramente” para los parámetros de apariencia, color, aroma, sabor residual y firmeza, y “Me gustó moderadamente” para los parámetros de sabor y evaluación global (fig. 16). De la misma manera, la intención de compra recibió puntajes similares ($p > 0.05$, fig. 17) con una media entre 3.03 – 3.60 (Tabla 2), siendo el valor más elegido “posiblemente los compraría” (fig. 17). Asimismo, no hubo diferencias entre la preferencia de consumo ($p > 0.05$; fig. 18), con una media entre 1.4 – 1.6 (Tabla 2).

VII. DISCUSIÓN

En los últimos años, los investigadores han examinado sustancias seguras y alternativas para reducir e incluso reemplazar el uso de fungicidas sintéticos en frutas, y las biopelículas compuestas por quitosano y aceites esenciales, han sido consideradas una tecnología viable para controlar las infecciones postcosecha, mostrando así su capacidad antifúngica, biodegradabilidad, que no genera resistencia a los hongos y microorganismos y la ausencia de efectos tóxicos (Barreto et al., 2016; N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2015) considerando los principios activos del aceite esencial de limón (*C. aurantifolia*) y orégano (*O. vulgare*) (Ammad et al., 2018; Boskovic et al., 2015; Fouad et al., 2017; Gong et al., 2014).

En la presente tesis, se evaluó la eficacia de los nombrados aceites esenciales cuando fueron aplicados juntamente con el quitosano (Proveniente de *Pandalus borealis*) para crear diferentes biopelículas para controlar a *B. cinerea*, que es un hongo que aparece en la maduración de las frutas en cultivo, en la postcosecha, en el transporte y almacenamiento del tomate. (Harrison et al., 2010; O' Neill et al., 1997; Zitter, 1986). La característica más importante del quitosano es el grado de desacetilación, que es lo que influencia la función biológica de las moléculas de quitosano (Badawy et al., 2009). Investigadores en otros estudios han recomendado que el quitosano presenta una mejor función biológica cuando su grado de desacetilación es mayor de 70% (Badawy et al., 2009; Benhamou et al., 1992; Munhuweyi et al., 2017). En este estudio, el grado de desacetilación del quitosano comprado fue de 75%, que corresponde al grado recomendado.

Se ajustó la concentración de quitosano a 4 mg/mL porque este valor es el mínimo para formar una solución espesa capaz de formar biopelículas, y que así permita la adición de aceites esenciales de limón y orégano a frutos de tomate (Barreto et al., 2016; Guerra et al., 2015, 2016) . Las concentraciones de AECA y AEOV se ajustaron a 20 μ L/mL y 5 μ L/mL respectivamente. Se buscó que los aceites no interfieran con la percepción olfatoria de los voluntarios en la encuesta

(Perdones et al., 2012). Se observó que el crecimiento fue totalmente inhibido cuando se empleó una concentración de quitosano a 4 mg/mL y 8 mg/mL así como en trabajos previos (Barreto et al., 2016; K. De Oliveira et al., 2017; N. Dos Santos et al., 2012)

La capacidad antifúngica del quitosano ha sido siempre asociada a la interacción entre los grupos amino cargados positivamente del compuesto con los fosfolípidos en la pared celular de los hongos, generándose daño por el cambio de la permeabilidad de la membrana, permitiendo el transporte activo de quitosano (gasto energético). De esta forma, el quitosano al entrar al citoplasma interfiere con el ARN y, por consiguiente, con la síntesis de proteínas, además de generar estrés oxidativo (ROS). Asimismo, el quitosano provoca la producción de enzimas de defensa en las frutas con recubrimiento (Liu et al., 2007; Xing et al., 2016).

Existe evidencia por parte de los investigadores, los cuales si reportaron la eficacia de AECA, mejorando la eficacia en conjunto con el quitosano, (Ammad et al., 2018; Perdones et al., 2012; Vitoratos et al., 2013) y de AEOV (Camiletti et al., 2016; N. Dos Santos et al., 2012; Gong et al., 2014; Sivropoulou et al., 1996). En el presente trabajo, se redujo la infección de un 76% a un 24% (AEOV), y en Vitoratos et al., 2013, redujo la infección de 100% a 18%. Las propiedades antifúngicas son atribuidas a los componentes mayoritarios, en este caso, al limoneno y al carvacrol. Estos son compuestos cíclicos, que son grupos funcionales responsables de conferir la actividad biológica de los aceites (Marinelli et al., 2012; Razzaghi-Abyaneh et al., 2009; Znini et al., 2011) . Diversos estudios previos han demostrado que los monoterpenos juegan un rol importante en la desintegración de las membranas celulares, causando despolarización y alteraciones físicas y químicas, desequilibrando el metabolismo fúngico (Lombardo et al., 2016; Sharma et al., 2008) y que el quitosano es efectivo en el control del moho gris (Guerra et al., 2015; Sangsuwan et al., 2016)

El color es un parámetro importante a la hora de elegir y comprar lo tomates. Un buen tomate presenta un color rojo, un indicativo de la presencia del licopeno (Mohammadi et al., 2015a). En este trabajo de investigación los recubrimientos no tuvieron efecto alguno en el licopeno. Se observó también un aumento del brillo en los frutos. En los tomates recubiertos, se observó más brillo en comparación con

los tomates sin tratar. Este efecto visual agradable se asocia con la alta transparencia y propiedades de las películas de quitosano (De Oliveira et al., 2014). Los resultados de las encuestas de degustación fueron muy parecidos a estudios anteriores, al no presentar diferencias significativas entre los tratamientos. El sabor de los tomates fue mayormente neutral y la intención de compra también fue neutra (N. Dos Santos et al., 2012; Guerra et al., 2016; Sabaghi et al., 2015).

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Los resultados del presente trabajo de investigación manifestaron que la aplicación combinada de quitosano proveniente de caparazón de camarones y aceites esenciales de *O. vulgare* en frutos de tomates contaminados artificialmente, redujo la infección en un 24% ($p < 0.05$) de moho gris en el tomate durante el almacenamiento a temperatura de ambiente, a excepción de los ensayos con *C. aurantifolia*. Aunque presentó inhibición en un 40%, no fue tan fuerte ($p > 0.05$) como en el caso anterior. No obstante, al estar ambos aceites en combinación, la reducción de la infección no fue mayor ($p > 0.05$) como se esperó, resultando en un 36%.
- 2) Las diferentes concentraciones de quitosano (4 mg/mL y 8 mg/mL) y AEOV (10 μ L/mL, 5 μ L/ml, 2.5 μ L/mL y 1.25 μ L/mL) si inhibieron en 100% el crecimiento micelial *in vitro*. Por otro lado, la inhibición provocada por AECA 20 μ L/mL sobre *B. cinerea* fue menor ($p < 0.05$), llegando hasta un 47% de disminución del diámetro micelial.
- 3) El empleo de quitosano con los diferentes aceites, si permite la formación de la biopelícula, como se observa en la figura 6g.
- 4) La aplicación del fungicida sintético compuesto por Iprodione 40% + Myclobutanil 10% (Botridium® - FARMEX) redujo la infección en un 20%, similar al recubrimiento QUI+ AEOV ($p < 0.05$). Por tanto, la eficacia de la aplicación de aceites esenciales puede ser igual o menor que los fungicidas sintéticos.
- 5) Los revestimientos empleados en los ensayos no influenciaron en los aspectos sensoriales del tomate en comparación con los tomates sin recubrimiento ($p > 0.05$, medias de puntaje donde 1 es total disgusto y 10 total agrado, entre 5.57 – 6.12). De la misma manera, no hubo variación en la intención de compra, tanto como para los tomates recubiertos y sin recubrir ($p > 0.05$, medias de puntaje donde 1 es definitivamente no compraría y 5 es definitivamente los compraría, entre 3.03 – 3.60), ni la preferencia al consumo ($p > 0.05$, medias entre 1.4 – 1.6). Estos hallazgos

revelan la viabilidad de los recubrimientos compuestos por QUI, AEOV o AECA para ser consumidos sin afectar el sabor y distintas características.

IX. RECOMENDACIONES

- Orientar estos estudios en la agrobiodiversidad peruana, por ejemplo, el aguaymanto, uvas, lúcuma, etcétera, y en aceites esenciales de la flora peruana, como, por ejemplo, el molle, paico, muña, entre otros, para prevenir infecciones de una manera natural contra diversos hongos y bacterias, las cuales causan pérdidas en los campos de cultivo, almacenes y mercados y supermercados.
- Aislar de manera particular diversas cepas de hongos y/o bacterias de importancia económica que afecten a cultivos dentro del contexto peruano, como, por ejemplo, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rizhophus stolonifer*, *Asperigillus* sp, *Alternaria* sp., etc.
- Hacer pruebas con quitosano y aceites esenciales en cultivos a pequeña escala, partiendo con pequeñas parcelas e ir aumentando gradualmente la dimensión experimental, para evaluar su viabilidad en amplios terrenos, y comparar su efectividad real frente a agroquímicos que abarcan áreas extensas.
- Extraer el quitosano aprovechando los desechos de industrias o negocios que producen cangrejos, camarones, langostinos entre otros., y de la misma forma, extraer los aceites esenciales de residuos agroindustriales como cáscaras de limón, naranja, mandarina, entre otros, para así darles un segundo uso.
- Producir bioempaques de quitosano con aceites esenciales como una posibilidad de investigación aumentando la concentración de quitosano. Se lograría una biopelícula más dura y resistente, ya no solo para recubrir un fruto, si no para reemplazar el uso de bolsas y de envases.
- Ampliar el uso de quitosano y aceites esenciales a hortalizas, verduras, e incluso carne. Asimismo, ampliar la aplicación de este recubrimiento a bacterias.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ammad, F., Moumen, O., Gasem, A., Othmane, S., Hisashi, K., Zebib, B., & Merah, O. (2018). Les huiles essentielles de citron (*Citrus limon* L.) pour lutter contre certaines maladies fongiques du bois de la vigne. *Comptes Rendus - Biologies*, 341(2): 97–101.
2. Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E., Casabianca, H., ... Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2): 220–243.
3. Athayde, A., de Oliveira, P., Guerra, I., da Conceição, M., de Lima, M., Arcanjo, N., ... de Souza, E. (2016). A coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) essential oil to control *Rhizopus* soft rot and quality in tomato fruit stored at room temperature. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(6): 582–591.
4. Badawy, M., & Rabea, E. (2009). Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1): 110–117.
5. Barreto, T., Andrade, S., Maciel, J., Arcanjo, N., Madruga, M., Meireles, B., ... Magnani, M. (2016). A Chitosan Coating Containing Essential Oil from *Origanum vulgare* L. to Control Postharvest Mold Infections and Keep the Quality of Cherry Tomato Fruit. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1724.
6. Benhamou, N., & Thériault, G. (1992). Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41(1): 33–52.
7. Benito, D. (2010). *Análisis y caracterización de genes de Botrytis cinerea cuya expresión se inducen in planta en la interacción B. cinerea - tomate*.
8. Blancard, D. (2012). The Tomato Plant and its Culture. In *Tomato Diseases* (pp. 17–34). Elsevier.
9. Borges, Á., Saraiva, R., & Maffia, L. (2014). Key factors to inoculate *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Summa Phytopathologica*, 40(3): 221–225.
10. Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*)

and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. *Procedia Food Science*, 5: 18–21.

11. Camiletti, B., Asensio, C., Gadban, L., Pecci, M., Conles, M., & Lucini, E. (2016). Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against the rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Industrial Crops and Products*, 85: 117–124.
12. D'Arcy, W. (1972). Solanaceae studies II: Typification of subdivisions of Solanum. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 59(2): 262–278.
13. Daniel, C., Lennox, C., & Vries, F. (2015). In vivo application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 99: 88–92.
14. De Oliveira, C., Magnani, M., Veríssimo, C., de Souza, A., Campos-Takaki, G., Montenegro, T., & de Souza, E. (2014). Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 171: 54–61.
15. De Oliveira, K., Ramos, L., Amorim de Araújo, S., Saraiva, M., & Souza, E. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, 66: 96–103.
16. de Souza, E. (2016). The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 56: 1–12.
17. Dos Santos, J., de Carvalho, R., de Souza, N., de Sousa Oliveira, K., Franco, O., Schaffner, D., ... Magnani, M. (2017). Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*, 73(October): 1237–1246.
18. Dos Santos, N., Athayde Aguiar, A., de Oliveira, C., de Sales, C., de Melo, S., Sousa da Silva, R., ... de Souza, E. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control

Rhizopus stolonifer and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32(2): 345–353.

19. Fagundes, C., Pérez-Gago, M. B., Monteiro, A. R., & Palou, L. (2013). Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3): 391–398.
20. Feng, W., & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*, 18(9): 1126–1130.
21. Fouad, H., & da Camara, C. (2017). Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 73: 30–36.
22. Garcés de Granada, E. (1992). Consideraciones sobre *Botrytis cinerea* pers., agente causal de la pudrición de las flores. *Agronomía Colombiana*, 9(2): 196–201.
23. García, R. (2017). *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa hibrida* en la zona florícola sur del Estado de México y la evaluación de su sensibilidad in vitro a fungicidas. Universidad Autónoma de México.
24. García, R., & Palou, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismo de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2): 41–51.
25. Gong, H., Liu, W., LV, G., & Zhou, X. (2014). Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24(1): 25–32.
26. Guerra-Sánchez, M., Vega-Pérez, J., Velázquez-del Valle, M., & Hernández-Lauzardo, A. (2009). Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1): 18–22.
27. Guerra, I., de Oliveira, P., de Souza, A., Carneiro, A., Tavares, J., Barbosa-Filho, J., ... de Souza, E. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold

infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214: 168–178.

28. Guerra, I., de Oliveira, P., Fernandes, M., Carneiro, A. S., Tavares, J., Barbosa-Filho, J., ... de Souza, E. (2016). The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita L. or x villosa Huds)* essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34(February): 112–121.
29. Haberbeck, L., da Silva, C., de Cássia, B., & Falcão, G. (2012). *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1): 267–273.
30. Harrison, G., Fernando, N., & Farm Services Victoria. (2010). Grey mould (*Botrytis*) in greenhouse tomato crops.
31. Khalili, S., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., ... Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1): 502–508.
32. Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). The Tomato (*Solanum lycopersicum L.* Solanaceae) and Its Botanical Relatives. In *The Tomato Genome* (pp. 7–22).
33. Liu, J., Tian, S., Meng, X., & Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3): 300–306.
34. Lombardo, P., Guimaraens, A., Franco, J., Dellacassa, E., & Pérez Faggiani, E. (2016). Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 121: 1–8.
35. Marinelli, E., Orzali, L., Lotti, E., & Riccioni, L. (2012). Activity of Some Essential Oils against Pathogenic Seed Borne Fungi on Legumes. *Asian Journal of Plant Pathology*, 6(3): 66–74.
36. Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S. M. (2015a). Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110:

203–213.

37. Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S. M. (2015b). Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28(January): 73–80.
38. Munhuweyi, K., Caleb, O., Lennox, C., van Reenen, A., & Opara, U. L. (2017). In vitro and in vivo antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 129: 9–22.
39. O' Neill, T. M., Shtienberg, D., & Elad, Y. (1997). Effect of Some Host and Microclimate Factors on Infection of Tomato Stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81(1): 36–40.
40. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1): 193–198.
41. Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. (2006). Nomenclature for Wild and Cultivated Tomatoe. *Tgc Report*, 56(January): 1–12.
42. Peralta, I., Spooner, D., & Knapp, S. (2008). *Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon ; Solanaceae)*. American Society of Plant Taxonomists.
43. Perdonés, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70: 32–41.
44. Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M.-B., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R., & Yoshinari, T. (2009). Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20(11): 1018–1024.
45. Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M., & Ziaiiifar, A. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*, 110: 224–228.
46. Sangsuwan, J., Pongsapakworawat, T., Bangmo, P., & Sutthasupa, S. (2016).

Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting *Botrytis cinerea* and their application in strawberry packaging system. *LWT - Food Science and Technology*, 74: 14–20.

47. Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., & Prinyawiwatkul, W. (2007). The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83(3): 366–373.
48. Sefu, G., Satheesh, N., & Berecha, G. (2015). Effect of Essential Oils Treatment on Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) Disease Development , Quality and Shelf Life of Mango Fruits (*Mangifera indica* L). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 15(11): 2160–2169.
49. Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., & Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 99: 37–43.
50. Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3): 337–344.
51. Simas, D., de Amorim, S., Goulart, F., Alviano, C., Alviano, D., & da Silva, A. (2017). Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. *Industrial Crops and Products*, 98: 108–115.
52. Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5): 1202–1205.
53. Tee, G. J. (2004). Surface area and capacity of ellipsoids in n dimensions. *New Zealand J. Math.*, 34(2): 165–198.
54. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., & Efthimiadou, A. (2013). Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1): 86–92.
55. Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, S., ... Lin, H. (2016). Chitosan-Based Coating with Antimicrobial Agents: Preparation, Property, Mechanism,

and Application Effectiveness on Fruits and Vegetables. *International Journal of Polymer Science*, 2016: 1–24.

56. Zitter, T. A. (1986). *Botrytis* Gray Mold of Greenhouse & Field Tomato.
57. Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Mazouz, H., Tomi, P., Paolini, J., & Costa, J. (2011). Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Nat.Prod.Comm.*, 6(11): 1763–1768.

XI. ANEXOS

Figuras

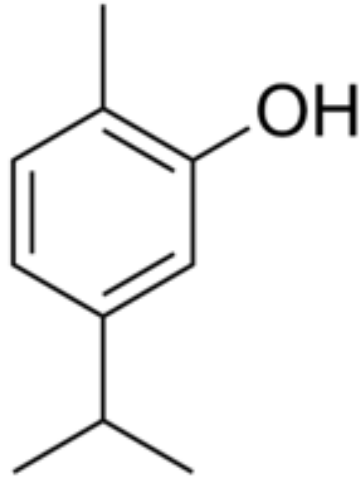


Fig. 1 Estructura química del carvacrol
(García & Palou, 2008)

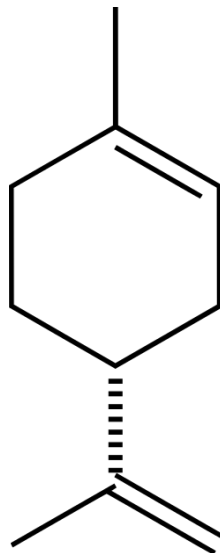


Fig. 2 Estructura química del limoneno
(García & Palou, 2008)



Fig. 3 Infección característica de *B. cinerea* en frutos de tomate. (Harrison, 2010)

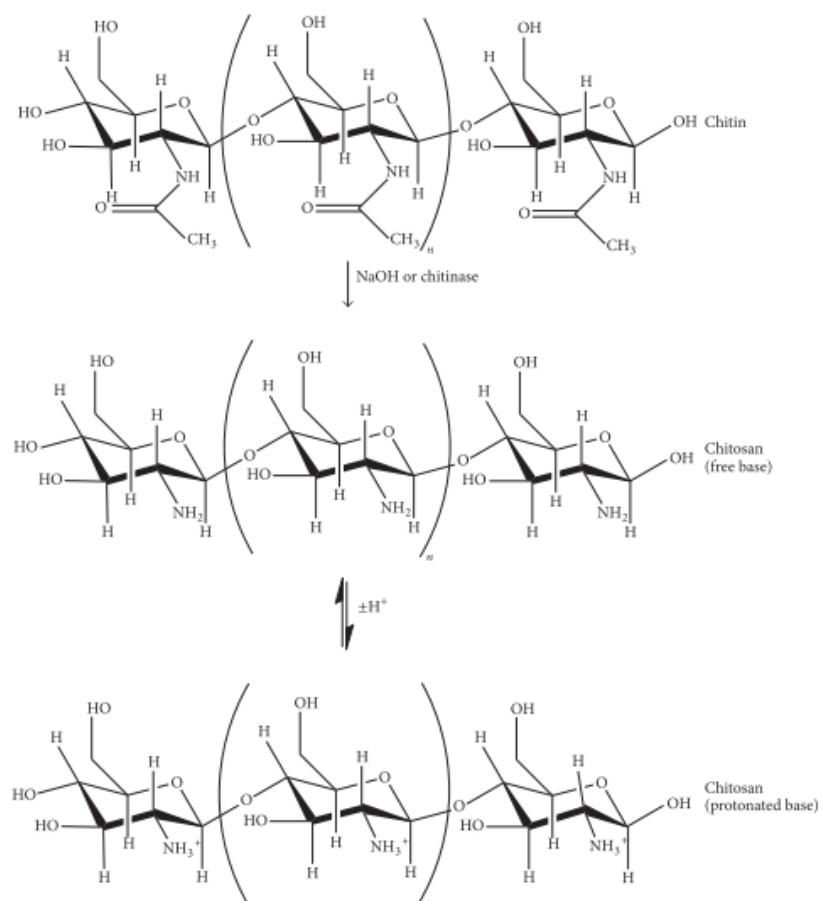


Fig. 4 Estructura molecular del quitosano (Xing et al., 2016)

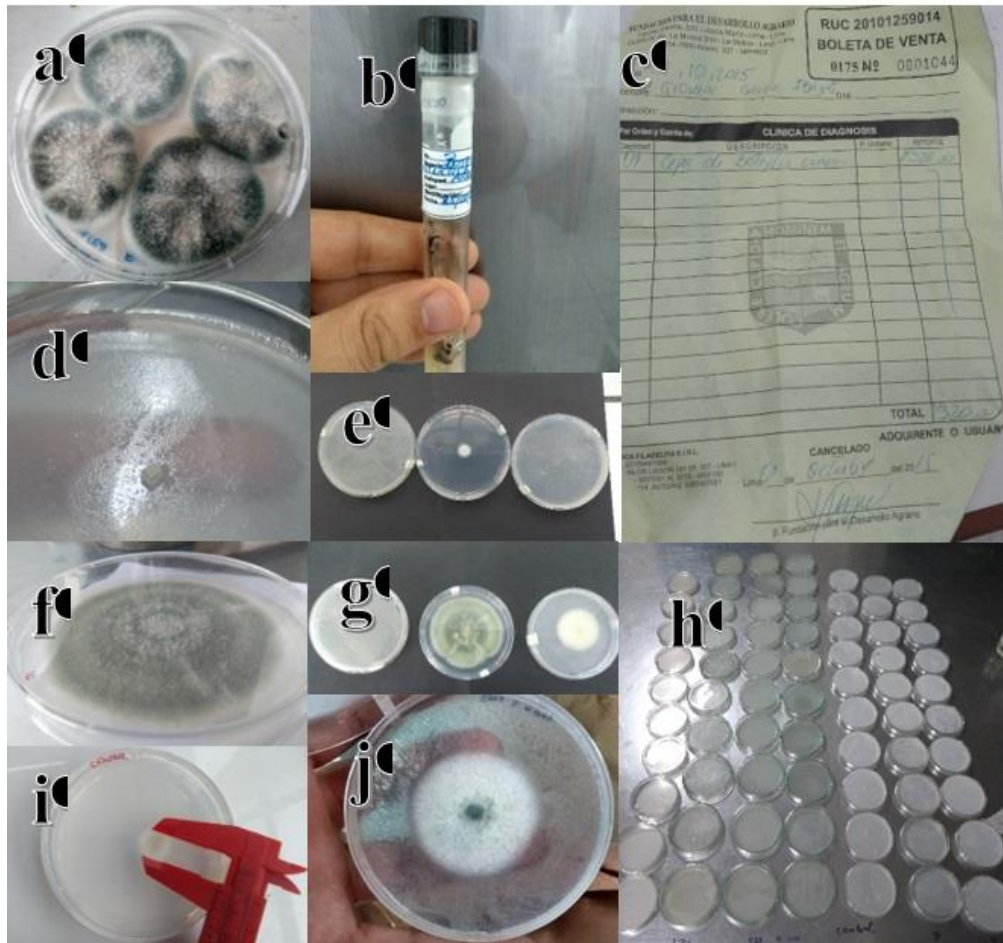


Fig. 5 Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* in vitro.



Fig. 6 Preparación de la biopelícula de quitosano y aceites esenciales de *Citrus aurantifolia* y *Origanum vulgare*.

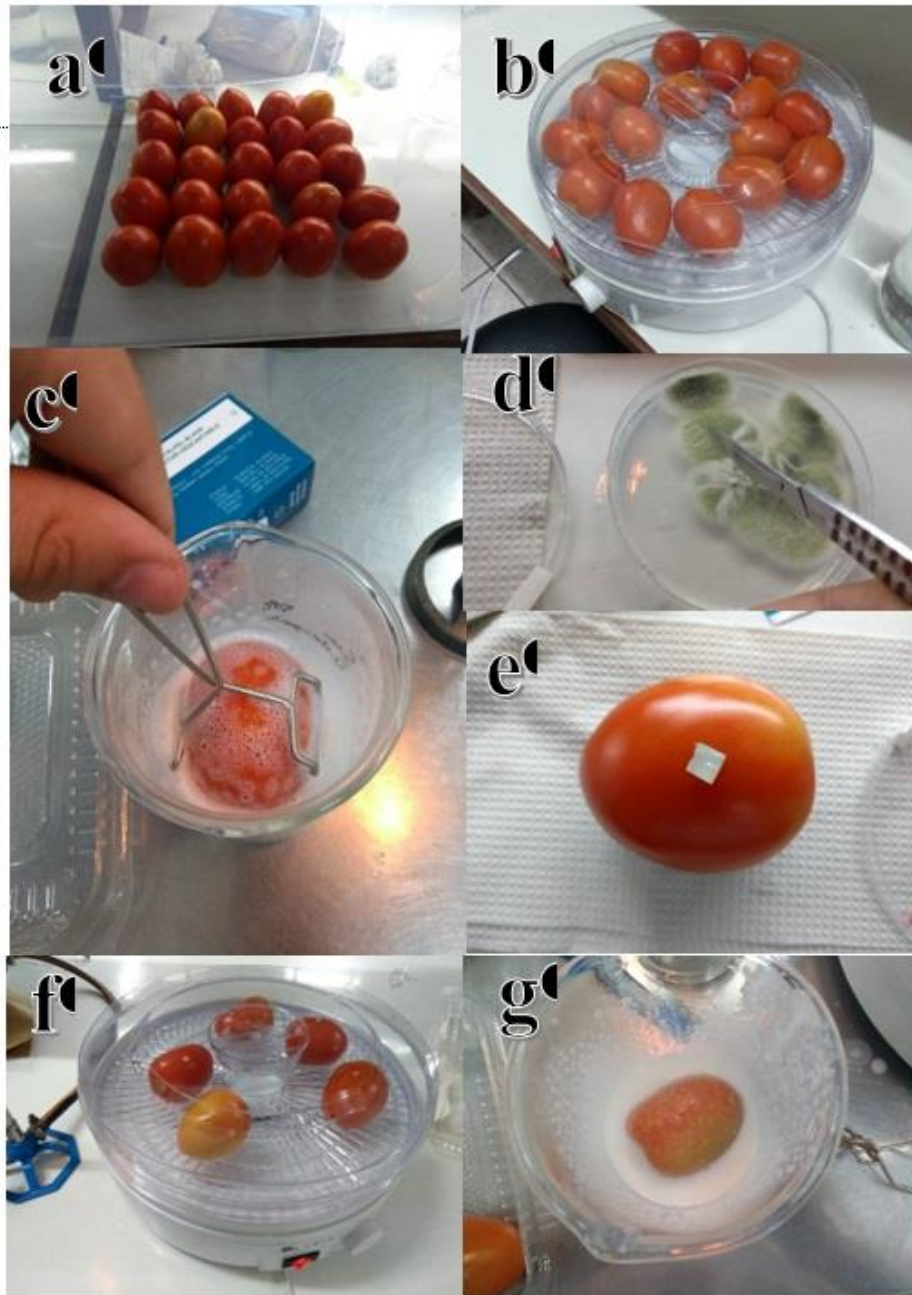


Fig.7 Aplicación de los revestimientos y formación de la biopelícula en tomates.

a. Quitosano en polvo; **b.** quitosano diluido en ácido acético 1% ; **c.** Batidora de inmersión para emulsificar la mezcla; **d.** Revestimientos emulsificados **e.** Aceite esencial de óregano **f.** Secado del revestimiento en deshidratador para la formación de la biopelícula en placas Petri **g.** Biopelícula generada. **h.** Aceite esencial de limón.



Fig. 8 Empaque y almacenamiento de los tomates (a – e) y Botridium® (f)
a. Qitosano en polvo; quitosano diluido en ácido acético 1% ; **c.** Batidora de inmersión para emulsificar la mezcla; **d, e.** Revestimientos emulsificados **f.** Secado del revestimiento en deshidratador para la formación de la biopelícula en placas Petri **g, h.** Biopelícula generada.

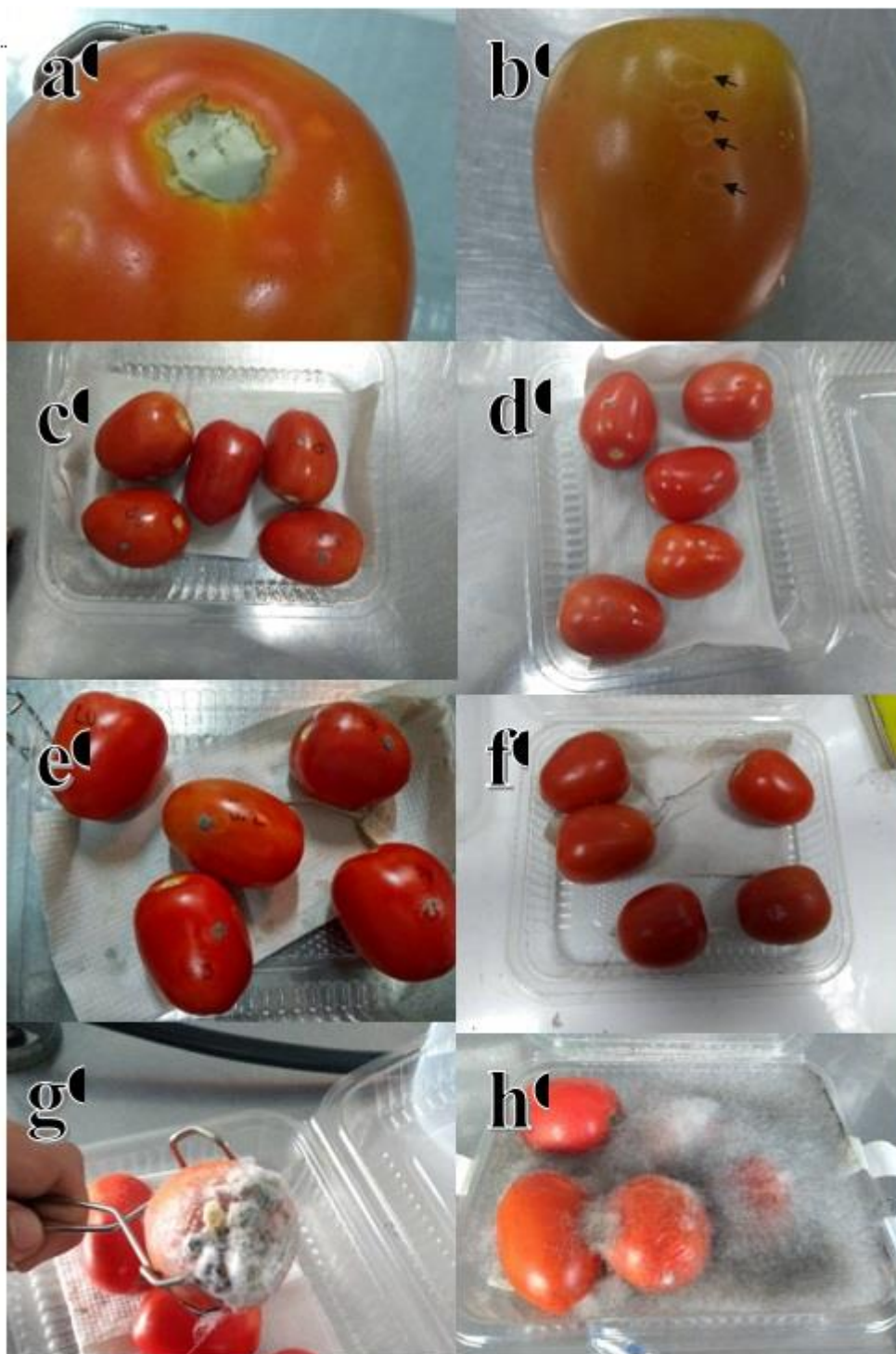


Fig. 9 Comparación de la infección entre los tomates sin recubrimientos, tratados con Botridium® y con la biopelícula.

- a.** Inicio de la infección. **b.** Las flechas indican las maculas fantasma propio de la infección por *B. cinerea*. **c.** Tratamiento QUI+AECA. **d.** Tratamiento QUI+AECA+AEOV. **e.** Tratamiento QUI+AECA+AEOV. **f.** Tratamiento con Botridium®. **g – h.** Tomates control.



Fig. 10 Análisis sensorial – Encuesta de degustación

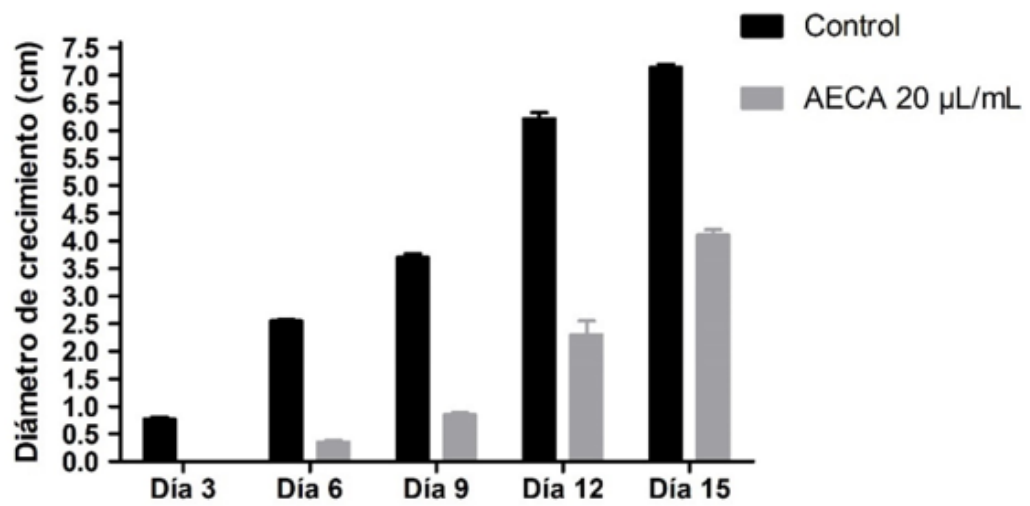


Fig. 11 Efecto del aceite esencial de limón (AECA 20 µL/mL) en la inhibición del diámetro de crecimiento de *B. cinerea* en Agar EM.

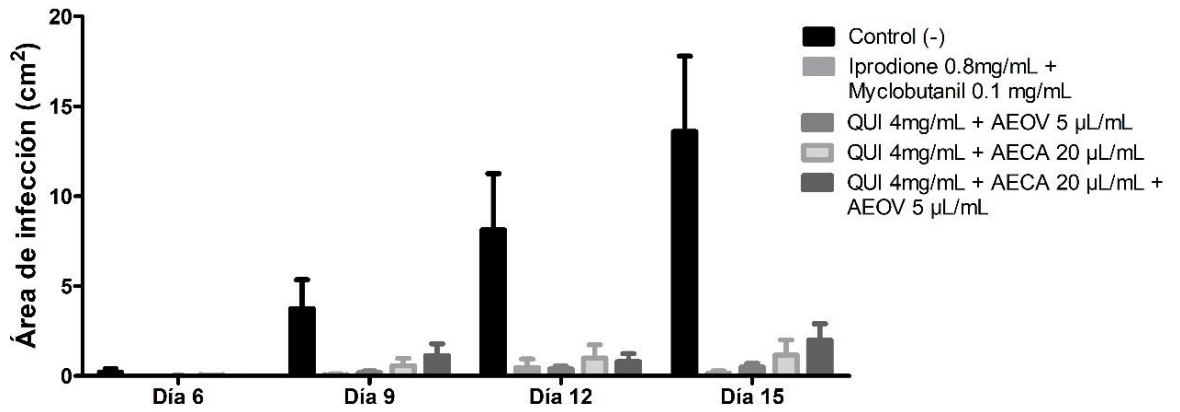


Fig. 12 Efecto de las diferentes combinaciones de AEOV, AECA y QUI en el área de infección de *B. cinerea* en frutos de tomate.

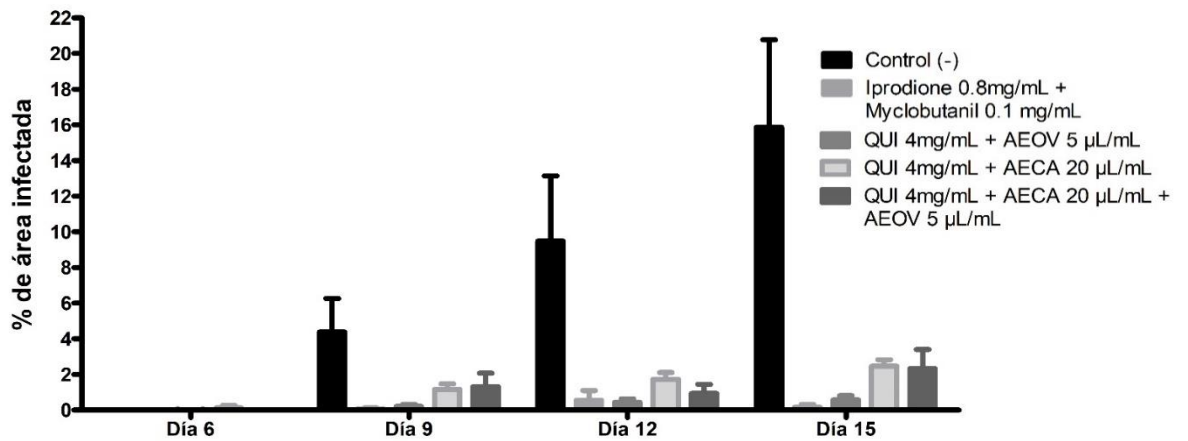


Fig. 13 Efecto de las diferentes combinaciones de AEOV, AECA y QUI en el porcentaje de infección de *B. cinerea* en frutos de tomate.

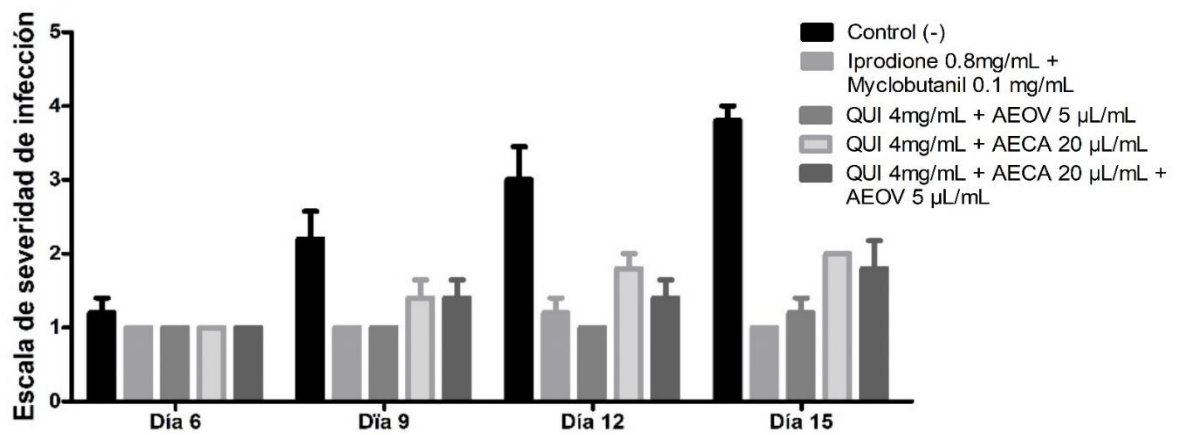


Fig. 14 Efecto de las diferentes combinaciones de AEOV, AECA y QUI en la escala de la severidad de infección provocada *B. cinerea* en frutos de tomate.

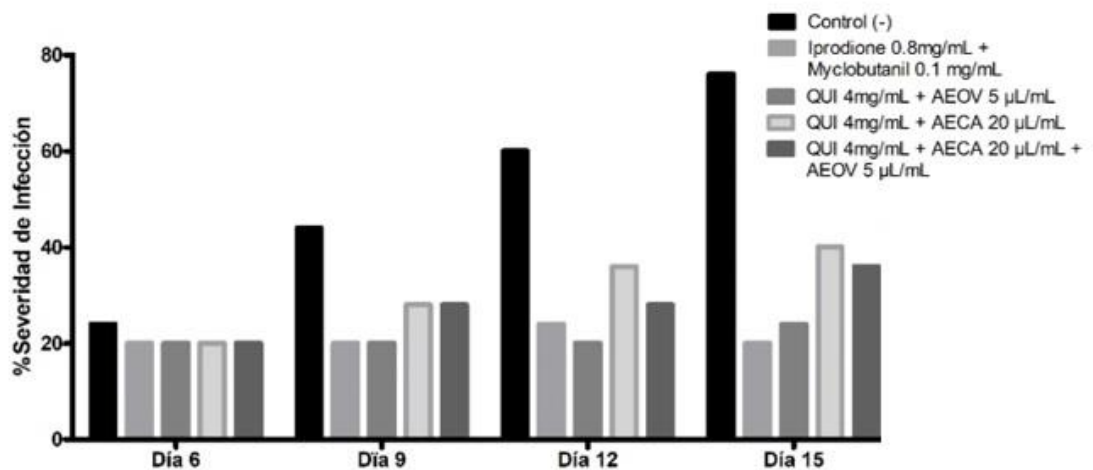


Fig. 15 Porcentaje de la severidad de infección de *B. cinerea* en frutos de tomate sin recubrimiento y recubiertos con combinaciones de QUI, AEOV y AECA.

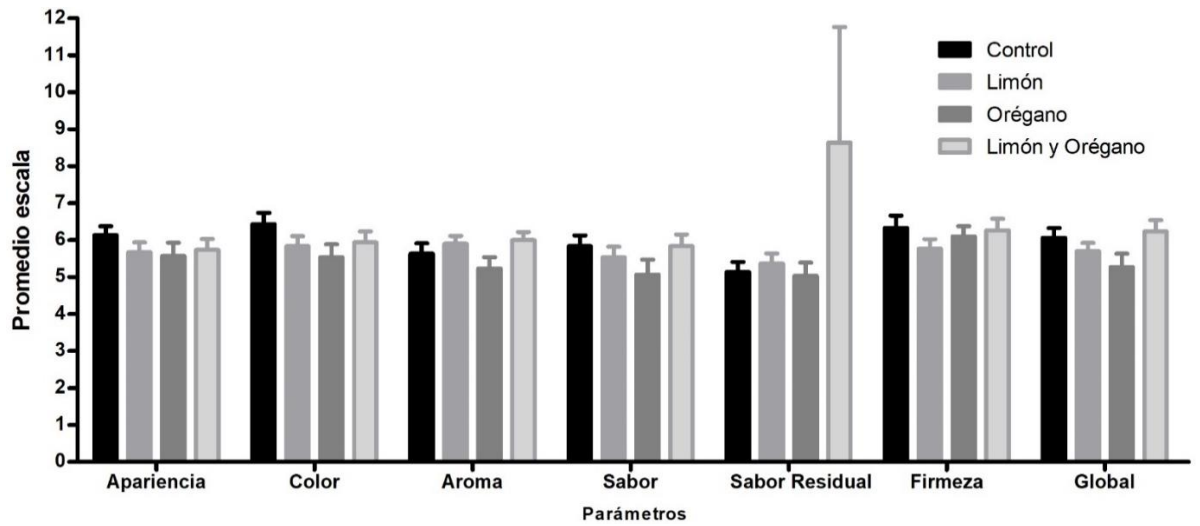


Fig. 16 Valores promedio de los parámetros sensoriales en frutos de tomate sin recubrimiento y recubiertos con QUI, AECA y AEOV en diferentes concentraciones

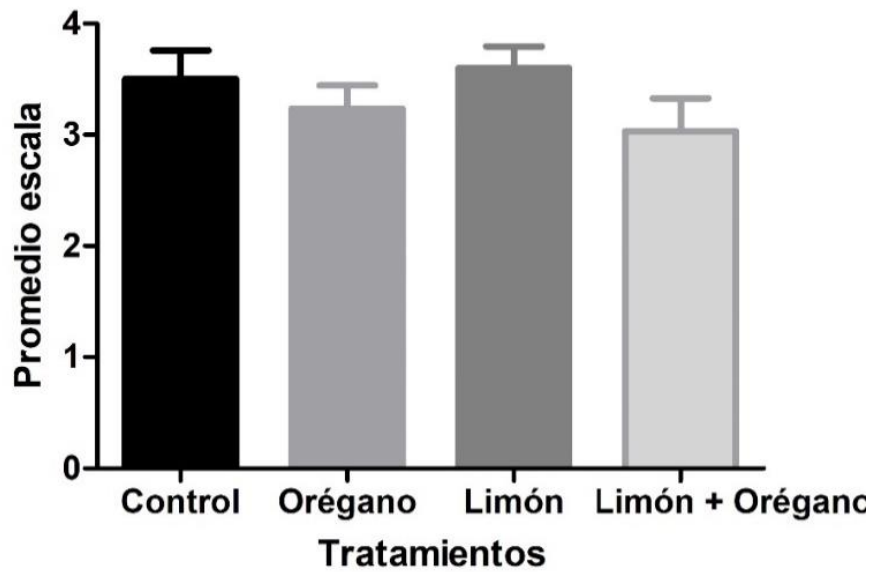


Fig. 17 Intención de compra de los tomates con distintos recubrimientos

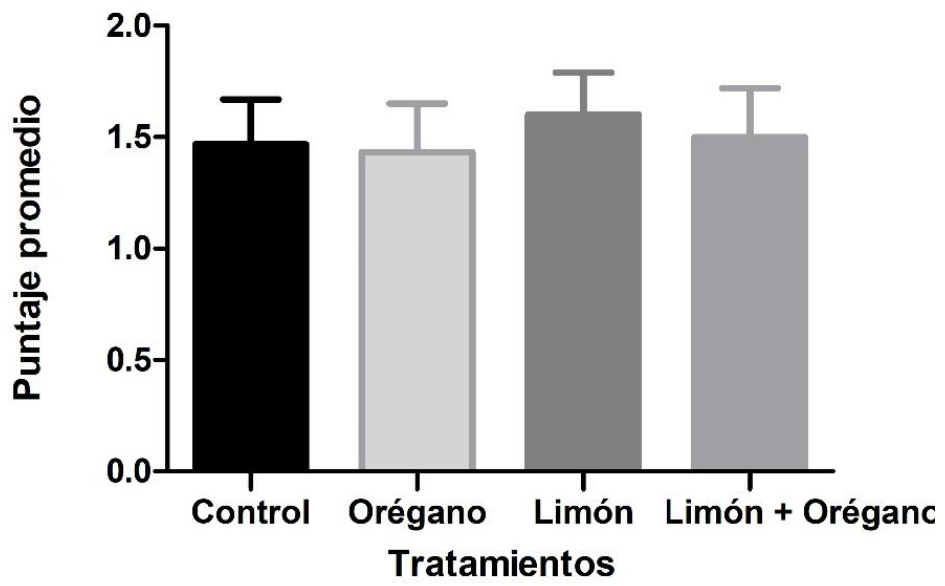


Fig. 18 Preferencia de los consumidores en los tomates con diferentes recubrimientos

Tablas

Tabla 1

%ICM de Botrytis cinerea después de quince días de exposición de QUI, AECA o AEOV en medio sólido (Agar extracto de malta)

	ICM%
AECA 20 µL/mL	68.83%
AEOV 10µL/mL	100.00%
AEOV 5 µL/mL	100.00%
AEOV 2.5 µL/mL	100.00%
AEOV 1.25 µL/mL	100.00%
AECA 20 µL/mL + AEOV 5 µL/mL	100.00%
QUI 4 mg/mL	100.00%
QUI 8 mg/mL	100.00%

Los porcentajes son expresados como promedios.

Tabla 2

Valores de las medias en el análisis sensorial, intención de compra y preferencias de consumo del revestimiento compuesto por combinaciones de QUI, AECA y AEOV en frutos de tomate

Evaluación	Control	QUI AECA	+ QUI AEOV	+ QUI+AECA+AEOV
Análisis sensorial	5.938	5.681	5.400	6.376
Intención de compra	3.233	3.600	3.033	3.500
Preferencia	1.433	1.600	1.500	1.467

No hay diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$)

Anexo: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado (a) voluntario (a)

Esta investigación es sobre el uso de antimicrobianos naturales a base de combinaciones de quitosano, aceites esenciales de limón y orégano con glicerol de grado alimenticio como revestimiento comestible de frutas. Este estudio es parte del trabajo de tesis desarrollado por el Bachiller Mario Ricardo Ruiz Burgpa, egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, de la Universidad Ricardo Palma, bajo la asesoría del Mag. Juan Carlos Ramos Gorbeña.

El objetivo principal de éste estudio es evaluar la eficacia de la aplicación combinada de quitosano y aceites esenciales de limón y orégano como tratamiento poscosecha para prevenir infecciones causadas por *B. cinerea*, en *Lycopersicon esculentum* “tomate”. Se plantea como una alternativa de solución natural para mantener la calidad organoléptica de frutas y vegetales *in vivo*, así como conservarlos frescos en los almacenes, supermercados, vehiculos de transporte y refrigeradoras, desincentivando la utilización de agroquímicos tóxicos que agreden al medio ambiente.

Pedimos su colaboración para la realización de análisis sensorial, así como su autorización para presentar los resultados de este estudio en el informe final de Tesis. Las encuestas no revelarán sus nombres. Le informamos que esta investigación no ofrece riesgos previsibles para su salud. Esclarecemos que su participación en el estudio es voluntaria y, por lo tanto, usted no está obligado a proporcionar la información y/o colaborar con las actividades solicitadas por el investigador. En caso decida que no participará o quiera retirarse del estudio, no le generará ningún problema. Los investigadores estarán a su disposición para cualquier aclaración que considere necesaria en cualquier etapa de la investigación.

✂-----

Compromiso del voluntario:

Ante lo expuesto, declaro que fui debidamente esclarecido y doy mi consentimiento para participar en la investigación y para la publicación de los resultados. Soy consciente de que recibí una copia de este documento.

Firma del voluntario

Firma del director de Tesis

Firma del Tesista

Anexo: Análisis sensorial – Encuesta de preferencia

Nombre: _____ Edad: _____ Correo: _____

_____ DNI: _____ Teléfono: _____

Fecha: _____

1. Evaluación sensorial

Usted está recibiendo muestras codificadas de tomate recubiertas con una biopelícula comestible de aceites esenciales de limón u orégano con quitosano proveniente de caparzones de camarón. Pruébelas de izquierda a derecha, evalúe sensorialmente las muestras de acuerdo con cada atributo de los cuadros y escriba el valor de la escala que usted considera correspondiente para la muestra (código) en lo que se refiere a los atributos evaluados. Espere 30 segundos antes de consumir la siguiente muestra y utilice agua y coma una galleta entre cada evaluación.

Código de muestra: 649									
Atributo	Escala								
	Me disgustó muchísimo	Me disgustó mucho	Me disgustó moderadamente	Me disgustó ligeramente	Neutral	Me gustó ligeramente	Me gustó moderadamente	Me gustó mucho	Me gustó muchísimo
Apariencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aroma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor residual	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Firmeza	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Evaluación global	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Código de muestra: 448									
Atributo	Escala								
	Me disgustó muchísimo	Me disgustó mucho	Me disgustó moderadamente	Me disgustó ligeramente	Neutral	Me gustó ligeramente	Me gustó moderadamente	Me gustó mucho	Me gustó muchísimo
Apariencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aroma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor residual	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Firmeza	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Evaluación global	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Código de muestra: 938									
Atributo	Escala								
	Me disgustó muchísimo	Me disgustó mucho	Me disgustó moderadamente	Me disgustó ligeramente	Neutral	Me gustó ligeramente	Me gustó moderadamente	Me gustó mucho	Me gustó muchísimo
Apariencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aroma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor residual	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Firmeza	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Evaluación global	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Código de muestra: 395									
Atributo	Escala								
	Me disgustó muchísimo	Me disgustó mucho	Me disgustó moderadamente	Me disgustó ligeramente	Neutral	Me gustó ligeramente	Me gustó moderadamente	Me gustó mucho	Me gustó muchísimo
Apariencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aroma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor residual	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Firmeza	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Evaluación global	1	2	3	4	5	6	7	8	9

2. Intención de compra

Ahora indique que haría si encontrara estos tomates en el mercado

Código de muestra: 649					
Atributo	Escala				
	Nunca los compraría	Posiblemente no los compraría	Neutral	Posiblemente los compraría	Los compraría
	1	2	3	4	5
	Intención de compra				

Código de muestra: 448					
Atributo	Escala				
	Nunca los compraría	Posiblemente no los compraría	Neutral	Posiblemente los compraría	Los compraría
	1	2	3	4	5
	Intención de compra				

Código de muestra: 938					
Atributo	Escala				
	Nunca los compraría	Posiblemente no los compraría	Neutral	Posiblemente los compraría	Los compraría
	1	2	3	4	5
	Intención de compra				

Código de muestra: 395					
Atributo	Escala				
	Nunca los compraría	Posiblemente no los compraría	Neutral	Posiblemente los compraría	Los compraría
	1	2	3	4	5
	Intención de compra				

3. Test de ordenación de la preferencia

Ahora, ordene las muestras de forma decreciente según su preferencia: a la izquierda la que mas le gustó y a la derecha la que menos le gustó.

Puesto	Código
1°	
2°	
3°	
4°	

¡Gracias por su colaboración!