



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

**Obtención de quitosano por el método biotecnológico
optimizado y su aplicación como recubrimiento para el
control de antracnosis en papaya**

TESIS

Que presenta

BLANCA ALICIA LÓPEZ ZAZUETA

Para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIA
Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores de tesis

DR. MISAEL ODÍN VEGA GARCÍA
DRA. LIDIA ELENA AYÓN REYNA

Culiacán Rosales, Sinaloa, México

Agosto 2023



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Presentación

La presente investigación, titulada “Obtención de quitosano por el método biotecnológico optimizado y su aplicación como recubrimiento para el control de antracnosis en papaya”, se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha del Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. Misael Odín Vega García y la Dra. Lidia Elena Ayón Reyna, contó con la asesoría del Dr. Roberto Gutiérrez Dorado, Dr. Fernando Arturo Rodríguez Gómez y la Dra. Martha Edith López López, con la ayuda económica brindada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme realizar el posgrado en Doctorado de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me ayudó a realizar mis estudios y concluir con el trabajo de tesis.

A mi director de tesis Dr. Misael Odín Vega García agradezco infinitamente por haberme dado la posibilidad de integrarme a su grupo de investigación. Por brindarme su constante y paciente seguimiento durante el desarrollo del presente trabajo. Además de agradecerle por transmitirme todo su conocimiento en el tema y por su tiempo invertido en la corrección de este trabajo.

A mi asesor, Dr. Roberto Gutiérrez Dorado por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, porque sus asesorías me ayudaron bastante en la realización de los análisis y en la discusión de los resultados.

A mi asesor, Dr. Fernando Arturo Rodríguez Gómez por todo el apoyo brindado a larga distancia, pero siempre presente, por la materia prima aportada y porque sus asesorías me ayudaron bastante en la realización de los análisis.

A mi directora, Dra. Lidia Elena Ayón Reyna le agradezco por ayudarme con los lineamientos para el desarrollo de la tesis, por brindarme su experiencia y conocimiento en el tema y por su esfuerzo y dedicación en la corrección de este trabajo. Por guiarme en todas las técnicas, que sin su apoyo hubiese resultado difícil su implementación. Además de agradecerle por transmitirme todo su conocimiento y

amor a este arte llamado investigación, así pues, por su tiempo invertido en este trabajo.

A mi asesora, Dra. Martha Edith López López con especial cariño y respeto le agradezco su constante y paciente seguimiento durante el desarrollo del presente trabajo. Gracias infinitas.

A mis compañeros de laboratorio y posgrado Denisse y Jordi por su apoyo incondicional y toda la ayuda brindada durante la parte experimental, pero principalmente por todas las pláticas compartidas que hacían más amena la estancia.

A todos los chicos y chicas del laboratorio poscosecha y laboratorios alrededores cada uno fue de gran importancia en la realización de esta investigación.

A mis amigas de toda la vida América, Fernanda, Melissa y Malenny y hoy a sus pequeños amores, amigos de mis hijos, Sofia, Alejandrito, Luisa Fernanda, Carlitos y Paulita gracias por cada momento y risas compartidas, los amo con todo mi corazón.

A mis padres, hermanas, sobrinos y mi segunda familia porque fueron ellos quienes me impulsaron a continuar con mis estudios y es gracias a ellos que he podido salir adelante ya que sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí.

Y por último quiero brindar mi máximo agradecimiento a mi esposo y mis dos hijos Robertito y Sara María pues saben que sin ellos nada de esto tuviera sentido, más allá de brindarme paciencia me brindaron amor, respeto y mucha comprensión los cuales fueron los motivos necesarios para seguir adelante, agradezco al cielo por estar unidos y tenerlos. ¡LOS AMO INFINITAMENTE!

DEDICATORIA

“Pasaste por nuestras vidas como una estrella fugaz, pero tu brillo fue especial y vivirá siempre en nuestros corazones. Ahora que tu alma descansa en paz quiero que sepas que siempre te recordaré con mucho cariño. Fuiste una gran persona para mí.”

-JALL.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	8
A. Biopolímeros	8
1. Quitina.....	8
a. Obtención de quitina.....	8
2. Quitosano.....	12
a. Obtención de quitosano.....	13
b. Quitosano como recubrimiento comestible.....	16
c. Aplicaciones del recubrimiento comestible a base de quitosano de peso molecular y grado de desacetilación altos.....	17
1) Control de la calidad poscosecha.....	17
2) Inductor del sistema de defensa antioxidante	19
4) Antracnosis.....	25
B. PAPAYA.....	26
1. Generalidades.....	26
2. Origen y antecedentes	26
3. Composición química y nutrimental	27
4. Importancia económica de la papaya.....	30
V. JUSTIFICACION.....	34
VI. HIPÓTESIS.....	35
VII. OBJETIVOS.....	36
A. OBJETIVO GENERAL	36
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
A. MATERIALES	38

B.	MÉTODOS	38
1.	Primera etapa: Aplicación de tres quitosanos comerciales	39
a.	Espesor y permeabilidad al vapor de agua de las películas	39
	b. Ensayo antifúngico <i>in vitro</i>	42
	c. Inhibición del crecimiento radial micelial	43
	d. Inhibición de la germinación de conidios	44
	e. Efecto fungistático/fungicida	45
	f. Ensayo antifúngico <i>in vivo</i>	45
	1) Incidencia de antracnosis	46
	2) Severidad de antracnosis	46
	g. Análisis histológico	47
	1) Microscopía óptica.....	47
	h. Parámetros de calidad poscosecha.....	48
1)	Pérdida de peso.....	48
	2) Color externo.....	48
	3) Firmeza	49
	4) Sólidos solubles totales (SST).....	49
	i. Compuestos bioactivos.....	49
	1) Ácido ascórbico (AA).....	49
	2) Compuestos fenólicos totales (CFT)	50
	j. Capacidad antioxidante no enzimática	51
	1) Método DPPH	51
	2) Método ABTS	51
2.	Etapa 2: Optimización del proceso biotecnológico para la obtención de quitosano.....	53
	a. Diseño experimental	53
	b. Obtención de quitina optimizada.....	53
	1) Fermentación ácido láctica.....	53
	2) Desproteínización.....	55
	3) Desmineralización	55
	4) Despigmentación.....	55
	c. Obtención de quitosano a partir de quitina optimizada	56
	1) Producción del extracto enzimático de <i>C. gloeosporioides</i>	56

2)	Purificación de la enzima quitina desacetilasa (QDA)	56
3)	Desacetilación de quitina.....	57
d.	Caracterización química de quitina y quitosano.....	57
1)	Humedad.....	57
2)	Proteína.....	57
3)	Lípidos.....	58
4)	Cenizas	58
5)	Carbohidratos.....	58
e.	Caracterización físicoquímica	59
1)	Peso molecular.....	59
2)	Medición de color	60
3)	Capacidad de retención de agua y grasas	60
f.	Evaluación de la variable de respuesta para optimizar quitosano	61
1)	Grado de desacetilación.....	61
3.	Etapa 3: Aplicación del quitosano biotecnológico optimizado en frutos de papaya	62
a.	Capacidad antioxidante enzimática	62
1)	Actividad de catalasa (CAT).....	62
2)	Actividad de peroxidasa (POD)	63
b.	Análisis estadísticos	63
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
A.	Primera etapa de investigación	65
1.	Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas de quitosano (QTS) de diferentes pesos moleculares	65
2.	Ensayo antifúngico <i>in vitro</i> del quitosano de diferentes pesos moleculares	67
a.	Crecimiento radial micelial, germinación de conidios y efecto fungistático-fungicida	67
3.	Actividad antifúngica <i>in vivo</i>	71
4.	Análisis de calidad poscosecha	76
5.	Análisis histológicos	81
6.	Compuestos bioactivos.....	84
7.	Capacidad antioxidante.....	88

B.	Segunda etapa de investigación	92
1.	Evaluación de la variable de respuesta utilizada para optimizar quitosano biotecnológico	92
a.	Grado de desacetilación (GD).....	92
2.	Caracterización química de quitina, quitosano comercial y quitosano biotecnológico optimizado.....	97
3.	Caracterización físico-química del quitosano comercial y quitosano biotecnológico optimizado.....	101
a.	Peso molecular	101
b.	Medición de color y capacidad de retención de agua y grasas	102
C.	Tercera etapa de investigación	106
1.	Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas de quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico (QTS B)	106
2.	Ensayo antifúngico <i>in vitro</i>	109
a.	Crecimiento radial micelial, germinación de conidios	109
a.	Incidencia y severidad de antracnosis	113
4.	Análisis de calidad poscosecha.....	119
a.	Pérdida de peso, firmeza, color externo y sólidos solubles totales	119
5.	Compuestos bioactivos	124
a.	Ácido ascórbico y fenólicos totales	124
6.	Capacidad antioxidante	129
a.	Método ABTS y DPPH	129
7.	Actividad enzimática antioxidante.....	132
a.	Catalasa (CAT) y peroxidasa (POD).....	132
X.	CONCLUSIONES	137
XI.	BIBLIOGRAFÍA	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Páginas
1	Estructura química de la quitina compuesta por dos unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina)	9
2	Estructura química de quitosano compuesto por 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina y N-acetil-2-Monómeros de amino-2-desoxi-D-glucosamina, unidos por enlaces β -(1-4) glicosídicos	14
3	Diagrama de flujo del desarrollo de la primera etapa del experimento. BAL= Bacterias ácido lácticas.	40
4	Diagrama de la segunda etapa del experimento. QBOPMA= Quitosano Biotecnológico Optimizado Peso Molecular, QCPMA= Quitosano comercial peso molecular alto, Quitosano Peso Molecular Medio y QCPMB= Quitosano Comercial Peso Molecular Bajo.	41
5	Imágenes representativas de cajas de PDA tratadas con QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa, Fungicida químico (tiabendazol) y el control mostrando el crecimiento radial micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> durante 9 días de incubación a 28 °C.	69
6	Imágenes representativas de los frutos de papaya tratados con QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa, Fungicida químico (tiabendazol) y el control mostrando síntomas de antracnosis sobre la superficie epidérmica durante 12 días de almacenamiento a 25 °C.	73
7	Porcentaje de incidencia de antracnosis en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa.	74
8	Porcentaje de severidad de antracnosis en papaya inoculada	75

- con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa.
- 9 Micrografías de luz de la sección transversal de frutos de papaya control (A), tratados con fungicida químico (B), QTS-55 kDa (C), QTS-25 kDa (D) y QTS-13 kDa al comienzo del almacenamiento mostrando cutícula, células epidérmicas y células de parénquima normales. Papayas control (F) y tratadas con fungicida químico (G) después 12 días de almacenamiento mostrando hifas intramurales (HI) en el tejido del fruto y rompimiento de cutícula (RC) de la papaya, respectivamente. CE= células epidérmicas, CP= células de parénquima, CU= cutícula. 82
- 10 Contenido de ácido ascórbico en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa 85
- 11 Contenido de fenólicos totales en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa 87
- 12 Capacidad antioxidante medida por el método ABTS en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. 89
- 13 Capacidad antioxidante medida por el método DPPH en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 90

	kDa, QTS-13 kDa.	
14	Gráfica de superficie y contornos que muestra el efecto del volumen del inóculo (mL) y concentración de nutrientes (g/L) sobre el grado de desacetilación del quitosano obtenido por método biotecnológico.	95
15	Efecto del quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y el quitosano comercial (QTS C), fungicida químico (tiabendazol) sobre la inhibición del crecimiento micelial radial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	110
16	Efecto del quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y el quitosano comercial (QTS C), fungicida químico (tiabendazol) sobre la inhibición de la germinación de conidios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	112
17	Porcentaje de incidencia de antracnosis en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	114
18	Imágenes representativas de los frutos de papaya tratados con quitosano comercial (QTS C), quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y fungicida químico (tiabendazol) mostrando síntomas de antracnosis sobre la superficie epidérmica durante 12 días de almacenamiento a 25 °C.	116
19	Porcentaje de severidad de antracnosis en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	117
20	Contenido de ácido ascórbico en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados	126

	con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	128
21	Contenido de fenólicos totales en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	
22	Capacidad antioxidante medida por el método de ABTS en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	130
23	Capacidad antioxidante medida por el método de DPPH en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	131
24	Actividad antioxidante de Catalasa (CAT) en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	134
25	Actividad antioxidante de Peroxidasa (POD) en papaya inoculada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	135

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Páginas
1	Composición en fresco del fruto de papaya	29
2	Producción mundial de papaya durante el 2021	31
3	Producción nacional de papaya durante el 2021	32
4	Diseño experimental que se empleó para obtener diferentes combinaciones de concentración de enzima (C) y tiempo de hidrólisis enzimática (tH) para la producción de quitina y quitosano mediante bioconversión de residuos de camarón, y las variables de respuesta (cenizas, rendimiento, grado de desacetilación).	54
5	Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de quitosano (QTS) de diferentes pesos moleculares.	66
6	Inhibición del crecimiento micelial radial, inhibición de la germinación conidios y efecto fungistático/fungicida de quitosanos (QTS) de diferentes pesos moleculares sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	68
7	Efecto de diferentes pesos moleculares de quitosano (QTS) sobre la inhibición del crecimiento micelial radial y la germinación conidios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y efecto fungicida/fungistático.	73
8	Composición proximal de quitina, quitosano comercial y quitosano biotecnológico optimizado.	80
9	Efecto de diferentes pesos moleculares de quitosano (QTS) sobre la pérdida de peso, firmeza, color externo (L* y °Hue) y sólidos solubles totales de papaya infectada con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y almacenada a 25 °C por 12 días.	103
10	Diseño experimental empleado para obtener diferentes combinaciones de volumen de inóculo y concentración de nutrientes (VI, CN) para la producción de Quitosano por	106

	desacetilación enzimática, y resultados experimentales de la variable de respuesta (Grado de desacetilación).	
11	Color (luminosidad L^* y parámetros a^* y b^*), capacidad de retención de agua y grasas de las películas a base de quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).	111

I. RESUMEN

Uno de los recursos naturales más abundantes en el mundo es la quitina, la cual puede ser extraída a partir de ciertos microorganismos, insectos y animales marinos, como el camarón. A partir de la quitina se puede obtener el quitosano, un biopolímero con amplia aplicación en la industria alimentaria. Sin embargo; para su extracción y obtención es utilizado un proceso termoquímico que compromete su calidad. Actualmente, un método alternativo es el proceso biotecnológico, en el cual se lleva a cabo una fermentación ácido láctica (FAL) para obtener quitina y una desacetilación enzimática (DE) utilizando enzimas como quitina desacetilasa (QDA) para obtener quitosano. La implementación de la FAL y DE en conjunto genera un quitosano de peso molecular (PM) y grado de desacetilación (GD) altos. Dichas características le otorgan al quitosano un mayor potencial antimicrobiano y de barrera, además de una estimulación sobre el sistema antioxidante, en comparación con el quitosano obtenido por el proceso termoquímico, lo que lo vuelve un mejor tratamiento para los frutos que son susceptibles a antracnosis, como la papaya, el cual es uno de los frutos tropicales de mayor consumo en el mundo. Además, en la bibliografía no existe información sobre la obtención del quitosano por el método biotecnológico (FAL-DE), ni el impacto de un PM y GD alto sobre el control de antracnosis, la calidad poscosecha y el sistema antioxidante en frutos de papaya. Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso biotecnológico (FAL-DE) para la obtención de quitosano y estudiar el efecto de su aplicación como recubrimiento sobre el desarrollo de antracnosis, calidad poscosecha y sistema antioxidante en frutos de papaya infectados con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Este trabajo se dividió en tres etapas, en la primera se aplicaron

quitosanos comerciales de tres PM (13, 25 y 55 kDa) con la finalidad de obtener el quitosano con el mayor efecto sobre el control antifúngico y poscosecha e inductor del sistema antioxidante de los frutos de papaya, en la segunda etapa se realizó la optimización del proceso biotecnológico (FAL y DE) utilizándose un diseño experimental compuesto rotatable donde las variables del proceso fueron volumen del inóculo (mL) y concentración de nutrientes (g/L), la variable de respuesta fue el grado de desacetilación (%). El quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) obtenido se caracterizó físicoquímica y estructuralmente al igual que el quitosano comercial (QTS C) y la quitina. En la tercera etapa, se aplicaron el QTS B al 1%, el QTS C 1% y el tiabendazol (0.05 mg/mL), observándose el efecto de manera *in vitro* e *in vivo* sobre *C. gloeosporioides*, la calidad poscosecha y el sistema antioxidante endógeno y exógeno. Respecto a los resultados, el QTS C presentó menor daño por antracnosis y menor degradación del tejido de papaya, así mismo, favoreció la activación del sistema antioxidante endógeno (ácido ascórbico y fenólicos totales) de los frutos de papaya. Respecto a la optimización del proceso biotecnológico, el extracto enzimático de *C. gloeosporioides* generó un QTS B con mayor GD que la enzima purificada quitin desacetilasa. Por otra parte, el mayor GD (89%) del QTS B se obtuvo con las siguientes variables de proceso: volumen de inóculo de 50 mL y una concentración de nutrientes de 50 g/L. QTS B presentó mayor peso molecular en comparación con QTS C. QTS B fue el más efectivo para reducir la enfermedad de antracnosis, disminuir la pérdida de peso y firmeza, mantener el color externo y los SST, además presentó mayor contenido de ácido ascórbico y fenólicos totales, la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) y la actividad antioxidante enzimática (POD y CAT) durante el almacenamiento de papaya a 25 °C.

II. ABSTRACT

One of the most abundant natural resources in the world is chitin, which can be extracted from certain microorganisms, insects, and marine animals, such as shrimp. Chitosan can be obtained from chitin, a biopolymer with wide application in the food industry. However; For its extraction and obtaining, a thermochemical process is used that compromises its quality. Currently, an alternative method is the biotechnological process, in which lactic acid fermentation (LAF) is carried out to obtain chitin and enzymatic deacetylation (ED) using enzymes such as chitin deacetylase (QDA) to obtain chitosan. The implementation of LAF and ED together generates a chitosan with a high molecular weight (MW) and degree of deacetylation (DD). These characteristics give chitosan a greater antimicrobial and barrier potential, in addition to stimulating the antioxidant system, compared to chitosan obtained by the thermochemical process, which makes it a better treatment for fruits that are susceptible to anthracnose. such as papaya, which is one of the most consumed tropical fruits in the world. In addition, in the bibliography there is no information on obtaining chitosan by the biotechnological method (LAF-DD), nor the impact of a high MW and DD on the control of anthracnose, postharvest quality and the antioxidant system in papaya fruits. For all this, the objective of this work was to optimize the biotechnological process (LAF-DD) to obtain chitosan and to study the effect of its application as a coating on the development of anthracnose, postharvest quality and antioxidant system in papaya fruits infected with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. This work was divided into three stages. In the first, commercial chitosan of three MW (13, 25 and 55 kDa) were applied in order to obtain the chitosan with the greatest effect on antifungal and postharvest control and inducer of the

antioxidant system of the papaya fruits, in the second stage the optimization of the biotechnological process (LAF and DD) was carried out using a rotatable compound experimental design where the process variables were inoculum volume (mL) and nutrient concentration (g/L), the variable response was the degree of deacetylation (%). The biotechnological optimized chitosan (CTS B) obtained was characterized physicochemically and structurally like the commercial chitosan (CTS C) and chitin. In the third stage, 1% CTS B, 1% CTS C and thiabendazole (0.05 mg/mL) were applied, observing the effect in vitro and in vivo on *C. gloeosporioides*, postharvest quality and the system. endogenous and exogenous antioxidant. Regarding the results, CTS C presented less damage due to anthracnose and less degradation of papaya tissue, likewise, it favored the activation of the endogenous antioxidant system (ascorbic acid and total phenolics) of papaya fruits. Regarding the optimization of the biotechnological process, the enzymatic extract of *C. gloeosporioides* generated a CTS B with higher DD than the purified enzyme chitin deacetylase. On the other hand, the highest DD (89%) of CTS B was obtained with the following process variables: inoculum volume of 50 mL and a nutrient concentration of 50 g/L. CTS B had a higher molecular weight compared to CTS C. CTS B was the most effective in reducing anthracnose disease, decreasing weight loss and firmness, maintaining external color and TSS, and also had higher ascorbic and phenolic acid content. totals, antioxidant capacity (ABTS and DPPH) and enzymatic antioxidant activity (POD and CAT) during papaya storage at 25 °C.

III. INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polímero, basado en recursos renovables y/o biodegradables, más abundante e importante en la naturaleza, seguido de la celulosa, ya que es un constituyente estructural de las especies marinas como el camarón, el cual representa una fuente importante de ingresos en la industria acuícola (Ramírez y col 2010; Lopes y col 2018). A partir de la quitina se obtiene quitosano, el cual es una molécula desacetilada compuesta de unidades de glucosamina y en menor proporción de poli- β -(1-4) N-acetil-D-glucosamina de naturaleza policatiónica (Tajdini y col 2010; Hua y col 2019; Vilaplana y col 2020). De manera comercial, en la extracción y obtención de estos biopolímeros se aplican diversos métodos físicoquímicos; sin embargo, es importante señalar que estos métodos comprometen las propiedades funcionales como el grado y distribución de las subunidades desacetiladas y el PM, así como la utilidad industrial del quitosano (Hernández-Cocoletzi y col 2009; Pareek y col 2013).

Por ello, las investigaciones actuales se están enfocando en la búsqueda de alternativas para la obtención de quitina y quitosano como es el caso del proceso biotecnológico, en el cual se utiliza la FAL para la extracción de quitina y la DE mediada por la acción de enzimas como QDA para la obtención de quitosano. Durante la implementación de la FAL se generan, además de quitina parcialmente purificada, otras sustancias de valor agregado alto como sales de calcio, proteínas y pigmentos (Lárez-Velásquez 2006). Con respecto a la DE, la enzima implementada cumple con actividad de desacetilación específica, la cual evita la degradación de distintos componentes de la molécula permitiendo obtener un quitosano con GD y PM altos los cuales se han asociado con el efecto fungicida del biopolímero

(Bautista-Baños y col 2004; Zhu y col 2013; Zhang y col 2019). Por ejemplo, la actividad antimicrobiana del quitosano ha sido verificada en una amplia variedad de microorganismos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria kikuchiana* Tanaka, *Botrytis cinerea* y *Aspergillus ochraceus* (Meng y col 2010; Árabe Rima-de Oliveira y col 2017; Ayón-Reyna y col 2015; Meng y col 2020), siendo el PM el factor crucial en la inhibición de los hongos (Kewsuwan y col 2014; Correa-Pacheco y col 2017; Mohammadi y col 2016; Hua y col 2019). Si bien estos patógenos provocan una respuesta del huésped (fruto), también la aplicación del quitosano puede influir fácilmente en el sistema antioxidante exógeno y endógeno, así como, en la calidad de los frutos (Kewsuwan y col 2014). Hua y col (2019) informaron que el tratamiento con quitosano aumentó la actividad de catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), influyó en la calidad poscosecha e inhibió la infección por *B. cinerea* en frutos de kiwi. Resultados similares acerca de un recubrimiento comestible de quitosano han sido observados en frutos de cereza (Dang y col 2010), durazno (Ma y col 2013), arándano, grosella roja (Hefft 2017), manzana (Li y col 2015), entre otros. Asimismo, se ha reportado que el quitosano reduce el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en diversos frutos (Colina y col 2014; Árabe-Rimá de Oliveira y col 2017; Lima-Oliveira y col 2018). La antracnosis es una enfermedad muy devastadora debido a que los síntomas por lo general aparecen después de la cosecha cuando el fruto comienza a madurar y se van desarrollando rápidamente hasta volver al fruto no apto para su comercialización (Gomes-Moraes y col 2013). Uno de los frutos más afectados por esta enfermedad es la papaya, ya que se reportan pérdidas por antracnosis del 40% al 100% de la producción anual. La papaya es un fruto que se cultiva principalmente en regiones

tropicales y es económicamente importante en el mercado internacional ya que su comercialización en fresco se ha incrementado en los últimos años debido a sus beneficios nutricionales y de salud (Jhon y col 2018). Sin embargo, no existen reportes en donde se evalúe la calidad del quitosano obtenido por el método biotecnológico y el efecto de su aplicación en el control de antracnosis, la calidad poscosecha, la inducción o actividad antioxidante del fruto tratado con el biopolímero. Es por ello que, el objetivo de esta investigación fue optimizar el proceso biotecnológico para la obtención de quitosano a partir de residuos de camarón y estudiar el efecto de su aplicación como recubrimiento sobre la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo*, calidad poscosecha y sistema de defensa antioxidante en frutos de papaya infectados con el hongo *C. gloeosporioides*.

IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA

A. Biopolímeros

1. Quitina

La quitina (del griego *tunic*, envoltura) es un biopolímero natural constituido por copolímeros lineales de N-acetil-glucosamina distribuidos al azar y unidos mediante un enlace β -(1-4) (**Figura 1**) (Zhang y col 2019; Younes y Rinaudo 2015). La quitina pura es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro, insípido y de estructura porosa (Ramírez y col 2010). Este bioproducto de elevada masa molecular cuenta con tres diferentes formas cristalográficas: α -, β - y γ -quitinas que se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, siendo su fuente de obtención principal el caparazón de muchos crustáceos. Se utiliza principalmente como materia prima para producir productos derivados, tales como quitosano, quito-oligosacáridos, astaxantina y glucosamina. Al estar ampliamente distribuido en materiales de desecho, la producción industrial de quitina representa un mejor aprovechamiento de estos recursos disponibles a nivel mundial (Lárez-Velázquez 2006). Sin embargo, a pesar de que la metodología tradicional (método químico) de obtención de quitina a partir de residuos de la industria camaronera ofrece una posibilidad de reducción de contaminantes, utiliza una cantidad alta de materiales químicos y energía que hace el proceso en su totalidad poco sustentable (Díaz-Sánchez 2007).

a. Obtención de quitina

La quitina está fuertemente asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos, por lo que se realizan procesos de separación para poder ser removidos

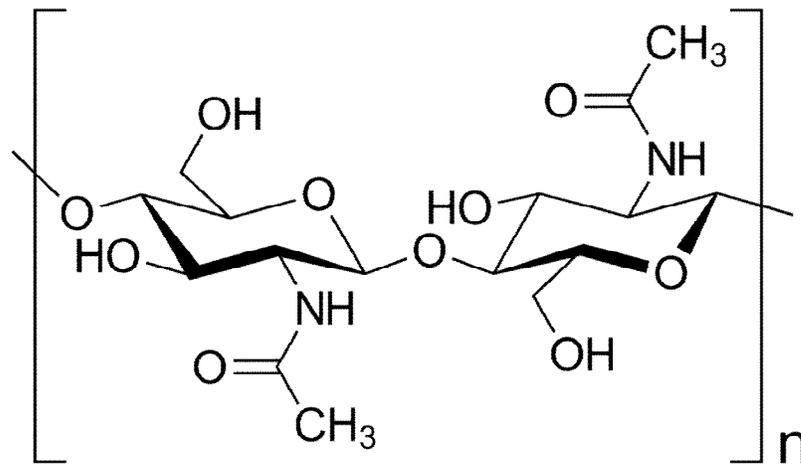


Figura 1. Estructura química de la quitina compuesta por dos unidades de N-acetil-glucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Younes y Rinaudo (2015).

y alcanzar un grado de pureza alto necesario para diversas aplicaciones (Teli y Sheikh 2012). Existen diferentes procesos de obtención de quitina, por ejemplo, los métodos tradicional o químico y el biológico. La obtención convencional implica el uso de ácidos y bases fuertes a temperatura alta (100-180 °C) (Lopes y col 2018). Para ello, los desechos marinos deben estar previamente limpios, secos y pulverizados para después ser sometidos a hidrólisis ácida. Dicha etapa es denominada desmineralización (DM) y consiste en la remoción de minerales, principalmente carbonato de calcio. Los ácidos utilizados son el HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH y HCOOH, siendo HCl al 1% el reactivo preferente (Mármol y col 2011; Mohammed y col 2013). La DM se logra fácilmente, ya que implica la descomposición de carbonato de calcio en las sales de calcio solubles en agua con la liberación de dióxido de carbono (Younes y Rinaudo 2015). Una vez desmineralizados, el proceso de desproteinización comienza utilizando una amplia gama de productos químicos incluyendo NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂; sin embargo, el reactivo preferencial por la industria es el NaOH y se aplica a una concentración que oscila entre 0.125 a 5.0 M, variando la temperatura (por encima de 160 °C) y la duración del tratamiento (de unos minutos hasta unos pocos días) (Younes y Rinaudo 2015). Por su parte, la despigmentación suele llevarse a cabo a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de disolventes. También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H₂O₂ (0.5-3.0%) y el NaClO (0.32%) (Thakhiew y col 2013).

La desventaja de este método es la utilización de químicos peligrosos a temperaturas altas los cuales causan corrosión del equipo y la formación de

subproductos indeseables tales como polímeros desacetilados de manera irregular debido a que el uso de ácidos suele atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero (de Alvarenga 2011); resultando en la reducción de su PM y GD, afectando directamente las propiedades funcionales y la utilidad industrial del quitosano el cual depende del grado y la distribución de las subunidades desacetiladas (de la Paz y col 2012; Pareek y col 2013). Adicionalmente, la implementación de este método utiliza gran cantidad de agua y energía y da lugar a desechos corrosivos, los cuales son depositados en los ecosistemas acuáticos dañando la flora y fauna, por lo que resulta un proceso agresivo para el medio ambiente (Gortari y Hours 2013). Dado que dicho método es poco amigable con el biopolímero obtenido y el medio ambiente, se ha llevado a cabo el estudio de diferentes procesos alternativos, dentro de los cuales se encuentran algunos procesos biológicos como la hidrólisis con proteasas y la FAL (Cira y col 2002; Rao y Stevens 2005).

La FAL es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto es el ácido láctico. Este proceso lo realizan muchas bacterias ácido lácticas, hongos y algunos protozoos. En condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En ésta, la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y se reducen a NADH las cuales producen la energía necesaria para re-

oxidar el NADH, lo cual se consigue mediante la cesión de dos electrones del NADH al ácido pirúvico, que se reduce a ácido láctico para que puedan tener lugar las reacciones de la glucólisis (Ramírez y col 2011). La fermentación se realiza en un reactor tipo columna con temperatura controlada y agitación ocasional, usando bacterias ácido lácticas, dando como resultado una fracción sólida conteniendo la quitina cruda y una fracción líquida (licor) rica en proteína natural de camarón, minerales y pigmentos (Cira y col 2002). En este proceso, las proteasas de los microorganismos provocan la hidrólisis de las proteínas (desproteización) y la producción de ácido láctico de los microorganismos durante la fermentación y este ácido a su vez contribuye a la desmineralización al reaccionar con el carbonato de calcio (CaCO_3). Este proceso de obtención de quitina permite la recuperación de productos con valor agregado como minerales, pigmentos y proteínas (Teli y Sheikh 2012; Pareek y col 2013; Younes y Rinaudo 2015). Además, si este proceso se combina con un procedimiento de hidrólisis enzimática para desacetilar el producto obtenido por FAL se genera un método más controlable que puede conducir a la producción de quitosano con calidad superior (Tsigos y col 2000).

2. Quitosano

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos y la nombró “quitina modificada”. Más tarde, en 1894, Hoppe-Seyler fue quien la denominó “quitosano” (de la Paz y col 2012).

El quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina; es decir, es una modificación de la quitina que posee mejores propiedades de reactividad y

solubilidad. Se obtiene al sustituir los grupos acetamido de la quitina por grupos amino y se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de PM alto, de fácil aplicación y ambientalmente amigable (Mármol y col 2011). El quitosano es un polímero compuesto por 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina y N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, unidos por enlaces β -(1-4) glicosídicos (**Figura 2**). Es altamente sensible al pH debido a su carácter de poliamina, que les confiere solubilidad a valores de pH ácido, carga positiva neta, propiedades de bioadhesión y tiene la capacidad de quelar iones metálicos (hierro y metales pesados) (Escárcega-Galaz y col 2018).

a. Obtención de quitosano

La mayor parte del quitosano disponible en el mercado se obtiene a partir de la quitina mediante un método termoquímico y solo una pequeña parte se obtiene de manera natural en ciertos hongos (*Mucoraceae*). Por el método termoquímico, la obtención puede realizarse de manera heterogénea, efectuada en medio alcalino (40-45% de hidróxido de sodio) a temperatura alta por un periodo de tiempo variable (120 °C/1-3 horas) sobre la quitina sólida. Sin embargo, esta N-desacetilación casi nunca es completa y el quitosano es considerado como un derivado de quitina parcialmente N-desacetilada. Las condiciones usadas para la desacetilación determinan el PM y el GD del polímero (Heidary y col 2013). Además, el proceso tradicional también comparte las desventajas de la mayoría de los procesos químicos, como el control y la inseguridad ambiental (Pareek y col 2013).

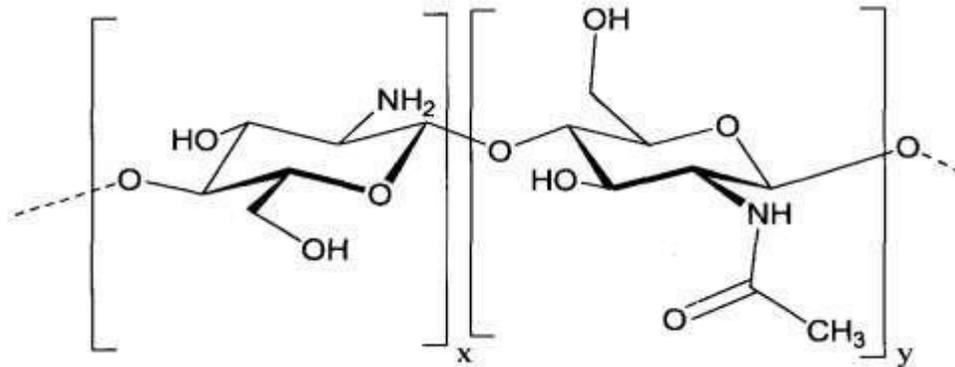


Figura 2. Estructura química de quitosano (QTS) compuesto por 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina y N-acetil-2-Monómeros de amino-2-desoxi-D-glucosamina, unidos por enlaces β -(1-4) glicosídicos. Younes y Rinaudo, 2015.

Un procedimiento alternativo o complementario a la desacetilación alcalina es el método biológico en el cual se usa la enzima QDA producida por la fermentación microbiana. La desacetilación enzimática permite que el proceso sea selectivo y no degrade más constituyentes de la molécula (Zhang y col 2005; Arakane y col 2012; de la Paz y col 2012). Otra ventaja de la hidrólisis enzimática es que para su realización se utilizan enzimas a partir de microorganismos, los cuales se pueden propagar rápidamente, por lo tanto, representan un gran potencial de aplicación para ahorrar costos durante la desacetilación de la quitina (Zhang y col 2005).

El método enzimático consiste en desacetilar la quitina por medio de la enzima QDA (EC 3.5.1.41), una glicoproteína que cataliza la reacción de conversión de los monómeros 2-acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)-glucopiranososa a 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (Pareek y col 2011). El proceso es muy sencillo y se realiza en un reactor controlando la temperatura (50 °C) y el pH de la reacción que se da entre el sustrato (quitina) y la enzima. QDA pertenece a la familia de las esterasas y puede ser obtenida principalmente de materiales biológicos como los hongos, por ejemplo, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Rhizopus oryzae* y *Penicillium oxalicum* (Gao y col 1995; Zhang y col 2005; Aye y col 2006; Blair y col 2006; García-Zapata y Roca-Ortega 2008; Pareek y col 2011; Pareek y col 2013). Estudios previos han demostrado el efecto positivo de la implementación del proceso biológico en las características fisicoquímicas del quitosano, obteniendo un quitosano más homogéneo (Pareek y col 2013; Zubiria-Suarez y col 2014; Jongsri y col 2016; Drevinskas y col 2017).

Ibrahim (2007) mencionó que las enzimas son particularmente adecuadas para las industrias de alimentos debido a que de manera natural son un material biológico catalogado como no tóxico que actúa de manera específica. Por su parte, Aye y col (2006) observaron que la enzima QDA se puede usar efectivamente como una herramienta para modificar la quitina, mencionando que QDA de *R. oryzae* produjo un quitosano estable. Así mismo, Pareek y col (2013) implementaron la enzima QDA de *P. oxalicum* para la bioconversión de quitina a quitosano obteniendo una desacetilación máxima del 80%. También, se ha observado que la implementación de la enzima QDA obtenida a partir del hongo *C. gloeosporioides*, el cual es causante de antracnosis en frutos tropicales como papaya, puede lograr con éxito la obtención de quitosano con buen PM (1,200 kDa) y GD alto (95%). Diversos estudios han demostrado que el quitosano aplicado en los frutos, principalmente como recubrimiento comestible, presenta control sobre antracnosis, mantiene la calidad y participa como estimulador del sistema antioxidante de defensa (Marpudi y col 2011; Pacheco y col 2011; Pacheco y col 2013; Ngo y Kim 2014; Bof y col 2015).

b. Quitosano como recubrimiento comestible

Un recubrimiento comestible se puede definir como una matriz transparente continua, comestible y delgada, que se estructura alrededor de un alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora de recubrimiento con el fin de preservar su calidad y servir de empaque (Fernández-Valdés y col 2015). Los biopolímeros más utilizados en la preparación de los recubrimientos comestibles son polisacáridos (almidón, pectina, celulosa, quitina y quitosano), proteínas (gelatina, caseína, gluten de trigo y zeína) y lípidos (ácido

esteárico, ceras, grasas y ésteres de ácidos grasos), los cuales pueden emplearse individualmente o en combinación (Chiumarelli y Hubinger 2014; Oleyaei y col 2016), o incluso con diferentes aditivos plastificantes, como el glicerol o el sorbitol, que dan la flexibilidad adecuada a la película, disminuyendo su fragilidad y mejorando las propiedades mecánicas de los hidrocoloides debido a su naturaleza hidrofílica (Perdones y col 2016). Los recubrimientos comestibles basados en polisacáridos, como el quitosano, son una alternativa para el empaque de alimentos, por su biodegradabilidad y costo de producción bajo, así como por sus propiedades biológicas. Algunos recubrimientos comestibles elaborados a base de quitosano de PM alto han mostrado mejores resultados que los recubrimientos de quitosano de PM bajo (Lárez-Velázquez 2006; Ramírez y col 2010; Pareek y col 2013; Dai-Hung y Su-Kwon 2014; Abdel-Mohsen y col 2016; Chien y col 2016; Vázquez-Luna y col 2019).

c. Aplicaciones del recubrimiento comestible a base de quitosano de peso molecular y grado de desacetilación altos

1) Control de la calidad poscosecha

En términos de calidad poscosecha, el quitosano actúa como una barrera de protección en los frutos y es implementado con el propósito de mantener sus atributos organolépticos y alargar su vida útil. Se ha demostrado que los recubrimientos comestibles elaborados de Quitosano Comercial de Peso Molecular Alto (QCPMA) presentan alta elasticidad, resistencia a la deformación y matrices fuertes debido a que tiene cadenas de grado de polimerización alto, lo que favorece

las interacciones polímero-polímero modificando, la cristalinidad y, en consecuencia, mejora las propiedades mecánicas (Bof y col 2015).

Nuntanid y col (2008) informaron que un aumento en el PM de quitosano aumenta la resistencia al rompimiento y el alargamiento del recubrimiento comestible, lo que se traduce en recubrimientos más fuertes y resistentes al estrés con buenas propiedades de barrera. En un estudio realizado por Zhang y col (2019) se menciona que la aplicación de QCPMA (120 kDa) retrasó la senescencia de nectarina durante su almacenamiento, ya que fue más efectivo para mantener la firmeza, reducir la pérdida de peso (PP) y retardar el cambio de color de los frutos en comparación con los frutos tratados con Quitosano Comercial Peso Molecular Bajo (QCPMB) de 30 kDa y los frutos control. Además, el QCPMA de 253.9 kDa influyó en los cambios de la firmeza, la PP y criterios subjetivos como nivel de marchitamiento, nivel de decoloración y apariencia estética en frutos de kiwi (Drevinskis y col 2017). Así también, se ha observado que un quitosano con GD alto (95%) influyó en la calidad del champiñón shiitake evitando la PP, la disminución de la firmeza y el aumento de sólidos solubles totales.

De acuerdo con Chen y col (1994) y Ziani y col (2008), los recubrimientos comestibles preparados con quitosanos con GD alto son más resistentes a la degradación y deformación que los recubrimientos de los quitosanos con GD más bajos, considerándose una excelente alternativa para la aplicación en los frutos como barrera externa contra el daño mecánico, químico y biológico. En otro estudio se mostraron los efectos de tres GD altos del quitosano (81, 88 y 95%), influyendo positivamente los tres en la calidad poscosecha de los frutos de fresa (%PP, pH,

sólidos solubles totales (SST), firmeza y el contenido de malonaldehído) (Jiang y col 2021). Un quitosano con 95% GD fue aplicado en aguacate y retuvo la pérdida de firmeza, así como el cambio de color en los frutos (Bill y col 2014).

Por otra parte, QCPMA (610 kDa y 75% GD) aplicado en frutos de fresa retardó el % de pérdida de peso, la acidez titulable y el pH (Hajji y col 2018). Jongsri y col (2016) mencionan que el recubrimiento de QCPMA provocó un retraso en el cambio de color, un menor %PP y una producción menor de etileno en los frutos de mango tratados con QCPMA (360 kDa y 85% GD) generando una supresión de CO₂, lo cual puede deberse a la formación de una película de barrera que crea una atmósfera modificada. Por su parte, Xing y col (2018) mencionan que el QCPMA (300 kDa y 92% GD) inhibe la producción de malonaldehído en papa. Ruzaina y col (2017) señalan que QCPMA de 300 kDa y 85% GD fue efectivo para reducir el %PP, mantener la firmeza y el cambio de color del tomate cherry.

2) Inductor del sistema de defensa antioxidante

Adicionalmente a este efecto de barrera y retraso de la maduración, se observó que la aplicación del quitosano en un fruto puede actuar como un inductor, promoviendo la activación del sistema de defensa (producción de compuestos bioactivos y enzimas antioxidantes). Debido a que el quitosano está constituido en su estructura de oligoquitinas y oligoquitosanos, mismos componentes que se encuentran en los fitopatógenos, la diferencia entre microorganismo y quitosano no puede ser reconocida y el sistema de defensa del fruto lo considera un ataque por un agente extraño desencadenando respuestas del sistema de defensa (Rodríguez-Pedroso y col 2009; Ngo y Kim 2014).

Lo anterior se corrobora con un estudio en donde un quitosano con PM alto (350 kDa) aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), obteniéndose un efecto antioxidante mayor que mejoró la viabilidad celular y atenuó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células inducidas por la oxidación (Yang y col 2016).

Por su parte, Zhang y col (2019) observaron el efecto del quitosano con PM alto y bajo (120 kDa y 30 kDa) sobre el contenido de fenólicos y flavonoides totales, la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) y la actividad de ascorbato peroxidasa (APX), los cuales tuvieron niveles más altos en la fruta de nectarina tratada con QCPMA en comparación con los frutos tratados con QCPMB y los frutos control. Hua y col (2019) señalan que la actividad enzimática de peroxidasa (POD) en frutos de kiwi tratados con QCPMA (342 kDa) fue significativamente mayor en comparación con los frutos control, dichos autores atribuyeron los efectos protectores del quitosano al PM y al GD, ya que dichas características generan un aumento de las actividades de enzimas antioxidantes y a la reducción de ROS intracelulares.

Respecto al GD del quitosano, Jiang y col (2019) señalaron los efectos que ejerce el biopolímero al presentar 81, 88 y 95% GD, aumentando el contenido de flavonoides totales y la actividad de SOD, así como disminuir el contenido de malonaldehído en frutos de fresa. Por su parte, Park y col (2004) evaluaron el efecto del quitosano con 50%, 75% y 90% GD sobre la actividad de eliminación contra distintos radicales (DPPH, $\cdot\text{OH}$ y O_2^{\cdot}), encontrando que dicha actividad aumentó significativamente para el quitosano con 90% GD en comparación con los otros dos PM. También, se observó que la aplicación de un quitosano con 90% GD sobre el

fruto de pera incrementó la actividad antioxidante en comparación con los frutos no tratados (Zheng y col 2019). Por su parte, Bill y col (2014) observaron un aumento en la actividad antioxidante por el método de DPPH, POD, fenilalanina amonio liasa, β -1,3-glucanasa, quitinasa, CAT, SOD y el contenido de fenólicos totales cuando los frutos de aguacate fueron sometidos a un recubrimiento de quitosano con un GD alto del 95%.

En otras investigaciones, el QCPMA con 610 kDa y 75% GD aumentó el contenido de carotenoides en frutos de fresa (Hajji y col 2018). Así mismo, Petriccione y col (2018) señalaron la efectividad QCPMA (360 kDa y 90% GD) al retrasar la pérdida en el contenido de fenólicos totales y la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y APX, en comparación con los frutos control. Jongsri y col (2016) señalaron que el H_2O_2 (parámetro oxidativo) disminuyó y el contenido de ácido ascórbico, fenólicos totales y flavonoides libres aumentaron al igual que la capacidad de DPPH y las actividades enzimáticas de CAT y APX en frutos de mango tratados con QCPMA (360 kDa y 85% GD) en comparación con los frutos tratados con QCPMM (270 kDa y 90% GD) y QCPMB (40 kDa y 91% GD). Xing y col (2018) mencionan que un QCPMA (300 kDa y 92% GD) aumenta la actividad de fenilalanina amonio liasa y SOD en papa. La aplicación de un quitosano de peso molecular alto de 280-300 kDa y 88% GD en manzana provocó un incremento en la capacidad antioxidante (DPPH), reductora, quelante y actividad de eliminación de radicales hidroxilos (Jung y Zhao 2012). Así mismo, un aumento en la capacidad antioxidante fue observado al momento de aplicar un QCPMA de 310-375 kDa y 85% GD en uva (Abd El-Rehim y col 2012).

3) Control de enfermedades poscosecha

Aun cuando los frutos son capaces de desencadenar diversos mecanismos de defensa en contra de patógenos, incluyendo la síntesis de enzimas, producción de compuestos bioactivos, lignificación, engrosamiento de las paredes celulares y muerte celular localizada para restringir el desarrollo del patógeno; estos mecanismos de defensa no son suficientes para detener el desarrollo del patógeno, por lo que es necesario tomar medidas efectivas para combatir la enfermedad (Loureiro y col 2012; Mikulic-Petkovsek y col 2013).

Entre las medidas más efectivas para evitar problemas fitopatológicos se encuentra el uso de recubrimientos comestibles como el quitosano. Como se mencionó anteriormente, la aplicación de dicho recubrimiento genera un importante retraso en la maduración de frutos. Este efecto es comúnmente aprovechado para reducir el desarrollo de microorganismos que ocasionan enfermedades poscosecha (Zhou y col 2016). Esto sucede debido a que el recubrimiento produce un desbalance entre la concentración de oxígeno y dióxido de carbono, que retarda la degradación de ácidos orgánicos, liberación de azúcares simples y ablandamiento del fruto. Todos estos eventos en conjunto contribuyen a tener condiciones menos favorables para los hongos y evitar que penetren por la epidermis del fruto (Zhang y col 2019).

La actividad antimicrobiana del quitosano parece estar estrechamente ligada con su PM, una disminución en este parámetro provoca un descenso en el número de especies de hongos inhibidos, por lo tanto, existe cierto requerimiento mínimo de tamaño molecular para poder mostrar actividad antifúngica (Moreno y col 2016; Lima-Oliveira y col 2018; dos Passos Braga y col 2019). Un estudio en *Fusarium solani*

demostró que se necesitan al menos siete residuos de glucosamina en el quitosano para acumularse en el interior celular del hongo y evitar el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación (Hadwiger y col 1986). Por otra parte, la inhibición del crecimiento se ha relacionado con los grupos aminos protonados del quitosano, los cuales puede neutralizar las cargas electronegativas de la superficie celular fúngica creando desórdenes y muerte celular (Hirano y Nagao 1995; Bautista-Baños y col 2004). Otras posibles explicaciones de la actividad fungicida del quitosano se relacionan con la inhibición de la síntesis de algunas enzimas presentes en los hongos o la ocurrencia de alteraciones citológicas (Colina y col 2014).

Diversos autores han encontrado que el quitosano de PM alto es efectivo para inhibir el desarrollo *in vitro* de hongos como *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, así como el desarrollo *in vivo* al inhibir el desarrollo de *Alternaria kikuchiana* en frutos de pera (Chien y Chou 2006; Pacheco y col 2010; Meng y col 2010; Hernández-Lauzardo y col 2011). Un rango de pesos moleculares altos fue estudiado (310-375 kDa) en el desarrollo *in vitro* de dos cepas de *C. gloeosporioides* aisladas de frutos infectados de papaya, los resultados mostraron que los quitosanos fueron igual de efectivos para el control antifúngico (Bautista-Baños y col 2003). La aplicación de QCPMA de 300 kDa exhibió una potente actividad microbiológica en los frutos de papaya (Dotto y col 2015). De igual modo, se menciona que el GD juega un papel crucial en la actividad antifúngica del quitosano y que a mayor GD (95%) y mayor PM (1,210 kDa) se presenta una mayor actividad bacteriostática y bactericida contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus*

aureus (Li y col 2015). También, un quitosano con un GD alto (95%) fue eficaz para el control de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate (Bill y col 2014).

Por otra parte, Xing y col (2018) sugieren que el QCPMA de 300 kDa y 92% de GD controla efectivamente la infección de *Ceratocystis fimbriata* en papa. Además, Silva-García y col (2018) evaluaron el efecto de quitosanos de tres pesos moleculares (alto, medio, bajo) de 248, 140 y 76 kDa con GD de 81%, 84% y 79%, respectivamente, y observaron que el QCPMA generó una actividad antifúngica mayor contra *Cándida* spp., y mencionan que el PM puede alterar el efecto del quitosano de dos maneras: en primer lugar, un PM alto presenta una mayor adsorción y cobertura de las paredes celulares, debilitamiento de la membrana y rotura y fuga celular; en segundo lugar, un PM bajo puede penetrar en las células fácilmente, lo que lleva a la inhibición de varias enzimas y la interrupción de la síntesis de proteínas, que interactúa con la síntesis del ARNm.

Se ha evidenciado por Lima-Oliveira y col (2018) que en un rango de 190-310 kDa y 75–85% GD el quitosano controla el crecimiento micelial de cinco especies patógenas de *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. tropicale* y *C. karstii*), así como el desarrollo de antracnosis en guayaba, mango y papaya. En otro estudio, se evaluó un QCPMA de 610 kDa y 75% de GD sobre *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus flavus* en frutos de fresa obteniendo un control sobre la incidencia de los tres hongos (Hajji y col 2018).

4) Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad fúngica que se encuentra distribuida en áreas tropicales y subtropicales a nivel mundial afectando los frutos principalmente en poscosecha (Rojo-Báez y col 2017). Esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas debido a que los síntomas de antracnosis, por lo general, no son detectables en precosecha o al momento de la cosecha ya que aparecen cuando los frutos están madurando o cuando están maduros, debido a que las esporas del hongo, después de haber germinado y penetrado de manera directa la cutícula del fruto, permanecen latentes mientras el fruto esté inmaduro pero se reactiva la invasión durante su maduración causando una severa descomposición durante el almacenamiento, transporte y distribución (Casarrubias-Carrillo y col 2002; Zhao y col 2013; Madani y col 2014).

Uno de los frutos con mayor susceptibilidad al ataque por antracnosis es la papaya en la cual se reportan pérdidas por la enfermedad entre el 40% y el 100% de la producción del fruto (Ayón-Reyna y col 2018). En papaya, la antracnosis es causada por el hongo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. de la familia de los Ascomycetes cuya infección causa la aparición de síntomas indeseables, iniciando con una emisión de látex sobre la superficie del fruto, seguido de la aparición de lesiones de color marrón, que al avanzar se tornan circulares, acuosas y comienzan a hundirse, mostrando márgenes claros y translúcidos. En una severidad avanzada de la enfermedad, en el centro de la lesión se producen masas de esporas de color salmón (Zavala-León y Alejo 2012).

La incidencia y la severidad de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* disminuyeron en el fruto de mango en presencia de QCPMA con 360 kDa y 85% de GD (Zhou y col 2016). La reducción de incidencia y severidad de la enfermedad de antracnosis podría estar asociada con la activación de las enzimas fenilalanina amonio liasa, quitinasa y β -1,3-glucanasa (Zhou y col 2016).

B. PAPAYA

1. Generalidades

La papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los frutos más importantes y ampliamente distribuidos en los países tropicales y subtropicales del mundo, debido a que su elevado valor nutritivo y excelente sabor contribuyen a su consumo alto (Dharmarathna y col 2013; Iniestra-González y col 2013). La parte comestible del fruto es dulce, suave y jugosa, por lo que es requerido principalmente para el mercado de frutas frescas, pero otros sectores relacionados a la producción de papaya están ganando importancia en el área farmacéutica y de los alimentos procesados debido a sus características nutricionales (Alam y col 2013; Pinto y col 2013).

2. Origen y antecedentes

Se señala que el cultivo de papaya fue descubierto por el conquistador español Hernán Cortés al sur de los estados de Tabasco y Yucatán en 1519, luego fue distribuido hacia Filipinas y de allí a África y al Oriente. Sin embargo, la primera mención literaria de la existencia de la planta de papaya fue hecha en Europa en 1535 por el autor español G. H. de Oviedo en su libro “La natural historia de las Indias” en el cual informó al rey de España del descubrimiento del crecimiento de

papayas entre el sur de México y el norte de Nicaragua (de Oliveira y Vitória 2011; Kalam-Azad y col 2013). Es importante mencionar que, específicamente la variedad Maradol se obtuvo en Cuba tras largos años de mejoramiento, siendo su creador el investigador cubano Adolfo Rodríguez Rivera quien la desarrolló en un periodo de diez años (Juan-Mariano 2009). En el año 1956 logró mediante auto polinización la completa variedad, obteniendo además una reducción del tamaño del fruto, alto rendimiento y una mayor vida de anaquel. El nombre de la variedad “Maradol” proviene del nombre de su creador “Adolfo” y su esposa “María” (Sánchez-Olvera 2003). Actualmente, Maradol es la variedad con mayor producción a nivel mundial debido a sus excelentes características organolépticas y nutricionales, que le otorgan beneficios a la salud del consumidor (John y col 2018).

3. Composición química y nutrimental

El fruto de papaya presenta excelentes propiedades nutrimentales, lo cual ofrece beneficios a la salud del consumidor; además, cuenta con contenido alto de agua (85.90 g/100 g de fruto fresco (gff)) y contenido calórico y graso bajo (23.10 y 0.05 g/100 gff, respectivamente), mientras que aproximadamente el 6% del fruto corresponde a proteína total (USDA 2019). Así mismo, los carbohidratos principales encontrados en la fruta son glucosa, sacarosa y fructosa (Widyastuti y Srianta 2011). También posee macro y micro minerales como el sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre, zinc y manganeso; además, es una excelente fuente de vitaminas como A, B₁, B₂, B₆, y K (**Cuadro 1**) (Nwofia y col 2012).

Cuadro 1. Composición en fresco del fruto de papaya

Componentes por 100 g de porción comestible	
Calorías	23.10-25.80 g
Humedad	85.90-92.60 g
Proteínas	0.081-0.34 g
Grasas	0.05-0.96 g
Carbohidratos	6.17-6.75 g
Fibra cruda	0.51-1.30 g
Cenizas	0.31-0.66 g
Calcio	12.90-40.80 mg
Hierro	0.25-0.78 mg
Potasio	183.0 mg
Sodio	4.0 mg
Fósforo	12.0 mg

Fuente: Ceballos-Chan (2005).

Nutricionalmente, el fruto presenta un contenido alto de vitamina C (ácido ascórbico) y pro-vitamina A (carotenoides), clasificándose como una de las principales fuentes frutales de ácido ascórbico (AA) con un rango promedio de 44 a 60 mg/100 gff (Gebhardt y Thomas 2002). El contenido de AA y pro-vitamina A puede variar entre cultivar o por la riqueza nutricional del lugar de crecimiento y la madurez del fruto. Específicamente, cuando el proceso de maduración comienza, la clorofila se va degradando y la síntesis de carotenoides va aumentando, lo que resulta en un cambio significativo de color de verde a amarillo-naranja con valores promedio que van desde 0.36 hasta 3.4 mg/100 gff, en donde los principales carotenoides presentes en el fruto son el licopeno, β -criptoxantina y β -caroteno (Gayosso-García y col 2011; Ikram y col 2015). Así mismo, se han reportado diversos compuestos fenólicos presentes en la pulpa de papaya cultivar Maradol tales como ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido m-cumárico, quercetina, apigenina, kaempferol, miricetina y luteolina (Ikram y col 2015).

Los carotenoides, junto con los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los frutos de papaya, presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas importantes, atribuyéndosele acción preventiva frente a la protección del fruto, al cáncer y las enfermedades cardiovasculares del consumidor (Gayosso-García y col 2011; Hewajulige 2016).

La capacidad antioxidante de los frutos de papaya está mediada en gran parte por el ácido ascórbico que es uno de los antioxidantes que actúa modificando las moléculas de superóxido y otras formas reactivas de oxígeno, a las cuales cede un electrón para estabilizarlos, protegiendo de esta manera a las moléculas del daño oxidativo (Udomkun y col 2015). Así mismo, los carotenoides y los compuestos fenólicos

también les confieren capacidad antioxidante a los frutos gracias a su propiedad quelante de metales de transición y su acción atrapadora de radicales libres (González-Anzar 2015).

4. Importancia económica de la papaya

A nivel mundial, la mayor producción de papaya se localiza en Asia con el 49.3% de la producción total, seguido del continente americano con el 37.2%, mientras que el resto de la producción se concentra entre África y Oceanía con 13.4% y 0.1%, respectivamente. Los principales países productores son India, Brasil, México, Indonesia, República Dominicana, Nigeria, República Democrática, Cuba y Colombia (**Cuadro 2**). En donde India destaca como el principal productor con 5, 940,000 ton de fruto fresco, seguido de Brasil con 1, 057,101 ton y México con 961,768 ton (FAOSTAT 2023).

En México la producción de papaya variedad Maradol se extiende ampliamente por toda la República Mexicana y es exportada a varios países (SAGARPA 2023). En el 2021, México generó una producción nacional de 2, 582,146 ton con una superficie de 19,114 hectáreas sembradas, siendo Oaxaca el principal productor con 2, 087,457 ton aportando el 39.21% de la producción seguido de Colima y Veracruz con 1, 220,330 y 1, 118,940 ton, respectivamente (**Cuadro 3**) (SAGARPA 2023).

Actualmente, México ocupa el primer lugar en exportación de papaya seguido de Guatemala y Brasil, siendo los principales destinos Estados Unidos y Canadá (FAOSTAT 2023). Sin embargo, las exportaciones de papaya y ganancias asociadas

Cuadro 2. Producción mundial de papaya durante el 2021.

País	Producción (ton)
India	5, 940,000
Brasil	1, 057,101
México	961,768
Indonesia	875,112
República Dominicana	869,306
Nigeria	837,738
República Democrática	214,836
Cuba	189,086
Colombia	179,979
Venezuela	178,740

Fuente: FAOSTAT (2023).

Cuadro 3. Producción nacional de papaya durante el 2021.

Estado	Producción (ton)
Oaxaca	2, 087,457
Colima	1, 220,330
Veracruz	1, 118,940
Chiapas	953,754
Michoacán	486,767
Guerrero	299,804
Jalisco	146,906
Campeche	140,955
Yucatán	112,318
Tabasco	89,464

Fuente: SAGARPA (2023).

a esta actividad pueden ser mermadas en gran medida debido a la rápida maduración del fruto, susceptibilidad a daños físicos, y sobre todo la gran incidencia de antracnosis en México y el mundo. A nivel poscosecha es esencial extender la vida útil de frutos como la papaya con diferentes tecnologías (e.g. recubrimientos comestibles) que garanticen su valor comercial o incluso provean un valor agregado (Valencia-Sandoval y col 2017).

V. JUSTIFICACION

La quitina es un biopolímero ampliamente distribuido en el mundo, presente en las estructuras de los animales marinos como el camarón, a partir de ella se puede obtener quitosano el cual es un biomaterial de importancia en la industria de alimentos. Sin embargo, la extracción de la quitina y la obtención del quitosano se realizan por procesos termoquímicos, los cuales comprometen la calidad del quitosano. El proceso biotecnológico que comprende la fermentación ácido láctica y desacetilación enzimática implementando enzimas como QDA es una buena opción debido a que el proceso puede generar un quitosano de PM y GD altos. Estas características le otorgan al quitosano mejores propiedades antimicrobianas y de barrera que lo vuelven un mejor tratamiento para los frutos que son susceptibles a antracnosis como la papaya, beneficiando su comercialización. Aunado a esto, no existe información reportada acerca de la optimización del proceso de obtención del quitosano por el método biotecnológico (fermentación ácido láctica y desacetilación enzimática) a partir de residuos de camarón, así como del impacto de su alto PM y GD sobre el control de antracnosis, contenido nutrimental y la actividad antioxidante en frutos como papaya. Por ello, es interesante conocer el efecto del quitosano obtenido por el proceso biotecnológico optimizado sobre el desarrollo de antracnosis, las características de calidad poscosecha y el sistema antioxidante de frutos de papaya inoculados con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

VI. HIPÓTESIS

La aplicación de un recubrimiento comestible de quitosano de peso molecular y grado de desacetilación altos obtenido por un proceso biotecnológico optimizado (fermentación ácido láctica y desacetilación enzimática) a partir de residuos de camarón presenta una mayor inhibición del desarrollo de antracnosis, mejora la calidad poscosecha y activa el sistema antioxidante exógeno (compuestos bioactivos) y endógeno (enzimático) de frutos de papaya inoculados con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en comparación con quitosano comercial.

VII. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Optimizar el proceso biotecnológico (desacetilación enzimática) para la obtención de quitosano de peso molecular y grado de desacetilación altos a partir de quitina optimizada obtenida de residuos de camarón y evaluar el efecto de su aplicación como recubrimiento comestible sobre el desarrollo de antracnosis, calidad poscosecha y sistema de defensa antioxidante en frutos de papaya infectados con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en comparación con quitosano comercial.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener la mejor concentración del inóculo enzimático que contiene a quitina desacetilasa y contenido de nutrientes para la obtención de quitosano de peso molecular alto a partir de quitina optimizada obtenida de desechos de camarón, con grado de desacetilación y peso molecular altos.
2. Caracterizar física, química y estructuralmente la quitina y el quitosano obtenidos por proceso biotecnológico optimizado a partir de desechos de camarón.
3. Evaluar el efecto de la aplicación del recubrimiento de quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y quitosano comercial (QTS C) sobre antracnosis en frutos de papaya inoculados con el hongo *C. gloeosporioides*.
4. Analizar el efecto de la aplicación de recubrimiento de QTS B y QTS C sobre la microestructura de frutos de papaya infectados con el hongo *C. gloeosporioides*.

5. Estudiar los cambios en la calidad poscosecha (pérdida de peso, firmeza, color externo y sólidos solubles totales) y en el contenido de compuestos bioactivos (ácido ascórbico, fenólicos totales, flavonoides totales, carotenoides totales) durante el almacenamiento de frutos de papaya tratados con QTS B y QTS C.
6. Determinar los cambios en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante endógeno (CAT y POD) durante el almacenamiento de frutos de papaya tratados con QTS B y QTS C.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron desechos de camarón (cabezas, cáscaras y colas) (*Litopenaeus vannamei*) obtenidos en un mercado de la localidad de Culiacán, Sinaloa. Los desechos fueron transportados al Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde fueron lavados y triturados con un extractor eléctrico, posteriormente pesados y congelados para su conservación, hasta su uso. El suero de leche fue proporcionado por una empresa quesera de la localidad, al cual se le ajustó el pH entre 4.5 y 5 antes de comenzar la FAL. La melaza fue proporcionada por el ingenio azucarero de El Dorado, Sinaloa. El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* fue proporcionado por el Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El quitosano comercial fue obtenido de la empresa Vepinsa de la ciudad de Los Mochis, Sinaloa. Los frutos de papaya (*Carica papaya* L.) cv. Maradol con índice de madurez 3 fueron obtenidos de un huerto cercano a Culiacán, Sinaloa, México y seleccionados con base en la libertad de golpes, ausencia de daños por microorganismos y fungicida sintético.

B. MÉTODOS

El desarrollo de este proyecto se realizó en tres etapas, en la primera etapa se llevó a cabo la aplicación de tres quitosanos comerciales de diferentes pesos moleculares (55, 25 y 13 kDa) para la elección del peso molecular con mayor efecto sobre la calidad poscosecha y control de antracnosis, así como el sistema

antioxidante. En la segunda etapa se obtuvo y caracterizó quitosano optimizado a partir de quitina extraída de desechos de camarón por procesos biotecnológicos optimizados (fermentación láctica y desacetilación enzimática por la enzima quitina desacetilasa extraída del hongo *C. gloeosporioides*) (**Figura 3**). Por último, en la tercera etapa se realizó una comparación de la efectividad *in vitro* e *in vivo* del quitosano biotecnológico optimizado con el quitosano comercial de peso molecular alto, así como con un fungicida químico (tiabendazol) en frutos de papaya cv. Maradol, en donde los parámetros evaluados fueron actividad antifúngica, calidad poscosecha, contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante (**Figura 4**).

1. Primera etapa: Aplicación de tres quitosanos comerciales

a. Espesor y permeabilidad al vapor de agua de las películas

Para la formación de la película se disolvió quitosano al 1% con ácido acético al 2% durante 24 h a temperatura ambiente, el quitosano fue desgasificado con ultrasonido por 15 min, se vaciaron 20 mL de quitosano en placas de policarbonato (10x10 cm²) y se metieron a una estufa a 45 °C por 6 h hasta evaporar el agua. El espesor de la película se midió con un micrómetro digital (Mitutoyo Corp., Kawasaki-shi, Japón). Se tomaron tres mediciones en lugares aleatorios a lo largo de cada película y el valor medio se utilizó para el cálculo. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó de acuerdo con Calderón-Castro y col (2018). Las películas se colocaron en la parte superior de los frascos de vidrio que contenían 15 g de cloruro de calcio (JT Baker, Center Valley, EE. UU.).

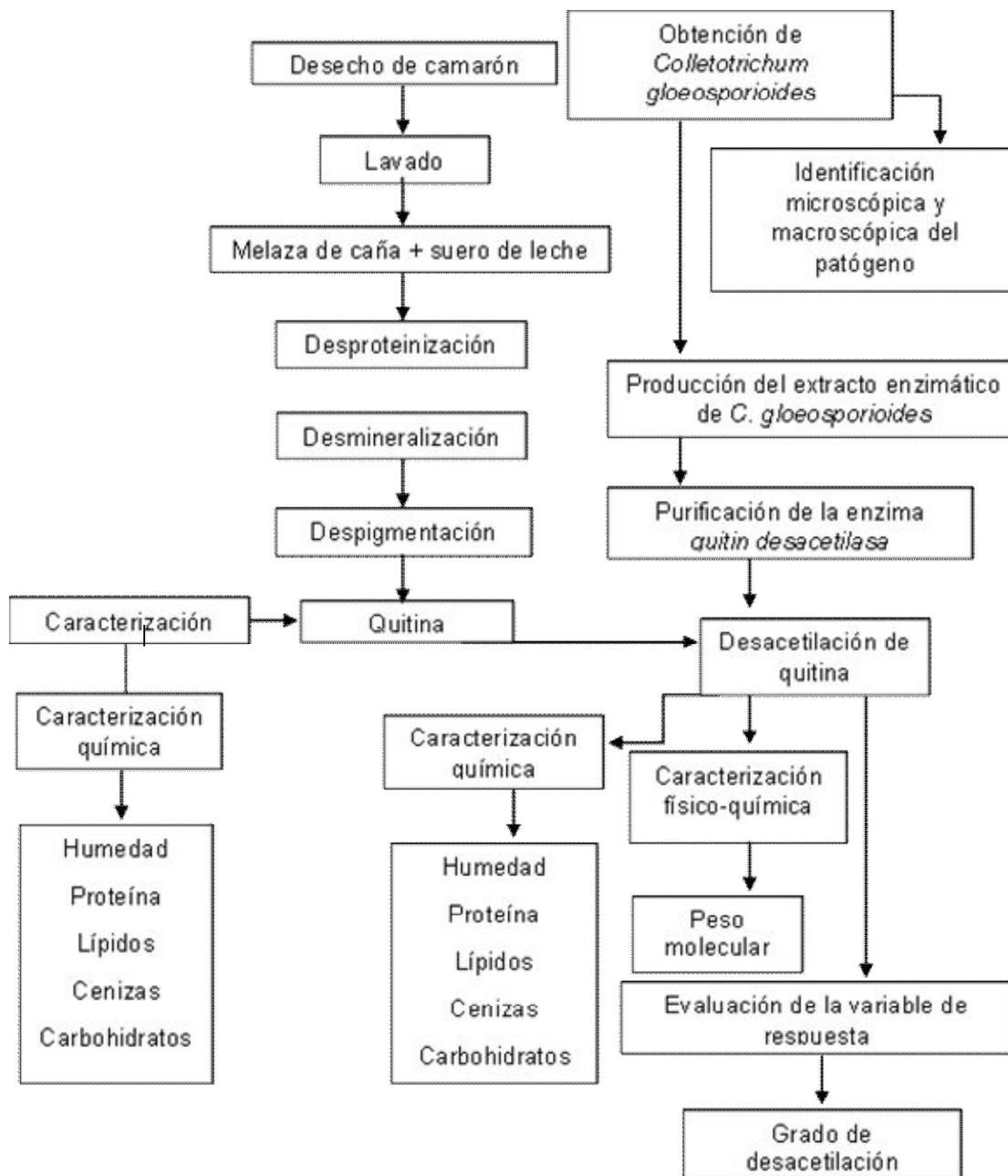


Figura 3. Diagrama de la segunda etapa del experimento.

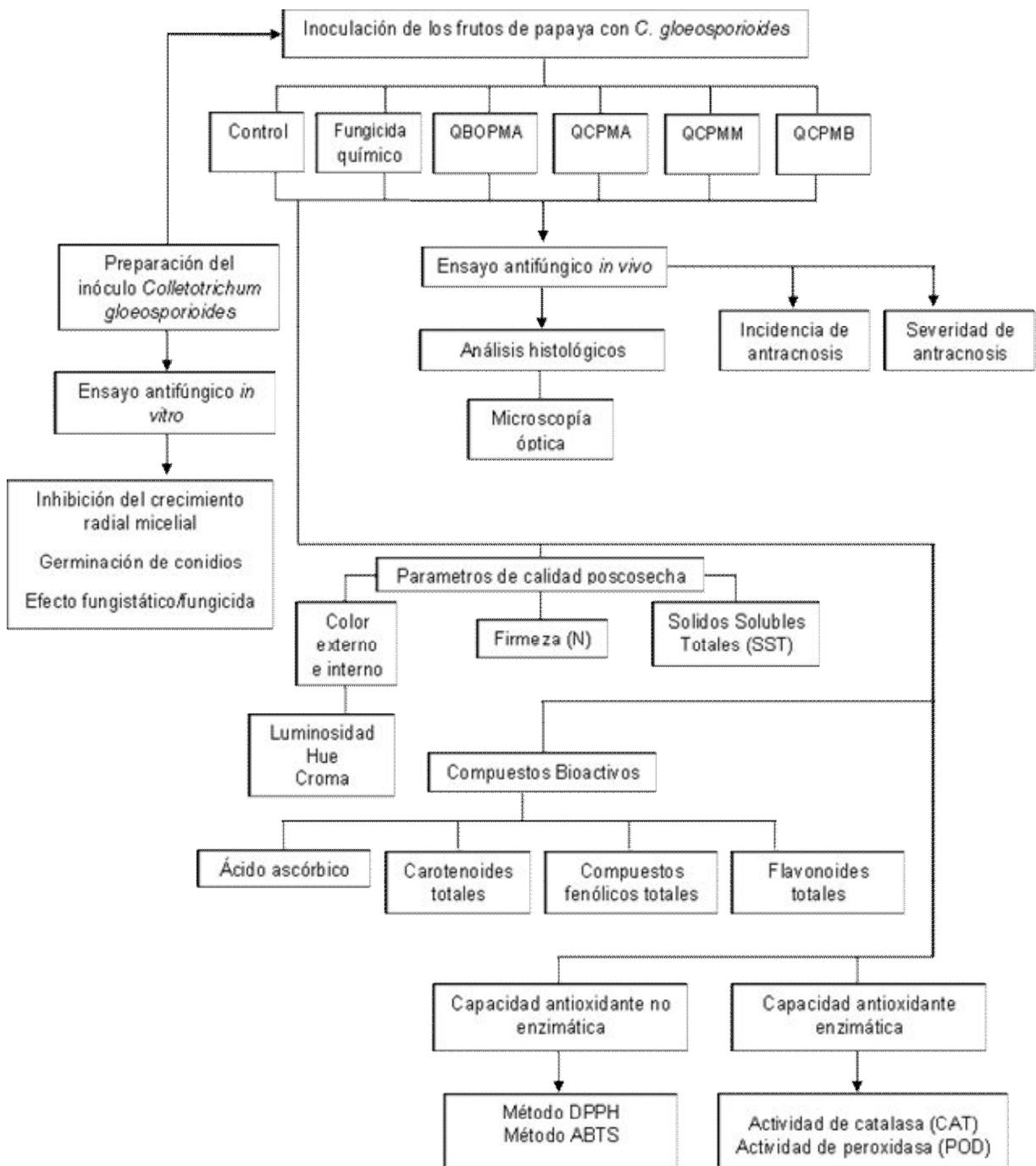


Figura 4. Diagrama de la tercera etapa del experimento. QTS B= Quitosano Biotecnológico peso molecular alto, QTS C= Quitosano comercial peso molecular alto.

Posteriormente, los matraces se colocaron en un desecador (Dry Keeper, Sanplatec Corp., Osaka, Japón) con una solución saturada de cloruro de sodio para generar una HR del 75%. La ganancia de peso de los frascos de vidrio con cloruro de calcio se registró cada 12 h durante 4 días. Estos procedimientos se realizaron cinco veces, y los datos generaron un gráfico de aumento de peso frente al tiempo. La PVA se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{M_p \times E \times A \times t \times \Delta p}{V}$$

Donde:

M_p = masa de humedad absorbida (g)

E = espesor de la película (m)

A = área de película expuesta (m²)

t = tiempo (s)

Δp = diferencia de presión parcial a través de la película (Pa)

b. Ensayo antifúngico *in vitro*

Para preparar la suspensión de conidios del hongo, a placas Petri conteniendo un cultivo de 2 semanas de *C. gloeosporioides* se les añadió agua destilada estéril y se realizó un raspado con un asa de plástico estéril para liberar los conidios de la superficie de las cajas. La suspensión de conidios se filtró a través de 3 capas de tela de organza estériles y su concentración se ajustó a 1×10^6 conidios/mL (Ayón-Reyna y col 2018). El conteo de esporas se realizó con un hemacitómetro (Neubauer Improved, Optik Labor; Lancing, United Kingdom), colocando 100 μ L de la

suspensión de conidios por pocillo (Ong y Ali 2015). El conteo de conidios se realizó utilizando un microscopio óptico a una amplificación de 40X (Axiophot photomicroscope Carl Zeiss, Germany). Para el ajuste de la concentración de esporas se utilizó la fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$. Para llevar a cabo la evaluación antifúngica *in vitro*, se prepararon los distintos quitosanos siguiendo la metodología de López-Mora y col (2013) con algunas modificaciones. Se elaboraron tres soluciones que correspondían a QCPMA (55 kDa), QCPMM (25 kDa) y QCPMB (13 kDa) todos al 1%, los cuales se disolvieron en agua destilada estéril con 1% de ácido acético y agitación constante por 24 h a temperatura ambiente. Por otra parte, se preparó una solución de un fungicida químico (tiabendazol) a una concentración de 0.5 mg/mL en agua destilada estéril. Todas las soluciones se ajustaron a pH 5.5 con una solución de NaOH 1N. Posteriormente, a las soluciones de quitosano y tiabendazol se les agregó PDA y se esterilizaron para después vaciarse y solidificarse en placas Petri de 85 mm de diámetro a temperatura ambiente.

c. Inhibición del crecimiento radial micelial

Para la determinación del crecimiento radial micelial del hongo, las cajas Petri elaboradas previamente que contenían PDA con QCPMA, QCPMM, QCPMB o tiabendazol se inocularon de manera puntual en el centro de cada caja con 1 μ L de la suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1×10^6 conidios/mL). Las cajas Petri inoculadas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días, hasta el momento en el cual el crecimiento del hongo en las cajas control alcanzó el borde de la placa.

Cajas conteniendo únicamente PDA se utilizaron como control negativo. Por cada tratamiento se realizaron 3 réplicas. Se midió la fungitoxicidad de los tratamientos en términos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición del crecimiento radial micelial} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde:

C= Crecimiento radial del hongo en el control

T= Crecimiento radial del hongo en presencia de cada tratamiento

d. Inhibición de la germinación de conidios

La evaluación de la inhibición de la germinación de conidios se llevó a cabo de acuerdo a López-Mora y col (2013). Para la germinación de conidios se pipetearon 100 μL de la suspensión conidial (1×10^6 conidios/mL) en las cajas Petri que contenían PDA (control negativo), PDA con un tiabendazol (control positivo) y PDA con QCPMA, QCPMM o QCPMB al 1%. Posteriormente, la suspensión de esporas se esparció con un asa estéril y las cajas se incubaron a 28 °C durante 6 h. La germinación de conidios fue examinada usando un microscopio óptico a una amplificación de 40X (Microscopio fotoeléctrico Carl Zeiss, Alemania). Se examinaron cien conidios y la germinación se estableció mediante el desarrollo de tubos germinativos. Un conidio se consideró como germinado cuando la longitud del tubo germinativo igualó o excedió la mitad de la longitud del conidio. Los resultados fueron

expresados como porcentaje de inhibición de la germinación usando la fórmula descrita por Ong y col (2013).

$$\% \text{ Inhibición de germinación} = 1 - \left(\frac{G}{Gc} \right) \times 100$$

Donde:

G = Número de esporas germinadas en el tratamiento.

Gc = Número de esporas germinadas en el control.

e. Efecto fungistático/fungicida

El efecto fungistático o fungicida de los tratamientos se determinó de acuerdo a lo reportado por Ayón-Reyna y col (2022). Se realizó un corte cilíndrico de 1 cm al agar de las cajas Petri que fueron utilizadas en el ensayo de crecimiento radial micelial que no mostraron crecimiento del hongo. Posteriormente, los discos fueron transferidos a cajas con PDA fresco y se incubaron durante 7 días a 25 °C, para observar cualquier recuperación de crecimiento. Se determinó el efecto fungistático si se observó crecimiento después del periodo de incubación y efecto fungicida si no se observó crecimiento.

f. Ensayo antifúngico *in vivo*

Los frutos de papaya fueron lavados, desinfectados con NaClO (1%), seleccionados y divididos en cinco lotes. Posteriormente, los frutos de todos los lotes se inocularon por inmersión durante 5 min en una suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* a una concentración de 1×10^6 conidios/mL y se dejaron a temperatura ambiente para retirar el exceso de humedad. Una vez inoculados los frutos, se aplicaron los tratamientos por inmersión. En el primer lote los frutos de

papaya no fueron tratados (control), los frutos del segundo lote se trataron con el fungicida tiabendazol a una concentración de 0.5 mg/mL, los frutos del tercer lote fueron tratados con QCPMA, mientras que los frutos del cuarto y quinto lote fueron tratados con QCPMM y QCPMB, todos a una concentración del 1% (p/v). Todas las inmersiones con los tratamientos fueron realizadas por 40 s, después se dejaron a temperatura ambiente por 2 h y se almacenaron durante 12 días a 25 °C a una humedad relativa de 90-95 % (López-Mora y col 2103).

1) Incidencia de antracnosis

La incidencia de la enfermedad de antracnosis se realizó de acuerdo a lo reportado por Ong y Ali (2015) con base en los síntomas de antracnosis en la superficie de los frutos. El efecto de los tratamientos sobre la incidencia de la enfermedad se evaluó diariamente a partir del día que se presentaron síntomas y se expresó como porcentaje de frutos que mostraron síntomas de antracnosis del total de frutos de cada tratamiento, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia de antracnosis (\%)} = \frac{\text{\# frutos infectados}}{\text{Total de frutos inoculados}} \times 100$$

2) Severidad de antracnosis

La severidad de antracnosis se evaluó visualmente cada tercer día en los frutos que fueron inoculados con el hongo y se reportó como porcentaje de la superficie de la fruta con síntomas de antracnosis (Madani y col 2016).

g. Análisis histológico

1) Microscopía óptica

La preparación de las muestras para su observación en el microscopio óptico se realizó utilizando la metodología reportada por Phothiset y Charoenrein (2014) con algunas modificaciones. Se realizaron cortes de papaya de 1 cm x 1 cm aproximadamente a los 0 y 12 días de almacenamiento, los cuales se colocaron en tubos eppendorf de 15 mL conteniendo 8 mL de una solución fijadora (FAA) por 48 h, la cual contenía 50% de etanol absoluto, 5% de ácido acético glacial, 10% de formaldehído y 35% de agua destilada. Posteriormente, las muestras se deshidrataron mediante cambios en concentraciones de etanol al 50%, 70%, 96% y 100%, después fueron transferidas a una solución de etanol absoluto y xileno (1:1), seguido de tres cambios en xileno al 100%. En cada uno de los cambios se mantuvo la muestra en agitación por 5 h. Enseguida, las muestras se infiltraron en parafina grado histológico a 60-30 °C por 24 h haciendo cambios cada 12 h. Se realizó una inclusión en parafina en moldes que se pusieron en refrigeración por 2 h y posteriormente se obtuvieron cortes histológicos de 10 µm de grosor con ayuda de un microtomo. Los cortes se colocaron en un baño de flotación con agua caliente (43 °C) más grenetina (1 g/L) y se recuperaron en portaobjetos a los cuales se les retiró el exceso de parafina en una estufa a 62 °C por 5 min, seguido de 3 cambios de xileno (3 min cada uno). Para la tinción, las muestras se sumergieron en una solución con safranina al 1% y etanol (al 50%) por 24 h, posteriormente se deshidrataron en una serie gradual de etanol al 50%, 70% y 96% (3 min en cada uno), seguido de una tinción con verde rápido al 0.1% por 3 min y se lavaron con etanol al 96% y tres

cambios de xileno (3 min cada uno). Finalmente, las muestras fueron fijadas utilizando acrílico y protegidas con un cubreobjetos, para posteriormente ser observadas en un microscopio óptico binocular “Primo Star” con iluminación led y halógeno marca Carl Zeiss, las imágenes fueron digitalizadas utilizando la cámara del microscopio anexada al programa Zen2 Blue Edition.

h. Parámetros de calidad poscosecha

1) Pérdida de peso

La pérdida de peso se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Rashid y col (2015). Se pesaron 9 frutos de cada tratamiento previamente seleccionados durante todo el almacenamiento. Se registró el peso de los frutos cada día con el empleo de una balanza Sartorius modelo TE 4101 (Goettingen, Alemania). Los valores se expresaron como porcentaje de pérdida de peso en relación al peso inicial del mismo, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \text{peso inicial} / \text{peso final} * 100$$

2) Color externo

Para la evaluación del color en cáscara de papaya se utilizó un colorímetro Minolta CR 200 (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón). Las mediciones fueron hechas en la región ecuatorial de las caras opuestas de cada fruto y se tomaron evitando las lesiones fúngicas de acuerdo con lo reportado por Rashid y col (2015). Los parámetros evaluados fueron luminosidad (L^*), croma (C^*) y tinte (Hue) empleando la escala de color CIELAB.

3) Firmeza

La medición de la firmeza se realizó utilizando un penetrómetro digital (Chatillon DFE Ametek modelo E-DFE-100; AMETEK Inc, Largo, Fl., EUA) equipado con una punta cilíndrica de 11 mm de diámetro y programado para penetrar 5 mm de profundidad con una velocidad constante de 50 mm/min (Ayón-Reyna y col 2015). Las mediciones fueron realizadas sobre rebanadas de papaya de 1 cm de grosor cortadas horizontalmente, las cuales fueron obtenidas del centro del mesocarpio de la región ecuatorial de cada fruto. Los resultados se expresaron en Newton (N).

4) Sólidos solubles totales (SST)

El contenido de SST se determinó de acuerdo al método oficial 22.014 de la AOAC (2012) utilizando un refractómetro manual (Fisherbrand by Fisher Scientific S66366, Ltd, Nepean, Ontario, Canadá). Diferentes partes del mesocarpio fueron seccionadas y maceradas, y el jugo obtenido fue colocado directamente en el refractómetro. Los resultados se reportaron como °Brix.

i. Compuestos bioactivos

1) Ácido ascórbico (AA)

La concentración de AA fue determinada de acuerdo a Dürüst y col (1997). Tejido fresco (0.5 g) fue homogenizado con 15 mL de ácido oxálico al 0.4% por 1 min en un homogenizador Ultra-Turrax T18 (IKA Works, Inc. Wilmington, NC, EUA). Una alícuota (1 mL) de ácido oxálico se mezcló con 1 mL de amortiguador de acetato (30 g de acetato de sodio anhídrido + 70 mL de agua desionizada + 100 mL de ácido acético glacial) y 8 mL de DCPI (sal 2,6-diclorofenolindofenol disodio) (12 mg/L H₂O

desionizada) por 15 s y la absorbancia se midió a 520 nm (L_1). Para L_2 , el equipo fue ajustado a cero con 1 mL de muestra + 1 mL de amortiguador de acetato + 8 mL de agua desionizada. Las muestras fueron determinadas sustituyendo 8 mL de agua desionizada por 8 mL de DCPI. Así, el valor de L_1-L_2 representa la absorbancia de la muestra. La concentración de AA se determinó utilizando una curva estándar de ácido ascórbico (10-50 $\mu\text{g/mL}$) y los resultados fueron expresados como mg de AA/100 gramos de fruto fresco (gff).

2) Compuestos fenólicos totales (CFT)

Para la determinación de CFT se obtuvo un extracto metanólico (EM) como lo descrito por López-Angulo y col (2014) con algunas modificaciones. Un gramo de pulpa congelada y molida fue extraído con 5 mL de metanol al 100% durante 3 días a 4 °C; el solvente fue cambiado cada 24 h y las fases metanólicas fueron mezcladas obteniendo un volumen final de 10 mL aproximadamente, el residuo fue eliminado mediante centrifugación (12,000 g por 15 min). Por último, el solvente fue eliminado mediante vacío (40 °C) con un evaporador rotatorio (BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland). El EM obtenido fue almacenado a -20 °C en completa oscuridad hasta su uso. El contenido de CFT se determinó por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Adom y col (2005) con algunas modificaciones. Primeramente, se realizaron diluciones del EM de pulpa de papaya con metanol. El EM diluido (20 μL) se oxidó con 180 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:8 v/v) más 50 μL de Na_2CO_3 (7% p/v) por 90 min en completa oscuridad, la absorbancia fue medida a 750 nm en un lector de microplacas de 96 pozos (SynergyTM HT Multi-Detection, Biotek, Inc., Winooski, VT). Se utilizó agua como muestra para el control negativo. La

cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva estándar de ácido gálico (50-500 µg/mL). Los fenólicos totales se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG)/100 gff).

j. Capacidad antioxidante no enzimática

1) Método DPPH

El análisis de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se realizó según lo reportado por Brand-Williams y col (1995) con algunas modificaciones. Una alícuota de 20 µL del EM diluido (obtenido para la evaluación de CFT) se mezcló con 180 µL del radical DPPH 150 mM (metanol). Las mezclas fueron incubadas por 30 min en completa oscuridad (27 °C) y leídas a una absorbancia de 525 nm en un lector de microplacas (Synergy™ HT Multi-Detection, Biotek, Inc., Winooski, VT). Trolox fue preparado como curva de calibración (Sigma-Aldrich-238813) (0-225 µg/mL) y la actividad antioxidante fue reportada como micromoles equivalentes de Trolox (µmol ET)/100 gff.

2) Método ABTS

El método de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) fue evaluado usando el análisis de decoloración del catión ABTS⁺ de acuerdo con Re y col (1999) con algunas modificaciones. Las soluciones ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 mM) fueron mezcladas en una relación 1:1, la mezcla se mantuvo en reposo por 12-16 h a 25 °C en completa oscuridad para producir el radical ABTS⁺. Esta solución fue diluida con amortiguador de fosfato (PBS) 7 mM (pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. En un tubo de ensayo se colocaron

100 μL del EM (obtenido para la evaluación de CFT) y se mezclaron con 1900 μL del radical ABTS diluido. La mezcla se mantuvo en reposo por 30 min a 27 °C en completa oscuridad y la absorbancia fue leída a 734 nm. Una curva de calibración de Trolox (0-225 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue utilizada para calcular la actividad antioxidante, expresándose como $\mu\text{mol ET}/100 \text{ gff}$.

k. Análisis estadístico de la primera etapa de investigación

En la primera etapa de la investigación se llevaron a cabo análisis completamente aleatorizados de uno (tratamientos) y dos factores (tratamientos y tiempo de almacenamiento) para analizar las respuestas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Se utilizó como unidad experimental un fruto de papaya y se utilizaron tres réplicas con tres repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron con ANOVA ($p \leq 0.05$) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos/días de almacenamiento o las muestras según el valor de $p \leq 0.05$, utilizando Statgraphic Plus, versión 5.1 (Manugistic Inc., Rockville, MD, EE. UU.). Las medias se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con $\alpha = 0.05$. Se realizó un análisis de residuos para verificar la distribución normal de los datos y la homocedasticidad (igualdad de varianzas). La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que la igualdad de varianzas se verificó con la prueba de Bartlett, utilizando $\alpha = 0.05$. Los datos de respuesta que no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis/Dunn, con $\alpha = 0.05$.

2. Etapa 2: Optimización del proceso biotecnológico para la obtención de quitosano

a. Diseño experimental

Se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para optimizar las condiciones de procesamiento (concentración del extracto enzimático/tiempo de desacetilación) para la obtención de quitosano, teniendo como variable de respuesta grado de desacetilación. Se utilizó un diseño experimental central compuesto rotatable (DCCR) con dos variables de proceso y cinco niveles de variación para el análisis de los datos (**Cuadro 4**). Para establecer la relación entre las variables de proceso y de respuesta, se aplicó un análisis de regresión múltiple a los datos experimentales.

Los modelos de regresión se utilizaron para crear gráficas de superficie de respuesta y de contornos para cada variable de respuesta (de la Paz y col 2012). Para optimizar las condiciones de proceso, se utilizó la técnica de superposición de la metodología de superficie de respuesta. Los gráficos de contornos de las variables de respuesta se superpusieron y se generó la región donde se encontró la mejor combinación de las variables de proceso, seleccionando un punto central como la mejor combinación. Se utilizó el software Design-Expert (Versión 7.01) STAT-EASE (de la Paz y col 2012).

b. Obtención de quitina optimizada

1) Fermentación ácido láctica

Los desechos de camarón previamente lavados y triturados, fueron descongelados y colocados en un reactor por lotes, se les añadió suero de leche y melaza, se homogenizó y se puso a fermentar a temperatura ambiente. El proceso

Cuadro 4. Diseño experimental que se empleó para obtener diferentes combinaciones de concentración de enzima (C) y tiempo de hidrólisis enzimática (tH) para la producción de quitina y quitosano mediante bioconversión de residuos de camarón y la variable de respuesta (grado de desacetilación).

Tratamiento	Variables de proceso o independientes			Variable de respuesta o dependiente	
	No.	Corrida	C (enzima)	tH (h)	Grado de desacetilación (%)
	1	8	0.19	26.11	
	2	10	0.86	26.11	
	3	6	0.19	103.89	
	4	5	0.86	103.89	
	5	12	0.05	65.00	
	6	4	1.00	65.00	
	7	13	0.53	10.00	
	8	11	0.53	120.00	
	9	3	0.53	65.00	
	10	1	0.53	65.00	
	11	2	0.53	65.00	
	12	7	0.53	65.00	
	13	9	0.53	65.00	

Diseño central compuesto rotatable con dos factores y cinco niveles; 13 tratamientos.

*No corresponde al orden de procesamiento. $X_1 = C =$ Concentración de extracto enzimático (%), $X_2 = tH =$ tiempo de desacetilación enzimática (h). $Y_{GD} =$ Grado de Desacetilación.

de fermentación se llevó a cabo debido a la acción de las bacterias ácido lácticas presentes en el suero de leche, tomando como sustrato los azúcares del suero de leche y de la melaza, produciendo ácido láctico. La relación de desechos de camarón/solución de fermentación se mantuvo constante en una relación 1:5 (p/v); así mismo, se aplicaron las condiciones óptimas del proceso de fermentación ácido láctica [tiempo de fermentación (t)= 108 h/ concentración de azúcar (C)= 8.74%] de acuerdo a lo reportado previamente por Cabanillas-Bojórquez (2023).

2) Desproteínización

Para la obtención de quitina más pura, se llevó a cabo una etapa adicional de desproteínización con hidróxido de sodio diluido, para lo cual a los residuos de camarón fermentados se les añadió una solución de NaOH 1 M, en relación de 1:10 (p/v) durante un periodo de 1 h. Al finalizar este tiempo la materia sólida se lavó con abundante agua purificada hasta alcanzar un pH de 7.0 (Colina y col 2014).

3) Desmineralización

Al igual que lo realizado en la etapa anterior, con el propósito de obtener quitina más pura, se llevó a cabo una etapa adicional de desmineralización con ácido clorhídrico diluido, para lo cual la parte sólida obtenida de la desproteínización se hizo reaccionar con una solución de HCl 1 N, en relación de 1:10 (p/v) durante 1 h. Al finalizar dicho periodo la materia sólida se lavó con abundante agua purificada hasta obtener un pH de 7.0 (Juárez 2010).

4) Despigmntación

La materia sólida obtenida del proceso de desmineralización se hizo reaccionar con una solución de hipoclorito de sodio al 10% en una relación 1:10 (p/v) durante 1 h. Al finalizar este periodo la parte sólida se lavó con abundante agua purificada. El producto fue secado a 65 °C durante 24 h, denominando a este producto quitina optimizada (Franco 2010).

c. Obtención de quitosano a partir de quitina optimizada

1) Producción del extracto enzimático de *C. gloeosporioides*

El hongo *C. gloeosporioides* fue cultivado en papa dextrosa agar (PDA) a 28 °C durante 15 días. La suspensión de esporas fue obtenida por raspado con un asa estéril y el conteo de esporas se realizó utilizando una cámara de Neubauer, obteniendo una concentración de 3.6×10^6 esporas/mL. Posteriormente, 50 mL de la suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* se añadieron al medio de fermentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenía: 10 g/L de glucosa, 3.165 g/L de extracto de levadura, 4.754 g/L de peptona, 3.00 g/L de KH_2PO_4 , 1.00 g/L de K_2HPO_4 , 0.535 g/L de MgSO_4 , 0.255 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.50 g/L de NaCl, y 0.50 g/L de CaCl_2 ; el pH se ajustó a 6.0 (Pareek y col 2011; Pacheco y col 2010). Enseguida, los matraces se taparon y se incubaron por 3 días a 30 °C en agitación constante, el fermentado se utilizó como extracto enzimático.

2) Purificación de la enzima quitina desacetilasa (QDA)

La enzima QDA se purificó del extracto enzimático. Después de la fermentación, el caldo se centrifugó ($12,700 \times g$, por 25 min a 4 °C) y el sedimento obtenido se mezcló con 1.0 mL de tampón tris-HCl de pH 6.5. La lisis de las células se

realizó utilizando sonicación durante 20 min. El lisado celular se centrifugó a 112 x g durante 15 min a 4 °C. Después, el sobrenadante fue dializado en membrana contra agua destilada durante 24 h, obteniendo de esta manera el extracto enzimático purificado (Pacheco y col 2010; Pareek y col 2011).

3) Desacetilación de quitina

Una vez obtenida la quitina optimizada y el extracto enzimático purificado de QDA se realizó la conversión de quitina a quitosano. En distintos reactores por lotes se mezclaron 50 mg de quitina, 0.05-1.0 mL del extracto enzimático purificado y 5.0 mL de amortiguador de fosfato (20 mM, pH 5.8). Las mezclas de reacción se incubaron a 45 °C durante 10 a 120 h (**Cuadro 4**). El producto fue enjuagado con agua y secado a 35 °C durante 24 h para obtener el quitosano óptimo (Aye y col 2006).

d. Caracterización química de quitina y quitosano

1) Humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo al método 925.09B de la AOAC (2012). Para ello se calculó la pérdida de peso de 2.0 g de muestra después de calentarla a 130 °C durante 1 h en una estufa de circulación de aire (FELISA, 142^a, México).

2) Proteína

Se utilizó el método 960.52, microKjeldahl, de la AOAC (2012) para la determinación de nitrógeno en un sistema Kjeltex (Mod 1009 y 1002, Tecator, Suecia). Se pusieron en digestión 0.2 g de muestra, con 5.0 mL de ácido sulfúrico y una mezcla reactiva de selenio (Merk Co., Alemania) a una temperatura de 200 °C. En la

destilación de la muestra, previamente diluida con 25 mL de agua, se emplearon diluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% como indicador para recibir el destilado. La titulación se llevó a cabo con una dilución valorada de HCl 0.1 N. La proteína cruda se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno total por 6.25.

3) Lípidos

El contenido de lípidos se determinó de acuerdo al método 920.39C de la AOAC (2012). Las extracciones se realizaron en muestras de 3.0-4.0 g de quitina y quitosano pulverizado, que pasaron a través de malla 80 (0.18 mm). Se utilizó un equipo Sostex System HT 1043 Extraction Unit (Tecador, Suecia) y se empleó como disolvente éter de petróleo. Los resultados se reportaron como porcentaje de lípidos.

4) Cenizas

Para la determinación de cenizas se utilizó el método 923.03 de la AOAC (2012). Se pesaron de 3.0 a 5.0 g de muestra, la cual se colocó en un crisol de porcelana y se sometió a incineración en mufla a 550 °C hasta que resultó una ceniza gris luminosa con peso constante. Las muestras incineradas se enfriaron en un desecador, se aatemperaron (25 °C) y se pesaron.

5) Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Carbohidratos (bs)} = 100 - \% \text{Proteína} - \% \text{Lípidos} - \% \text{Cenizas}$$

e. Caracterización físicoquímica

1) Peso molecular

El PM de los polímeros de quitina y quitosano está relacionado con la viscosidad intrínseca y para su determinación se utilizó un viscosímetro Cannon Fenske Routine 150 (EUA). El PM se calculó de acuerdo a la metodología reportada previamente por Zhang y col (2005). La viscosidad intrínseca se determinó mediante un gráfico que relaciona la viscosidad reducida y la concentración, en el sitio en el cual la extrapolación de la recta obtenida se intersecta con el eje de las ordenadas:

$$\frac{\eta_{SP}}{C} = [\eta] + K[\eta]^2 C$$

La viscosidad intrínseca se calculó por medio de los parámetros $K=1.81 \times 10^{-3}$ y $a=0.93$, los cuales dependen del intervalo del grado de desacetilación, del solvente usado y de la temperatura. Conociendo la viscosidad intrínseca se determinó el PM de las muestras utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K_m * M_v^a$$

Donde:

$[\eta]$ es la viscosidad intrínseca (mL/g)

K_m = Constante característica del sistema polímero-solvente

a = Constante que depende de la configuración de la cadena polimérica, varía de 0 a 1

M_v = Peso molecular viscosimétrico promedio del polímero (g/mol)

2) Medición de color

Las películas de quitosano y quitina se colocaron en placas de Petri transparente y el color se midió utilizando colorímetro Minolta CR 200 (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón) que se estandarizó con una placa blanca de calibración ($X= 78.83$, $Y= 83.79$, $Z= 88.60$, $L^*= 3.47$, $a^*= 0.12$, $b^*= 0.32$). Los resultados se registraron como L^* , a^* , b^* ($L^*= 0$ produce negro y $L^*= 100$ significa blanco puro, a^* en valor negativo indica verde mientras que los valores positivos indican rojo, b^* en negativo los valores indican azul y los positivos indican amarillo) (Seo y col 2009).

3) Capacidad de retención de agua y grasas

Para la capacidad de retención de agua (CRA) las películas de quitosano y quitina fueron cortadas en círculos de 2 centímetros de diámetro, se pesaron y posteriormente se sumergieron en agua durante 10 min. Seguidamente, se eliminó el exceso de agua en la superficie de las películas con papel filtro y se pesó cada muestra. La CRA se calculó de acuerdo a Cao y col (2005).

$$CRA = ((M_s - M_h)/M_h) \times 100\%$$

Donde:

M_h = la masa de la película humedad

M_h = la masa de la película seca

La capacidad de retención de grasas (CRG) de las películas de quitosano y quitina se midieron utilizando el método descrito por Cao y col (2005). La retención de agua y grasa se llevó a cabo inicialmente pesando 0.5 g de muestra en un tubo de centrífuga, se añadió 10 mL de agua o aceite de soja y se mezcló en un agitador vórtex por 1.0 min para dispersar la muestra. Posteriormente, la muestra se colocó a temperatura

ambiente durante 30 min con agitaciones durante 5.0 s cada 10 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 25 min. Después de que el sobrenadante fue decantado, el tubo se volvió a pesar. La CRG se determinaron de la siguiente manera:

f. Evaluación de la variable de respuesta para optimizar quitosano

1) Grado de desacetilación

Para obtener el GD se realizó el método de titulación ácido-base de acuerdo a lo reportado por Zhang y col (2005). Una muestra de 0.3 g de los biopolímeros se secaron a peso constante en un horno a 105 °C (Thermo Heraeus T 6030, Thermo Co., EE. UU.). Luego, se disolvieron en 30 mL de HCl 0.1 M solución estándar en un matraz Erlenmeyer de 250 mL durante 24 h a temperatura ambiente hasta su completa disolución. Después se agregaron 3 gotas de indicador naranja de metilo:azul de metileno (1:1 v/v), posteriormente se tituló con una solución estándar de NaOH (0.1 M) hasta que la solución cambió de color gris a rojo.

El GD se calculó como:

$$GD (\%) = \frac{203 * (C_1 V_1 * C_2 V_2) * 100}{42 * (C_1 V_1 - C_2 V_2) + m(1 - W)}$$

Donde C_1 y V_1 eran la concentración (M) y el volumen (mL) del estándar de HCl respectivamente; C_2 y V_2 fueron la concentración (M) y volumen (mL) de la solución estándar de NaOH, respectivamente; m era el peso de la muestra (g); W fue el contenido de humedad de muestra (%); 203 era el peso molar de la quitina y 42 fue el peso molar de acetilo.

3. Etapa 3: Aplicación del quitosano biotecnológico optimizado en frutos de papaya

En esta etapa los parámetros de caracterización de las películas comestibles (grosor y permeabilidad al vapor de agua), los ensayos antifúngicos *in vitro* (crecimiento radial micelial y germinación de conidios) e *in vivo* (incidencia y severidad de antracosis), los parámetros de calidad poscosecha (pérdida de peso, firmeza, color externo y SST), los análisis de los compuestos bioactivos (ácido ascórbico y fenólicos totales), así como la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) se realizaron de la misma forma como se describieron en la primer etapa de la investigación. Los análisis se realizaron en el tratamiento de control, QTS B, QTS C y el fungicida químico.

a. Capacidad antioxidante enzimática

1) Actividad de catalasa (CAT)

La obtención del extracto enzimático y la cuantificación de la actividad de CAT se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado por Yimyong y col (2011) con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de tejido congelado y se homogenizaron en un mortero frío con 5 mL de amortiguador de fosfato 0.045 M (pH 7.0) que contenía ditioneitol (DTT) 5 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 5 mM y 0.125 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Las muestras fueron centrifugadas a 17,200 x *g* por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y utilizado como extracto enzimático manteniéndose a temperatura baja durante su uso. La mezcla de reacción utilizada para la evaluación de la actividad consistió de 1 mL de amortiguador de fosfato de potasio (40 mM, pH 7.0), 25 µL de H₂O₂ (40 mM) y 25 µL del extracto enzimático a 4 °C. El blanco utilizado fue la mezcla del amortiguador y extracto enzimático sin el H₂O₂.

El cambio de concentración de H_2O_2 fue calculado basado en el coeficiente de extinción $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 240 nm. La actividad de la CAT fue expresada como Unidades U/mg de proteína.

2) Actividad de peroxidasa (POD)

La actividad de POD fue determinada de acuerdo a Silva y col (1984) con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de tejido congelado y homogenizaron con 5 mL de la solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.5. El homogenizado fue centrifugado a $17,200 \times g$ por 35 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo. Para la cuantificación de la actividad enzimática se mezclaron 2,750 μL de amortiguador de fosfato 0.1 M (pH 7.8), 100 μL guayacol al 1% (v/v), 100 μL de H_2O_2 (0.46%) y 50 μL de extracto crudo a 4°C por 3 min. Una unidad de POD fue definida como el incremento de absorbancia de 0.01 min^{-1} a 470 nm. Reportándose como U/mg de proteína.

El contenido de proteína en el extracto enzimático para CAT y POD fue estimado utilizando el método de estándar de Bradford y se expresó como unidades por kg de proteína.

b. Análisis estadísticos

En la tercera etapa de investigación se llevaron a cabo análisis completamente aleatorizados de uno (tratamientos) y dos factores (tratamientos y tiempo de almacenamiento) para analizar las respuestas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Se utilizó como unidad experimental un fruto de papaya y se utilizaron tres réplicas con tres repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron con ANOVA ($p \leq 0.05$) para

determinar diferencias significativas entre los tratamientos/días de almacenamiento o las muestras según el valor de $p \leq 0.05$, utilizando Statgraphic Plus, versión 5.1 (Manugistic Inc., Rockville, MD, EE. UU.). Las medias se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con $\alpha = 0.05$. Se realizó un análisis de residuos para verificar la distribución normal de los datos y la homocedasticidad (igualdad de varianzas). La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que la igualdad de varianzas se verificó con la prueba de Bartlett, utilizando $\alpha = 0.05$. Los datos de respuesta que no cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis/Dunn, con $\alpha = 0.05$.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Primera etapa de investigación

1. Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas de quitosano (QTS) de diferentes pesos moleculares

El espesor y la PVA de las películas de quitosano fue evaluado *in vitro* (como película) ya que no es posible hacer la evaluación *in situ* en los frutos de papaya. Además, la permeabilidad a los gases del recubrimiento obtenido una vez aplicado en el fruto es un factor muy importante ya que puede influir en la velocidad de respiración (Cheng y col 2022). Los valores del espesor de las películas fueron similares en los diferentes pesos moleculares del QTS (0.10 mm), lo cual puede deberse a la misma pérdida de agua durante el mismo periodo de tiempo, además se observó que el peso molecular no influyó en el grosor de las películas (**Cuadro 5**). En general, los resultados mostraron que la PVA aumentó a medida que disminuyó el PM del QTS. En este trabajo, el valor mínimo de PVA fue de $1.10 \times 10^{-11} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, que correspondió a QTS-55 kDa. Por el contrario, QTS-25 y QTS-13 kDa obtuvieron valores de PVA de 1.19×10^{-11} y $1.30 \times 10^{-11} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, respectivamente (**Cuadro 5**). Estos resultados fueron similares a los informados por Liu y col (2020) quienes encontraron valores de 1.46 a $2.08 \times 10^{-12} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ cuando se utilizaron pesos moleculares de 7, 50 y 110 kDa; las películas de QTS-110 kDa exhibieron valores de PVA más bajos que las películas de QTS-50 y QTS-7 kDa. Debido a que las películas de QTS con mayor peso molecular presentan menos dominios hidrófilos que el QTS con menor peso molecular, el vapor de agua se absorbe más fácilmente y la etapa de difusión mejora sustancialmente.

Cuadro 5. Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de quitosano (QTS) de diferentes pesos moleculares.

Tratamientos	Espesor (mm)	Permeabilidad al vapor del agua (g m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²)
QTS-55 kDa	0.1 ^a	1.10 ± 0.1 x 10 ^{-11a}
QTS-25 kDa	0.1 ^a	1.19 ± 0.2 x 10 ^{-11b}
QTS-13 kDa	0.1 ^a	1.30 ± 0.1 x 10 ^{-11c}

Los valores representan la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Medias en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

2. Ensayo antifúngico *in vitro* del quitosano de diferentes pesos moleculares

a. Crecimiento radial micelial, germinación de conidios y efecto fungistático-fungicida

QTS-55, QTS-25 y QTS-13 kDa inhibieron el 100% del crecimiento radial micelial del hongo *C. gloeosporioides* mostrando un efecto mayor que al fungicida (71%) (**Cuadro 6, Figura 5**). *C. gloeosporioides* desarrolló resistencia al fungicida. La resistencia al fungicida puede estar influenciada por factores genéticos, como la frecuencia inicial de alelos de resistencia, el número y la expresividad de los genes según lo informado por Bill y col (2014). Estos autores mencionaron resistencia al fungicida procloraz en *C. gloeosporioides* y de igual forma la aplicación de quitosano mostró mayor inhibición que el fungicida. Por el contrario, el quitosano forma una barrera externa en los microorganismos que quela metales y provoca la supresión de nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano. La capacidad de unión a metales está relacionada con los grupos amino del biopolímero y es probable que todos los eventos ocurran simultáneamente en cualquier quitosano independientemente del PM (Fernández-de Castro y col 2016). Además, también se ha sugerido que los oligómeros de quitosano pueden penetrar en las células microbianas y afectar la transcripción de ARN y la síntesis de proteínas (Jovanovic y col 2016).

La actividad de quitosano contra el crecimiento del micelio de diferentes hongos ha sido ampliamente demostrada anteriormente, bajo diferentes pesos moleculares. El crecimiento de *R. stolonifer* fue completamente inhibido por QTS-30.7, QTS-23.8 y QTS-17.4 kDa según Guerra-Sánchez y col (2008).

Cuadro 6. Inhibición del crecimiento micelial radial, inhibición de la germinación conidios y efecto fungistático/fungicida de quitosanos (QTS) de diferentes pesos moleculares sobre *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tratamientos	Inhibición del crecimiento radial micelial (%)	Inhibición de la germinación de conidios (%)	Efecto fungistático/fungicida (cm)
Control	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	8.0 ± 0.0 ^a
Fungicida	71 ± 0.5 ^b	80.3 ± 1.2 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
QTS-55 kDa	100 ± 0.0 ^a	92.0 ± 1.1 ^a	0.0 ± 0.0 ^b
QTS-25 kDa	100 ± 0.0 ^a	92.2 ± 1.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^b
QTS-13 kDa	100 ± 0.0 ^a	93.1 ± 1.3 ^a	0.0 ± 0.0 ^b

Los valores representan la mediana de nueve réplicas. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron por separado mediante las pruebas de Kruskal-Wallis/Dunn. Letras diferentes para un mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Se utilizó fungicida químico (tiabendazol) como control positivo.

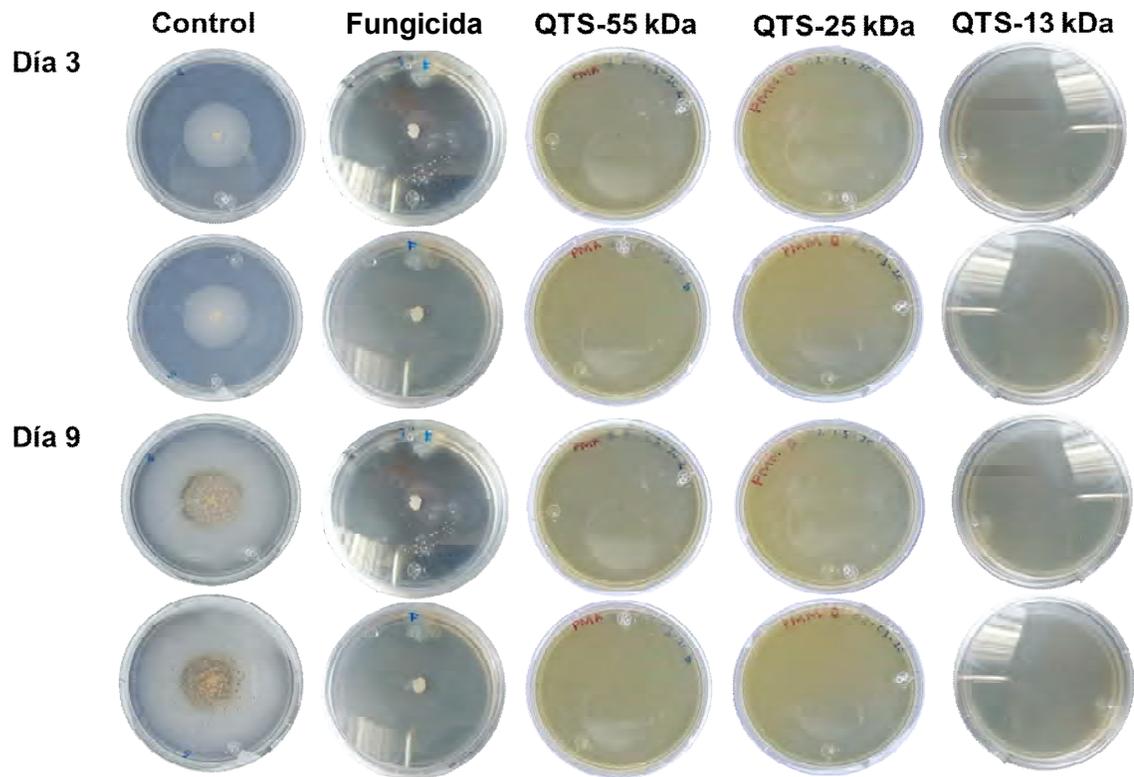


Figura 5. Imágenes representativas de cajas de PDA tratadas con QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa, fungicida químico y el control mostrando el crecimiento radial micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* durante 9 días de incubación a 28 °C.

El tratamiento con quitosano tuvo efecto sobre la germinación de conidios, presentando valores del 92% al 93% de inhibición en los tres pesos moleculares sin mostrar diferencias significativas entre ellos, los cuales tuvieron un mayor efecto que el fungicida (80%) (**Cuadro 6**). Bill y col (2014) reportaron previamente una mayor inhibición de la germinación conidial de *C. gloeosporioides* tratadas con quitosano que aquellas tratadas con el fungicida procloraz. Según Peralta-Ruiz y col (2020), el efecto del quitosano sobre la inhibición del desarrollo del hongo, independientemente del PM, está relacionado con cambios estructurales de las esporas, como marchitez, rotura, pérdida de material celular y profundización de las crestas. Además, la interacción entre las cargas positivas del biopolímero y los residuos cargados negativamente de las macromoléculas de los hongos, generan complejos polielectrolitos que dañan la función del hongo.

Durante el período de incubación no se observó crecimiento del hongo *C. gloeosporioides* en las placas tratadas con quitosano de diferentes pesos moleculares (55 kDa, 25 kDa, 13 kDa) ni en las tratadas con el fungicida químico, lo que evidenció que los tratamientos ejercieron un efecto fungicida y no permitieron el desarrollo del hongo aun cuando se proporcionaron las condiciones y nutrientes necesarios (**Cuadro 6**). Estos resultados fueron consistentes con los informes anteriores de Sergey y col (2014) y Jiang y col (2021) quienes encontraron que un QTS-70 kDa y QTS-4.4 kDa tenían actividad antimicrobiana frente a *Candida cruisei*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente. El efecto fungicida de quitosano de diferentes pesos moleculares observado en esta investigación indica que el quitosano está destruyendo al hongo. Estudios previos han demostrado el efecto

positivo de la implementación del proceso biológico en las características físico-químicas del quitosano, ya que permite obtener un quitosano más homogéneo (Pareek y col 2013; Zubiria-Suarez y col 2014; Jongsri y col 2016; Drevinskas y col 2017). En esta investigación no se observaron diferencias significativas en la actividad antifúngica *in vitro* de los quitosano de diferentes pesos moleculares, sin embargo; hay algunos estudios donde reportan que se ve afectada su actividad con el PM y mencionan que dichas diferencias en el PM conducen a dos mecanismos diferentes de interacción del quitosano y los microorganismos: un PM alto del quitosano puede infligir a nivel de la pared celular generando una cobertura, debilitando y rompiendo la membrana celular permitiendo la fuga celular; mientras que un PM bajo de quitosano puede penetrar en las células vivas, lo que lleva a la inhibición de varias enzimas y la interrupción de la síntesis de proteínas, interfiriendo con la síntesis de ARNm (Guo y col 2008). Tal es el caso de un estudio realizado por Hernández-Lauzardo y col (2011), quienes observaron que el PM si influyó en la germinación de conidios de *R. stolonifer*, ya que cuando se trataron con QTS-30.7 kDa, la germinación se inhibió totalmente en comparación con el QTS-23.8 y QTS-17.4 kDa, debido a que provocó el mayor cambio en la estructura de los conidios. Por su parte, Badawy y Rabea (2009) evaluaron cuatro pesos moleculares (290, 57, 37 y 5 kDa) y encontraron que la actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* aumentaba a medida que disminuía el PM.

3. Actividad antifúngica *in vivo*

Los primeros síntomas de antracnosis aparecieron en los frutos control el día 2 de almacenamiento, mientras que en los frutos tratados con fungicida y QTS-25 kDa al día 3 (**Figuras 6 y 7**). Mientras que, la aplicación de QTS-55 y QTS-13 kDa retrasó la

aparición de los síntomas de antracnosis hasta el día 4. La incidencia de antracnosis aumentó con el tiempo para todos los tratamientos alcanzando un máximo del 100% en los frutos control y fungicida al día 7 de almacenamiento, mientras que en frutos tratados con quitosano (QTS-25, QTS-13 y QTS-55 kDa) tuvieron el máximo porcentaje de incidencia a los 8, 9 y 12 días, respectivamente.

Los frutos con mayor área afectada por antracnosis desde el inicio hasta el final del almacenamiento fueron los no tratados (control), mientras que, las papayas tratadas con QTS-55 kDa presentaron la menor severidad de antracnosis (**Figura 8**). Mientras tanto, los frutos tratados con QTS-25 y QTS-13 kDa mostraron menos daño por antracnosis que los frutos del control y tiabendazol. En general, se observó que el QTS-55 kDa fue el más efectivo para retrasar la aparición de los síntomas y disminuir el avance de la enfermedad en papaya. Lo anterior puede deberse a que QTS-55 kDa tiene la capacidad de inducir cambios morfológicos en las estructuras reproductivas fúngicas. Además, en este estudio, los frutos infectados con *C. gloeosporioides* recubiertos con QTS revelaron mayor actividad y capacidad antioxidante (ácido ascórbico, fenólico, ABTS y DPPH) que los frutos tratados con fungicida. Se evidenció que la aplicación de QTS de diferentes pesos moleculares mejoró las actividades de respuesta de defensa en los frutos.

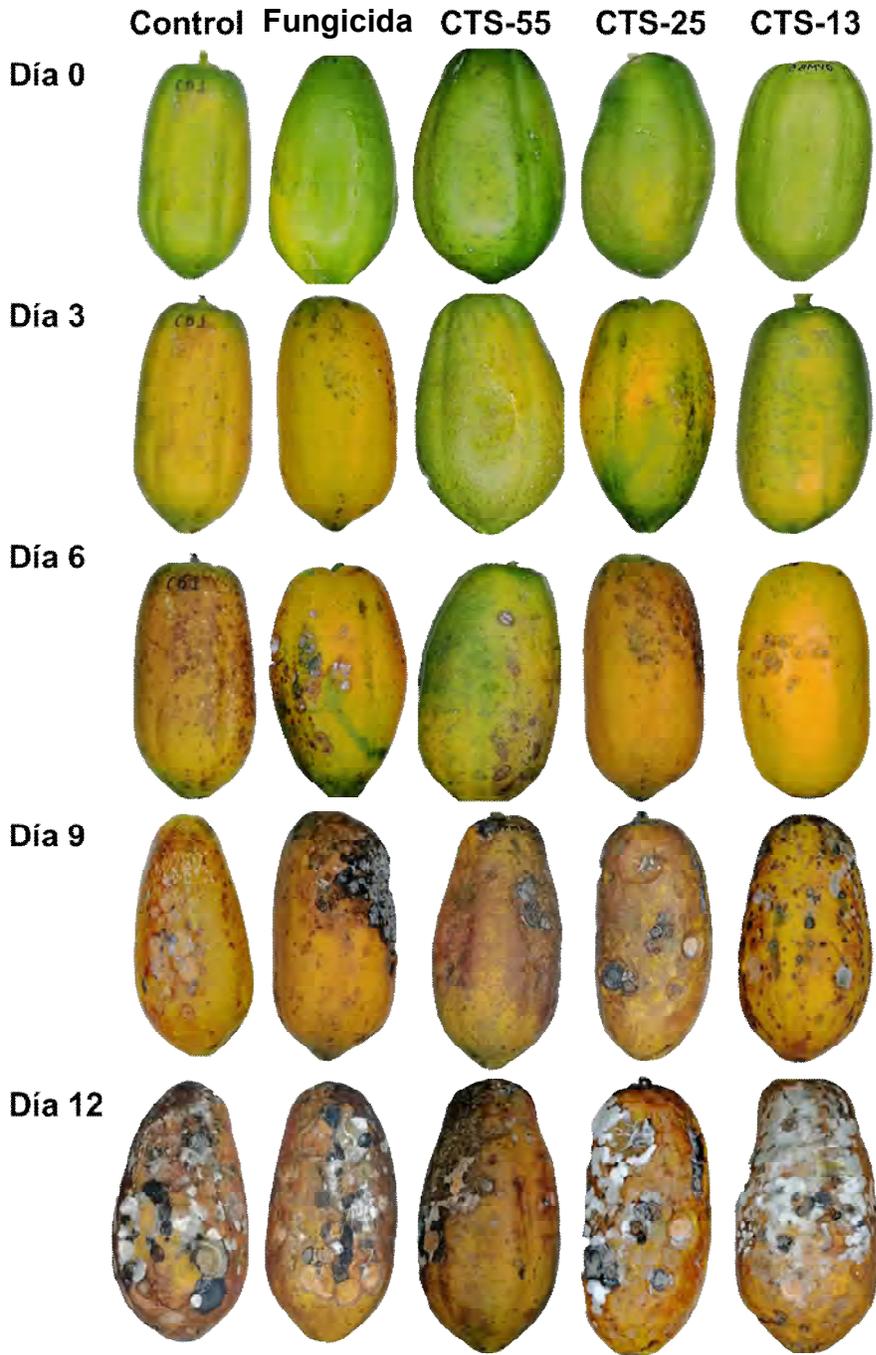


Figura 6. Imágenes representativas de los frutos de papaya tratados con QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa, fungicida químico y el control mostrando síntomas de antracnosis sobre la superficie epidérmica durante 12 días de almacenamiento a 25 °C.

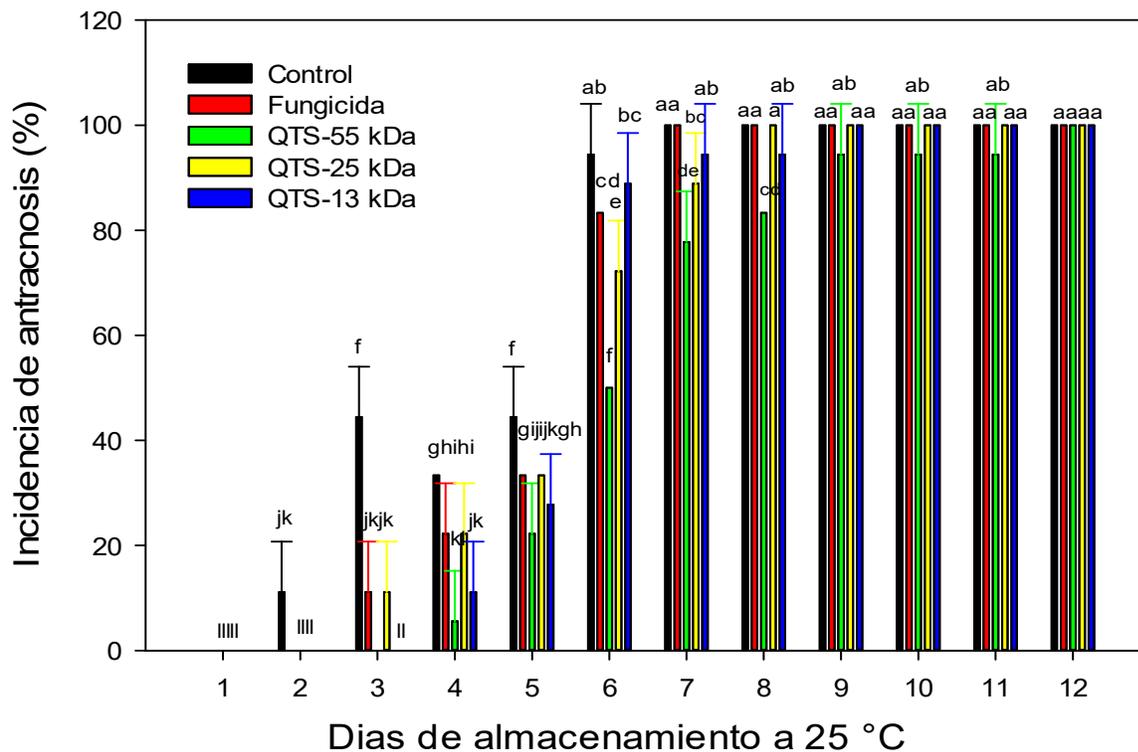


Figura 7. Porcentaje de incidencia de antracnosis en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). Valor LSD= 7.68.

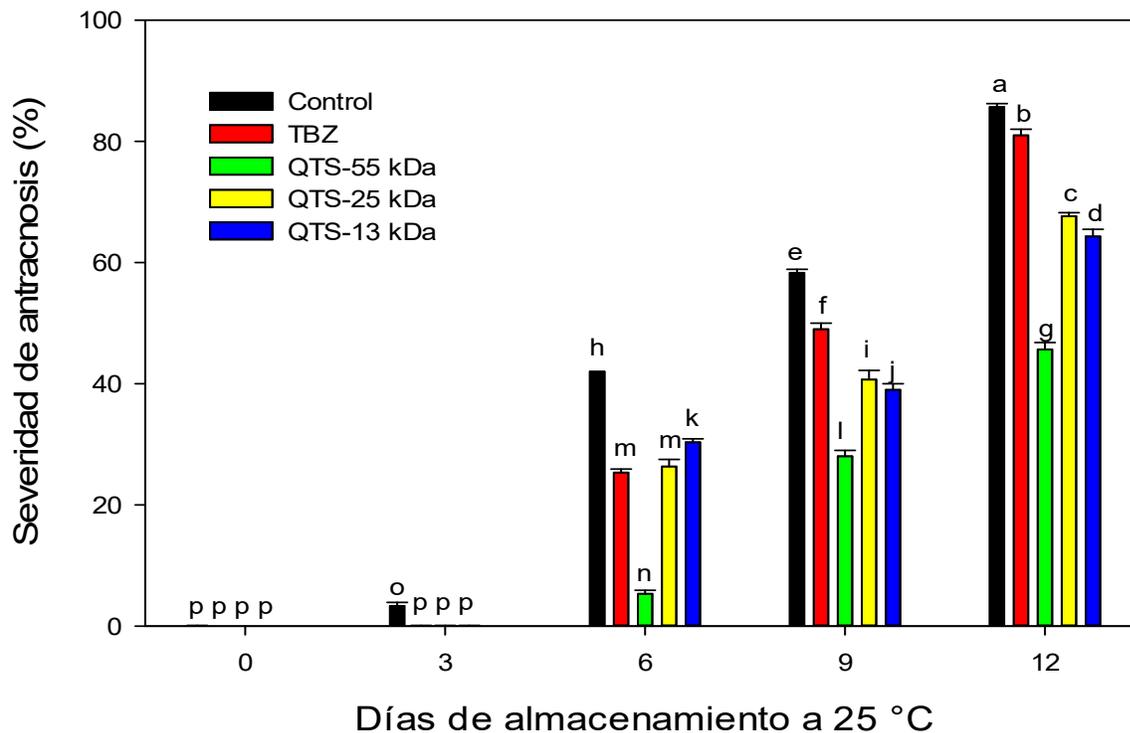


Figura 8. Porcentaje de severidad de antracnosis en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). Valor LSD= 1.33.

En sus informes, Chien y Chou (2006) y Lima-Oliveira y col (2018) mencionaron que los frutos de papaya y cítricos tratados con quitosano (15 kDa) mostraron menor incidencia y severidad de antracnosis causada por moho verde, azul y gris en comparación con los fungicidas comerciales tiabendazol (0.1%), metil tiofanato (10 µg/mL) y difenoconazol (0.5 µg/mL). Mientras tanto, la eficiencia del quitosano fue evidenciada por Younes y Rinaudo (2015) quienes mencionaron que los cambios en los microorganismos se observaron principalmente en QTS-135 a QTS-42 kDa, debido a una mayor adsorción en la superficie celular que podría formar una membrana polimérica, que inhibió la entrada de nutrientes a la célula en comparación con un PM bajo.

4. Análisis de calidad poscosecha

La pérdida de peso aumentó en todos los tratamientos durante el almacenamiento, sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos hasta el final de este período, donde los frutos control presentaron la mayor pérdida seguidos del fungicida, mientras que QTS-55 kDa presentó la menor pérdida (**Cuadro 7**). QTS posee propiedades de barrera que conducen a una reducción en la pérdida de vapor de agua. Esto coincide con un estudio previo de Chien y Chou (2006) donde QTS-15 kDa redujo la pérdida de peso de frutos cítricos en comparación con frutos tratados con fungicida (0.1%). Además, la pérdida de peso disminuyó a medida que aumentaron los pesos moleculares de QTS. En este sentido, Jongsri y col (2016) y Zhang y col (2019) analizaron diferentes pesos moleculares desde 30 hasta 1390 kDa en algunos frutos observando que una menor permeabilidad al vapor de agua se relaciona con mayores

Cuadro 7. Efecto de diferentes pesos moleculares de quitosano (QTS) sobre la pérdida de peso, firmeza, color externo (L* y °Hue) y sólidos solubles totales de papaya infectada con *Colletotrichum gloeosporioides* y almacenada a 25 °C por 12 días.

Tratamientos	Análisis de calidad poscosecha				
	Pérdida de peso (%)	Firmeza (N)	Color externo (L*)	Color externo Hue (°H)	Sólidos solubles totales (°Brix)
Día 0 de almacenamiento a 25 °C					
Control	0.00±0.0 ^o	73.23±1.6 ^a	42.15±1.3 ^j	130.43±0.8 ^a	11.93±0.6 ^f
Fungicida	0.00±0.0 ^o	73.11±1.6 ^a	42.18±1.1 ^j	129.99±1.0 ^a	12.03±0.6 ^f
QTS-55 kDa	0.00±0.0 ^o	72.98±1.6 ^a	42.20±1.3 ^j	130.23±0.9 ^a	11.99±0.6 ^f
QTS-25 kDa	0.00±0.0 ^o	73.00±1.5 ^a	42.19±1.2 ^j	129.96±1.0 ^a	12.00±0.6 ^f
QTS-13 kDa	0.00±0.0 ^o	73.23±1.6 ^a	42.17±1.3 ^j	130.32±0.9 ^a	11.93±0.6 ^f
Día 3 de almacenamiento a 25 °C					
Control	2.63±0.9 ^{klm}	41.84±1.8 ^e	55.23±1.8 ^f	102.58±1.8 ^e	12.80±0.1 ^{de}
Fungicida	1.69±0.6 ^{klmn}	41.76±1.3 ^e	49.21±1.4 ^h	121.00±1.3 ^c	13.26±0.1 ^{bcd}
QTS-55 kDa	1.33±0.6 ^{lmn}	66.07±1.5 ^b	45.41±0.9 ⁱ	124.98±1.0 ^b	11.66±0.1 ^{fg}
QTS-25 kDa	1.05±0.4 ^{mn}	63.54±1.7 ^c	42.61±1.2 ^j	125.23±3.2 ^b	13.03±0.1 ^{cde}
QTS-13 kDa	1.27±1.2 ^{lmn}	44.38±1.9 ^d	51.64±1.13 ^g	108.18±1.1 ^d	13.43±0.2 ^{abc}
Día 6 de almacenamiento a 25 °C					
Control	6.19±1.0 ⁱ	19.93±1.5 ⁱ	61.47±1.0 ^d	82.36±1.1 ^j	13.33±0.5 ^{bcd}
Fungicida	5.16±0.6 ^{ij}	22.01±0.9 ^h	60.87±1.0 ^d	87.90±1.4 ^h	13.33±0.5 ^{bcd}
QTS-55 kDa	5.02±0.5 ^{ij}	27.98±1.0 ^f	56.33±1.1 ^{ef}	111.15±1.3 ^c	11.16±0.2 ^g
QTS-25 kDa	4.84±0.7 ^{ij}	26.86±2.1 ^{fg}	49.34±0.9 ^e	96.55±1.0 ^{fg}	12.66±0.7 ^e
QTS-13 kDa	5.03±1.2 ^{ij}	25.85±1.4 ^g	56.91±1.7 ^e	82.05±1.0 ^j	12.83±0.6 ^{de}
Día 9 de almacenamiento a 25 °C					
Control	8.31±1.6 ^{fg}	18.01±1.3 ^m	61.89±0.9 ^d	79.01±0.6 ^k	13.25±0.2 ^{bcd}
Fungicida	8.10±0.7 ^{gh}	19.61±1.4 ^{ij}	63.40±0.9 ^{bc}	81.36±1.5 ^j	13.80±0.6 ^{ab}

QTS-55 kDa	7.72±0.5 ^{gh}	19.92±0.9 ⁱ	64.66±1.5 ^a	97.38±1.4 ^f	11.33±0.2 ^g
QTS-25 kDa	7.68±0.5 ^{gh}	19.82±2.1 ⁱ	64.23±1.3 ^{ab}	85.41±1.0 ⁱ	12.83±0.6 ^{de}
QTS-13 kDa	7.68±1.2 ^{gh}	18.27±1.4 ^j	64.49±0.9 ^a	84.96±0.3 ⁱ	14.00±0.0 ^a
Día 12 de almacenamiento a 25 °C					
Control	11.80±0.9 ^a	8.00±0.6 ^m	61.89±1.0 ^{cd}	76.25±1.5 ^l	14.00±0.4 ^a
Fungicida	11.24±0.7 ^b	10.36±0.9 ^j	63.83±1.1 ^b	73.38±1.5 ^l	13.75±0.4 ^{ab}
QTS-55 kDa	09.82±0.5 ^d	13.58±1.0 ^k	64.20±1.5 ^{ab}	95.25±0.7 ^g	11.50±0.5 ^{fg}
QTS-25 kDa	10.45±0.7 ^c	10.90±2.1 ^l	64.41±1.3 ^{ab}	74.91±1.4 ^l	13.25±0.2 ^{bcd}
QTS-13 kDa	10.57±1.3 ^c	10.76±1.0 ^l	64.81±0.7 ^a	75.10±0.9 ^l	13.50±0.4 ^{abc}
Valor-p (Kolmogorov- Smirnov)	>0.150	>0.15	0.062	>0.150	>0.150
Valor-p (Bartlett)	0.265	0.564	0.777	0.103	0.219
Valor-p (ANOVA)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Los valores representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Medias en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se utilizó fungicida químico (tiabendazol) como control positivo.

pesos moleculares, debido a una estructura más compacta y homogénea debido a las cadenas con mayor grado de polimerización en el biopolímero. Asimismo, los cambios en el PM proporcionarían cambios en la hidrofobicidad y cristalinidad de la película y, en consecuencia, cambios en la permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas de la película obtenido a partir de quitosano (de Moura y col 2011). Es interesante mencionar que no existe información sobre el efecto del quitosano de bajo PM en el control de la pérdida de agua en frutos. Entonces, esta investigación sugiere que, al menos en la papaya, los pesos moleculares en el rango de 13 a 55 kDa son suficientes para actuar como una barrera al vapor de agua, siendo el de mayor peso molecular el que proporciona una barrera mayor.

Al inicio del almacenamiento, los valores de firmeza en el fruto rondaron los 73 N, los cuales disminuyeron a medida que avanzaba el tiempo. Al final del almacenamiento, la firmeza fue mayor en frutos tratados con QTS-55 kDa seguidos de frutos tratados con QTS-25, QTS-13 kDa y fungicida; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre estos últimos tratamientos, mientras que los frutos control fueron los que mayor pérdida de firmeza presentaron con una disminución del 11% (**Cuadro 7**). Esto podría atribuirse a que el quitosano contribuye a preservar los puentes de unión de pectina y la distribución de celulosa en la pared celular evitando su degradación, manteniendo así la turgencia de los frutos (Zhang y col 2019). Estos resultados coinciden con informes previos que demuestran que el PM más alto preservó una mayor firmeza en comparación con los pesos moleculares más bajos de quitosano en kiwi (Drevinskis y col 2017), mango (Jongsri y col 2016) y nectarina (Zhang y col 2019).

La luminosidad de la cáscara (valor L^*) y el ángulo de Hue (H°) se han utilizado como indicadores de calidad poscosecha en papaya (Ayón-Reyna y col 2015). En general, los valores de L^* aumentan y H° disminuyen cuando la fruta alcanza la madurez. La inmersión de papaya en cualquier tratamiento de quitosano resultó en valores de L^* más altos en comparación con las frutas de control. Al final del almacenamiento a 25 °C, los recubrimientos de quitosano fueron igualmente efectivos en la conservación de L^* , lo que indica un menor oscurecimiento causado por la senescencia y el desarrollo de antracnosis en el fruto (**Cuadro 7**). Con respecto a H° , el uso de QTS-25 y QTS-13 kDa indujo un cambio de color menor en comparación con el control y fungicida. Sin embargo, entre los tratamientos quitosano, QTS-55 kDa presentó el menor cambio en H° (**Cuadro 7**). La aplicación de quitosano retrasó los cambios de color en la cáscara de papaya y mango en comparación con frutas no tratadas y frutas tratadas con una formulación de fungicidas (trifloxistrobina y tebuconazol) según lo informado por Jongsri y col (2016) y Gomes y col (2020). Estos autores indicaron que el quitosano modificó la atmósfera interna en los frutos, lo que provocó un retraso en el proceso de degradación de la clorofila y una reducción en la actividad de la polifenol oxidasa, retrasando el proceso de maduración y manteniendo el color de los frutos.

El contenido inicial de SST fue de aproximadamente 12 °Brix y fue aumentando hasta alcanzar valores de alrededor de 14 °Brix en frutos control al final del almacenamiento sin mostrar diferencias significativas con el fungicida. Los frutos tratados con QTS-25 y QTS-13 kDa presentaron un aumento más lento en comparación con los frutos control, mientras que los frutos cubiertos con QTS-55 kDa

mantuvieron constante los SST durante los 12 días de almacenamiento; así, este tratamiento fue el que logró retardar la síntesis de azúcares en el fruto, generando diferencias significativas con el resto de los tratamientos (**Cuadro 7**).

Este efecto podría deberse al hecho de que QTS-55 kDa forma una película más gruesa y densa, bloqueando los poros en la superficie y reduciendo la tasa de respiración. Además, se ha demostrado que QTS-55 kDa tiene elasticidad alta, resistencia a la deformación y matrices fuertes debido a que tiene cadenas con un alto grado de polimerización (Moura y col 2011). La interacción polímero-polímero favorece la modificación de la cristalinidad del polímero y consecuentemente, la retención de la firmeza, cambio de color y degradación del contenido total de sólidos solubles, lo que se puede notar en esta investigación. Estos mismos efectos fueron reportados por Jongsri y col (2016) y Zhang y col (2019) en frutos de mango y nectarina tratados con QTS-40, QTS-30 y QTS-6.7 kDa, los cuales presentaron bajo contenido de azúcares en comparación con el fruto control.

5. Análisis histológicos

Respecto al análisis histológico por microscopía óptica en la **Figura 9** se muestra en corte longitudinal de los frutos de papaya sanos y sin efecto de los tratamientos al día 0 con cutícula, células epidérmicas y células de parénquima normales. Sin embargo, conforme el paso del almacenamiento *C. gloeosporioides* pudo segregar cutinasa extracelular y romper la cutícula de la papaya y penetrar, observándose de acuerdo a la literatura hifas intramurales en el tejido del fruto (Auyong y col 2012).

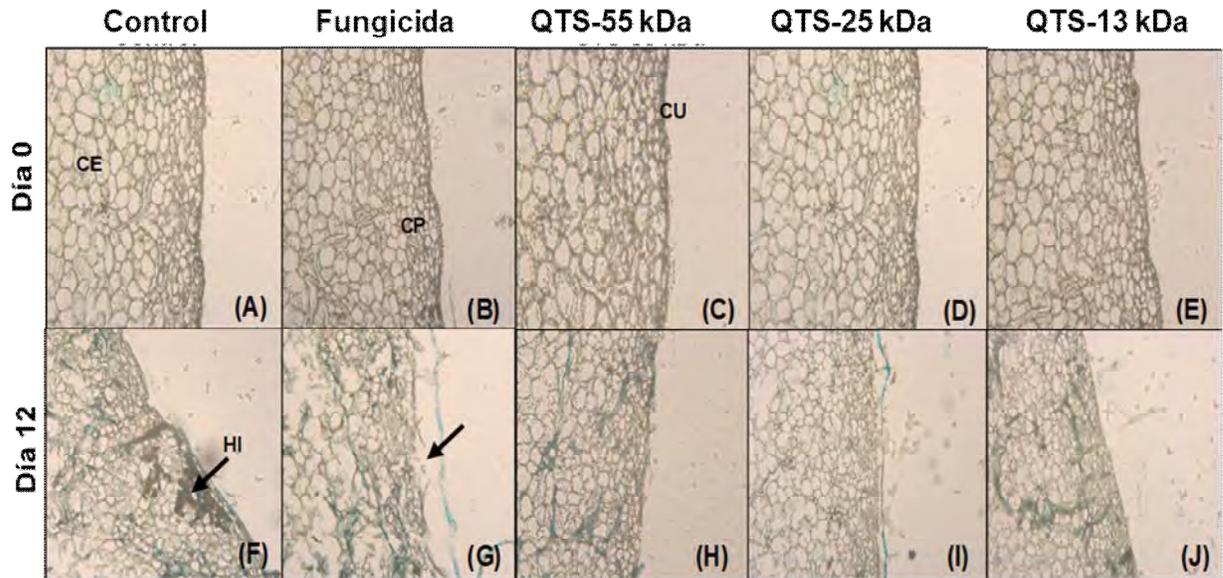


Figura 9. Micrografías de luz de la sección transversal de frutos de papaya control (A), tratados con fungicida químico (tiabendazol) (B), QTS-55 kDa (C), QTS-25 kDa (D) y QTS-13 kDa al comienzo del almacenamiento mostrando cutícula, células epidérmicas y células de parénquima normales. Papayas control (F) y tratadas con fungicida químico (G) después 12 días de almacenamiento mostrando hifas intramurales (HI) en el tejido del fruto y rompimiento de cutícula (RC) de la papaya, respectivamente. CE= células epidérmicas, CP= células de parénquima, CU= cutícula.

Asimismo, las especies de *Colletotrichum* forman apresorios melanizados para facilitar la adhesión y la penetración por medio de acción mecánica y lisis enzimática (Kleemann y col 2012). Debido a la formación de apresorios, la penetración ocurre de manera directa. En los apresorios se observa un punto carente de melanina lo que sugiere un poro donde ocurre segregación enzimática necesaria durante la penetración (Ranathunge y col 2012). En esta etapa, el patógeno obtiene nutrientes del contenido celular del fruto por lo que la infección se asocia principalmente con la producción de enzimas líticas tales como proteasas y enzimas carbohidrato-activas que degradan los polisacáridos de las paredes celulares. Además, es importante mencionar que la aplicación del fungicida empeoró el estado de degradación del fruto de papaya. Caso contrario a los frutos que fueron tratados con QTS-55, QTS-25 y QTS-13 kDa, si bien la presencia de *C. gloeosporioides* fue observada, el daño o la gravedad de la enfermedad fue menor debido a la presencia los tratamientos. Se encontró que el quitosano independientemente del peso molecular puede inducir cambios notables en la microestructura externa e interna, lo cual puede ser debido a que los niveles de expresión de genes implicados en la pared celular y la homeostasis de la membrana fueron obviamente afectados por el tratamiento con quitosano tal y como lo reportaron previamente Silva-García y col (2018) y Meng y col (2020) para el control de *Candida* spp y *Aspergillus ochraceus*, respectivamente. Además, de acuerdo con Rodríguez y col (2013) el desarrollo de *C. gloeosporioides* se relacionó con una coloración roja en células epidérmicas y células de parénquima del exocarpio de aguacate producto de la metabolización de polifenoles. Compuestos que se relaciona con la restricción del crecimiento fúngico en el sitio de infección (Vargas y col 2012). Lo cual concuerda con

lo observado en esta investigación debido a que los frutos tratados con los distintos quitosanos presentaron una mayor producción de compuestos fenólicos totales conforme se presentaba un mayor control en la enfermedad de antracnosis.

6. Compuestos bioactivos

El contenido de ácido ascórbico tendió a disminuir durante el almacenamiento desde 106 mg/100 gff al inicio hasta 93 mg/100 gff para QTS-55 kDa y 78 mg/100 gff para el fungicida al final del almacenamiento, valores que correspondieron a los contenidos más alto y más bajo, respectivamente (**Figura 10**). Los frutos recubiertos con quitosano presentaron mayor contenido de ácido ascórbico en comparación con los frutos control y fungicida.

Dentro de los tratamientos basados en quitosano, QTS-55 kDa tuvo el mayor contenido de ácido ascórbico seguido de QTS-13 y QTS-25 kDa. La disminución del contenido de ácido ascórbico podría deberse a la acción de la ácido ascórbico oxidasa, que convierte el ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico en la senescencia del fruto (Suseno y col 2014). En el estudio realizado por Chien y Chou (2006) señalaron que los cítricos tratados con QTS-15 kDa presentaron mayor contenido de ácido ascórbico que los frutos tratados con QTS-357 kDa y tiabenzalo (0.1%). Sin embargo, Jongsri y col (2016) informaron que el recubrimiento de QTS-360 y QTS-40 kDa retrasó la pérdida del contenido de ácido ascórbico de la fruta de mango durante el almacenamiento, lo cual coincide con los resultados de este estudio. En otro estudio, las bayas con QTS-253.9 kDa tenían un mayor contenido de ácido ascórbico que las bayas con QTS-6.7 kDa y sin recubrimiento (Drevinskas y col 2017).

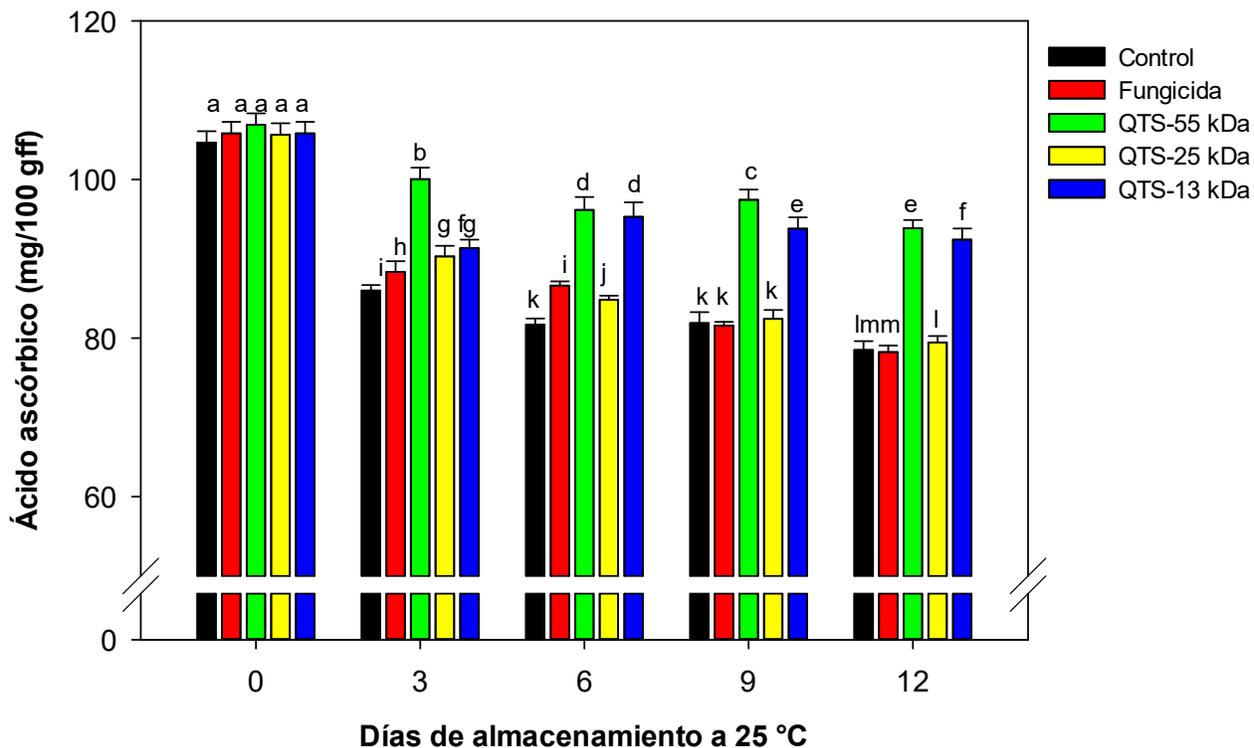


Figura 10. Contenido de ácido ascórbico en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). Valor de LSD= 3.33.

La incorporación de quitosano de peso molecular alto como recubrimiento puede reducir la difusión de O₂ y ralentizar la tasa de maduración y, en consecuencia, mantener el contenido de ácido ascórbico y retrasar la senescencia de las bayas favorecidas por la presencia de O₂. Yan y col (2018) señalaron que el espesor de la película tiene relación con el PM porque encontraron que una cobertura de QTS-100 kDa era menos delgada y transparente que las de QTS-53.3 y QTS-13 kDa. El espesor de película de QTS-55 kDa podría estar relacionado con una menor permeabilidad, lo que podría reducir el paso de oxígeno y evitar la oxidación del ácido ascórbico en el fruto.

Durante el almacenamiento de los frutos, el contenido de fenoles totales tendió a aumentar, registrándose un valor de rango para todos los tratamientos de 46 a 69 mg EAG/100 gff. Al final del almacenamiento, los frutos tratados con QTS-13 kDa presentaron el mayor contenido de fenoles totales seguidos de QTS-55 y QTS-25 kDa, mientras que los frutos control y los tratados con fungicida presentaron los valores más bajos de fenoles totales (**Figura 11**). Los resultados de esta investigación fueron similares a los reportados por Drevinskas y col (2017) quienes mencionaron que QTS-13 kDa promueve la síntesis de fenoles totales en bayas.

Badawy y Rabea (2009) observaron un contenido alto de fenoles totales en los tratamientos con QTS-290, QTS-57 y QTS-37 kDa en comparación con el PM más bajo de quitosano (5 kDa), que indujo el menor aumento en el contenido total de fenólico en tomate. Por otro lado, en un reporte previo se observó que el fruto expresaba una rápida acumulación de fenoles como respuesta del mecanismo de defensa luego de la infección por un patógeno (Ayón-Reyna y col 2018). Sus resultados coinciden con los

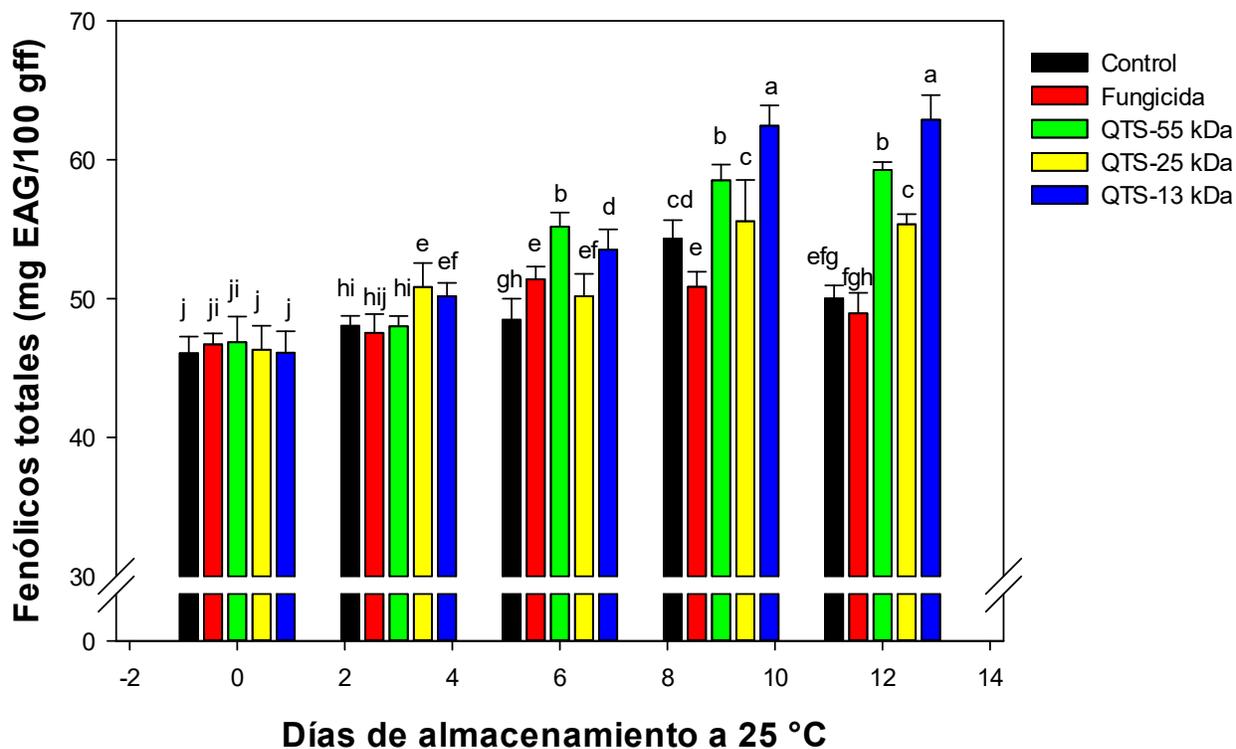


Figura 11. Contenido de fenólicos totales en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). Valor LSD= 5.07

resultados obtenidos en el presente estudio porque el contenido de fenólico aumentó ligeramente al día 6 cuando se intensificaron los síntomas de antracnosis; y también, los frutos recubiertos con quitosano de diferentes pesos moleculares presentaron menor desarrollo de antracnosis y mayor cantidad de compuestos fenólicos (Vargas y col 2012).

7. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante determinada por el ensayo ABTS aumentó en todos los tratamientos hasta el día 6 con un valor aproximado de 590 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ gff}$, seguido de una ligera disminución el día 9 y una drástica disminución el día 12 (**Figura 12**). En el último día, la fruta tratada con QTS-55 kDa tuvo un valor ligeramente superior ($p < 0.05$) al de las papayas tratadas con QTS-13 kDa. Por otro lado, la fruta tratada con fungicida mostró los valores más bajos de capacidad antioxidante seguida por la fruta control. Un patrón similar de cambios observado en todos los tratamientos con quitosano en el ensayo ABTS se mostró en la técnica DPPH. Los resultados indicaron que la capacidad antioxidante medida por la prueba de captación de radicales libres DPPH aumentó hasta el día 6 (395 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ gff}$), disminuyendo durante el resto del almacenamiento (**Figura 13**). Asimismo, hubo diferencia significativa entre el control y fungicida versus el quitosano de diferentes pesos moleculares, donde los valores más altos correspondieron a los frutos tratados con quitosano, sin diferencias entre ellos. En frutos tratados con QTS-55 y QTS-13 kDa, el DPPH fue significativamente más alto que el resto de los tratamientos en los días 3, 6 y 9. Estos resultados fueron similares a los informados por Zhang y col (2019) en frutos de

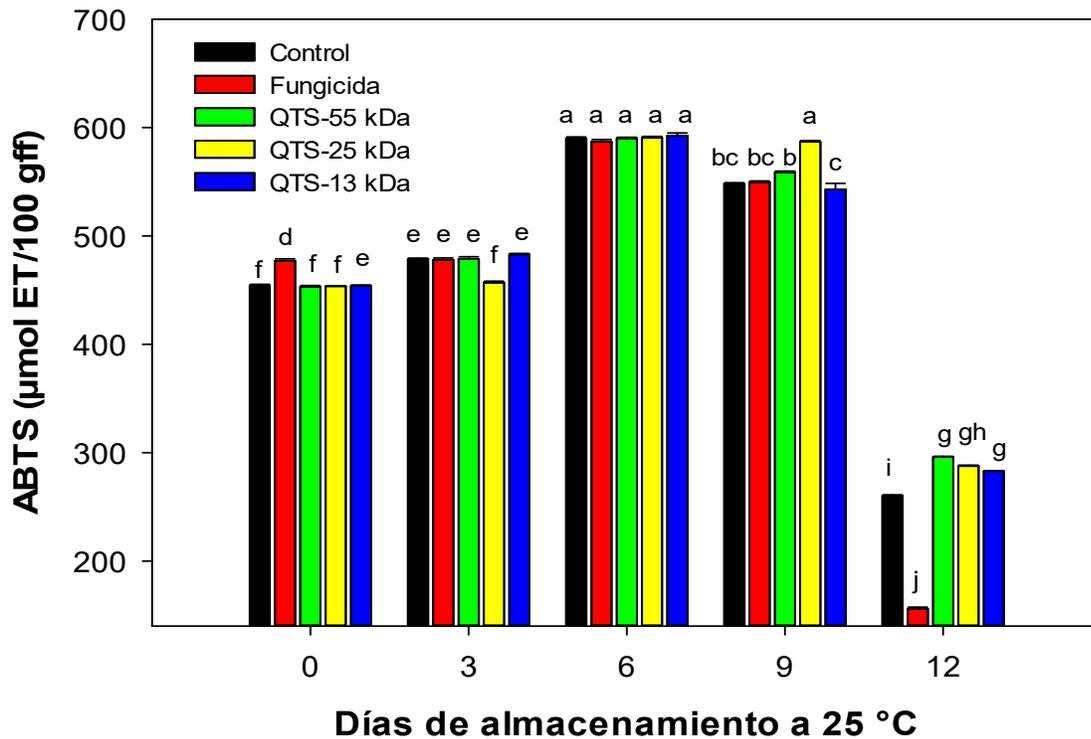


Figura 12. Capacidad antioxidante medida por el método ABTS en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y almacenamiento de días ($p < 0.05$). Valor LSD= 5.76

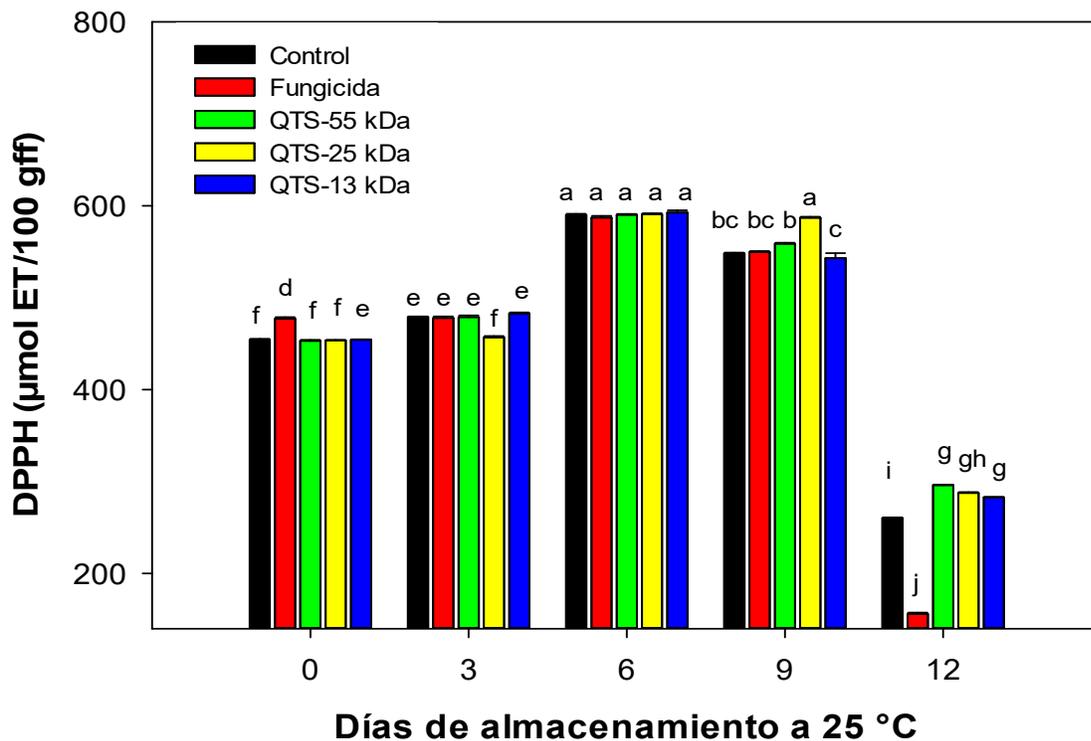


Figura 13. Capacidad antioxidante medida por el método DPPH en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico y QTS-55 kDa, QTS-25 kDa, QTS-13 kDa. Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y almacenamiento de días ($p < 0.05$). Valor LSD= 5.55

nectarina, donde se aplicó QTS-30 kDa, donde se observó que promovieron una mayor capacidad antioxidante a través de los ensayos de eliminación de radicales libres ABTS y DPPH. Por su parte, Jung y Zhao (2012) señalan que las QTS-22 y QTS-30 kDa fueron significativamente más altas en la actividad secuestrante de radicales DPPH en comparación con las muestras de QTS-4.5 kDa. Por tanto, el quitosano puede actuar como molécula inductora e interactuar con los receptores de membrana, provocando un aumento de la actividad antioxidante del huésped (fruto) e inhibiendo el crecimiento de una serie de hongos patógenos (Benhamou 1996). En general, en este estudio se observó que QTS-55 y QTS-13 kDa participaron en los mecanismos de defensa debido a que los frutos de papaya tratados con estos tratamientos presentaron el menor desarrollo fúngico y los mayores contenidos de ácido ascórbico y compuestos fenólicos, así como las actividades más altas de ABTS y DPPH. En la literatura se señala que los recubrimientos de quitosano (300 y 30 kDa) tienen el potencial de controlar la severidad de la enfermedad en mango inoculado al inhibir la descomposición fúngica causada por *C. gloeosporioides* conduciendo mecanismos de defensa como H₂O₂, contenido fenólico total, quitinasa, β actividades de 1,3-glucanasa y peroxidasa (Jung & Zhao 2012).

Al igual que nuestros hallazgos, existen reportes que indican que el quitosano puede actuar como inductor, promoviendo la activación del sistema de defensa de los frutos debido a que el biopolímero está compuesto por oligoquitinas y oligoquitosanos (componentes estructurales de los fitopatógenos) y la diferencia entre microorganismo y quitosano es no reconocido, por lo que el sistema de defensa de la fruta lo considera

un ataque de un agente extraño desencadenando respuestas del sistema de defensa durante el almacenamiento de las frutas (Ngo & Kim 2014).

B. Segunda etapa de investigación

1. Evaluación de la variable de respuesta utilizada para optimizar quitosano biotecnológico

a. Grado de desacetilación (GD)

Las quitina desacetilasas son enzimas responsables de catalizar la desacetilación de la quitina para preparar quitosano (Arnold y col 2020). En esta investigación se incubaron distintos volúmenes de inóculo de *C. gloeosporioides* que contenían a la enzima quitina desacetilasa de 5, 9, 20, 30 y 35 mL/L con quitina obtenida por FAL (10 g) durante 7 días a 30 °C. Los valores de GD obtenidos experimentalmente variaron entre 27% y 83% (**Cuadro 8**). El análisis de varianza del modelo de predicción para GD del quitosano, muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de desacetilación enzimática [volumen de inóculo (VI, mL) y Concentración de nutrientes (CN, g/L)]. El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.0001$) para GD. Este análisis también mostró que el GD del QTS B fue significativamente dependiente de los términos lineales del volumen del inóculo (VI; $p < 0.0001$) y la concentración de nutrientes (CN; $p < 0.0017$), así como del término de interacción (VI*CN; $p < 0.0001$) y los términos cuadráticos del volumen del inóculo (VI²; $p < 0.0009$) y concentración de nutrientes (CN²; $p < 0.0001$). El modelo de predicción para el GD del QTS B usando variables codificadas fue:

$$Y_{GD} = 85.82 - 3.43X_1 - 1.63X_2 + 3.98X_1 X_2 - 1.69X_1^2 - 3.32X_2^2$$

El modelo de predicción para el GD del QTS B usando variables no codificadas fue:

Cuadro 8. Diseño experimental empleado para obtener diferentes combinaciones de volumen de inóculo y concentración de nutrientes (VI, CN) para la producción de Quitosano por desacetilación enzimática, y resultados experimentales de la variable de respuesta (Grado de desacetilación).

No.	Volumen de inóculo (mL)	Concentración de nutrientes (g/L)	Grado de desacetilación (%)
1	09.39	18.18	49.07
2	30.61	18.18	44.59
3	09.39	81.82	51.99
4	30.61	81.82	55.01
5	05.00	50.00	27.05
6	35.00	50.00	83.18
7	20.00	05.00	45.89
8	20.00	95.00	51.08
9	20.00	50.00	51.52
10	20.00	50.00	58.65
11	20.00	50.00	55.38
12	20.00	50.00	49.04
13	20.00	50.00	56.34

Diseño central compuesto rotatable con dos factores y cinco niveles; 13 tratamientos. No: corresponde al orden de procesamiento. $X_1 = VI =$ volumen del inóculo (mL), $X_2 = C =$ Concentración de nutrientes (g/L). $Y_{GD} =$ Grado de desacetilación.

$$Y_{GD} = 89.079 - 0.065 VI + 0.565 CN + 3.65 \times 10^{-4} VI \cdot CN - 1.727 \times 10^{-4} VI^2 - 0.027 CN^2$$

Este modelo de predicción explicó el 98% de la variabilidad total ($p < 0.0001$) de los valores del GD del QTS B. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 97 % y la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0.05$). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 0.97%. Estos valores indican que el modelo experimental para el GD del QTS B fue adecuado y reproducible.

A partir del modelo matemático de predicción del GD se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contornos (**Figura 14**) en los cuales se observa el efecto de las variables de la desacetilación enzimática (VI y CN) sobre el GD de QTS B. El volumen de inóculo (mL) y la concentración de nutrientes (g/L) tuvieron efecto importante sobre el GD del QTS B. Los máximos valores (alrededor del 83%) de esta variable de respuesta se encuentran a volúmenes de inóculos altos y concentraciones de nutrientes medios, conforme aumentó o disminuyó la concentración de nutrientes hubo una disminución del grado de desacetilación. Como en el análisis de varianza se encontró que la interacción entre el VI y la CN fue significativa, se tuvo un efecto contrario a volúmenes de inóculo bajos, donde los mínimos valores de GD (alrededor del 27%) se encontraron a concentraciones de nutrientes medios (50 g/L), conforme aumentó o disminuyó la concentración de nutrientes hubo un aumento del grado de desacetilación. Durante el análisis por metodología de superficie de respuesta se debe caracterizar los gráficos de superficie y contornos obtenidos; la caracterización de la superficie consiste en ubicar el punto estacionario el cual puede ser un máximo, un mínimo o un punto silla. Asimismo, el punto estacionario puede ubicarse dentro o fuera

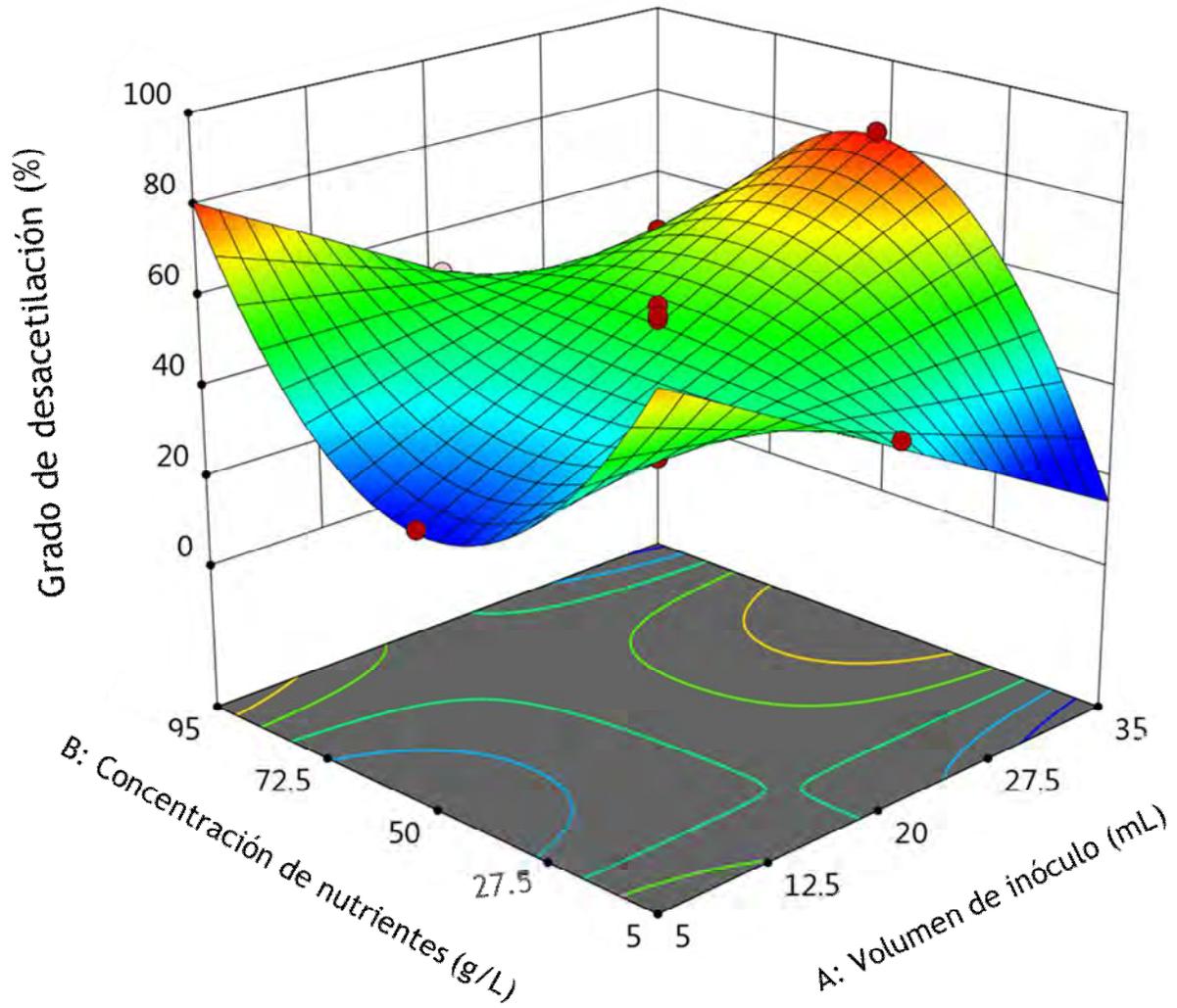


Figura 14. Gráfica de superficie y contornos que muestra el efecto del volumen del inóculo (mL) y concentración de nutrientes (g/L) sobre el grado de desacetilación del quitosano obtenido por método biotecnológico.

del entorno experimental. Al caracterizar la superficie de la **Figura 14** se puede observar que el punto estacionario se encuentra fuera del entorno experimental y lo que se tiene en la superficie es una cresta ascendente, la cual se ubica, como se mencionó anteriormente, a volúmenes de inóculos altos (35 mL) y concentraciones de nutrientes medios (50 g/L). En este estudio es deseable obtener el valor máximo posible del grado de desacetilación, por lo que es posible obtener un grado de desacetilación mayor al 83%. Lo que se hace en estos casos es seguir experimentando en el sentido del óptimo [en este caso experimentar a volúmenes de inóculo mayores a 35 mL y a una concentración de nutrientes intermedia (50 g/L)], siempre que lo permitan las condiciones de operación del sistema. Se propone un óptimo alternativo, en donde la respuesta sea favorable y las condiciones de operación son posibles. En este caso se propusieron volúmenes de inóculo mayores a 35 mL/L, con una concentración de nutrientes de 50 g/L, encontrándose que cuando la quitina se incubó con un volumen de inóculo de 50 mL/L se obtuvo una desacetilación casi completa, obteniendo un QTS B con un GD de casi del 90%, lo que demuestra la presencia y actividad de la enzima en el medio, provocando la desacetilación de casi todas las unidades de N-Acetilglucosamina del biopolímero. Es por ello que, las condiciones óptimas del proceso de desacetilación enzimática (DE) fueron: volumen de inóculo de 50 mL/L y una concentración de nutrientes de 50 g/L. Con estas condiciones óptimas de DE se obtuvo un alto GD (89%) del QTS B.

En la literatura, el proceso de desacetilación enzimática se ha descrito previamente para quitina desacetilasa de diferentes microorganismos incluyendo los hongos como *Mucor* sp (Álvarez-De la Hoz y col 2011). Recientemente, se pudo observar que la aplicación de quitina desacetilasa del hongo *Myceliophthora thermophila*, fue efectiva para obtener un 90% de GD en un quitosano de 100 kDa (Krolicka y col 2018). Por su parte, una quitina desacetilasa de *Acinetobacter schindleri* MCDA01 demostró tener una tasa alta de actividad y reacción de desacetilación para la quitina, la enzima eliminó un 63.05% el grupo acetilo (Yang y col 2022).

De acuerdo a lo reportado por Sixto-Berrocal y col (2023) se utilizó un coctel de desacetilasas producido por *Aspergillus niger* para la desacetilación de la quitina, y como resultado el QTS B presentó un grado de desacetilación superior al 78%. Por lo tanto, quitina desacetilasa es un potente descomponedor de quitina para catalizar la desacetilación de quitina y obtener quitosano y se espera que estos hallazgos permitan la conversión efectiva de los biorrecursos de quitina en sus valiosos derivados: nanofibras de quitina, quitosano y quitoooligosacáridos (Arnold y col 2020). Otro bioproceso reportado es el realizado por Sedaghat y col (2017), al quitosano se le determinó el GD (88%) obtenido por FAL y desacetilación por autoclave, obteniéndose que este bioproceso presentó diferencias significativas con los procesos químicos y la utilización de FAL-microondas.

2. Caracterización química de quitina, quitosano comercial y quitosano biotecnológico optimizado

En esta etapa no fueron caracterizados los tres quitosanos comerciales, únicamente fue caracterizado el quitosano comercial de peso molecular alto (QTS C) ,

la quitina [obtenida al aplicar condiciones optimizadas del proceso de fermentación ácido láctica (tiempo de fermentación (t)=108 h/concentración de azúcar (C)=8.74%) (Cabanillas-Bojórquez, 2023) y el quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) (obtenido por desacetilación enzimática con el extracto enzimático fúngico de *C. gloeosporioides*) (**Cuadro 9**).

Las muestras con mayor humedad se observan en la quitina las cuales presentaron 10% de humedad, seguido del QTS B (3%) y finalmente QTS C con 1%: un porcentaje mayor de humedad puede deberse a una menor masa molecular del biopolímero, ya que, con mayor cantidad de grupos hidrofílicos libres, como los grupos hidroxilos, aminos y aldehídos al final de la cadena polimérica aumenta la higroscopicidad de los polímeros tras la desacetilación y explican el aumento de capacidad de absorción de agua (Gocho 2000). Los resultados de este estudio concuerdan con los de Adekanmi y col (2020) quienes registraron un contenido de humedad del QTS C en el rango de 2.37-5.4%. Sin embargo, también se han reportado niveles más bajos de contenido de humedad como 0.35%, 0.41%, 0.52%, 0.009% y 0.0048% para QTS C de diferentes pesos moleculares en un rango entre 50 y 115 kDa (Kumari y col 2017).

Los contenidos de proteína cruda de la quitina, CTS C y CTS B fueron de 37.16%, 34.67% y 35.13%, respectivamente (**Cuadro 9**). El bioproceso de FAL y la DE propició un decremento ($p < 0.05$) en el contenido de proteína (de 37.16% a 35.13%). La presencia del contenido proteico en el quitosano se debe a que el exoesqueleto de los crustáceos (camarón) es una capa no celular secretada por la epidermis, el cual se encuentra formando una organización jerárquica de varios niveles estructurales.

Cuadro 9. Composición proximal de quitina, quitosano comercial y quitosano biotecnológico optimizado.

Composición	Quitina	QTS C	QTS B
Físicoquímica (% bs)			
Humedad	10.00±0.7 ^a	1.00±0.9 ^c	3.00±0.8 ^b
Proteínas	37.16±0.1 ^a	34.67±0.4 ^c	35.13±0.6 ^b
Lípidos	9.53±0.7 ^a	6.36±0.4 ^b	6.24±0.3 ^b
Cenizas	24.00±0.9 ^a	20.00±0.2 ^b	16.00±0.1 ^c
Carbohidratos	19.31±0.5 ^c	37.88±0.7 ^a	27.55±0.4 ^b

Medias con letra diferente en el mismo renglón indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$);

QTS C= Quitosano comercial, QTS B= Quitosano biotecnológico optimizado.

En el nivel molecular se encuentra la quitina, la cual mediante su alineamiento antiparalelo forma estructuras altamente cristalinas, el siguiente nivel estructural es el arreglo entre las moléculas que se encuentran ligadas en la periferia a proteínas globulares formando estrechas unidades llamadas nanofibrillas, el tipo de proteínas presentes contiene β -aminoácidos como la glicina, tirosina, glicoproteínas conteniendo residuos histidilo y aspartilo, ácido aspártico, serina y glicina, el contenido de proteína para distintos quitosano oscila entre 20% y 47% de acuerdo a los reportado por Colina y col (2014).

Las muestras de quitina, QTS C y QTS B tuvieron contenidos de lípidos de 9.53%, 6.36 y 6.24%, respectivamente (**Cuadro 9**). Colina y col (2014) reportaron un contenido de lípidos de 1.3% a 9.9%, señalando un contenido de lípidos en un rango entre 5% y 20% en diferentes QTS C (sin especificar el PM).

QTS B registró el contenido de cenizas más bajo en comparación con quitina, seguido del QTS C (**Cuadro 9**). El bajo contenido de cenizas de QTS B (16%) es una indicación del éxito en el paso de desmineralización por FAL; lo que lleva a un bajo nivel de sustancias inorgánicas en las muestras de QTS B (Kumari y col 2017). Los contenidos de cenizas de QTS registrados en este estudio fueron superiores a los valores, 1.3%, 1.5% y 1.8%, reportados por Anand y col (2014).

Sin embargo, Juárez (2010) obtuvo quitosano por proceso biológico/químico el cual presentó un contenido de cenizas de 19%. El contenido de cenizas es ligeramente más alto comparado con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que durante la desproteización enzimática aparentemente no existe una considerable separación de los minerales presentes en la muestra.

Respecto al contenido de carbohidratos en la muestra de QTS C presentó un contenido mayor del 37%, el contenido de carbohidratos disminuyó para el caso de QTS B y quitina con 27 % y 19%, respectivamente (**Cuadro 9**). En la literatura se reporta un contenido de carbohidratos en muestras de QTS C en un rango de 27% a 37%, lo cual fue similar a los resultados de esta investigación (Anand y col 2014).

3. Caracterización físico-química del quitosano comercial y quitosano biotecnológico optimizado

a. Peso molecular

La FAL y la DE fueron bioprocesos más eficientes que la desacetilación convencional o química (QTS C de PM 50 kDa), pues permitieron obtener un QTS B de mayor peso molecular (309.3 kDa). Se ha mencionado que la desacetilación enzimática puede generar pesos moleculares altos en comparación a la desacetilación química y eso puede ser debido a una de las características del quitosano (molécula susceptible), este polímero puede ser modificado fácilmente ya que presenta grupos funcionales libres como grupo amino primario en unidades desacetiladas en C2, grupos hidroxilo primarios en C6, así como los secundarios en unidades acetiladas o desacetiladas en C3, estos grupos reactivos se pueden modificar rápidamente permitiendo la funcionalización del quitosano con una amplia variedad de moléculas bioactivas (enzimas) (Mourya y Inamdar 2008).

Además, los grupos amino del quitosano permiten ser explotados a pH bajo como grupos protonados y cargados positivamente para conferir propiedades polielectrolíticas, mientras que, a pH más alto, la amina natural se desprotona y se convierte en nucleófilo puede sufrir una variedad de reacciones enzimáticas con grupos

electrofilicos por enlaces covalentes. Las enzimas, al unirse al sustrato (quitina), realizan una desacetilación específica sin dañar los enlaces glicosídicos de tipo β (1-4) de la estructura del quitosano permitiendo que la reacción ocurra más eficientemente, logrando cadenas lineales formadas por monómeros de D-glucosamina más grandes (Aljawish y col 2015).

Por lo tanto, la funcionalización del quitosano mediada por enzimas puede ofrecer ventajas de seguridad sobre los métodos de modificación química. Varios estudios han demostrado que la funcionalización enzimática del quitosano puede mejorar sus propiedades iniciales o crear nuevas propiedades funcionales con la capacidad de mantener sus propiedades iniciales intactas y así ampliar el campo de aplicaciones (Shi y col 2006; Cunha y Gandini 2010; Aljawish y col 2012).

Resultados similares fueron descritos por Sedaghat y col (2017) quienes realizaron una FAL en condiciones óptimas (20% de glucosa y 6 días de fermentación) para extraer quitina y obtener QTS B por autoclave; presentando el QTS B un peso molecular de 362 kDa. Por su parte, Knidri y col (2019) obtuvieron exitosamente QTS B de caparazones de gambas, los resultados mostraron que la extracción asistida por microondas permitió producir QTS B de peso molecular de 300–360 kDa. Sin embargo, un PM menor al de esta investigación obtenido por FAL-extracción enzimática de *Aspergillus niger* fue reportado por Sixto-Berrocal y col (2023), en donde el QTS B presentó un PM de 71.31 kDa.

b. Medición de color y capacidad de retención de agua y grasas

El color de la superficie de las películas de quitosano es un parámetro importante que influye en la apariencia general y la aceptación del consumidor. Todas las películas

del QTS B y QTS C eran visualmente blanquecinas; en el valor a^* , QTS B mostró la mayor intensidad del color rojo (2.09) mientras que QTS C mostró un valor negativo (-1.89) (**Cuadro 10**). Por otra parte, QTS B y QTS C resultaron en valores similares de b^* (8.91 y 8.89, respectivamente) ($p>0.05$), indicando una tendencia hacia el amarillo (**Cuadro 10**).

Asimismo, se observó un valor similar de L^* de 77.53 y 78.99 entre las películas QTS B y QTS C como se muestra en la **Cuadro 10**. Debido a la similitud de estos parámetros de color entre QTS B y QTS C, el QTS B cumple con la apariencia física de las películas basadas en quitosano y refleja que el método de obtención biotecnológico es viable para la extracción de quitosano. Además, en la literatura se menciona que los agentes blanqueadores químicos con los que se extrae el QTS C podrían disminuir la capacidad de unión a las grasas, el peso molecular y la viscosidad de los quitosanos (Rasweefali y col 2022). Valores de color en las películas de QTS C similares fueron reportados previamente por Rasweefali y col (2022) con un valor de L^* de 68.99, a^* de -1.55 y b^* 8.82. También, se obtuvieron colores similares a Xie y col (2022) entre la película de QTS de 100 kDa ($a^*=0.16$ y $b^*=10.93$) y la película de QTS de 300 kDa ($a^*=0.13$ y $b^*=11.33$). Sin embargo, hasta el momento no existe información en literatura sobre los parámetros de color de las películas quitosano obtenidas por método biotecnológico optimizado.

Por otro lado, la capacidad de retención al agua (CRA) de una sustancia se describe como la tendencia del agua a exhibir una fuerte afinidad con las sustancias hidrófilas. La CRA predice la conservación de la calidad del recubrimiento comestible durante el procesamiento y el almacenamiento de los frutos tratados y se menciona

Cuadro 10. Color (luminosidad L* y parámetros a* y b*), capacidad de retención de agua y grasas de las películas a base de quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).

Película de quitosano	Medición de color			Capacidad de retención de agua (%)	Capacidad de unión de grasas (%)
	Luminosidad	Parámetro b	Parámetro a		
QTS C	78.99±0.3 ^a	8.89±0.7 ^a	-1.89±0.1 ^b	581.14±0.1 ^a	676.20±0.6 ^a
QTS B	77.53±0.7 ^a	8.91±0.4 ^a	2.09±0.6 ^a	548.33±0.8 ^b	547.00±0.2 ^b

Los valores representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Medias en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

que una CRA mayor, puede ser deseable para evitar el exceso de pérdida de agua en la superficie de los frutos con contenido alto de humedad (Terkula y col 2022). La CRA de la película comestible a base QTS B fue de 548.33%, este valor estuvo cerca del obtenido en el recubrimiento comestible a base de QTS C (581.14 %)(**Cuadro 10**). En la literatura, Hossain y Iqbal (2014) reportaron que la CRA para seis QTS C osciló entre un 458% y 805%. Por otra parte, Rout (2001) encontró que CRA para QTS C estuvo entre 581% y 1150% y que se puede mejorar por los procesos de obtención de quitosano como la desmineralización y la desproteínización teniendo un efecto significativo en CRA.

Mientras tanto, la capacidad de unión de grasas (CUG) del QTS B mostró un 547% y estuvo dentro del rango reportado para el QTS C (676%) (**Cuadro 10**), lo cual, a su vez, coincide con los 535% de CUG reportados por No y col (1998); no obstante, el valor obtenido en este estudio fue inferior al valor reportado para QTS C (722%) (Rasweefali y col 2022). Por su parte, Rout (2001) informó que cambiar la secuencia de pasos de la obtención de quitosano influye en la CUG, por ejemplo, se observa un aumento en CUG cuando la desmineralización se lleva a cabo antes de la desproteínización, seguida de la desacetilación, por el contrario, se observa una disminución de CUG cuando la desproteínización se realiza antes de la desmineralización, seguida de desacetilación. Así mismo, se ha informado que un tiempo de desacetilación más prolongado mejora tanto CRA como CUG, también se afirmó que el CRA y el CUG del quitosano son una propiedad funcional que depende del método de procesamiento (Kumari y col 2017). Sin embargo, es importante

mencionar que en literatura no existe información acerca de CRA y CUG de un QTS B obtenido por FAL y desacetilación enzimática.

C. Tercera etapa de investigación

Para esta etapa es necesario mencionar que en literatura no existe información sobre el impacto que tiene un QTS B sobre la actividad antifúngica, parámetros de calidad poscosecha, compuestos bioactivos, capacidad y actividad enzimática antioxidante, por lo tanto, las comparaciones se realizaron por el PM del QTS C, QTS B y los PM reportados en distintas investigaciones publicadas.

1. Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas de quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico (QTS B)

Respecto al espesor de las películas comestibles a base del QTS C y QTS B estuvieron comprendidos entre 0.18 y 0.20 mm, respectivamente. Dichos valores no fueron significativamente diferentes entre sí, por lo tanto, el incremento del PM de un tratamiento (QTS C) a otro (QTS B) no influyó en el espesor de las películas. Se menciona que, utilizar quitosano para la formación de una película reduce la elongación y la rotura de las mismas (Kumari y col 2017). De acuerdo a Liu y col (2020) la presencia de los grupos amino e hidroxilo del quitosano refuerza la relación intermolecular de los enlaces de hidrógeno, estas características del quitosano generan una mayor cohesión de la red polimérica y limita el deslizamiento de las cadenas poliméricas durante el ensayo de tracción, reduciendo así la capacidad de elongación de la película (Bonilla y col 2014). En literatura, se menciona un grosor similar a esta investigación por Ruíz-Ramos y col (2006) con 0.15 mm en películas de QTS C de PM

de 150 kDa y 75% GD (1%). Por su parte, Llanquileo y col (2022) señalaron un grosor de 0.03 mm en la película de quitosano de 300 kDa y 75% GD.

En cuanto a la PVA se pudo observar que la película de QTS C presentó mayor PVA con $1.15 \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ en comparación con la película de QTS B con $1.07 \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, teniendo en cuenta estos resultados se sugiere que la PVA dependió del PM de los tratamientos al presentar diferentes valores (**Cuadro 11**). Es importante mencionar que la disminución de la PVA permite que el QTS B pueda ser utilizado como bioempaque para las frutas de papaya. En películas hidrofílicas como las de quitosano, el agua interactúa a través de enlaces de hidrógeno, lo que aumenta el volumen libre y la flexibilidad de las películas mediante modificaciones de la permeabilidad de la película. Así, la presencia de agua en estas películas influye en la forma en que el gas es absorbido y difundido (Cazón y Vázquez 2020). Como otros polímeros hidrofílicos, quitosano presenta variaciones en la PVA en relación con la actividad del agua (AG). A valores bajos de AG, la permeabilidad de la película es relativamente baja porque la solubilidad en agua es baja. Un valor de AG creciente conduce a un contenido de humedad de película creciente (isoterma de sorción de humedad sigmoideal), lo que aumenta la capacidad de transferencia de agua. A un valor alto de AG, el extenso hinchamiento de los polisacáridos con el aumento de la absorción de agua mejora la difusión de las moléculas de agua (Kittur y col 1998).

Cuadro 11. Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).

Tratamientos	Espesor (mm)	Permeabilidad al vapor del agua (g m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²)
QTS C	0.18±0.9 ^a	1.15 x 10 ⁻¹¹ ±1.1 ^a
QTS B	0.20±0.7 ^a	1.07 x 10 ⁻¹¹ ±0.9 ^b

Los valores representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Medias en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Prueba t-student, $p < 0.05$).

Srinivasa y col (2007) informaron que el contenido de humedad en las películas disminuye con el aumento de la concentración de quitosano. Los valores de PVA de esta investigación fueron menores a las reportadas por Ruíz-Ramos y col (2006) quienes señalan una PVA de 3 a 5 g m kPa⁻¹ d⁻¹ m⁻² en películas de QTS C de PM de 150 kDa y 75% GD (1%). Se menciona que, en películas de QTS C de diferentes PM (1, 30, 100, 300 kDa) la humedad y PVA disminuyeron marginalmente con el aumento del PM, lo que podría estar asociado a una película con estructura más compacta y suave.

2. Ensayo antifúngico *in vitro*

a. Crecimiento radial micelial, germinación de conidios

Los tratamientos QTS C y QTS B fueron igual de efectivos para inhibir el crecimiento radial micelial del hongo *C. gloeosporioides* ya que ambos presentaron 100% de inhibición; mientras que el tratamiento fungicida mostró solamente un 73% de inhibición siendo significativamente menor que los tratamientos con quitosano (**Figura 15**). El efecto antifúngico del quitosano se debe al grupo amino cargado positivamente que interactúa con los componentes cargados negativamente de las paredes celulares o citomembranas fúngicas, como glucano, manano, proteínas y lípidos (Tan y col 2016). Al aplicarse, quitosano de diferentes PM (1, 30, 100 y 300 kDa) los diámetros de inhibición contra *S. aureus* y *E. coli* fueron afectados conforme aumentó el PM (Xie y col 2022). El QTS C (300 kDa) y el oligoquitosano (6 kDa) inhibieron significativamente el crecimiento del micelio de *A. kikuchiana* y *P. piricola* de acuerdo con Meng y col (2010).

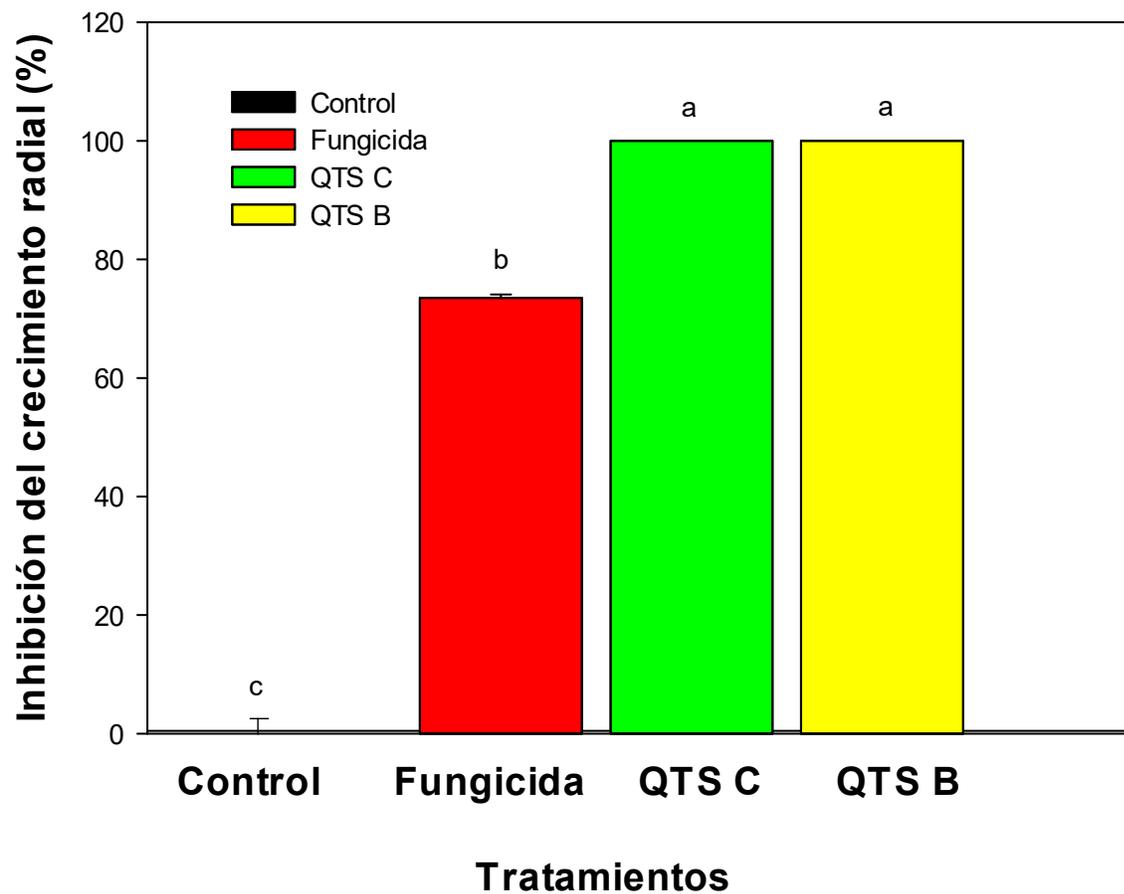


Figura 15. Efecto del quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y el quitosano comercial (QTS C), fungicida químico (tiabendazol) sobre la inhibición del crecimiento micelial radial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Los valores representan la mediana de nueve réplicas. Letras diferentes en el parámetro indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Kulikov y col (2015) llevaron a cabo un estudio para relacionar el PM y la actividad antifúngica de 8 QTS C con un rango de peso de 0.73–20 kDa contra *Candida spp.* Los autores encontraron que todos los QTS C presentaban actividad contra *Candida spp* por la disminución y modificación de las paredes celulares de los hongos. Por su parte, el quitosano de 17, 23 y 30 kDa y 75% GD inhibieron el crecimiento micelial en los tres aislados de *R. stolonifera* (Guerra-Sánchez y col 2008).

En la **Figura 16** se presenta la inhibición de la geminación de conidios de *C. gloeosporioides* tratadas con fungicida, QTS C y QTS B, se observó que los tratamientos a base de quitosano presentaron una inhibición de conidios significativamente mayor en comparación con el tratamiento fungicida (81%), en donde QTS C y QTS B generaron una inhibición del 91% y 93%, respectivamente. La inhibición de conidios puede deberse a que el quitosano puede formar una película de Langmuir-Blodgett (la cual contiene una o más monocapas de un material orgánico, depositados en la superficie de un líquido sobre un sólido por inmersión del sustrato sólido sobre el líquido) para limitar la funcionalidad de las membranas celulares fúngicas, posteriormente el quitosano se adsorbe homogéneamente y penetra, aumentando el grosor, la rugosidad y el orden de la cadena por interacción electrostática, dipolar e hidrofóbica, debilitando la estabilidad de las membranas celulares (Fan y col 2018). Así también, se reportó que la germinación de esporas de *A. kikuchiana* y *P. piricola* fueron significativamente inhibidos tanto por el QTS C (300 kDa) como el oligoquitosano (6 kDa) después de 6 h de inoculación (Meng y col 2010).

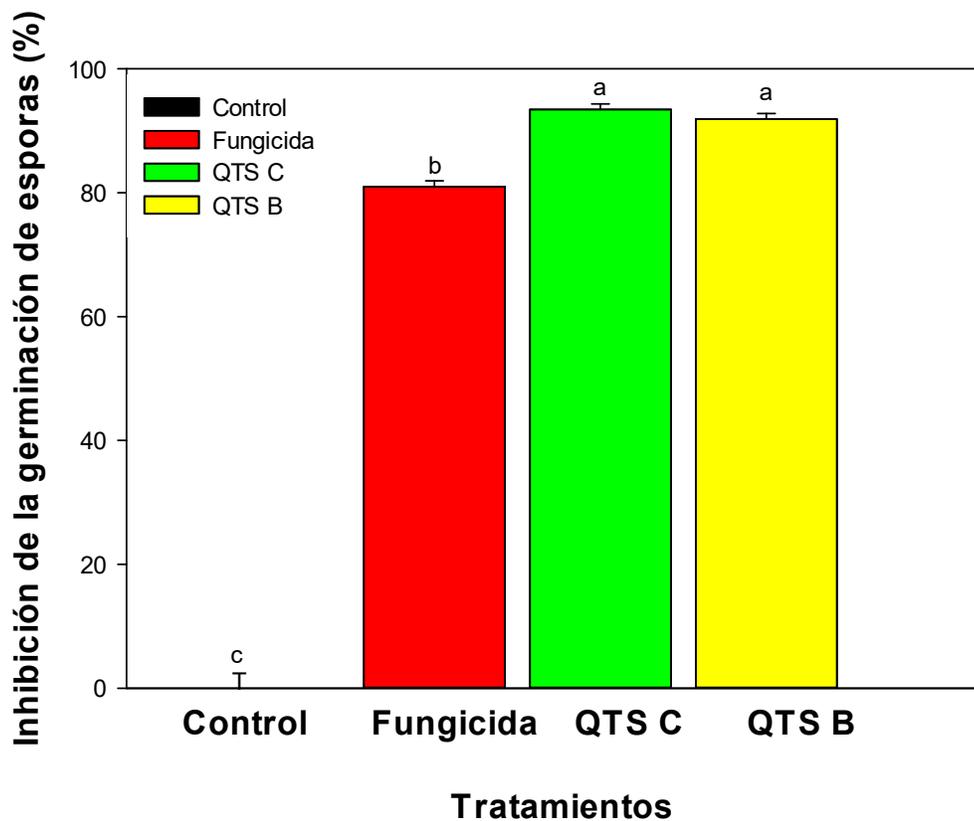


Figura 16. Efecto del quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y el quitosano comercial (QTS C), fungicida químico (tiabendazol) sobre la inhibición de la germinación de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Los valores representan la mediana de nueve réplicas. Letras diferentes en el parámetro indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por su parte, Badawy y Rabea (2009) analizaron QTS C de diferentes pesos moleculares (5, 37, 57 y 290 kDa) y observaron que todos los PM fueron efectivos para inhibir el crecimiento de *B. cinérea*.

3. Actividad antifúngica *in vivo*

a. Incidencia y severidad de antracnosis

Los primeros síntomas de la enfermedad de antracnosis se presentaron al día 3 en los frutos control con el 11% de los frutos dañados del total de los frutos almacenados. Mientras que, los tratamientos fungicida, QTS C y QTS B lograron retardar la aparición de los síntomas hasta el día 4, con un 22%, 22% y 5% de los con síntomas, respectivamente. Al día 7 de almacenamiento, todos los frutos control y los tratados con fungicida (100%) estaban infectados por antracnosis, mientras que en el QTS C fue al día 8 en el que todos sus frutos presentaban síntomas de la enfermedad. Para el caso del tratamiento QTS B fue al finalizar el tiempo de almacenamiento (día 12) en el que el 100% de los frutos tenían síntomas por antracnosis (**Figura 17**). Este comportamiento pudo deberse a que el QTS provocó la expulsión del citoplasma fuera de las células en el micelio, causando daño irreversible en la membrana celular (Zhou y col 2016). Además, en un estudio reportado por Zahid y col (2015) se observó que con un QTS de 50 kDa se presenta una menor viscosidad del quitosano que le permite entrar en el núcleo de la célula, interfiriendo con la síntesis del ADN y ARNm y afectando la producción de proteínas y síntesis de varias enzimas. Mientras que, el quitosano de 350 kDa presentó una viscosidad más densa y recubrió al hongo afectando a la morfología de las esporas en varias etapas, reduciendo el peso del

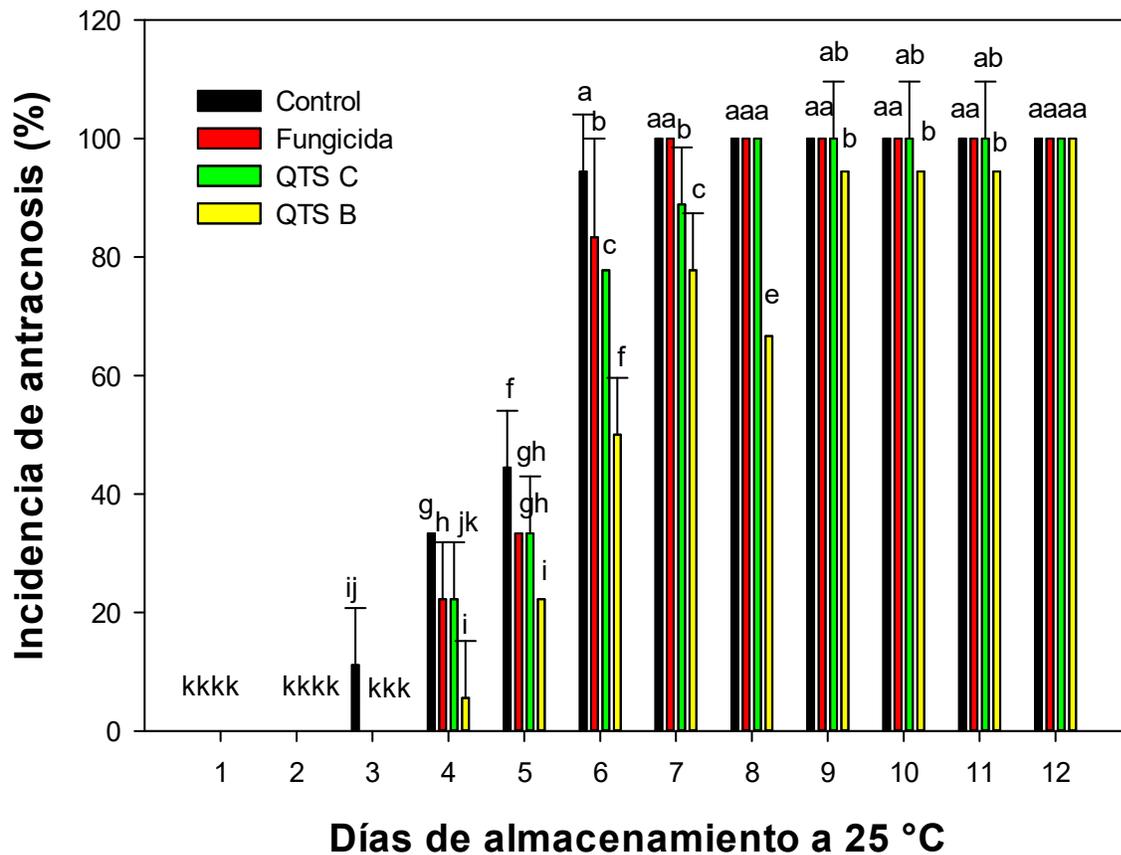


Figura 17. Porcentaje de incidencia de antracnosis en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). Valor LSD= 7.68.

micelio y también el crecimiento de las esporas. Por otra parte, la aplicación de quitosano obtenido por la desacetilación en autoclave y ultrasonido inhibieron los crecimientos de levadura y moho completamente en pepinos y tomates durante 10 días de almacenamiento de acuerdo a Adeboyejo y Oyesanya (2023).

Asimismo, para los frutos de pera recubiertos con QTS C (300 kDa) y oligosacáridos (6 kDa) la incidencia de la enfermedad de la mancha negra causada por *A. kikuchiana* y *P. piricola* se redujo en comparación con los frutos control, en donde los primeros síntomas se observaron después de las 72 h de inoculación. A pesar de que el oligosacárido (6 kDa) presentó una inhibición sobre el crecimiento *in vitro*, el QTS C (300 kDa) logró retardar significativamente la aparición de los síntomas. La diferencia entre tratamientos puede estar relacionado con una reducción en la concentración de oligoquitosano en la película formada en la fruta debido a una menor viscosidad y mayor difusividad que el QTS C y pudo resultar en un efecto de control relativamente débil en la actividad antifúngica (Meng y col 2010). En un estudio publicado por Badawy y Rebea (2009) en donde se aplicaron quitosanos de diferentes PM (5, 37, 57 y 290 kDa) se observó que la enfermedad del moho gris causado por *B. cinerea* en tomate se retrasó comparado con el control. Asimismo, se pudo notar que cada uno de los quitosanos presentó un efecto positivo antifúngico, pero, fue el quitosano de 57 kDa quien proporcionó un excelente control del moho gris (Badawy y Rebea 2009).

La severidad de antracnosis de los frutos de papaya tratados con fungicida y los diferentes quitosanos se observa en las **Figuras 18 y 19**. Los síntomas de antracnosis

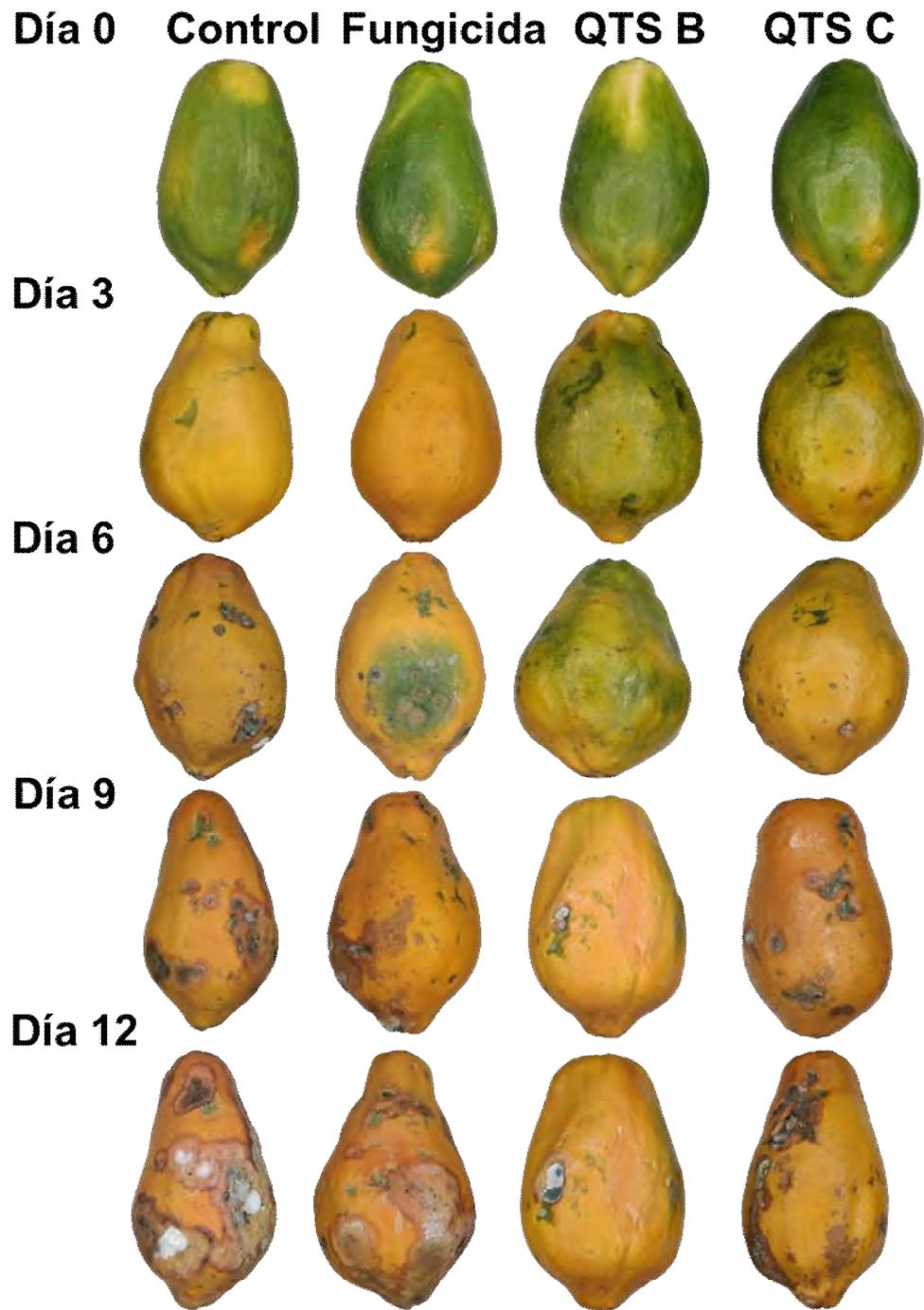


Figura 18. Imágenes representativas de los frutos de papaya tratados con quitosano comercial (QTS C), quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y fungicida químico (tiabendazol) mostrando síntomas de antracnosis sobre la superficie epidérmica durante 12 días de almacenamiento a 25 °C.

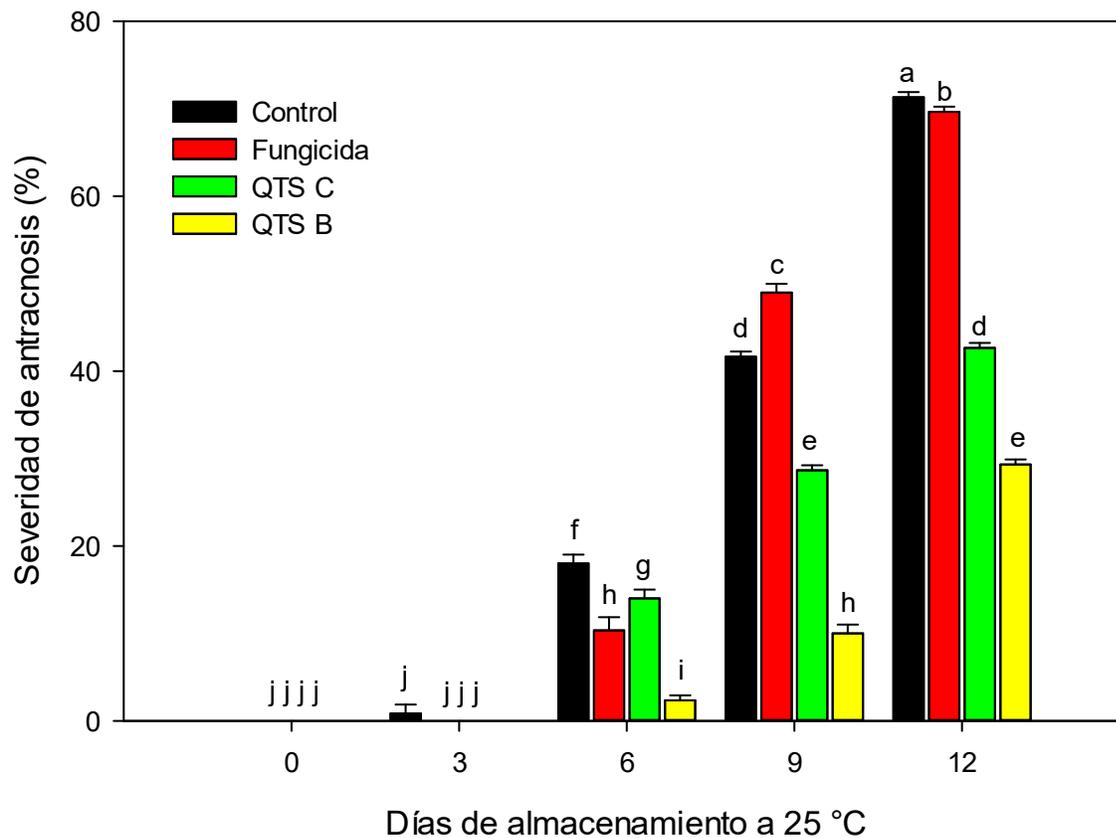


Figura 19. Porcentaje de severidad de antracnosis en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). Valor de LSD= 7.87.

se desarrollaron conforme avanzó el tiempo de almacenamiento y al día 6 los frutos control y fungicida presentaban un área dañada en la superficie de los frutos de 18% y 10%, mientras que los tratamientos con QTS C y QTS B tenían un daño del 14% y 2%, respectivamente. A pesar que los frutos control fueron afectados con una mayor área más rápido que el resto de los tratamientos, en el día 9, los frutos tratados con fungicida mostraron un mayor daño (49%) que el control (41%). Mientras que, los frutos tratados con QTS C y QTS B presentaron una severidad de 18% y 10% al mismo día, respectivamente. Los síntomas se presentaron como lesiones coalescentes y se extendieron en varias zonas del fruto. En la zona central de la lesión se observó un pequeño hundimiento de color gris a café con puntos de color salmón o rosa en donde se ubican los acérvulos y los conidios (estructuras reproductivas). Al finalizar el almacenamiento los frutos de papaya tratados con QTS B mantuvieron los valores más bajos en la severidad de daño(29%), lo que le permite mantener mejor calidad en los frutos. Resultados similares fueron reportados por Meng y col (2010), ya que observaron que los tratamientos con QTS C (300 kDa) y oligoquitosano (6 kDa) redujeron la expansión de la lesión de los hongos *A. kikuchiana* y *P. piricola* en frutos de pera. Por su parte, Chien y Chou (2006) señalan que la severidad en frutos cítricos fue menor cuando se trataron con recubrimientos de dos QTS C uno de 357 kDa y otro de 15 kDa, los dos quitosanos fueron efectivos inhibiendo la lesión de *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. lecanidion* y *B. cinerea* que lo observado en los tratados con fungicida y el control. En esta investigación, la incidencia de la enfermedad y el diámetro de la lesión de antracnosis en los frutos de papaya tratados con QTS B fueron más bajos que los de los frutos de control, fungicida y QTS C durante la incubación, lo que podría deberse

al resultado del aumento del sistema antioxidante enzimático (POD y CAT) y no enzimático (AA, fenólicos y flavonoides totales).

4. Análisis de calidad poscosecha

a. Pérdida de peso, firmeza, color externo y sólidos solubles totales

La pérdida de peso de los frutos de papaya disminuyó durante el almacenamiento a 25 °C. Los tratamientos QTS C y QTS B aplicados como recubrimientos redujeron la pérdida de peso en comparación con los frutos tratados con fungicida y control específicamente al finalizar el tiempo de almacenamiento con 10.93%, 10.45%, 12.91% y 12.35%, respectivamente (**Cuadro 6**). La pérdida de peso poscosecha pueden deberse a la pérdida de humedad como proceso natural de degradación en la maduración, resultando en un encogimiento del tejido de la fruta (Ghosh y col 2021). La superficie de una fruta tratada con quitosano puede desarrollar una capa comestible que sirve como barrera de gases (evitando el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono) y ralentiza el ritmo de la respiración (Qiu y col 2013; Ghosh y col 2021). En este sentido, se ha observado que los tratamientos a base de QTS C logran retardar la pérdida de peso de los frutos poscosecha en comparación con frutos control (Sogvar y col 2016; Limon y col 2021). De acuerdo con Adeboyejo y Oyesanya (2023) la pérdida de peso en tomates fue efectivamente reducida por la aplicación de

Cuadro 6. Efecto del quitosano comercial (QTS C), quitosano biotecnológico optimizado (QTS B) y el fungicida químico (tiabendazol) sobre la pérdida de peso, firmeza, color externo (L* y °H) y sólidos solubles totales de papaya infectada con *Colletotrichum gloeosporioides* y almacenada a 25 °C por 12 días.

Tratamientos	Análisis de calidad poscosecha				
	Pérdida de peso (%)	Firmeza (N)	Color externo (L*)	Color externo Hue (°H)	Sólidos solubles totales (°Brix)
Día 0					
Control	0.00±0.0 ^o	12.25±0.5 ^a	72.18±1.3 ^{kl}	110.73±0.4 ^a	09.05±0.2 ^{fgh}
Fungicida	0.00±0.0 ^o	12.26±0.5 ^a	71.88±1.1 ^{kl}	109.99±1.0 ^a	09.00±0.1 ^{fgh}
QTS C	0.00±0.0 ^o	12.25±0.6 ^a	71.20±1.3 ^k	110.73±0.4 ^a	08.95±0.1 ^{fg}
QTS B	0.00±0.0 ^o	12.27±0.4 ^a	72.18±1.1 ^{kl}	109.96±1.0 ^a	08.91±0.1 ^{fg}
Día 3					
Control	3.74±0.9 ^{klm}	09.80±0.9 ^{de}	82.55±1.1 ^j	84.30±0.8 ^c	10.16±0.8 ^{dc}
Fungicida	2.79±0.6 ^{klmn}	09.95±0.4 ^{de}	80.85±1.4 ^j	84.13±1.8 ^c	09.50±0.6 ^{ef}
QTS C	2.44±0.6 ^{lmn}	10.91±0.1 ^{bc}	83.06±1.6 ^{hi}	83.06±1.0 ^d	08.58±0.1 ^{hi}
QTS B	2.06±0.4 ^{mn}	11.32±0.4 ^{ab}	85.95±1.6 ^{ij}	85.36±2.2 ^b	08.40±0.7 ⁱ
Día 6					
Control	7.29±1.0 ⁱ	08.40±0.7 ^{fg}	92.55±1.1 ^{de}	74.36±0.8 ^e	10.50±0.4 ^{bc}
Fungicida	6.27±0.6 ^{ij}	07.95±0.4 ^g	90.85±1.4 ^{de}	74.13±1.4 ^e	10.53±0.2 ^{bc}
QTS C	6.13±0.5 ^{ij}	10.34±0.8 ^{cd}	93.06±1.2 ^{cd}	82.26±1.9 ^{df}	08.65±0.3 ^{gh}
QTS B	5.95±0.7 ^{ij}	10.44±0.5 ^{cd}	95.95±1.6 ^{bc}	82.68±2.0 ^{df}	08.73±0.2 ^{gh}
Día 9					
Control	9.42±1.6 ^{fg}	06.90±0.6 ^{hi}	92.33±1.2 ^{gh}	71.62±1.6 ^h	11.41±0.2 ^a
Fungicida	8.91±0.7 ^{gh}	06.56±0.4 ⁱ	92.35±0.8 ^{fg}	70.28±1.1 ⁱ	10.80±0.8 ^b
QTS C	8.83±0.5 ^{gh}	09.05±0.6 ^{ef}	94.43±1.7 ^{def}	80.15±1.3 ^g	09.80±0.5 ^{de}
QTS B	8.79±1.2 ^{gh}	09.20±0.9 ^e	95.95±1.1 ^{ef}	81.43±0.3 ^f	09.10±0.0 ^{fg}
Día 12					

Control	12.91±0.9 ^a	06.58±0.6 ^l	92.37±1.4 ^{def}	59.96±1.2 ^l	11.73±0.1 ^a
Fungicida	12.35±0.7 ^b	06.59±0.6 ^l	91.67±1.8 ^{def}	56.57±1.8 ^m	11.35±0.1 ^a
QTS C	10.93±0.5 ^c	07.56±0.6 ^{gh}	93.66±1.2 ^b	62.87±0.5 ^k	10.26±0.1 ^{cd}
QTS B	10.45±0.7 ^d	08.40±0.2 ^f	94.54±1.3 ^a	67.65±2.0 ^j	09.80±0.0 ^{de}
Valor-p (ANOVA)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Los valores representan la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Medias en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$). El valor p de ANOVA indica la significancia del modelo completo probado.

quitosanos obtenidos por desacetilación por autoclave y ultrasonido (93.65% y 81.80%, respetivamente) en comparación con las muestras control (58.52%) después de 10 días de almacenamiento en refrigeración. Cuando se aplicó QTS C de 357 kDa y QTS C de 15 kDa la pérdida de peso fue menor en comparación con el control y los tratados con fungicida durante el almacenamiento a 15 °C (Chien y Chou 2006).

La calidad de la fruta y la vida poscosecha están significativamente influenciadas por la firmeza de la fruta, que es una característica clave. Los frutos con mayor pérdida de firmeza fueron los utilizados como control ya que iniciaron en un valor promedio de 12.25 N y finalizaron con 6.58 N, mientras que los tratados con el fungicida pasaron de 12.26 N a 6.59 N al finalizar el almacenamiento. Después de 12 días de almacenamiento, QTS B mantuvo la mayor firmeza de los frutos de papaya y presentó diferencias significativas con el control, fungicida y QTS C (**Cuadro 6**). Se ha encontrado que el recubrimiento de quitosano mantiene la firmeza de la fruta de papaya al regular las enzimas que degradan la pared celular para retrasar el ablandamiento de la fruta. El ablandamiento de la fruta es causado principalmente por la solubilización de la pectina, la pérdida de galactosa y arabinosa y la despolimerización del xiloglucano durante la maduración y después de la cosecha (Al Eryani-Raqeeb y col 2009). La destrucción de los polisacáridos de la pared celular se ve facilitada por enzimas que degradan la pared celular como Poligalacturonasa (PG), Pectinmetilesterasa (PME) y β -Galactosidasa (β -GAL), cuyas actividades incrementadas disminuyen la firmeza y la cohesión de la fruta en la estructura de la pared celular (Zhao y col 2019; Lin y col 2020; Yang y col 2022). El tratamiento con quitosano reduce la actividad y la expresión génica de PG, PME y β -GAL en diversos

grados en las etapas temprana y tardía del almacenamiento. Cuando se aplican recubrimientos a las superficies de las frutas, crean una barrera que reduce el flujo de oxígeno y ralentiza la actividad de las enzimas que rompen la pared celular, mejorando así la integridad de la membrana de la fruta (Lin y col 2020). Quitosano es un polisacárido cargado negativamente, que puede formar un complejo de quitosano-pectina e inhibir la entrada de pectinasa (como PG) en el sustrato para garantizar una mayor resistencia de la pared celular (González-Aguilar y col 2008).

Respecto al color externo (L^* y $^{\circ}H$), esta característica es crucial en la calidad de la fruta porque es el primer parámetro en el que se centran los consumidores y tiene el poder de influir en su comportamiento de compra (Ali y col 2011). Además, el grado de maduración y pardeamiento de los frutos infectados con antracnosis se puede evaluar mediante las coordenadas de L^* y $^{\circ}H$ (Ali y col 2011). El valor L^* de los frutos de papaya fue en aumento durante el almacenamiento, los frutos con mayor L^* fueron QTS B, seguido por QTS C, fungicida y control en orden descendiente. Diferencias significativas fueron encontradas en los días 6 y 12 entre el tratamiento QTS B y los tratamientos fungicida y control; sin embargo, QTS B no presentó diferencias con los frutos tratados con QTS C, y a su vez el QTS C no presentó diferencias con el resto de los tratamientos (**Cuadro 6**). Los resultados de la aplicación de QTS B sugieren un retraso en la senescencia y el pardeamiento de la fruta. De manera similar, con el uso de QTS B y QTS C, los valores de $^{\circ}H$ disminuyeron, presentándose un menor cambio de color en QTS B que en QTS C (**Cuadro 6**). Todos estos resultados demostraron el desarrollo y deterioro de la calidad sensorial de la fruta de papaya en diferentes grados, la cual dependió de los tratamientos aplicados. Ali y col (2011) informaron que frutos de

papaya con aplicaciones de recubrimientos de QTS C sufrieron cambios al formarse un recubrimiento sobre la superficie de los frutos lo cual disminuyó el proceso de respiración provocando una maduración más lenta y por ende un desarrollo en el color de la cáscara más lento, como lo demuestran los valores de L^* y $^{\circ}H$.

En el **Cuadro 6** se muestra el contenido de SST para los diferentes tratamientos, donde se observó un mayor aumento para los frutos control (de 9.05 a 11.73) y fungicida (de 9.00 a 11.35 $^{\circ}$ Brix), caso contrario para los frutos que fueron tratados con QTS B en donde se observó una retención de los SST entre los días 3 y 6 del período de almacenamiento. El QTS B presentó menor contenido de SST durante todos los días de almacenamiento y diferencia significativa con todos los tratamientos. La retención de SST puede estar relacionada con un menor ritmo de respiración y síntesis de azúcar durante el proceso de maduración, un retraso en la maduración es factor clave para alargar el tiempo de la calidad de vida y exportación de los frutos climatérico (Moreira y col 2006). Zhao y col (2020) mencionan que una bicapa a base de quitosano en pepino generó una consevación de la relación azúcar/ácido (índice de maduración-dulzura) manteniendo la calidad de los frutos por más tiempo. En este estudio, la aplicación CTS B pudo retrasar la maduración y mantener la calidad de la fruta de papaya.

5. Compuestos bioactivos

a. Ácido ascórbico y fenólicos totales

En este estudio, el contenido de ácido ascórbico (AA) aumentó en los primeros 6 días de almacenamiento seguido de una disminución al día 12 para todos los

tratamientos, presentándose el mayor contenido en los frutos tratados con QTS B, seguido por el QTS C y el fungicida, mientras que los frutos control presentaron el menor contenido, incluso tuvieron la mayor reducción al pasar del día 6 al día 12 (**Figura 20**). Durante la etapa de maduración la concentración de AA comienza a aumentar a medida que la fruta se acerca a su madurez fisiológica para disminuir en la madurez comercial y senescencia (Mellidou y col 2012). Aunado a esto, el quitosano es una biomolécula con estructura igual a diversos microorganismos que al aplicarse en el fruto genera un reconocimiento patogénico que desencadena una respuesta del sistema antioxidante entre ellos los compuestos bioactivos (Zhou y col 2016). Por lo tanto, en esta investigación la aplicación de QTS B ocasionó una mayor síntesis de AA durante el tiempo de almacenamiento en comparación con el QTS C, fungicida y el control. Estos resultados fueron consecuentes con Jurić y col (2023) ya que observaron que las mandarinas recubiertas con QTS-300 kDa tuvieron un contenido de AA significativamente mayor (59.43%) que las frutas control. Por su parte, la aplicación de quitosano derivados de la desacetilación en autoclave o asistida por ultrasonido en tomates y pepinos lograron una mayor retención de AA en comparación con los frutos control (Adeboyejo y Oyesanya 2023).

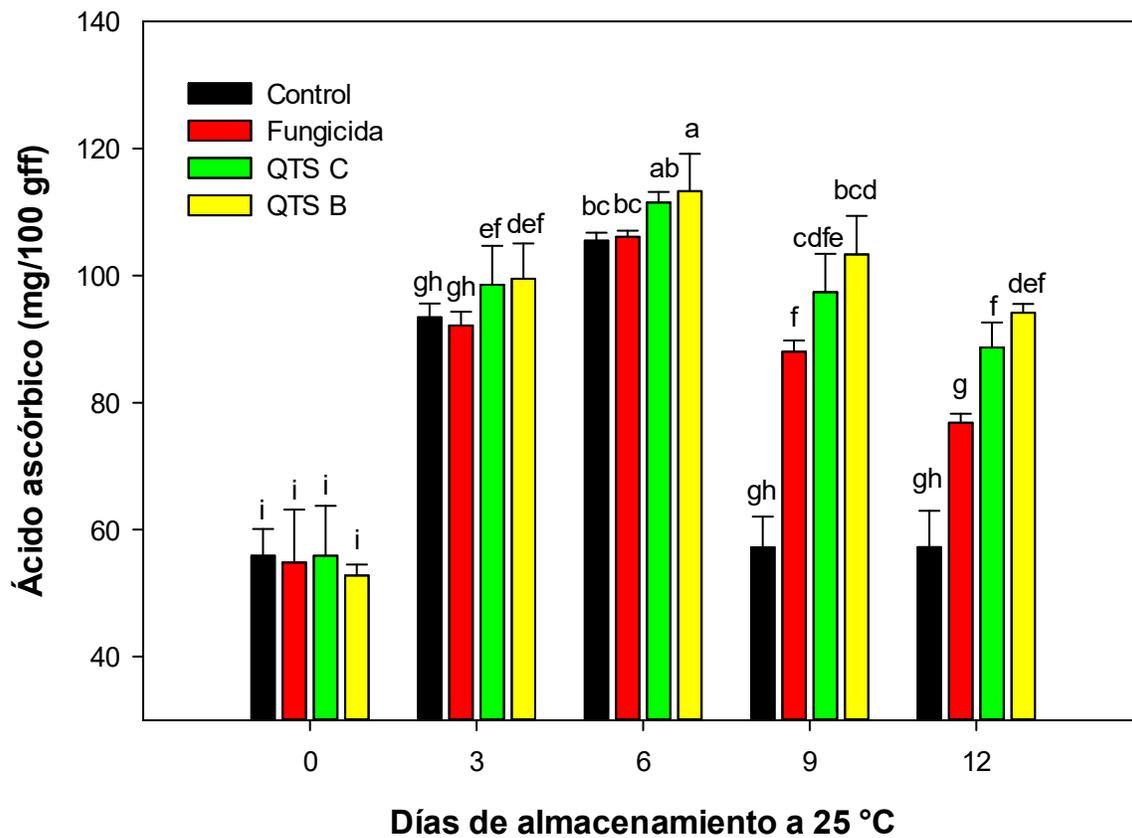


Figura 20. Contenido de ácido ascórbico en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). LSD= 7.89.

En relación a los compuestos fenólicos totales, la aplicación de quitosano aumentó significativamente el contenido de estos durante el periodo de almacenamiento, en comparación con el control y fungicida; no obstante, QTS B fue mayor que QTS C (**Figura 21**). Las reacciones de oxidación suelen reducir los fenoles cuando se almacenan las frutas (Ali y col 2020). Los frutos tratados con QTS B redujeron la pérdida de fenólicos lo cual puede deberse a una disminución en la respiración y transpiración del fruto. Se sabe que una de las ROS más conocidas y responsables del daño oxidativo en las frutas es el H_2O_2 , que se forma debido a las condiciones de almacenamiento poscosecha, para contrarrestar este efecto, los frutos de papaya tratados con QTS B aumentaron la actividad de CAT, lo que puede considerarse beneficioso para reducir la generación de H_2O_2 . Cuando la fruta de mandarina se almacenó a 25 °C durante 21 días tratadas con QTS-300 kDa, el contenido de fenoles totales incrementó en comparación con los frutos control (Juric y col 2023). Badawy y Rebea (2009) señalaron un incremento de fenólicos totales cuando la fruta de tomate se almacenó a 25 °C durante 21 días tratada con quitosano independientemente del PM (5, 37, 57 y 209 kDa) en comparación con el control. Al igual que esta investigación, el peso molecular más bajo indujo el aumento más pequeño en el total de fenólicos totales.

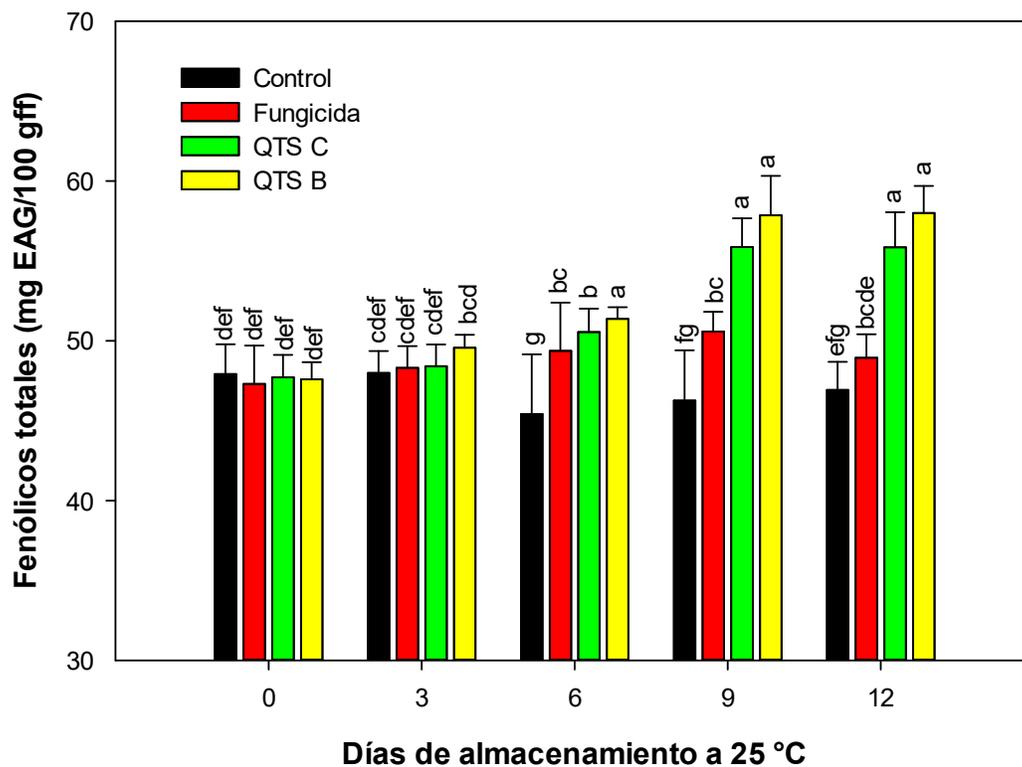


Figura 21. Contenido de fenólicos totales en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). LSD=6.34.

6. Capacidad antioxidante

a. Método ABTS y DPPH

En los primeros 3 días de almacenamiento no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el método ABTS. No obstante, en el resto del almacenamiento los frutos de papaya tratados con QTS B presentaron una capacidad antioxidante significativamente mayor que los frutos control, QTS C y fungicida, observándose los menores valores en los frutos control (**Figura 22**). Entre los dos tratamientos a base de QTS, los del tratamiento biotecnológico incrementó la actividad de eliminación de radicales ABTS con un valor máximo de 594 $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ gff}$ durante el tiempo de almacenamiento. En general, se observó un incremento en los valores de capacidad antioxidante de todos los tratamientos en los primeros días, seguido de una disminución, registrándose una drástica disminución al pasar del día 9 al día 12. Por otro lado, se presentó un incremento en la capacidad antioxidante medida por DPPH en los primeros 6 días de almacenamiento, mostrándose nuevamente que las papayas recubiertas con QTS B presentaron los valores más altos (395 $\mu\text{mol/ET} 100 \text{ gff}$). A partir de la mitad del tiempo de almacenamiento, la capacidad antioxidante por DPPH disminuyó y los valores menores fueron de 348 y 357 $\mu\text{mol/ET} 100 \text{ gff}$ que corresponden a los tratamientos control y fungicida, respectivamente (**Figura 23**). Resultados similares fueron reportados por Petriccione y col (2018) y Petriccione y col (2015) ya que encontraron una mayor capacidad antioxidante por DPPH en frutos de níspero y fresa después de la adición del recubrimiento de QTS (360 kDa).

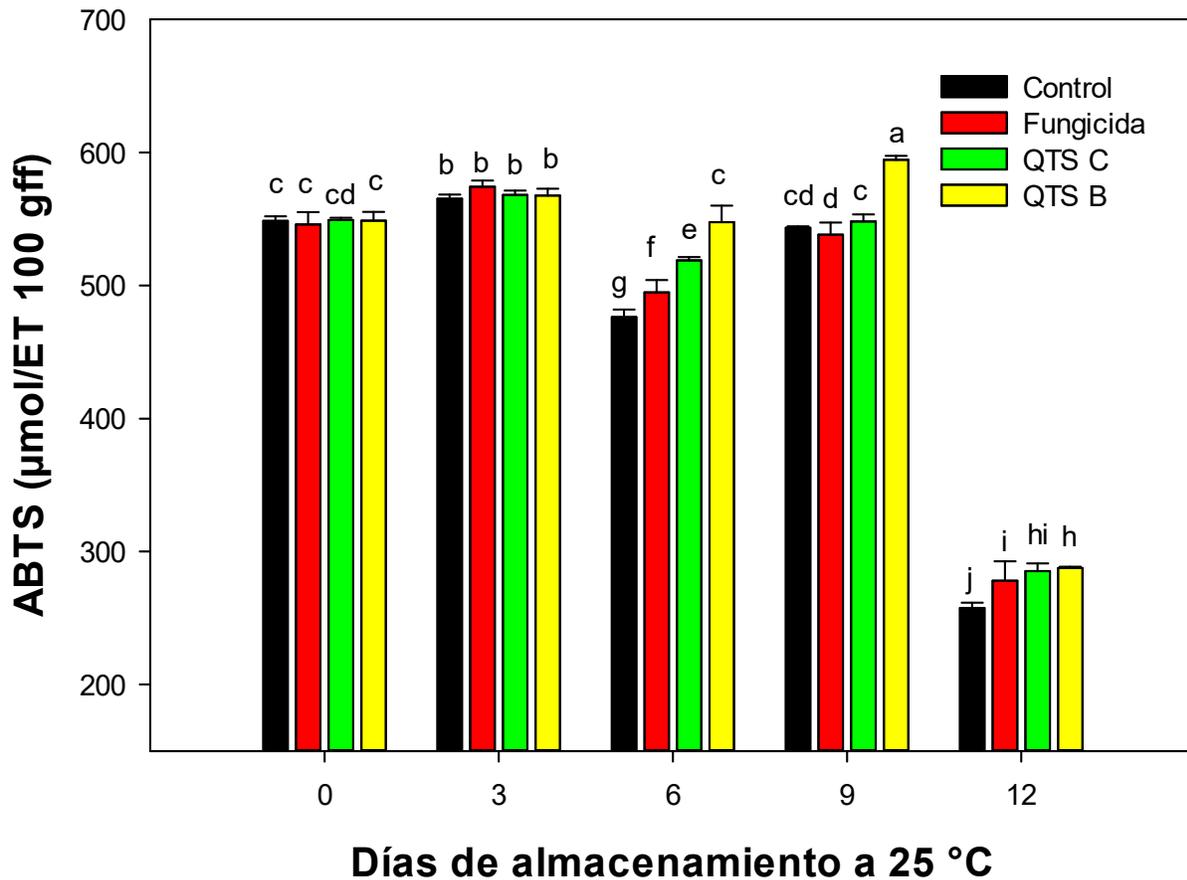


Figura 22. Capacidad antioxidante medida por el método de ABTS en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). LSD=9.23

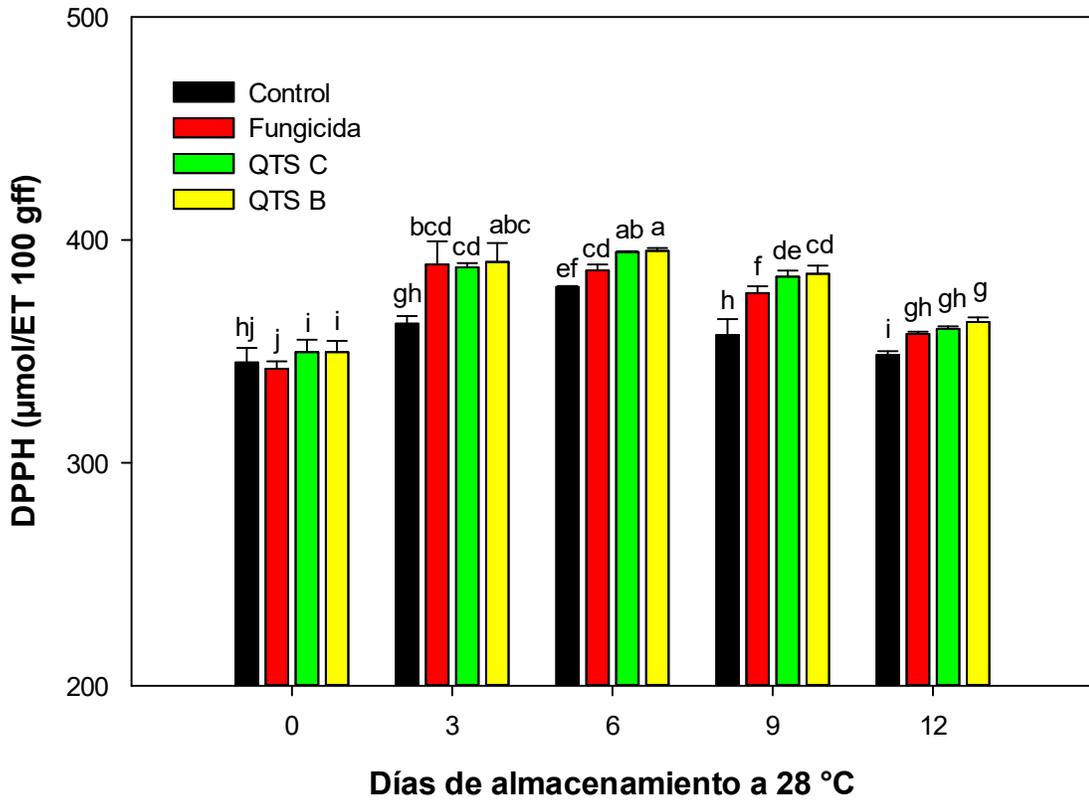


Figura 23. Capacidad antioxidante medida por el método de DPPH en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados con fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). LSD=6.78

Además, los autores registraron que la capacidad antioxidante aumentó dentro de los primeros seis días para luego disminuir estando influenciado este cambio por la actividad de los compuestos bioactivos como ácido ascórbico, fenólicos y flavonoides (Ai y col 2012; Mou y col 2023). En este sentido, los resultados de este estudio mostraron que las frutas tratadas con QTS B tenían altos niveles de sustancias fenólicas y de ácido ascórbico, lo que resultó en una alta actividad antioxidante. Además, el QTS B mejoró la actividad de algunas enzimas antioxidantes (CAT y POD), previniendo el oscurecimiento de la pulpa y reduciendo el daño de la membrana. Se ha reportado que el quitosano activa la enzima clave en la ruta de síntesis de los fenoles, como es la fenilalanina amonioliasa, que aumenta los polifenoles totales e influye en la capacidad antioxidante de los frutos por su alto potencial antioxidante (Petriccione y col 2015; Romanazzi y col 2017).

7. Actividad enzimática antioxidante

a. Catalasa (CAT) y peroxidasa (POD)

Algunas enzimas son responsables de gran parte del sistema antioxidante de los frutos. Estas enzimas antioxidantes son catalizadores que participan en la eliminación de los radicales libres y también interrumpen las reacciones en cadena de oxidación para minimizar el daño causado por los radicales libres, CAT y POD son las enzimas antioxidantes más comunes que se encuentran en casi todos los organismos vivos (Konda y Kolla 2023).

Al inicio del almacenamiento no se mostraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas entre tratamientos; sin embargo, para el día 3 los frutos tratados con QTS B mostraron mayor actividad de las enzimas con respecto al resto de

los tratamientos, los cuales a su vez no fueron diferentes entre ellos. Pero para el día 6 los frutos tratados con QTS B ya mostraban valores estadísticamente mayores que el control y los tratados con fungicida químico (tiabendazol). Este comportamiento, en el cual el QTS B fue mayor seguido por el QTS C, fungicida y control, se mantuvo durante el resto del almacenamiento (**Figura 24**). Por otra parte, la actividad de POD aumentó conforme avanzó el tiempo de almacenamiento iniciando en valores entre 0.18 y 0.29 y terminando con una actividad entre 0.33 y 0.87 U/mg de proteína (**Figura 25**). Entre tratamientos, el que presentó mayor actividad fue el QTS B presentando diferencias con el resto de los tratamientos; por su parte, el QTS C mostró una actividad mayor en comparación al control y fungicida. A pesar de que se presentó un incremento en todos los tratamientos durante los días de almacenamiento, en el día 3 el tratamiento control presentó un descenso en la actividad de POD y esto fue inversamente proporcional a la actividad de CAT, lo cual puede ser debido a que ambas enzimas utilizan el mismo sustrato, es decir, peróxido de hidrógeno, por lo tanto, la actividad de una enzima puede influir en la actividad de la otra, normalmente, cuando hay un aumento de la actividad de POD, se puede observar una disminución de la actividad de CAT, lo cual en esta investigación se pudo observar (Konda y Kolla 2023). Estas enzimas, POD y CAT, han estado involucradas en mecanismos contra la descomposición fúngica, ayudan a la eliminación de proteínas carbonadas causadas por la infección patogénica (Meng y col 2010). Por lo tanto, el hecho de que se aumentó la actividad de enzimas antioxidantes, POD y CAT en papaya inducidas por QTS B podría ser benéfico para la fruta contra la infección por *C. gloeosporioides*.

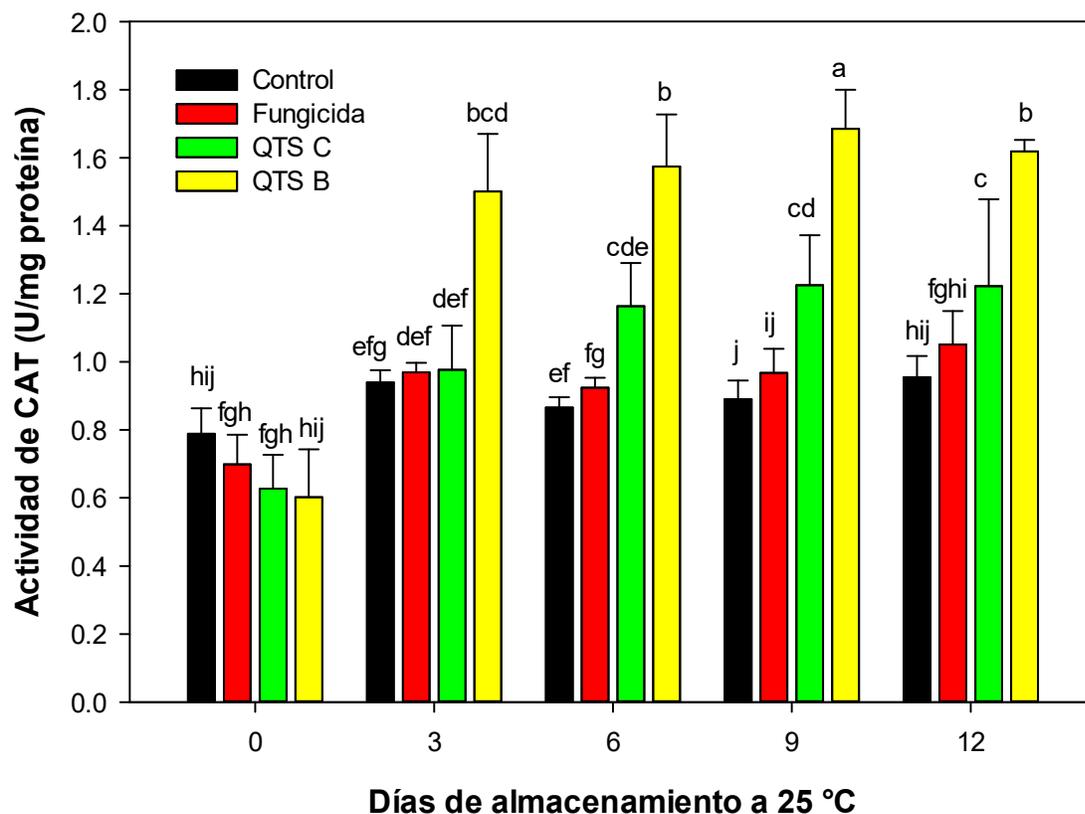


Figura 24. Actividad antioxidante de Catalasa (CAT) en papaya inoculada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C por 12 días. Los frutos no recibieron tratamiento (control) o fueron tratados fungicida químico, quitosano comercial (QTS C) y quitosano biotecnológico optimizado (QTS B). Las barras verticales en las columnas representan la desviación estándar de las medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y días de almacenamiento ($p < 0.05$). LSD=8.23

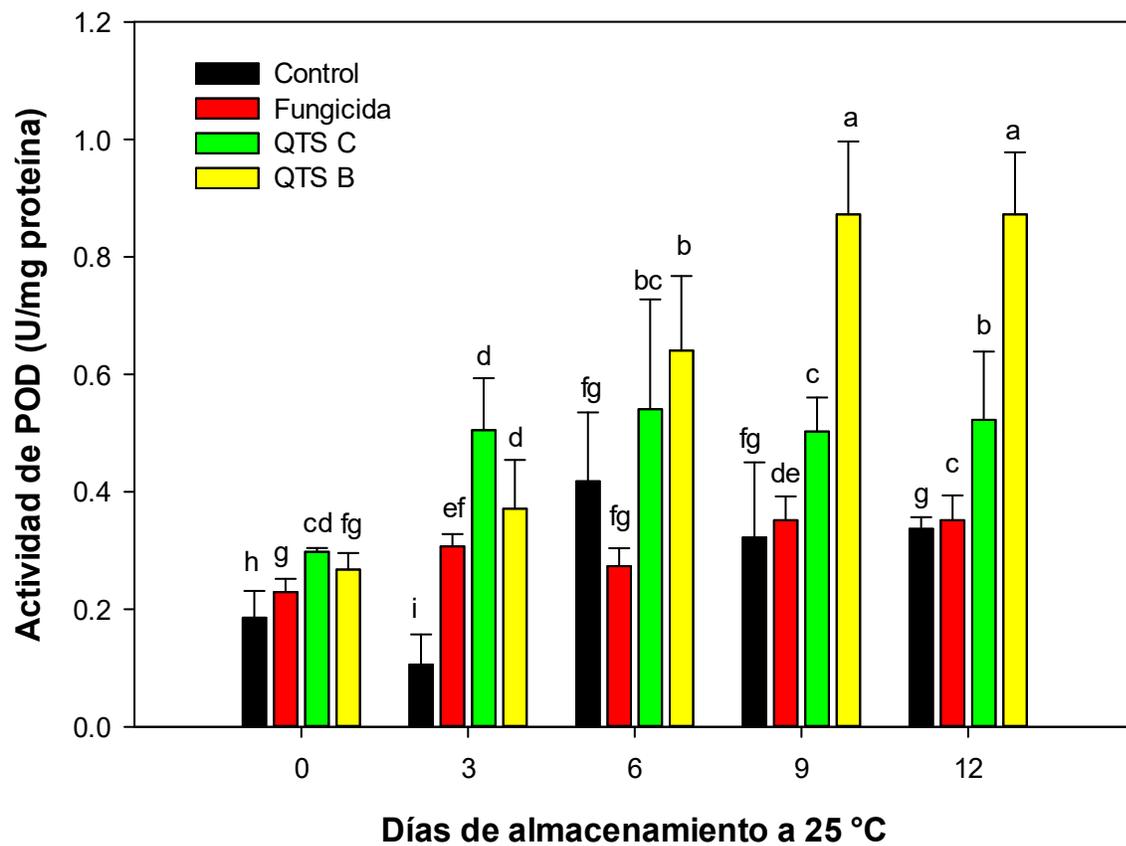


Figura 25. Efecto del quitosano comercial (QTS C), quitosano biotecnológico optimizado (QTS B), fungicida químico (tiabendazol) sobre la actividad de Peroxidasa (POD) en frutos de papaya infectada con *Colletotrichum gloeosporioides* almacenada a 25 °C durante 12 días. Los datos representan la media de seis réplicas y las barras verticales indican la menor diferencia significativa ($p < 0.05$). (LSD=5.34).

En los frutos de papaya tratados con quitosano, la actividad antioxidante de CAT y POD aumentaron debido las diversas propiedades que posee el quitosano. La capacidad del quitosano para actuar como bioestimulante y elicitador exógeno a través de las vías de señalización del óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno fue una propiedad muy importante que ayudó a los frutos a activar su sistema de defensa y proteger al fruto del ataque de *C. gloeosporioides*, además ayudó a mantener la calidad poscosecha y la vida útil de los frutos de papaya, debido a la eliminación el sistema ROS durante el almacenamiento en condiciones de estrés.

Estos resultados son consistentes con los estudios previos en frutos de guayaba, cereza y fresa tratados con quitosano (82-360 kDa) donde la actividad de CAT fue mayor cuando el PM fue en aumento. Por lo tanto, el tratamiento con quitosano y el PM de este juegan un papel importante en la resistencia a la oxidación, mejorando la actividad de CAT (Dang y col 2010; Yang y col 2016; Petriccione y col 2015; Petriccione y col 2018). La actividad de POD en los frutos de pera aumentó y luego disminuyó a partir de las 24 h. Sin embargo, en comparación con el oligoquitosano (6 kDa), la inoculación de QTS C (300 kDa) mejoró la actividad de POD significativamente (Meng y col 2010).

X. CONCLUSIONES

Al comparar quitosano comercial (QTS C) de diferentes PM, el tratamiento QTS C-55 kDa fue efectivo para inhibir el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum gloeosporioides*, fue el más efectivo para el control poscosecha (pérdida de peso, firmeza, color externo y SST) y presentó un efecto positivo en el sistema antioxidante no enzimático (ácido ascórbico, fenólicos totales, ABTS y DPPH). Por estos resultados, QTS C-55 kDa fue elegido para ser comparado con el quitosano biotecnológico optimizado (QTS B).

La mejor combinación de las variables de proceso de desacetilación enzimática, volumen de inóculo y concentración de nutrientes, fue 50 mL/L y 50 g/L, respectivamente.

El QTS B obtenido en las mejores condiciones de procesamiento de DE tuvo un grado de desacetilación alto del 89%. Los valores experimentales indican que el QTS B obtenido en las mejores condiciones de procesamiento resultó ser de buena calidad y similar a los quitosanos reportados en la literatura, así como, al QTS C-55 kDa

La aplicación del proceso biotecnológico de fermentación ácido-láctica y desacetilación enzimática (FAL/DE) permitió obtener un QTS B de mayor peso molecular en comparación con el QTS C-55 kDa obtenido con el proceso químico convencional.

El tratamiento con QTS B fue más efectivo que el QTS C-55 kDa y el fungicida químico TZB para inhibir el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum gloeosporioides*, fue el más efectivo para el control poscosecha (pérdida de peso,

firmeza, color externo y SST) y presentó un efecto positivo en el sistema antioxidante no enzimático (ácido ascórbico, fenólicos totales, ABTS y DPPH) y enzimático (POD y CAT) durante el almacenamiento de papaya a 25 °C por 12 días.

En general, los resultados de este estudio indicaron que, la obtención de QTS B con un alto peso molecular por FAL/DE, con el uso del inóculo enzimático de quitina desacetilasa, para tratar frutos de papaya por inmersión es una estrategia integrada útil para controlar la antracnosis, retrasar el proceso de maduración, mejorar la calidad y la vida de anaquel de los frutos, así como, estimular el sistema antioxidante endógeno y exógeno de los frutos de papaya. El tratamiento poscosecha de frutos con QTS B, contra los efectos negativos del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, representa un método ambientalmente seguro por lo que se considera una mejor opción que el uso de fungicidas que impactan negativamente a los ecosistemas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Mohsen AM, Jancar J, Massoud D, Fohlerova Z, Elhadidy H. 2016. Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 510:86-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.003>
- Adeboyejo FO, Oyesanya OB. 2023. Ultrasound and autoclave-deacetylated *Achatina fulica* shell chitosan: Characterisation and effect on tomato and cucumber fruit qualities during storage. *Food Chemistry* 415:135750. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135750>
- Adekanmi AA, Adekanmi SA, Adekanmi OS. 2020. Different processing sequential protocols for extraction, quantification and characterization of chitosan from cray fish. *International Journal of Engineering and Information Systems (IJEAIS)*. 4:47-61. https://www.researchgate.net/publication/347646699_Different_Processing_Sequential_Protocols_for_Extraction_Quantification_and_Characterization_of_Chitosan_from_Cray_Fish
- Ai H, Wang F, Xia Y, Chen X, Lei C. 2012. Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. *Food Chemistry* 132:493-498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.033>
- Al Eryani-Raqeeb A, Mahmud TMM, Syed Omar SR, Mohamed Zaki AR, Al Eryani AR. 2009. Effects of calcium and chitosan treatments on controlling

- anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.).
International Journal of Agricultural Research 4:53-68.
<https://doi.org/10.3923/ijar.2009.5>
- Alam MS, Kaur B, Gupta K, Kumar S. 2013. Studies on refrigerated storage of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). Agricultural Engineering International: CIGR Journal [serie en línea]. 15: 275-80. Disponible de CIGR [http://www. <https://cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/view/2611>]. Publicado el 27 de noviembre de 2013.
- Ali A, Wee Pheng T, Mustafa MA. 2015. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of 'Sekaki' papaya. Journal of Applied Microbiology, 118:1456-1464. <https://doi.org/10.1111/jam.12782>
- Ali SW, Rajendran S, Mangala Joshi M. 2011. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. Carbohydrate Polymers 83:438-446.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.004>
- Aljawish A, Chevalot I, Jasniewski J, Scher J, Muniglia L. 2015. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 112:25–39.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.014>
- Aljawish A, Chevalot I, Piffaut B, Rondeau-Mouro C, Girardin M, Jasniewski J, Scher J, Muniglia L. 2012. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction

conditions. Carbohydrate Polymers, 4:537-544.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016>

Almora K, Pino JA, Hernández M, Duarte C, González J, Roncal E. 2004. Evaluation of volatiles from ripening papaya (*Carica papaya* L., var. Maradol roja). Food Chemistry, 86:127-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.039>

Álvarez-De la Hoz A, Castro-Mora R, Izaguirre-Guarisma C, Morillo-Piña O, García-Lugo P. 2011. Degradación y desacetilación de quitina coloidal por acción de una quitinasa bacteriana y una desacetilasa de quitina fúngica. Revista Iberoamericana de Polímeros 12:300-307. <https://reviberpol.files.wordpress.com/2020/04/2011-alvarez.pdf>

Anand M; Kalaivani R; Maruthupandy M; Kumaraguru AK; Suresh S. 2014. Extraction and characterization of chitosan from marine crab and *Squilla* Collected from the gulf of mannar region South India. Journal of Chitin and Chitosan 2 280-287. <https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1053>

AOAC. 2012. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, Virginia, 416.

Árabe Rimá-de Oliveira K, Ramos-Berger LR, Amorim-de Araújo S, Saraiva-Camara MP, Leite-de 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>

- Arakane Y, Taira T, Ohnuma T, Fukamizo T. 2012. Chitin-related enzymes in agrobiosciences. *Current Drug Targets*, 13:442-470. <https://doi.org/10.2174/138945012799499721>
- Arnold ND, Brück WM, Garbe D, Brück TB. 2020. Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. *Marine drugs* 18:87-93. <https://doi.org/10.3390/md18020093>
- Auyong ASM, Ford R, Taylor PWJ. 2012. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. *Journal of Basic Microbiology* 52:372–382. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100250>
- Aye KN, Karuppuswamy R, Ahamed T, Stevens WF. 2006. Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresource Technology* 97:577-582. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.030>
- Ayón-Reyna LE, Delgado-Vargas F, Soltero-Sánchez CA, López-Angulo G, López-López ME, López-Velázquez JG, Parra-Unda JR, Vega-García MO. 2018. Bioactive compounds and antioxidant activity of papaya inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* as affected by hot water-calcium chloride. *Journal of Food Biochemistry*, e12608. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12608>
- Ayón-Reyna LE, Tamayo-Limón R, Cárdenas-Torres FI, López-López ME, López-Angulo G, López-Moreno HS, López-Cervántes J, López-Valenzuela JA, Vega-García MO. 2015. Effectiveness of hydrothermal-calcium chloride treatment and chitosan on quality retention and microbial growth during storage of fresh-

cut papaya. Journal of Food Science, 80:594-601.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12783>

Ayón-Reyna LE, Uriarte Gastelum YG, Camacho-Díaz BH, Tapia Maruri D, López ME, López-Velázquez JG, Vega-García MO. 2022. Antifungal activity of a chitosan and mint essential oil coating on the development of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya using macroscopic and microscopic analysis. Food and Bioprocess Technology, 15:1-11. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02764-w>

Badawy MEI, Rabea EI. 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. Postharvest biology and technology 51:110-117.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.05.018>

Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología, 22:178-186. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222204>

Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E., Wilson CL. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection, 22:1087-1092.
[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)

Bill M, Sivakumar D, Korsten L, Thompson KA. 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components

- in avocado (*Persea Americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64: 159-167.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>
- Blair DE, Hekmat O, Schuttelkopf AW, Shresta B, Tokuyasu K, Witters SG, Aalten D. 2006. Structure and Mechanism of Chitin Deacetylase from the Fungal Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 45:9416-9426.
<https://doi.org/10.1021/bi0606694>
- Blanco, A., García-Abuín, A., Gómez-Díaz, D., Navaza, J.M. (2013). Physicochemical characterization of chitosan derivatives. *Ciencia y Tecnología Alimentaria. Journal of Food*, 11(2), 190-197.
- Bof MJ, Bordagaray VC, Locaso DE, García MA. 2015. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloids* 51:281-294.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.018>
- Bonilla J, Fortunati E, Atarés L, Chiralt A, Kenny JM. 2014. Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids* 35 463-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.002>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28:25-30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cabanillas-Bojórquez LA, Montes-Ávila J, Vega-García M, López-Moreno HS, Castillo-López RI, Gutiérrez-Dorado R. 2023. Effect of optimized chitosan coating obtained by lactic fermentation chemical treatment of shrimp waste on

- the post-harvest behavior of fresh-cut papaya (*Carica papaya* L.).
Fermentation 9, 220. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030220>
- Cabanillas-Bojórquez LA. 2016. Efecto de cubiertas de Quitosano obtenido en condiciones óptimas de fermentación láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de papaya (*Carica papaya* L.) procesada mínimamente. [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Sinaloa. Disponible de: Facultad de Ciencias Químico Biológicas
- Calderón-Castro A, Vega-García MO, Zazueta-Morales JJ, Fitch-Vargas PR, Carrillo-López A, Gutiérrez-Dorado R, Limón-Valenzuela V, Aguilar-Palazuelos E. 2018. Effect of extrusion process on the functional properties of high amylose corn starch edible films and its application in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. Journal of Food Science and Technology volume 55:905-914. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2997-6>
- Cao W, Wang A, Jing D, Gong Y, Zhao N, Zhang X. 2005. Novel biodegradable films and scaffolds of chitosan blended with poly(3-hydroxybutyrate). Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 16:1379-1394. <https://doi.org/10.1163/156856205774472308>
- Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D, Gutiérrez-Alonso JG. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* penz. Revista Mexicana de Fitopatología [en línea]. 20:316-325. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61247022008>

- Cazón P, Vázquez M. 2020. Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. *Environmental Chemistry Letters* 18: 257-267.
- Chen RH, Lin JH, Yang MH. 1994. Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. *Carbohydrate Polymers* 24:41-46. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90115-5)
- Chien PJ, Chou CC. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1964-1969. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2570>
- Chien RC, Yen MT, Mau JL. 2016. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shell. *Carbohydrate Polymers* 138:259-264. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.061>
- Chiumarelli M, Hubinger MD. 2014. Evaluation of edible films and coating formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocolloids* 28:20-27. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.013>
- Cira L, Huerta S, Hall G, Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37:1359-1366. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00008-0)

- Colina M, Ayala A, Rincón D, Molina J, Medina J, Inciarte R, Vargas J, Montilla B. 2014. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. Revista Iberoamericana de Polimeros 15:21-43. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/281290687>
- Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Valle-Marquina MÁ, Hernández-López M. 2017. The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Grow thin vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. Journal of Phytopathology 165:297-305. <https://doi.org/10.1111/jph.12562>
- Cunha, A.G., & Gandini, A. (2010) Turning Polysaccharides into Hydrophobic Materials: A Critical Review. Part 2. Hemicelluloses, Chitin/Chitosan, Starch, Pectin and Alginates. Cellulose, 17, 1045-1065. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9435-5>
- Dai-Hung N, Se-Kwon K. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. Advances in Food and Nutrition Research 73:15-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>
- Dang QF, Yan JQ, Li Y, Cheng XJ, Liu CS, Chen XG. 2010. Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the storing of *Prunus avium* L. Journal of Food Science 75:125-131. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01483.x>
- de Alvarenga ES. 2011. Characterization and properties of chitosan. Biotechnology of biopolymers 91:92-108. Disponible en:

https://cdn.intechopen.com/pdfs/16199/InTech-Characterization_and_properties_of_chitosan.pdf

de la Paz N, Fernández M, López OD, Nogueira A, García CM, Pérez D, Tobella JL, de Oca YM, Díaz D. 2012. Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. Revista Iberoamericana de Polímeros 13:3-9. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7896914>

de Oliveira JG, Vitória AP. 2011. Papaya: Nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An overview. Food Research International 44:06-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.035>

Dharmarathna SLC, Wickramasinghe S, Waduge RN, Jayanthe-Rajapakse RPV, Mudiyansele-Kularatne SA. 2013. Does Carica papaya leaf-extract increase the platelet count? An experimental study in a murine model. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3:20-24. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60145-8](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60145-8)

Díaz-Sánchez LM. (2007). Nuevo método para la obtención de quitina. Ciencia y Tecnología: Revista de la Universidad de Costa Rica 25:35-41. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/cienciaytecnologia/article/view/2214/2175>

Dotto GL, Vieira MLG, Pinto LAA. 2015. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room

temperature. Food Science and Technology 64:126-130.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.042>

Drevinskas T, Naujokaitytė G, Maruška A, Kaya M, Sargin I, Daubaras R, Česonienė L. 2017. Effect of molecular weight of chitosan on the shelf life and other quality parameters of three different cultivars of *Actinidia kolomikta* (kiwifruit).

Carbohydrate Polymers 173:269-275.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.002>

Dürüst N, Sümengen D, Dürüst Y. 1997. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:2085-

2087. <https://doi.org/10.1021/jf9606159>

Escárcega-Galaz AA, Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Sanches-Silva A, Madera-Santana TJ, Paseiro-Losada P. 2018. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings.

International Journal of Biological Macromolecules 116:472-481.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149>

FAOSTAT. 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponible de: <http://faostat.fao.org>. Consultado el 14 de marzo del 2023.

Fernández-Valdés D, Bautista-Baños S, Fernández-Valdés D, Ocampo-Ramírez A, García-Pereira A, Falcón-Rodríguez A. 2015. Películas y recubrimientos

- comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 24:52-57.
<http://ref.scielo.org/bmg5rr>
- Franco M. 2010. Extracción de Astaxantina a Partir de Residuos de Camarón Ensilados por Métodos Ácido y Bacteriano. [Tesis de Doctorado] Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa (Iztapalapa, México).
- Gao X, Katumoto T, Onodera K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *Journal of Biochemistry* 117:257-263.
<https://doi.org/10.1093/jb/117.2.257>
- García-Zapata T, Roca-Ortega J. 2008. Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en unguento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial* 11:24-32. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81619829004>
- Gayosso-García L, Yahia E, González-Aguilar G. 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol). Fruit determined by HPLC-DAD-MS-ESI. *Food Research International* 44:1284-1291.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.001>
- Gocho H, Shimizu H, Tanioka A, Chou TJ, Nakajima T. 2000. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. *Carbohydrate Polymers* 41:87-90. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00113-7)
- Gomes ACA, da Costa Lima M, de Oliveira KÁR, dos Santos Lima M, Magnani M, Câmara MPS, de Souza EL. 2020. Coatings with chitosan and phenolic-rich

extract from acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) or jaboticaba (*Plinia jaborcaba* (Vell.) Berg) processing by-product to control rot caused by *Lasiodiplodia* spp. in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. International Journal of Food Microbiology 331:108694.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108694>

Gomes-Moraes SR, Asama Tanaka FA, Massola Júnior NS. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). Comunicação Científica Revista Brasileira de Fruticultura 35:57-64.
<https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000200039>

González-Aguilar GA, Celis J, Sotelo-Mundo RR, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, Álvarez-Parrilla E. 2008. Physiological and biochemical changes of different fresh-cut mango cultivars stored at 5 °C. International Journal of Food Science and Technology 43:91-101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01394.x>

Gortari MC, Hours RA. 2013. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. Electronic Journal of Biotechnology, 16:14-14. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-texto-completo-10>

Guerra-Sánchez MG, Vega-Pérez J, Velázquez-del Valle MG, Hernández-Lauzardo AN. 2008. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. Pesticide Biochemistry and Physiology 93:18-22.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.09.001>

- Hajji S, Younes I, Affes S, Boufi S, Nasri M. 2018. Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocolloids* 83: 375-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.013>
- Hefft DI. 2017. Effects of Chitosan-Coated Paperboard Trays on the *Botrytis cinerea* Formation and Sensory Quality of Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Redcurrants (*Ribes rubrum* L.). *International Journal of Fruit Science* 18:300–306. <https://doi.org/10.1080/15538362.2017.1411863>
- Heidary M, Riehaneh A, Akram Z, Keikhosro K. 2013. Ethanol and chitosan production from wheat hydrolysate by *Mucor hiemalis*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 88: 345-351. <https://doi.org/10.1002/jctb.3822>
- Hernández-Cocoletzi H, Águila-Almanza E, Flores-Agustin O, Viveros-Nava O, Ramos-Cassellis E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22:57-60. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/sv/v22n3/v22n3a12.pdf>
- Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Guerra-Sánchez MG. 2011. Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *African Journal of Microbiology Research* 5:4243-4247. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.104>
- Hewajulige I, Dhekney S. 2016. Papayas. *Encyclopedia Food and Health*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00517-1>.

- Hossain M, Iqbal A. 2014. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 12:153–160. <https://www.banglajol.info/index.php/JBAU/article/view/21405>
- Hua C, Li Y, Wang X, Kai K, Su M, Shi W, Zhang D, Liu Y. 2019. The effect of low and high molecular weight chitosan on the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on kiwifruit and host response. *Scientia Horticulturae* 246:700-709. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.038>
- Ibrahim F. 2007. Partial purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* [Tesis de Maestría]. Food Science & Agricultural Chemistry Department Macdonald Campus, McGill University Ste Anne de Bellevue. Disponible de: <https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/rb68xd85m>
- Iniestra-González JJ, Lino-López GJ, Paull RE, Barba de la Rosa AP, Mancilla-Margalli NA, Sañudo-Barajas JA, Ibarra-Junquera V, Chen NJ, Hernández-Velasco MA, Osuna-Castro JA. 2013. Papaya endoxylanase biochemical characterization and isoforms expressed during fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* 81:13-22. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.001>
- Jhon A, Yang J, Liu J, Jiang Y, Yang B. 2018. The structure changes of water-soluble polysaccharides in papaya during ripening. *Biological Macromolecules* 115:152-156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.059>
- Jiang WB, Sheng Q, Jiang YM, Zhou XJ. 2004. Effects of 1-methylcyclopropene and gibberellic acid on ripening of Chinese jujube (*Zizyphus jujube* M.) in relation to

- quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:31-35.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.1594>
- Jiang Y, Yin H, Zhou X, Wang D, Zhong Y, Xia Q, Deng Y, Zhao Y. 2021. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application. *Food Chemistry* 361:130111.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130111>
- Jongsri P, Wangsomboondee T, Rojsitthisak P, Seraypheap K. 2016. Effect of molecular weights of chitosan coating on postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruit. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 73: 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.038>
- Juan-Mariano M. 2009. Análisis de la rentabilidad de la papaya Maradol (*Carica papaya*) en el estado de Campeche con la tecnología BMF. [Tesis de Licenciatura] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencias Socioeconómicas, Departamento de Economía Agrícola, Coahuila, México. Disponible de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080>
- Juárez J. 2010. Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón. [Tesis de Licenciatura] Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa (Iztapalapa, México). Disponible de: Repositorio CIATEJ, Item 1023/545.
- Jung J, Zhao Y. 2012. Comparison in antioxidant action between α -chitosan and β -chitosan at a wide range of molecular weight and chitosan concentration.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.020>

Jurić S, Sigurnjak BM, Vlahoviček-Kahlina K, Sopko SK, Fruk G, Jalšenjak N, Maslov BL. 2023. Chitosan-based layer-by-layer edible coatings application for the preservation of mandarin fruit bioactive compounds and organic acids. *Food Chemistry* 17:10057. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100575>

Kalam-Azad MA, Golam-Babbani M, Anim L, Marzuki-Sidik. 2013. Development of transgenic papaya through *Agrobacterium*-mediated transformation. *International Journal of Genomics*, 2013:1-5. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/235487>

Kewsuwana P, Rujitanapanichb S, Bhasabutrac T, Puripunyananicha V, Busamongkola A, Injareana U, Pichetpong P. 2014. Irradiated Oligochitosan Against *Colletotrichum Gloeosporioides* in Chili. *Energy Procedia* 56:274-279. <http://dio.org/10.1016/j.egypro.2014.07.158>

Kittur FS, Kumar KR, Tharanathan RN. 1998. Functional packaging properties of chitosan films. *Zeitschrift fur LebensmittelUntersuchung und Forschung A* 44: 206-208. <https://doi.org/10.1007/s002170050211>

Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Themaat EVLV, Does CVD. 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Plos Pathogens* v.8:1-15. <http://dio.org/10.1371/annotation/0f398a0c-dfda-4277-b172-4ff9cb31aec3>

- Knidri, H, EL., Dahmani, J., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2019). Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 1092-1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.079>.
- Krolicka M, Hinz SWA, Koetsier MJ, Joosten R, Eggink G, van den Broek LAM, Boeriu CG. 2018. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:1658–1669. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04032>
- Kulikov SN, Khairullin RZ Varlamov VP. 2015. Influence of polycations on antibacterial activity of lysostaphin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:683-687. <https://dspace.kpfu.ru/xmlui/handle/net/135821>
- Kumari S, Annamareddy SHK, Abanti S, Rath PK. 2017. Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *International Journal of Biological Macromolecules* 104:1697-1705. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.119>
- Lárez-Velásquez C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química* 1:15-21. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26498713_Quitina_y_quitosano_materiales_del_pasado_para_el_presente_y_el_futuro
- Li H, Wang Y, Liu F, Yang Y, Wu Z, Cai H, Zhang Q, Wang Y, Li P. 2015. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the

possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae* 186:77-83.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.014>

Lima-Oliveira PD, Árabe-Rimá de Oliveira K, dos Santos-Viera WA, Saraiva-Camara MP, Leite-de Souza E. 2018. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 266:87-94.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.018>

Limon TAB, Monribot-Villanueva JL, Guerrero-Analco JA, Altúzar-Molina A, Carrión G, Goycoolea FM, Moerschbacher BM, Aluja M. 2021. Chitosan coatings reduce fruit fly (*Anastrepha obliqua*) infestation and development of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* in Manila mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101:2756-2766. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10903>

Lin Y, Li N, Lin H, Lin M, Chen Y, Wang H, Ritenour MA, Lin Y. 2020. Effects of chitosan treatment on the storability and quality properties of longan fruit during storage. *Food Chemistry* 306:125627.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125627>

Liu F, Li Y, Hao S, Cheng Y, Zhan Y, Zhang C, Meng Y, Xie Q, Xia H. 2020. Well-aligned MXene/chitosan films with humidity response for high-performance electromagnetic interference shielding. *Carbohydrate Polymers* 243:116467.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116467>

Lopes C, Antelo LT, Franco-Uría A, Alonso AA, Pérez-Martín R. 2018. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical

- and enzymatic processes. *Journal of Cleaner Production* 172:4140-4151
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.082>
- López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Ahumada-Santos YP, Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. species from Mexico. *Arabian Journal of Chemistry* 12:1964-1973.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.050>
- López-Mora LI, Gutiérrez-Martínez P, Bautista-Baños S, Jiménez-García LF, Zavaleta-Mancera HI. 2013. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy atkins' durante el almacenamiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19:315–331.
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.07.038>
- Loureiro A, Nicole MR, Varzea V, Moncada P, Bertrand B, Silva MC. 2012. Coffee resistance to *Colletotrichum kahawae* is associated with lignification, accumulation of phenols and cell death at infection sites. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 77:23-32.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.11.002>
- Ma Z, Yang L, Yan H, Kennedy JF, Meng X. 2013. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydrate Polymers* 94: 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.012>
- Madani B, Mirshekari A, Yahia E. 2016. Effect of calcium chloride treatments on calcium content, anthracnose severity and antioxidant activity in papaya fruit

- during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:63-68. <https://doi:10.1002/jsfa.7462>
- Madani B, Muda Mohamed MT, Biggs AR, Kadir J, Awang Y, Tayebimeigooni A, Shojaei TR. 2014. Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya. *Crop Protection*, 55:55-60. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.009>
- Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler C, Gutiérrez E. 2011. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU* 1:53-68. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revision_de_sus_aplicaciones
- Marpudi SL, Abirami LSS, Pushkala R, Srividya N. 2011. Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using Aloe vera based antimicrobial coating. *Indian Journal of Biotechnology* 10:83-89. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279568905_Enhancement_of_storage_life_and_quality_maintenance_of_papaya_fruits_using_Aloe_vera_based_antimicrobial_coating
- Mellidou I, Keulemans J, Kanellis AK, Davey MW. 2012. Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biology* 12:239. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-239>
- Meng D, Garba B, Ren Y, Yao M, Xia X, Li M, Wang Y. 2020. Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.213>

- Meng X, Yang L, Kennedy JF, Tian S. 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81:70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.04.012>
- Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Jakopic J, Cunja V, Veberic R, Munda A, Stampar F. 2013. Phenolic compounds as defense response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84:38-45. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.09.003>
- Mohammadi A., Hashemi M, Hosseini SM. 2016. Integration between chitosan and *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil for controlling *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of cucumber fruit rot. *LWT-Food Science and Technology* 65:349-356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.015>
- Mohammed MH, Williams PA, Tverezovskaya O. 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids* 31:166-171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.021>
- Moo-Huchin VM, Estrada-Mota I, Estrada-León R, Cuevas-Glory L, Ortiz-Vázquez E, Vargas L, Vargas M, Sauri-Duch E. 2014. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* 152:508-515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013>
- Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Ansorena R, Roura SI 2006. Effects of abusive temperatures on the postharvest quality of lettuce leaves: ascorbic acid loss

- and microbial growth. *Journal of Applied Horticulture* 8:109-113.
<http://horticultureresearch.net/Abusive%20temperatures%20on%20the%20postharvest%20quality%20of%20lettuce%20leaves.pdf>
- Mou L, Zhang J, Lu Y, Bilal M, Li J, Li G. 2023. Preservative paper containing phenolic acid grafted on chitosan for post-harvest peach preservation. *Food Bioscience* 55:102925. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102925>
- Mourya VK, Nazma NN. 2008. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers* 68:1013-1051.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.03.002>
- Ngo DH, Kim SK. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research* 73:15-31.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>
- Nwofia GE, Ojmelukwe P, Eji C. 2012. Chemical composition of leaves, fruit pulp and seeds in some (*Carica papaya* L) morphotypes. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2:00-06.
https://www.researchgate.net/publication/236646755_Chemical_composition_of_leaves_fruit_pulp_and_seeds_in_some_Carica_papaya_L_morphotypes
- Oleyaei SA, Zahedi Y, Ghanbarzadeh B, Moayedi AA. 2016. Modification of physicochemical and thermal properties of starch films by incorporation of TiO₂ nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 89:256-264.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.078>

- Ong K, Kazi FK, Forney CF, Ali A. 2013. Effect of gaseous ozone on papaya anthracnose. *Food Bioprocess Technology* 6:2996-3005. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.023>
- Ong MK, Ali A. 2015. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 100: 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.023>
- Pacheco N, Garnica-Gonzalez M, Gimeno M, Bárzana E, Trombotto S, David L, Shirai K. 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules* 86:3285-3290. <https://doi.org/10.1021/bm200750t>
- Pacheco N, Trombotto S, David L, Shirai K. 2013. Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate Polymers*, 96(1): 227-232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.051>
- Pareek N, Singh RP, Ghosh S. 2011. Optimization of medium composition for enhanced chitin deacetylase production by mutant *Penicillium oxalicum* SAEM-51 using response surface methodology under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46:1693-1697. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.002>
- Pareek N, Vivekanand V, Agarwal P, Saroj S, Singh RP. 2013. Bioconversion to chitosan: A two stage process employing chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAEM-51. *Carbohydrate Polymers*, 96:417-425. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.005>

- Perdones A, Chiralt A, Vargas M. 2016. Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids* 57:271-279. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.006>
- Petriccione M, Mastrobuoni F, Pasquariello MS, Zampella L, Nobis E, Capriolo G, Scortichini M. 2015. Effect of chitosan coating on the postharvest quality and antioxidant enzyme system response of strawberry fruit during cold storage. *Foods* 29:501-523. <https://doi.org/10.3390/foods4040501>.
- Petriccione M, Pagano L, Forniti R, Zampella L, Mastrobuoni F, Scortichini M, Mencarellib F. 2018. Postharvest treatment with chitosan affects the antioxidant metabolism and quality of wine grape during partial dehydration. *Postharvest Biology and Technology*, 137: 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.010>
- Phothiset S, Charoenrein S. 2014. Effects of freezing and thawing on texture, microstructure and cell wall composition changes in papaya tissues. *Science of Food and Agriculture* 94:189-196. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6226>
- Pinto FO, Pereira MG, Luz LN, Cardozo DL, Ramos HCC, Macedo CMP. 2013. Use of microsatellite markers in molecular analysis of segregating populations of papaya (*Carica papaya* L.) derived from backcrossing. *Genetics and Molecular Research* 12:48-59. <https://doi.org/10.4238/2013.july.8.6>
- Ramírez JCR, Ulloa PR, Velázquez MY, González JAU, Romero FA. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* 2:7-13. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

- Ramírez MÁ, Rodríguez AT, Alfonso L, Peniche C. 2010. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotechnological Application* 27:270-276.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102728522010000400002&lng=es&nrm=iso
- Ranathunge NP, Mongkolporn O, Ford R, Taylor PWJ. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on Capsicum spp: infection, colonization and defense mechanisms. *Australasian Plant Pathology* 41:463-473.
<https://doi.org/10.1007/s13313-012-0156-0>
- Rao MS, Stevens WF. 2005. Chitin production by Lactobacillus fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:1080-1087.
<https://doi.org/10.1002/jctb.1286>
- Rashid MHA, Grout BW, Continella A, Mahmud TMM. 2015. Low-dose gamma irradiation following hot water immersion of papaya (*Carica papaya* linn.) fruits provides additional control of postharvest fungal infection to extend shelf life. *Radiation Physics and Chemistry* 110:77-81.
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.01.024>
- Rasweefali MK, Sabu S, Sunooj KV, Sasidharan A, Martin Xavier K.A. 2022. Consequences of chemical deacetylation on physicochemical, structural and functional characteristics of chitosan extracted from deep-sea mud shrimp.

Carbohydrate Polymer Technologies and Applications 2:100032.

<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100032>

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999.

Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26:1231-1237.

[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Rodríguez D, Alonso M, Tornet Y, Valero L, Rainildes E, Pérez R. 2013. Evaluación de accesiones cubanas de papaya (*Carica papaya* L.) ante la mancha anular.

Summa Phytopathol Botucatu 39:24-27. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000100004)

[54052013000100004](https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000100004)

Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato MA, Rivero-González D, Bosquez-Molina

E, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. 2009. Chemical-structural properties and biological activity of chitosan on phytopathogenic microorganisms. Revista

Chapingo Serie Horticultura 15:307-317. Disponible en:

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027152X200900](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027152X2009000500012&lng=es&nrm=iso)

[0500012&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027152X2009000500012&lng=es&nrm=iso)

Rojo-Báez I, García-Estrada RS, Sañudo-Barajas AJ, León-Félix J, Allende-Molar R.

2017. Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. Revista Mexicana de Fitopatología 34:316-325.

<https://doi.org/10.1590/0100-29452017379>

- Romanazzi G, Feliziani E, Bautista-Baños S, Sivakumar D. 2017. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Food Science and Nutrition* 57:579-601. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
- Rout SK. 2001. Physicochemical, Functional and Spectroscopic Analysis of Crawfish Chitin and Chitosan as Affected by Process Modification. *LSU Historical Dissertations and Theses* 432:162-170. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/432
- Ruíz-Ramos JO, Pérez-Orozco JP, Báez-González JG, Bósquez-Molina E, Pérez-Alonso C, Vernon-Carter EJ. 2006. Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers* 64:355–363. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.020>
- SAGARPA. 2023. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. Avance de siembras y cosechas. Disponible de: <http://www.siap.gob.mx/>. Consultado el 15 de febrero del 2023.
- Sedaghat F, Yousefzadi M, Toiserkani H, Najafipour S. 2017. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan.

- International Journal of Biological Macromolecules 104:883–888.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>
- Seo MH, Lee SY, Chang YH, Kwak HS. 2009. Physicochemical, microbial, and sensory properties of yogurt supplemented with nanopowdered chitosan during storage. Journal of Dairy Science 92:5907-5916.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2520>
- Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. 2006. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. Journal of Surgical Research 15:185-92. <http://doi.org/10.1016/j.jss.2005.12.013>
- Silva-García LG, de Melo-Guedes GM, Queiroz-da Silva ML, Castelo-Branco DSCM, Costa-Sidrim JJ, de Aguiar-Cordeiro R, Gadelha-Rocha MF, Silveira-Vieira R, Nogueira-Brilhante RS. 2018. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. Carbohydrate Polymers 195:662-669.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
- Sixto-Berrocal AM, Vázquez-Aldana M, Miranda-Castro SP, Martínez-Trujillo MA, Cruz-Díaz MR. 2023. Chitin/chitosan extraction from shrimp shell waste by a completely biotechnological process. International Journal of Biological Macromolecules 230:123–204, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123204>
- Sogvar OB, Saba MK, Emamifar A. 2016. Aloe vera and ascorbic acid coatings maintain postharvest quality and reduce microbial load of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology 114:29-35.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.019>

- Srinivasa PC, Ravi R, Tharanathan RN. 2007. Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80:184-189. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.05.007>
- Tajdini F, Amini MA, Nafissi-Varcheh N, Faramarzi MA. 2010. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucormiehei* and *Mucor racemosus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 47:180–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.05.002>.
- Tan C, Feng B, Zhang X, Xia W, Xia S. 2016. Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. *Food Hydrocolloids* 52:774-784. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.016>
- Teli M, Sheikh J. 2012. Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. *International Journal of Biological Macromolecules* 50:195-200. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.04.003>
- Terkula BI, Torsabo D, Noramalina CEC, Chik E, Wahab F, Rozaimah SSA, Hassan HA, Kasan NA. 2022. The impact of re-ordering the conventional chemical steps on the production and characterization of natural chitosan from biowaste of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Sea Research*, 190:1385-1101. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2022.102306>
- Thakhiew W, Devahastin S, Soponronnarit S. 2013. Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of

- antimicrobial agent. *Journal of Food Engineering* 119:140-149.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.020>
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18:305-312.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01462-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01462-1)
- Udomkun P, Nagle M, Mahayothee B, Nohr D, Koza A, Müller J. 2015. Influence of air-drying properties on nonenzymatic browning, major bioactive compounds and antioxidant capacity of osmotically pretreated papaya. *Food Science and Technology* 60:914-922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.036>
- USDA. 2014. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. (En línea).
<http://www.usda.gov>. Consultado el 28 de Abril de 2023.
- Valencia-Sandoval K, Duana-Ávila D, Hernández-Gracia TJ. 2017. Study of the Mexican papaya market: an analysis of its competitiveness (2001-2015). *Suma de Negocios* 8:131-139. <https://doi.org/10.1016/j.sumneg.2017.10.002>
- Vargas WA, Sanz MJM, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Díaz-Mínguez JM. 2012. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. *Plant Physiology* 158:1342-1358. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190397>
- Vázquez-Luna A, Santiago M, Rivadeneyra-Domínguez E, Díaz-Sobac R. 2019. Edible films based on nanostructured starch as barrier material moisture. *CienciaUAT*, 13(2), 152-164. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1105>
- Vilaplana R, Chicaiza G, Vaca C, Valencia-Chamorro S. 2020. Combination of hot water treatment and chitosan coating to control anthracnose in papaya (*Carica*

- papaya* L.) during the postharvest period. *Crop Protection* 128:105007.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105007>
- Wang Q, Tian F, Feng Z, Fan X, Pan Z, Zhou J. 2015. Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with *Lycium barbarum* fruit extract for active food packaging. *International Journal of Food Science and Technology* 50:458-464. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12623>
- Widyastuti TEW, Srianta I. 2011. Development of functional drink based on foam-mat dried papaya (*Carica papaya* L.): optimization of foam-mat drying process and its formulation. *International Journal of Food, Nutrition & Public Health* 4:67-76.
<https://www.researchgate.net/publication/272420549>
- Xie H, Ouyang K, Zhang L, Hu J, Huang S, Sun W, Xiong H, Zhao Q. 2022. Chitosan/rice hydrolysate/curcumin composite film: Effect of chitosan molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* 210:53-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.031>
- Xing K, Li TJ, Liu YF, Zhang J, Zhang Y, Shen XQ, Li XY, Miao XM, Feng ZZ, Peng X, Li ZY, Qin S. 2018. Antifungal and eliciting properties of chitosan against *Ceratocystis fimbriata* in sweet potato. *Food Chemistry* 268:188-195.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.088>
- Yan L, Wang R, Wang H, Sheng K, Liu C, Qu H, Ma A, Zheng L. 2018. Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition. *Food Hydrocolloids* 84:450-457. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.025>

- Yang B, Prasad KN, Jiang Y. 2016. Structure identification of a polysaccharide purified from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp. Carbohydrate Polymers 137:570-575. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.088>
- Yang G, Wang Y, Fang Y, An J, Hou X, Lu J, Zhu R, Liu S. 2022. A novel potent crystalline chitin decomposer: Chitin Deacetylase from *Acinetobacter schindleri* MCDA01. Molecules 16:22-27. <https://doi.org/10.3390/molecules27165345>.
- Yimyong S, Datsenka TU, Handa AK, Seaypheap K. 2011. Hot water treatment delays ripening-associated metabolic shift in “Okrong” Mango fruit during storage. Journal of the American Society for Horticultural Science 136:441-451. <https://doi.org/10.21273/JASHS.136.6.441>
- Younes I, Rinaudo M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. Marine Drugs 13:1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Zahid N, Maqbool M, Siddiqui Y, Manickam S, Ali A. 2015. Regulation of inducible enzymes and suppression of anthracnose using submicron chitosan dispersions. Scientia Horticulturae 193:381-388. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.014>
- Zavala-León MJ, Alejo JC. 2012. Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). Fitosanidad 16:83-86. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216004>

- Zhang W, Zhao H, Zhang J, Sheng Z, Cao J, Jiang W. 2019. Different molecular weights chitosan coatings delay the senescence of postharvest nectarine fruit in relation to changes of redox state and respiratory pathway metabolism. *Food Chemistry* 289:160-168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.047>
- Zhang Z, Pang X, Xuwu D, Ji Z, Jiang Y. 2005. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry* 90:47-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.023>
- Zhao H, Wang L, Belwal T, Jiang Y, Li D, Xu Y, Luo Z, Li L. 2020. Chitosan-based melatonin bilayer coating for maintaining quality of fresh-cut products. *Carbohydrate Polymers* 235:115973. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115973>
- Zhao N, Li X, Chen W, Shi J. 2013. Effect of hot water treatment on the inhibition of anthracnose, PG, PME activity and PGIP gene expression in harvested papaya fruits. *Acta Horticulturae* 975:87-93. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.975.63>
- Zhou Y, Zhang L, Zeng K. 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biological Control* 96:39-47. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.001>
- Zhu X, Li X, Chen W, Lu W, Mao J, Liu T. 2013. Molecular cloning, characterization and expression analysis of CpCBF2 gene in harvested papaya fruit under

temperature stresses. *Electronic Journal of Biotechnology* 16:1-10.
<http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-1>.

Ziani K, Oses J, Coma V, Mate JI. 2008. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT-Food Science and Technology* 41:2159-2164. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.023>

Zubiria-Suarez J, Jiménez-De las Salas A. 2014. Analysis methods for removing waste chitin shrimp and environmental economic parameters as. *Ciencia e Ingeniería* 1: 2-9. Disponible en: <http://revistas.uniquajira.edu.co/index.php/cei>