

OBTENCIÓN DE UN RECUBRIMIENTO ANTIFÚNGICO CON NANOPARTÍCULAS DE
ZnO PARA MANEJO POS COSECHA EN NARANJA VALENCIA (*Citrus sinensis*).



MANUEL JOSÉ PASQUEL

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2017

OBTENCIÓN DE UN RECUBRIMIENTO ANTIFÚNGICO CON NANOPARTÍCULAS DE
ZnO PARA MANEJO POS COSECHA EN NARANJA VALENCIA (*Citrus sinensis*).

MANUEL JOSÉ PASQUEL

Trabajo de grado en modalidad de investigación presentado como requisito para optar al
título de Ingeniero Agroindustrial

DIRECTORES

M.Sc. SILVIO ANDRÉS MOSQUERA SÁNCHEZ

D.Sc JORGE ENRIQUE RODRÍGUEZ-PÁEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2017

Nota de aceptación

Los directores y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por su autor y lo encuentran satisfactorio.

M.Sc. Silvio Andrés Mosquera Sánchez
Director

D.Sc. Jorge Enrique Rodríguez-Páez
Director



M.Sc. Lucy Caterine Daza Gómez
Presidente del Jurado

Ing. Stephanie Dayana Sarabino Alegría
Jurado

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 23 de febrero de 2017

DEDICATORIA

La realización del presente trabajo de grado es un homenaje
a mi madre María Rosario Pasquel David, por ser mi
apoyo incondicional y ejemplo.

El recuerdo de su amor, sacrificio, valentía y carácter
es la fuente inagotable de energía y motivación para continuar
esforzándome por mejorar

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida, salud y voluntad para alcanzar mis objetivos.

A mis padres Anselmo y María Rosario por brindarme una familia cálida y amorosa, los recuerdo y los extraño.

A mi esposa Sandra Ximena por su amor y apoyo incondicional, gracias por creer en mí.

A mis Directores de tesis:

Profesor Silvio Andrés Mosquera Sánchez, por su confianza, interés y orientación durante este proceso.

Profesor Jorge Enrique Rodríguez Páez, por su apoyo constante, dedicación de tiempo, esfuerzos y recursos; por su paciencia y generosidad, mi gratitud, respeto y admiración.

A los Grupos de Investigación

CYTEMAC, especialmente a Cenayda López Obando, Alejandra Mazabuel Garzón y Cristian Eduardo Camayo.

CYTBIA, especialmente a Sandra Patricia Paz.

GIMAI, especialmente a la profesora Lyda Patricia Mosquera, Paola Andrea Arciniegas Grijalba y Melisa Carolina Patiño Portela.

A la Universidad del Cauca y todos mis docentes, los cuales me transmitieron sus conocimientos encaminando mi formación profesional.

A todos los que han contribuido y me acompañaron durante este proceso.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO REFERENCIAL	19
1.1 LOCALIZACIÓN.	19
1.2 MARCO TEÓRICO.	20
1.2.1 Producción de frutos cítricos.	21
1.2.1.2 Poscosecha de frutos cítricos.	21
1.2.2 Recubrimiento natural.	21
1.2.2.1 Almidón.	22
1.2.3 Nanotecnología.	22
1.2.3.1 Óxido de cinc.	23
1.3 MARCO HISTÓRICO.	24
2. METODOLOGÍA	31
2.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CINC (ZnO-NPs).	31
2.1.1 Materiales.	31
2.1.1.1 Precursor.	31
2.1.1.2 Solvente.	31
2.1.2 Método.	31
2.1.3 Caracterización de las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs).	33
2.1.3.1 Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).	33
2.1.3.2 Espectroscopia Raman.	33
2.1.3.3 Difracción de rayos X (DRX).	33

2.1.3.4 Microscopia Electronica de Transmisión (MET).	34
2.1.3.5 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).	34
2.1.3.6 Espectroscopia de absorción UV-VIS.	35
2.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i> DE LAS ZnO-NPs.	35
2.2.1 Equipos empleados para realizar los ensayos.	35
2.2.1.1 Autoclave NAPCO 9000.	36
2.2.1.2 Cámara de flujo de laminar LACONCO Purifier Vertical Clean Bench.	36
2.2.1.3 Horno MEMMERT.	36
2.2.2 Metodología <i>in vitro</i> para determinar la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs.	36
2.2.2.1 Aislamiento del hongo a partir de una naranja afectada.	36
2.2.2.2 Método de Recuento de Esporas.	37
2.2.2.3 Viabilidad de las esporas de los hongos estudiados.	38
2.2.2.4 Determinación de la capacidad antifúngica.	39
2.3 PREPARACIÓN DEL RECUBRIMIENTO.	40
2.3.1 Equipos empleados para realizar los ensayos.	40
2.3.1.1 Ultrasonido.	41
2.3.1.2 HL2.	41
2.3.1.3 Aspersor Autojet modular spray sistem 1550*.	41
2.3.2 Método empleada para obtener el recubrimiento.	41
2.4 METODOLOGÍA <i>in vivo</i> .	42
2.4.1 Material vegetal.	42
2.4.2 Método.	43
2.5 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y PARÁMETROS POS COSECHA DE LA NARANJA VALENCIA (<i>Citrus sinensis</i>).	44
2.5.1 Firmeza.	44

2.5.2 Pérdida de peso.	45
2.5.3 Tasa de respiración.	45
2.5.4 Sólidos solubles totales.	45
2.5.5 Acidez titulable.	46
2.5.6 Potencial de hidrógeno pH.	46
2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL.	47
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CINC (ZnO-NPs).	50
3.1.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).	51
3.1.2 Espectroscopia Raman.	53
3.1.3 Difracción de Rayos X (DRX).	56
3.1.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).	57
3.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).	58
3.1.7 Espectroscopia de absorbancia UV-Vis.	59
3.2 AISLAMIENTO DE HONGOS PATÓGENOS DE LA NARANJA.	60
3.2.1 <i>Penicillium digitatum</i> .	60
3.2.2 <i>Penicillium italicum</i> .	60
3.2.3 Recuento de esporas y viabilidad de los hongos.	61
3.3 ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA.	62
3.3.1 <i>in vitro</i> .	62
3.3.1.1 Prueba fungistática a los patógenos del género <i>Penicillium</i> .	62
3.3.2 Actividad antifúngica in vivo.	68
3.3.2.1 Prueba fungistática.	69
3.3.2.2 Pérdida de peso.	72

3.3.2.3 Tasa de respiración.	75
3.3.2.4 Firmeza.	78
3.3.2.5 Sólidos solubles totales (SST).	80
3.3.2.6 Acidez titulable.	82
3.3.2.7 Índice de madurez.	83
3.3.2.8 Potencial de hidrógeno (pH).	84
4. CONCLUSIONES.	86
5. RECOMENDACIONES.	87
6. BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS	98

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Asignación de grupos funcionales a las bandas presentes en los espectros IR obtenidos de muestras extraídas durante el proceso de síntesis del ZnO, a diferentes temperaturas.	52
Tabla 2. Bandas presentes en el espectro Raman correspondiente al ZnO sintetizado en etilenglicol y tratado térmicamente a 600 °C a las cuales se les ha asignado su correspondiente simetría y proceso (tipo de modo fonónico y su naturaleza: acústico transversal (TA) o longitudinal (LA), y óptico transversal (TO) o longitudinal (LO)), comparándolas con las obtenidos por otros investigadores.	55
Tabla 3. Determinación elemental porcentual puntal de la muestra sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600 °C/4 horas.	58

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema del proceso de síntesis de óxido de cinc, usando el método precipitación controlada MPC.	32
Figura 2. Proceso de aislamiento de <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	37
Figura 3. Proceso de recuento de esporas.	38
Figura 4. Viabilidad de los hongos <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	39
Figura 5. Preparación de medios de cultivo PDA con ZnO.	40
Figura 6. Equipo empleado en la elaboración del recubrimiento.	42
Figura 7. Etapas de acondicionamiento de la naranja a evaluar para seguimiento <i>in vivo</i> . A. Limpieza y desinfección, B. Inoculación, C. Aspersión y D. Disposición en góndola.	43
Figura 8. Esquema que ilustra la medición de la firmeza a las naranjas en estudio.	44
Figura 9. Evaluación de los parámetros fisiológicos de la naranja Valencia a diferentes tratamientos. A. Tasa de respiración, B. Sólidos solubles.	46
Figura 10. Evaluación de los parámetros fisiológicos de la naranja Valencia a diferentes tratamientos. A. Acidez titulable y B. pH.	47
Figura 11. Diagrama de flujo de las diferentes actividades experimentales realizadas para obtener los resultados que se indican en este documento.	49
Figura 12. Registro fotográfico de las etapas realizadas en el proceso de síntesis de óxido de cinc a través de la metodología modificada MPC.	50
Figura 13. Espectros de Infrarrojo (FTIR) correspondientes a muestras sólidas extraídas del sistema durante la etapa de secado (pre-calcinado a 300 °C/30 min) y tratada térmicamente a 600°C/4 h (ZnO–NPs).	52
Figura 14. Deconvolución del espectro IR, entre 600 ~ 370 cm ⁻¹ , correspondiente a la muestra sólida sintetizada y tratada térmicamente a 600 °C durante 4 horas.	53
Figura 15. Espectro Raman correspondiente a la muestra de ZnO sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600 °C por 4 horas.	54
Figura 16. Difractogramas de rayos X correspondientes a muestras precalcinado (300 °C) y la tratada térmicamente a 600 °C/4 horas de ZnO sintetizado por MPC (PDF 89-7902).	57

Figura 17. Micrografía obtenida con MET de sólidos de ZnO sintetizados por el método de precipitación controlada MPC, en etilenglicol, tratada a 600 °C/4 h.	57
Figura 18. Micrografías tomadas con MEB de la muestra sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600 °C.	58
Figura 19. Espectro UV-Vis correspondiente al ZnO sintetizado en etilenglicol y tratado térmicamente a 600 °C.	59
Figura 20. A. <i>P. digitatum</i> en medio de cultivo PDA 48 horas después de sembrado B. Impronta MOAR magnificación 40X Hifa (hi), conidióforos (cdf), fiálides (fia) y conidios (co) de <i>P. digitatum</i> , en observación microscópica.	61
Figura 21. A. <i>P. italicum</i> en medio de cultivo PDA 48 horas después de sembrado B. Impronta MOAR magnificación 40X Hifa (hi), conidióforos (cdf), fiálides (fia) y conidios (co) de <i>P. italicum</i> , en observación microscópica.	61
Figura 22. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los tratamientos en patógenos del género <i>Penicillium</i> .	62
Figura 23. Áreas de crecimiento de los hongos en el tiempo para los diferentes tratamientos A. <i>P. digitatum</i> B. <i>P. italicum</i> .	63
Figura 24. Registro fotográfico de la valoración <i>in vitro</i> de los tratamientos testigo, TZ3, TZ6, TZ9 y TZ12 sobre <i>P. digitatum</i> , ordenado para los días, 3 superior izquierda, 5 superior medio, 7 superior derecha, 9 inferior izquierda, 11 inferior medio y 12 inferior derecha respectivamente.	64
Figura 25. Improntas MOAR de los hongos tratados, superior izquierda <i>P. digitatum</i> en medio de cultivo PDA 48 horas muestra testigo magnificación 100X, superior derecha <i>P. digitatum</i> en medio de cultivo PDA 48 horas tratamiento TZ9 magnificación 100X, inferior izquierda <i>P. italicum</i> en medio de cultivo PDA 48 horas tratamiento TZ12 magnificación 100X, inferior derecha <i>P. italicum</i> en medio de cultivo PDA 48 horas, muestra testigo magnificación 400X, hifa (hi), conidióforos (cdf), fiálides (fia) y conidios (co).	67
Figura 26. Afección y evolución fúngica causada por <i>P. digitatum</i> (superior) y <i>P. italicum</i> (inferior) para los días 1, 9 y 16 respectivamente, de la muestra testigo.	69
Figura 27. Seguimiento in vivo de actividad antifúngica de <i>P. digitatum</i> . Réplica del día 13.	70
Figura 28. A. Porcentaje de inhibición para los hongos del género <i>Penicillium</i> .	71
Figura 29. Pérdida de peso (%) en naranja con afección fúngica <i>P. digitatum</i> considerando los tratamientos que contenían o no ZnO-NPs.	73

Figura 30. Pérdida de peso (%) en naranja con afección fúngica <i>P. italicum</i> considerando los tratamientos que contenían o no ZnO-NPs.	73
Figura 31. Curvas de tasa de respiración, en función del tiempo, para naranjas con afección fúngica <i>P. digitatum</i> , evaluadas a los diferentes tratamientos.	76
Figura 32. Curvas de tasa de respiración, en función del tiempo, para naranjas con afección fúngica <i>P. italicum</i> , evaluadas a los diferentes tratamientos.	77
Figura 33. Curvas de firmeza, en función del tiempo, para naranjas con afección fúngica, sin y con recubrimientos que contenían diferentes diluciones de ZnO-NPs.	79
Figura 34. Curvas de sólidos solubles totales, en función del tiempo y agente fúngico, para las naranjas sin y con tratamientos.	81
Figura 35. Seguimiento de la acidez titulable, en función del tiempo y agente fúngico, de naranjas sometidas a tratamientos con o sin ZnO-NPs.	82
Figura 36. Curvas de índice de madurez, en función del tiempo, para los tratamientos con o sin ZnO-NPs de naranjas con afección fúngica del género <i>Penicillium</i> .	83
Figura 37. Curvas de pH en función del tiempo de naranjas del sistema con afección fúngica, sometidas a tratamiento sin y con ZnO-NPs.	85

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Datos promedios obtenidos durante los seguimientos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de las variables de respuesta.	101
Anexo B. Viabilidad para los hongos del género <i>Penicillium</i>	107
Anexo C. Análisis de estadístico de la actividad antifúngica del ZnO-NPs <i>in vitro</i> .	108
Anexo D. Análisis de estadístico de la pérdida de peso, en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	109
Anexo E. Análisis de estadístico de la tasa de respiración, en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	112
Anexo F. Análisis de estadístico de la firmeza en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	114
Anexo G. Análisis de estadístico de los sólidos solubles totales, en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	116
Anexo H. Análisis de estadístico de la acidez titulable, en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	118
Anexo I. Análisis de estadístico del índice de madurez, en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	120
Anexo J. Análisis de estadístico el potencial de hidrógeno, en naranjas con afección fúngica causada por <i>P. digitatum</i> y <i>P. italicum</i> .	122

RESUMEN

El interés actual en la preservación de los alimentos, busca identificar materiales que se puedan incorporar a biopolímeros con el objetivo de mejorar sus propiedades de barrera y garantizar la calidad microbiológica y físico-química de productos hortofrutícolas recubiertos con el biomaterial modificado. Tal es el caso de las nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs). El presente estudio evaluó su efecto antifúngico sobre los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. Inicialmente, se modificaron las condiciones de síntesis para obtener ZnO-NPs; éstas fueron caracterizadas utilizando Espectroscopia Infrarojo (IR), Espectroscopia Raman, Difracción de Rayos-X (DRX), Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de absorción UV-Visible, evaluando su capacidad antifúngica (*in vitro*) al inocular artificialmente la cepa en diferentes diluciones del óxido. Posteriormente se diseñaron metodologías, las cuales permitieron incorporar los tratamientos más eficaces de estas nanoestructuras a recubrimientos naturales a base de almidón de yuca. Finalmente, se evaluaron los efectos del recubrimiento modificado sobre la calidad microbiológica y físico-química de la naranja Valencia (*Citrus sinensis*) en condiciones pos cosecha. Los resultados mostraron una eficiente inhibición del crecimiento de los hongos del género *Penicillium*, superiores al 90%. Las propiedades físico-químicas se conservaron por mayor tiempo (sólidos solubles totales y acidez titulable), la pérdida de peso y firmeza fue controlada, y se reguló la tasa de respiración del fruto. Por lo tanto, es recomendable considerar el uso del recubrimiento en frutos cítricos con el fin de conservar por más tiempo las condiciones iniciales del fruto.

Palabras clave. Recubrimiento antifúngico, Inhibición, Pos cosecha, Óxido de cinc.

ABSTRACT

The current interest in food preservation, seeks to identify materials to incorporate into biopolymers with the aim of improving its barrier properties and ensuring the microbiological and physicochemical quality of horticultural products coated with the modified biomaterial. Such is the case of ZnO nanoparticles (ZnO-NPs). This study evaluated their antifungal effect on the fungi *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. Initially, the synthesis conditions to obtain ZnO-NPs were modified; their characterization was performed with the techniques Infrared Spectroscopy (IR), Raman Spectroscopy, X-Ray Diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning Electron Microscopy (SEM) and UV-Visible Absorption Spectroscopy, evaluating its antifungal capacity (*in vitro*) by artificially inoculating the strain at different dilutions of the oxide. Subsequently, methodologies to incorporate the most efficient treatments of these nanostructures to natural coatings based on cassava starch were designed. Finally, the effects of the modified coating on the sweet orange's (*Citrus sinensis*) microbiological and physicochemical quality under postharvest conditions were evaluated. The results showed an efficient inhibition of *Penicillium* fungi's growth, greater than 90%. Physicochemical properties were preserved for a longer time (total soluble solids and titratable acidity), weight and firmness loss was controlled, and the fruit's respiration rate was regulated. Thence, it is recommendable to consider the use of ZnO-NPs coating in citrus fruits in order to preserve the initial conditions of the fruit for longer.

Keywords: Antifungal coating, Inhibition, Postharvest, Zinc oxide

INTRODUCCIÓN

La cadena mundial de los cítricos es importante debido a que constituye una fuente nutricional de antioxidantes, con predilección en la canasta familiar, que se evidencia porque frutos como la naranja, la mandarina y el limón presentan un crecimiento del 7% promedio anual en su producción, alcanzando 125 millones de ton/año (FAO, 2015). Tras el diagnóstico del sector citrícola nacional, se identificaron problemáticas que limitan su desarrollo y competitividad, destacándose el uso indiscriminado de agroquímicos y el manejo inadecuado de plagas y enfermedades (Forner *et al.*, 2013). Adicionalmente, se reportó que las pérdidas pos cosecha eran del orden de $\pm 45\%$ en zonas altamente tecnificadas (Aguilar *et al.*, 2012), esto debido a la susceptibilidad físico-mecánica intrínseca del producto, lo que permitiría que microorganismos patógenos, como el *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, se manifiesten en podredumbres (mohosidad verde y azul), ocasionando su descomposición.

Actualmente, se trabaja en el desarrollo de tecnologías que reduzcan el deterioro microbiológico de vegetales y minimicen el impacto ambiental (Erasmus *et al.*, 2015), buscando disminuir el uso de fungicidas químicos debido a la residualidad generada en los productos hortofrutícolas tratados. Una opción promisoriosa es usar la nanotecnología para elaborar recubrimientos que permitan y garanticen una alta protección y seguridad efectiva del producto, ofreciendo soluciones a problemas pos cosecha (Bodbodak y Rafiee, 2016). Considerando la potencial aplicación de las ZnO-NPs en remediación medioambiental, en este trabajo se consideró el uso de estas nanopartículas como agente antifúngico, y los resultados obtenidos son un aporte al conocimiento adquirido a través de otros estudios realizados que consideraron su capacidad antimicrobiana (Manna, 2012) y, específicamente, su capacidad antifúngica frente a diferentes hongos (Kavya-Shree *et al.*, 2015). En estos estudios se indica que la funcionalidad antibacterial y antifúngica de las ZnO-NPs era propiciada por: las especies reactivas de oxígeno (ROS), el Zn^{2+} disuelto y/o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Espitia *et al.*, 2012) que se producía durante el proceso. Estos resultados llevaron a varios académicos a proponer la incorporación de ZnO-NPs en empaques para alimentos para proteger los productos frente a hongos y bacterias.

Películas de cloruro de vinilo (PVC), recubiertas con nanopartículas de ZnO, presentaron actividad antibacterial importante sobre *E. coli* (Li *et al.*, 2011), evidenciándose un efecto inhibitorio del 95% sin incidencia de luz. Resultados como el anterior han motivado a los investigadores a considerar el uso de estas películas recubiertas con Nanopartículas, concretamente de ZnO, para conformar empaques antimicrobiales.

En consecuencia, este trabajo abordó el problema de sintetizar y caracterizar Nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs), menores a 100 nm, que, como lo indica la literatura científica, presentan mejores o nuevas propiedades con relación a su contraparte micrométrica (Cao y Wang, 2011), entre ellas actividad antifúngica. Garantizando esta funcionalidad, se conformaron recubrimientos para controlar el crecimiento micelar de los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, que fue el interés central del presente trabajo. Con el desarrollo de esta propuesta de investigación se buscó dar inicio a un trabajo sistemático en investigación y exploración para producir recubrimientos naturales que contengan Nanopartículas de óxidos metálicos, concretamente ZnO-NPs, con el fin de mejorar y/o propiciar nuevas funcionalidades considerando el potencial uso de los mismos; por lo tanto los resultados de esta propuesta se pueden tomar como fundamento y soporte para estudios posteriores que permitan fortalecer nuevas alternativas productivas para la región.

En el presente trabajo se modificó el proceso de síntesis de las ZnO-NPs, obteniéndose las mismas de manera controlada y reproducible, con las características deseadas. Después de determinar las características y propiedades de las ZnO-NPs, se evaluó, *in vitro*, su capacidad antifúngica sobre los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. Con base en estos resultados, se desarrolló un recubrimiento a partir de almidón de yuca modificado, al que se le incorporó ZnO-NPs, con el propósito de evaluar *in vivo* su capacidad para garantizar la calidad microbiológica de la naranja Valencia (*Citrus sinensis*).

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 LOCALIZACIÓN

El proyecto se desarrolló en las instalaciones de la Universidad del Cauca, siguiendo la secuencia procedimental necesaria para la obtención del recubrimiento con ZnO-NPs. En la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Laboratorio del Grupo de Investigación CYTEMAC, se realizó la síntesis y obtención de las ZnO-NPs; en La Unidad de Microscopia Electrónica de la Vicerrectoría de Investigaciones se determinó el tamaño y la morfología de la partícula de ZnO, y se observó la evolución de hongos a los diferentes tratamientos, y en el Laboratorio de Microbiología se hizo el seguimiento y control de los microorganismos a través del agente antifúngico, las ZnO-NPs.

En la Planta Piloto de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias se elaboró la matriz polimérica que se empleó como recubrimiento y se llevó a cabo el seguimiento *in vivo* del agente antifúngico ZnO-NP en la naranja. Todas las instalaciones se encuentran ubicadas en el Municipio de Popayán a una altura aproximada de 1738 msnm, una temperatura media de 18°C y una humedad media de 77,75% (Alcaldía de Popayán, 2013)

1.2 MARCO TEÓRICO

El tema central de este trabajo de grado está relacionado con el de recubrimientos para frutas, específicamente para la naranja Valencia (*Citrus sinensis*). El objetivo de estos recubrimientos es contener el alimento de manera efectiva, a bajo costo, satisfaciendo los requerimientos industriales y los del consumidor, manteniendo la calidad de la fruta y minimizando el impacto ambiental (Marsh y Bugusu, 2007). El recubrimiento debe retardar el deterioro del producto, retener los efectos benéficos del mismo, extender su vida en anaquel y mantener la calidad y seguridad del alimento. La protección suministrada por el

recubrimiento debe considerar, principalmente, tres tipos de influencias externas: químicas, biológicas y físicas. Para este trabajo fue de interés la influencia biológica en relación a suministrar una barrera de protección contra microorganismos, agentes patógenos, concretamente sobre *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.

En este trabajo, el producto a proteger (la naranja Valencia) es una especie de los denominados frutos cítricos. Los cítricos pertenecen a la clase *Angiospermae*, subclase *dicotiledónea*, orden *rutae*, familia *rutaceae* y al género *citrus*, y dentro de ellos se conocen las siguientes especies: naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus aurantifolia*) y toronja (*Citrus paradisi*) (MADR, 2005).

1.2.1 Producción de frutos cítricos. Los principales productores de cítricos (naranjas, tangerinas, mandarinas y clementinas) son China, Brasil y Estados Unidos, participando respectivamente con el 19,1 %, 17,5 % y 9,7 % de la producción mundial; aunque la citricultura se extiende entre varios países, la producción y el comercio revelan cierto grado de concentración en pocos países. Siguen en orden de importancia México, India y España representando en conjunto el 17,2 % de la producción mundial (El-Otmani *et al.*, 2011).

Según cifras del Ministerio de Agricultura de Colombia, a través del Sistema de Información de Gestión y Desempeño de Organizaciones de Cadenas (SIOC), la cadena de cítricos, en términos de superficie, se divide en seis regiones productoras: Centro con 22.781 ha [Tolima, Huila y Cundinamarca], Costa Atlántica 10.283 ha [Sucre, Magdalena, Córdoba, Cesar, Bolívar y Atlántico], Nor-Oriente 13.713 ha [Santander, Norte de Santander y Boyacá], Occidente 14.683 ha [Antioquia, Risaralda, Caldas, Quindío y Valle del Cauca], Llanos Orientales 5.250 ha [Meta y Casanare] y Sur 4.470 ha [Cauca y Nariño], donde las producciones de cítricos asociados alcanzan el 50% del total producido en Colombia y registran tasas de crecimiento positivas. Además, la producción nacional de cítricos por especie está mayoritariamente compuesta por toronjas, mandarinas, limas ácidas y naranjas (MADR, 2011; ASOHOFrucol, 2014).

1.2.1.1 Pos cosecha de frutos cítricos. La calidad de los frutos cítricos está fuertemente influida por las prácticas de cultivo y las condiciones ecológicas de su desarrollo, actividades que los hacen susceptibles al ataque de lepidópteros, moscas de fruta y ácaros, entre otros, y de diversos microorganismos que pueden causar pudrición (la infección puede ocurrir en frutos sanos y sin ninguna lesión), siendo la intensidad del daño influenciada por las condiciones climáticas (humedad y temperatura elevada) durante su desarrollo (MADR, 2005).

Uno de los principales problemas, en pos cosecha, lo constituyen los llamados hongo verde, *Penicillium digitatum*, y hongo azul, *Penicillium italicum*, ya que su difusión y multiplicación se realiza a través de esporas, que se encuentran dispersas en el aire, estos hongos no se desarrollan en frutas sanas, pero penetran en ella a través de los golpes y las heridas, que estas presentan, ocasionados durante su recolección, transporte y manejo. La aparición de manchas en la piel de la fruta es la primera manifestación de la presencia del hongo, en su etapa inicial, las cuales se transforman posteriormente en tonalidades blanquecinas, para luego desarrollar esporulación de color verde o azul, dependiendo de la especie de *Penicillium*; finalmente, se manifiesta una pérdida de consistencia, acompañada de un olor característico y la reducción completa de su aptitud para el consumo humano (FAO, 2007).

1.2.2 Recubrimiento natural (RN). Para proteger el fruto frente a la acción de los agentes microbiales, una buena posibilidad es usar recubrimientos que, para no agredir el medio ambiente, se busca que sean recubrimientos naturales. Estos se pueden definir como una matriz continua y delgada, de material vegetativo, que forma un revestimiento sobre el alimento y que puede estar constituido por polisacáridos, proteínas, lípidos, emulsificantes, plastificantes, ceras, gomas, ácidos orgánicos, etc. Estos compuestos poseen propiedades específicas (hidrofóbicas, hidrófilas, brillo, entre otras) que se integran al recubrimiento, dependiendo de su potencial uso (Saavedra y Algecira, 2010).

Los recubrimientos se pueden constituir en una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua, retrasando el deterioro del alimento, mejorando las propiedades mecánicas

y ayudando a proteger al producto del deterioro físico que puede ser ocasionado por impacto mecánico, presión, vibraciones y de otros factores mecánicos (Ruelas *et al.*, 2013). Además, el recubrimiento puede actuar como agente antimicrobiano, antioxidante, nutracéutico, ingrediente de color y sabor, para reducir la carga microbiana, retardar la oxidación, decoloración y para conservar la calidad del producto; adicionalmente permite controlar la respiración y la senescencia del mismo, de una manera similar a como lo hacen las atmósferas modificadas (Navarro *et al.*, 2011; Beltrán 2011).

1.2.2.1 Almidón. Una de las materias primas utilizadas en la fabricación de recubrimientos naturales es el almidón. Este es un polisacárido empleado en alimentos como estabilizante, gelificante, espesante y emulsificante, que se ha constituido en una fuente importante de recursos renovables de agentes hidrofílicos para formar películas, con un amplio rango de viscosidades (Boukraâ y Bouchegrane, 2007). Entre otras aplicaciones, el almidón de yuca se ha empleado, de manera amplia, para producir recubrimientos comestibles, donde los resultados han mostrado que él presenta potencialidades de empleo dadas sus características isotrópicas, inodoras, insípidas, incoloras, no tóxicas y biológicamente degradable (Krochta y De Mulder, 1997).

Aunque los polímeros naturales biodegradables, como el almidón, la gelatina y la celulosa, son materias primas adecuadas para preparar recubrimientos, envases y películas, su naturaleza hidrofílica y su sensibilidad a la humedad han limitado sus aplicaciones, tal como lo muestran los experimentos de laboratorio. Pero, con el advenimiento de nuevas tecnologías, como lo es la nanotecnología, se han generado muchas expectativas con relación al tema de los polímeros biodegradables y, específicamente, en el de los recubrimientos funcionales o “inteligentes”.

1.2.3 Nanotecnología. Dada la potencialidad de la nanotecnología, evidenciada en la gran cantidad de aplicaciones de la misma (Cao y Wang, 2011), se ha considerado la posibilidad de incorporar nanoestructuras a los recubrimientos para darle ciertas propiedades y por lo tanto nuevas funcionalidades. Se define nanotecnología como “la comprensión y el control de la materia a dimensiones de aproximadamente 1 a 100 nanómetros (un nanómetro es la

milmillonésima parte de un metro), donde fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones, debido a sus propiedades” (NNI, 2010). La nanotecnología, específicamente la fabricación y la utilización de materiales de tamaño nanométrico, ha llevado a los investigadores a analizar una variedad de aplicaciones que ellas propiciarían en la ingeniería electrónica, como elementos en las fuentes de energía, aplicaciones de los materiales, industria farmacéutica, alimenticia, agricultura, aplicaciones biomédicas, textil, entre otras (Hong *et al.*, 2013).

Como se puede evidenciar, la nanotecnología ha revolucionado muchas industrias incluyendo las de procesamiento y empaque de alimentos. Estudios realizados sobre productos de consumo concluyeron que hay disponibles más de 200 productos fabricados identificados como “nano”. Actualmente, la nanotecnología es uno de los campos científicos líderes y emergentes de mayor avance, el cual combina el conocimiento específico de diversas disciplinas, entre ellas el de la Física, Química, Biología, Medicina, Informática e Ingeniería, entre otros, y presenta un gran potencial de aplicaciones a la vida real (Logothetidis, 2012), todo esto debido a su gran versatilidad (Hong *et al.*, 2013; Magnuson, 2009).

Entre las nanoestructuras de mayor interés, por sus posibilidades de aplicación, se encuentran las de los óxidos metálicos, destacándose: el dióxido de titanio (TiO_2), óxido de cinc (ZnO), la ceria (CeO_2), el óxido de estaño (SnO_2), entre otros. Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se emplearon Nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs).

1.2.3.1 Óxido de cinc. Es un polvo blanco de masa molecular 81,4 g, poco soluble y ligeramente alcalino en agua, cuyo sólido forma cristales hexagonales y se vuelve amarillo al calentarlo a 500°C , recobrando su color blanco al enfriarse. Por calentamiento, el color del ZnO cambia debido a la volatilización del oxígeno de la red cristalina, dando origen a un compuesto no estequiométrico Zn_{1+x}O ($X \leq 70$ ppm). El punto de fusión del ZnO es de 1975°C y su densidad relativa es $5,6 \text{ g/cm}^3$. No es tóxico ni irritante y es un compuesto anfótero que se disuelve tanto en ácido, formando sales, como en bases produciendo

cincatos, productos de la reacción entre el cinc y soluciones alcalinas, y especies hidratadas del tipo $[\text{Zn}(\text{OH})_3]^-$ y $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ (Montero *et al.*, 2012). Poseen propiedades antibacterianas y actividades antifúngicas a concentraciones bajas (Sharma *et al.*, 2010; Sharma y Ghose, 2015).

1.3 MARCO HISTÓRICO

En la última década, polisacáridos como el almidón han sido empleados en la obtención de recubrimientos naturales, los cuales se han aplicado a los alimentos formando una fina capa sobre ellos la cual se constituye en una barrera semipermeable para los gases y el vapor de agua, retrasando el deterioro fisiológico normal del alimento, ayudando a mantener la integridad estructural del contenido del producto (Saavedra y Algecira, 2010). De igual forma, los biopolímeros presentan limitaciones y características no deseadas que pueden ser compensadas aplicando coberturas, surfactantes y sustancias hidrófobas o procesándolos en multicapas por coextrusión, formulando mezclas de biopolímeros con diferentes propiedades, propiciando modificaciones químicas, físicas o su combinación, incorporando nanocompuestos o buscando el equilibrio entre el conjunto de parámetros que definen la característica final del empaque (Hoyos, 2010). Actualmente, los investigadores vienen desarrollando recubrimientos naturales con el fin de reemplazar las ceras sintéticas comerciales que usualmente se emplean, incorporándole a la matriz polimérica de origen natural, entre otros: aceites esenciales, sustancias ácidas y alcalinas, extractos de plantas, materiales inorgánicos (Van Long *et al.*, 2016) para mejorar su funcionalidad, dado el creciente interés del público consumidor por esta alternativa.

Por otro lado, el estudio de materiales empleados como agentes antimicrobianos y/o antifúngicos han mostrado ser de importancia para el sector alimenticio en la elaboración de recubrimientos comestibles, a partir de hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC), usando aditivos alimentarios reconocidos generalmente como seguros (GRAS por sus siglas en inglés), entre ellos: carbonato de potasio (PC), fosfato de amonio (Aph), bicarbonato de potasio (PBC), carbonato de amonio (AC), metilparabeno de sodio (SMP), etilparabeno de

sodio (SEP) y propilparabeno de sodio (SPP). Al evaluar su actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, en tomates cereza (*Lycopersicon esculentum* L.), encontraron que los compuestos que mostraron un mayor control sobre las patologías ocasionadas por *B. cinerea* fueron: PC, APh, PBC, y AC, mientras que los parabenos de sodio fueron los más apropiados contra la mohosidad causada por *A. alternata* (Fagundes *et al.*, 2013).

De igual forma Qiu *et al.* (2014), evaluaron revestimientos con quitosano de bajo y alto peso molecular (L-quitosano y H-quitosano) para controlar el crecimiento de *Fusarium concentricum*, hongo aislado de espárragos verdes (*Asparagus officinalis* L). Los resultados de ensayos *in vitro* mostraron la capacidad del quitosano para actuar como agente conservante atractivo, debido a su actividad antifúngica, encontrándose que con una concentración de 0,05 mg/mL se evidenciaba un notable efecto sobre el crecimiento radial y la inhibición total de la germinación de esporas. En la investigación llevada a cabo por Lopes *et al.* (2014), se desarrolló una película con cinamaldehído a la que se le evaluó su actividad antimicrobiana, específicamente sobre productos de panadería, buscando la aceptación del producto por los consumidores. Se analizaron muestras de pan recubiertas con películas que contenían entre 5 y 10% peso/volumen (w/v) de cinamaldehído, encontrándose que ellas eran eficaces en la inhibición del crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos, específicamente de *Staphylococcus spp.*

En el trabajo de Arnona *et al.* (2014), se evaluó un recubrimiento bicapa comestible, con base en carboximetilcelulosa (CMC) y quitosano, con el fin de preservar la calidad pos cosecha de diversos frutos cítricos. Al comparar su comportamiento con la cera comercial, este mostró eficacia en el brillo y firmeza del fruto, pero no en la pérdida de peso. Otros estudios, usando recubrimientos, buscaban prevenir la formación de hongos tales como los *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, agentes causales de podredumbres verde y azul, respectivamente, en pos cosecha de frutos cítricos. Para ello emplearon compuestos comestibles que contenían (HPMC), componentes hidrofóbicos (cera de abejas y la goma laca), conservantes de alimentos, así como antifúngicos (sorbato de potasio (PS), benzoato de sodio (SB), propionato de sodio (SP), y sus mezclas). El ensayo se realizó infectando frutas, inoculándoles artificialmente cepas, almacenándolas por 30 días, a 5 °C. En este

estudio, Valencia *et al.* (2011), evidenciaron una reducción significativa en el desarrollo de los mohos, así como una efectiva disminución en la pérdida de peso, manteniendo firme la corteza. Estos trabajos reportaron modificación en la concentración de gas al interior de la fruta revestida, y demostraron que el tratamiento no inducía mal sabor del producto.

Investigaciones de Aloui *et al.* (2015), evaluaron la capacidad de películas, con base biológica, obtenidas del alginato de sodio (NaAlg) y de la goma de algarroba (LBG), para proteger la viabilidad de las células *Wickerhamomyces anomalus* y controlar el crecimiento de *Penicillium digitatum*. El efecto de la incorporación de células microbianas, sobre las propiedades físicas de las películas desarrolladas, se evaluó considerando sus propiedades mecánicas y ópticas, así como de barrera de gases. Además, aplicando dos matrices como recubrimientos bioactivos, ellos investigaron su eficacia en la preservación de la calidad pos cosecha de naranjas 'Valencia' y la inhibición del crecimiento de *P. digitatum* en frutos inoculados artificialmente. Sus resultados mostraron que las películas de NaAlg y LBG mantuvieron más del 85% de la población inicial de levadura *W. anomalus* y que las películas conformadas, a las que se les incorporó la levadura, inhibieron el *P. digitatum* tanto *in situ* como *in vitro*.

Igualmente, un estudio sobre la actividad antifúngica del citral contra el *Penicillium digitatum* (Fan, 2013), evaluado *in vitro* e *in vivo*, mostró que la concentración mínima inhibitoria y la concentración fungicida mínima (MFC), en el tratamiento de cera + citral (10 × MFC), disminuyó significativamente la incidencia de moho verde después de 6 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C. De igual forma, este aumentó significativamente el contenido de vitamina C, aumentando las actividades enzimáticas antioxidantes de la catalasa, el superóxido dismutasa y la peroxidasa, pero disminuyendo las actividades del polifenol oxidasa, el malonaldehído y la fenilalanina amonio liasa. El tratamiento tuvo efectos menores sobre el pH, el índice de coloración, y el total de sólidos solubles (Fan, 2013).

Por otro lado, en este momento, existe un gran interés en investigar sobre el uso de los nanomateriales como agentes antimicrobiales dado su pequeño tamaño (1-100 nm) y las novedosas estructuras que se pueden obtener, lo que podría propiciar mejoras en sus

propiedades físicas, químicas y biológicas, si se relacionan con su contraparte micrométrica (Klabunde y Richards, 2012; Manna, 2012). El desarrollo de nanomateriales, específicamente de nanopartículas con actividad antibacterial y antifúngica, ha motivado la realización de investigaciones en esta temática debido a la aparición, de manera más o menos continua y dispersa, de cepas cada vez más resistentes a los antibióticos convencionales, o a la aparición de nuevas cepas (Manna, 2012; Ram *et al.*, 2011). Concretamente, el uso de las nanopartículas inorgánicas, en lugar de los antibióticos antibacteriales y antifúngicos convencionales, presenta ventajas comparativas interesantes como su alta estabilidad a las altas temperaturas y presiones, su capacidad de resistir procesos inclementes y severos, así como su robustez y los largos tiempos de acción de su funcionalidad.

Algunos de los óxidos metálicos que se han estudiado, para determinar su actividad antibacterial y/o antifúngica, son los siguientes: TiO_2 , ZnO , MgO , CaO , CuO , Al_2O_3 , AgO y CeO_2 , bajo diferentes condiciones, pero indudablemente los que más llaman la atención son aquellos que manifiestan esta funcionalidad sin necesidad de foto-activación (CaO , MgO y ZnO , principalmente), condición que sí es requerida por el TiO_2 , el fotocatalizador por excelencia (De Azeredo, 2012). Considerando específicamente el ZnO , existen trabajos que evidencian el gran interés sobre este óxido metálico. Por ejemplo, Pasquet *et al.* (2014), investigaron la actividad antimicrobial de tres tipos de polvos comerciales de ZnO que se diferenciaban en tamaño y forma de partícula, superficie específica, porosidad y tamaño del agregado de partículas, en suspensiones acuosas. Para ello usaron cinco cepas microbiales: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, y determinaron como los parámetros estructurales característicos de las nanopartículas afectaban su actividad microbial. Los resultados mostraron que la concentración de ZnO y el tiempo de acción eran variables importantes a considerar durante el proceso y que tanto el tamaño de cristalito como la porosidad eran parámetros relevantes para justificar la eficiencia del ZnO como material antimicrobial.

Es conveniente recordar que los hongos constituyen una amplia diversidad de microorganismos eucarióticos que crecen sobre plantas o materia en descomposición;

exceptuando a los gérmenes unicelulares, muchos de los hongos existen como filamentos multicelulares. Dentro de los hongos patógenos estudiados, los que más se destacan son: *Candida albicans*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium citrinum* IFO6352, *P. expansum*, *Cladosporium cladosporioides* IFO6348, *Chaetomium globosum* IFO6347 y algunas especies de *Fusarium* (Ram *et al.*, 2011). Considerando el control e inactivación de los hongos, existe en los investigadores una gran motivación en realizar estudios sobre la actividad antifúngica de las Nanopartículas porque desean conocer la acción de ellas sobre estos fitopatógenos, determinar el mecanismo que propicia la inactivación de los hongos, sintetizar las nanopartículas más eficientes y definir la forma más adecuada de emplear y aplicar estas nanoestructuras, considerando un uso específico (Navarro, 2008). Con relación al mecanismo de acción de las nanopartículas, hay que considerar que los hongos poseen una pared la que se constituye en un sitio importante para la interacción con, y barrera para, las nanopartículas, y aún no se entiende cuál es el mecanismo que le permite a estas últimas agredir y/o pasar a través de ella. Si ellas pueden ingresar a las células, las nanopartículas podrían ocasionar alteraciones de la membrana y de otras estructuras celulares y moleculares, así como de los medios de defensa que poseen los hongos. Estos efectos dependen de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas e incluyen efectos de obstrucción, disolución de las mismas con la generación de iones y/o compuestos tóxicos, o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mecanismos que aún no han sido dilucidados totalmente (Yang y Ma, 2014).

Específicamente, la radiación solar, y de ella la componente UV, ha mostrado ser importante en la actividad antifúngica que presentan las nanopartículas de ZnO, esto debido al efecto que la radiación tiene sobre la generación de los ROS y la disolución foto-inducida (Ma *et al.*, 2014). El desarrollo de estos procesos justifican la importancia que debe tener la incidencia, sobre las nanopartículas, de irradiación con cierta longitud de onda, para favorecer la capacidad antifúngica de las mismas (Yang y Ma, 2014). Con relación a la obtención de las ZnO-NPs, y su uso como fungicida, la investigación ha estado muy activa tratando de optimizar los métodos de síntesis y en obtener un material más eficiente. (Sharma *et al.*, 2010) sintetizaron ZnO, sin y con surfactantes, y obtuvieron nanopartículas con un diámetro que variaba entre 2 y 28 nm; dependiendo de las condiciones de síntesis. Estas nanopartículas de ZnO presentaron actividad antibacteriana y antifúngica como lo

demonstraron al aplicarlas a cepas de *Fusarium sp.*, ensayo utilizado para determinar el efecto antifúngico del ZnO sintetizado.

Por otro lado, (Gunalan *et al.*, 2012) utilizaron un proceso de síntesis "verde", empleando extracto de Aloe, para obtener las ZnO-NPs. Con estas nanopartículas realizaron diferentes ensayos microbiológicos variando la concentración de las ZnO-NPs, así como el método de obtención de las mismas, por ruta "verde" o química, con un tamaño de partícula de 40 y 25 nm, respectivamente. Para el ensayo antifúngico ellos usaron cepas de *A. flavus*, *A. nidulans*, *T. harzianum*, y *R. stolonifer* y encontraron que la mayor actividad la presentaron las nanopartículas sintetizadas en el extracto de Aloe, aumentando su efectividad con el incremento de la dosis aplicado a los cultivos.

Recientemente, (Sharma y Ghose, 2015) sintetizaron ZnO-NPs a través de un método de precipitación homogéneo, sin emplear surfactante o agentes quelatantes o gelatantes. Los resultados obtenidos mostraron que las ZnO-NPs sintetizadas presentaban una buena actividad antifúngica sobre la *Candida albicans*, actividad que se incrementó al usar una mayor concentración de las mismas. Un trabajo muy interesante, para determinar la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs (70 ± 15 nm), fue el realizado por He *et al.* (2011), sobre dos hongos patógenos que aparecen frecuentemente en las frutas en la etapa pos cosecha: *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Los datos mostraron que con concentraciones mayores a 3 mmol^{-1} se inhibió significativamente el crecimiento de estos hongos y que el *P. expansum* fue más sensible al tratamiento con el ZnO. Los investigadores observaron, además, que las nanopartículas inhibían el crecimiento de la *B. cinerea* debido a que ellas afectaban sus funciones celulares, ocasionando deformaciones en las hifas del hongo. Por otro lado, en el caso del *P. expansum* las Nanopartículas impidieron el desarrollo de los conidióforos y la conodia, lo que condujo a la muerte de las hifas. Estos resultados sugieren que las nanopartículas de ZnO podrían ser usadas como un fungicida efectivo en la agricultura y en la industria alimenticia.

Finalmente, es necesario destacar que la nanotecnología también ha afectado al sector alimenticio y que está presente en diferentes etapas de la cadena alimentaria, desde la agricultura hasta el procesamiento de los alimentos, donde los nanomateriales se han incorporado como suplemento o en los empaques (Kanmani y Rhim, 2014). En estos últimos, los nanomateriales se han utilizado para mejorar sus propiedades de barrera, así como para fabricar empaques activos o inteligentes, mejorar sus propiedades como material para empaques comestibles y biodegradables, propiciar aplicaciones de rotulación (tipo nano código de barra), monitorear cambios de pH y/o detectar la presencia de otras moléculas orgánicas. Específicamente, la adición de nanopartículas a los empaques ha mejorado sus propiedades de barrera, frente a diferentes gases, propiciando propiedades antimicrobiales y de biodegradabilidad, permitiendo, además, detectar los gases presentes y obtener información sobre la calidad de los alimentos. El minimizar el crecimiento de microorganismos contaminantes, post-procesamiento del alimento, ha permitido extender el tiempo de vida media de éste y mejorar la inocuidad alimentaria.

Hay que resaltar que la mayor parte de las investigaciones se han realizado sobre empaques para alimentos y muy poco, casi nada, sobre recubrimientos (De Azeredo, 2012; Echegoyen, 2015). En el caso concreto de las películas, se viene trabajando con bio-nanocompositos, por ejemplo, usando biopolímeros (Kanmani y Rhim, 2014); en uno de los casos se empleó almidón de maíz, reforzado con talco, para obtener termoplásticos (López *et al.*, 2015) y en otro Na-montmorillonita y glicerol para afectar la biodegradabilidad de la película (Heydari *et al.*, 2013), trabajos que muestran el interés que hay en mejorar la biodegradabilidad de las películas (Zolfi *et al.* 2014). La presente propuesta de investigación busca incrementar el conocimiento que había sobre la conformación de recubrimientos naturales funcionales, propiciándoles, además, capacidad antifúngica al incorporarles nanopartículas de óxido de cinc, todo esto con el fin de mejorar el manejo pos cosecha de los frutos, concretamente de la naranja.

2. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente trabajo de grado y dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se realizaron las siguientes actividades.

2.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CINC (ZnO-NPs).

2.1.1 Materiales empleados. A continuación, se listan realizando una descripción, de marcas empleadas y su nomenclatura química.

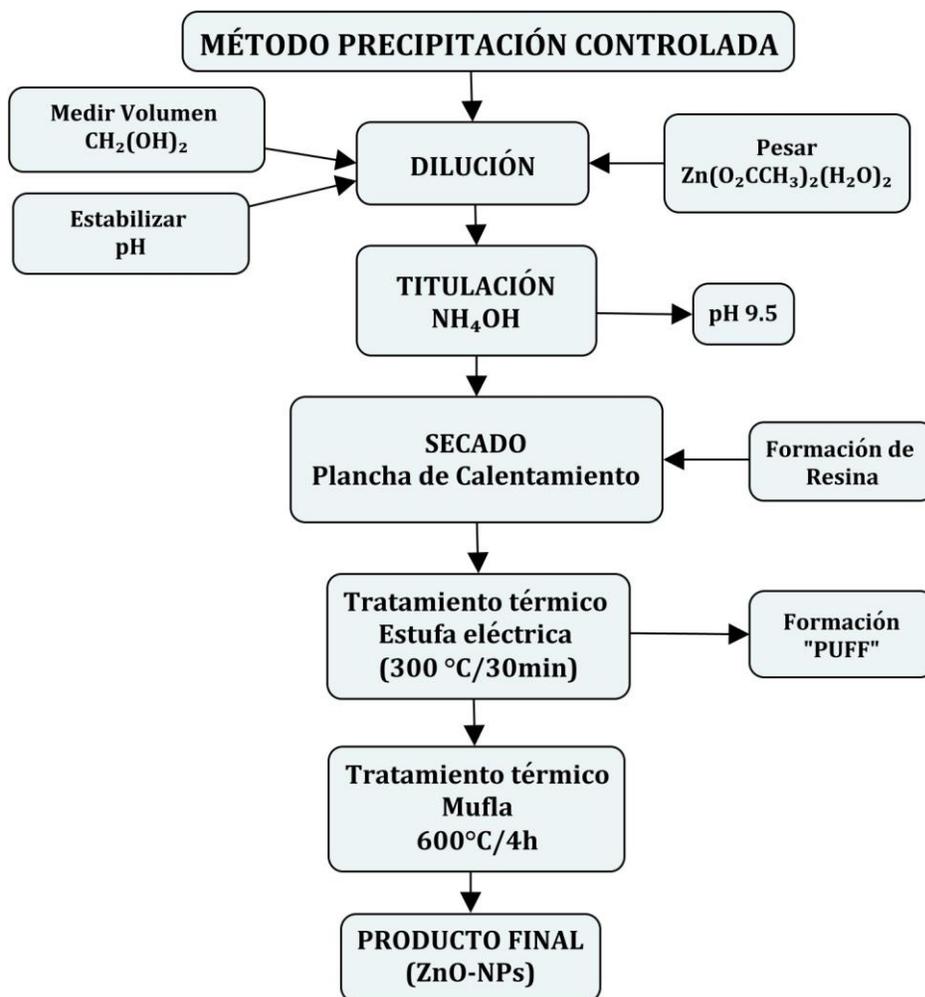
2.1.1.1 Precursor. En el proceso de síntesis química, para obtener el óxido de cinc (ZnO) a través del método precipitación controlada, se usó acetato de cinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) grado analítico (marca Merck®) como precursor.

2.1.1.2 Solvente. Se usó etilenglicol ($(\text{CH}_2)_2(\text{OH})_2$) grado analítico (marca Merck®) como solvente de síntesis, para la obtención de ZnO.

2.1.2 Método. Con el fin de garantizar el tamaño nanométrico de las ZnO-NPs y, que éstas presentaran una morfología específica, se empleó el método de síntesis denominado precipitación controlada (MPC), usando etilenglicol como solvente para disolver el acetato de cinc. Inicialmente, el acetato de cinc (13,1694 g) se disolvió en el solvente de síntesis (200 mL) al cual se le adicionó de manera controlada, agua y agente precipitante, hidróxido de amonio (Solución 25% marca Merck®), haciendo uso del Titrino (dosificador) SET/MET 702 Metrohm; el sensor de este equipo permitió leer, en forma automática, la valoración de la solución presente, teniendo como criterio parada el control de pH/mV. El modo de trabajo utilizado fue el de valoración monótona con incrementos de volumen seleccionables - MET. Las adiciones sucesivas se realizaron permitiéndole al sistema alcanzar, después de cada

suministro, un valor de pH constante, pH de “equilibrio” para el correspondiente volumen de NH_4OH adicionado, acción que podría durar unos pocos segundos inclusive minutos. Este proceso se realizó hasta alcanzar en el sistema un pH de 9,5. El sólido que se formó en el seno de la solución se secó, calentándolo suavemente en una plancha de calentamiento con agitación constante; posteriormente, la “resina” que se formó se colocó en un horno eléctrico a $300\text{ }^\circ\text{C}$ hasta obtener un sólido seco, el cual, se maceró y se dispuso en un crisol para finalmente calcinarlo a $600\text{ }^\circ\text{C}$, por 4 horas, para obtener el ZnO. En la figura 1 se indican las diferentes etapas del proceso de síntesis utilizado para obtener las nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs)

Figura 1. Esquema del proceso de síntesis de óxido de cinc, usando el método de precipitación controlada MPC.



2.1.3 Caracterización de las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs). Para la caracterización de las ZnO-NPs se emplearon las técnicas que se indican a continuación.

2.1.3.1 Espectroscopia infrarroja (FT-IR). Para obtener los espectros de los sólidos de interés se empleó el equipo Infrarrojo IR 200 FT-IR Spectrometer Thermo que permitió identificar los grupos funcionales presentes en el material, revelando la presencia de las bandas características del ZnO asociadas a los grupos funcionales Zn-O y Zn-OH, principalmente, también se evidenció la presencia o no de materia orgánica proveniente del precursor o solvente. Para ello se preparó una mezcla de bromuro de potasio (KBr marca Merck®) seco y de la muestra de interés, en una relación aproximada 10 a 1, la cual se prensó obteniéndose una pastilla que se colocó en el porta muestra del espectrofotómetro para registrar su espectro, en el rango entre 400 y 4000 cm^{-1} . La técnica se basa en registrar el espectro de absorción de un haz de luz, en el rango espectral del infrarrojo, que atraviesa la muestra a analizar. El equipo registra el valor de la longitud de onda, realmente el del número de onda (cm^{-1}), donde se presenta la resonancia de los modos normales de vibración característicos de los grupos funcionales, o enlaces, presentes en el sólido en estudio. Esta operación se realiza en un rango de longitudes de onda de interés (Martínez *et al.*, 2011), normalmente entre 400 y 4000 cm^{-1} . (Lepot *et al.*, 2007)

2.1.3.2 Espectroscopia Raman. Esta técnica fotónica de alta resolución proporciona información química y estructural de las muestras, de los modos vibracionales. Se basa en el examen de la luz dispersada por el material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz incidente es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. Es una técnica vibracional de caracterización que complementa la información obtenida de la espectroscopia IR, permite, además, obtener información de los defectos que existen en el material.

2.1.3.3 Difracción de Rayos X (DRX): Se realizó para determinar las fases cristalinas presentes en los polvos cerámicos sintetizados. En esta técnica, la muestra en polvo se

colocó en el portamuestra sobre una superficie plana de vidrio, ejerciendo la presión adecuadamente hasta compactarla, y se expuso, posteriormente, a la acción de los rayos x que emitía una fuente de Cu ($K_{\alpha} = 1.542 \text{ \AA}$); se registró el difractograma entre 10 y 70° utilizando un difractómetro de Rayos-X PANalytical X'Pert PRO. Esta técnica hace uso del efecto de difracción propiciado por la estructura cristalina que presenta el material a estudiar, considerando la validez de la ley de Bragg para describir este tipo de fenómeno ($n\lambda = 2d \sin\theta$ donde “n” es el orden de la difracción, “ λ ” la longitud de los rayos x utilizados, “d” el espaciamiento entre los planos cristalinos de la estructura y “ θ ” el valor del ángulo de difracción). (Mazuelas, 2002)

2.1.3.4 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET). Se utilizó para determinar el tamaño y la morfología de las partículas sintetizadas, empleando el Microscopio electrónico de transmisión JEOL Modelo JEM 1200EX que permitió determinar el efecto de los parámetros de síntesis, sobre el tamaño y morfología de las partículas ZnO sintetizado, así como sobre su estado de aglomeración. Para obtener la muestra a analizar, el sólido se dispersó en etanol, con ayuda de ultrasonido, y se depositó, una cantidad muy pequeña de esta, en una rejilla de cobre a la que, previamente, se le ha depositado una película Forvmar. Después de secar la muestra, ésta se ubicó en la cámara porta muestra del microscopio electrónico y se procedió a observar de manera directa la misma, alcanzándose una extraordinaria amplificación de la muestra. Las imágenes obtenidas se llevaron a un sistema de análisis de imágenes que permitió analizarlas y reproducirlas de manera digital. Esta técnica de caracterización hace uso de un haz de electrones, producido por un cátodo caliente, que es acelerado y colimado por campos eléctricos y magnéticos para que incida sobre la muestra a analizar. Considerando la dualidad onda – partícula y la interacción de los electrones incidentes con la muestra, se obtienen imágenes de la misma (Hwang y Wu, 2004)

2.1.3.5 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB). Se evaluó el tamaño y morfología de las partículas sintetizadas, así como su estado de aglomeración. Las muestras se adhirieron a una cinta de carbono y luego se realizó un metalizado superficial con oro (equipo Denton Vacuum Modelo Desk IV), con el fin de generar una superficie que fuera conductora para

evitar que las muestras semiconductoras adquirieran carga eléctrica. Posteriormente, se realizó la inspección a la muestra usando un microscopio JEOL Modelo JSM 6490 LV, en el modo de electrones secundarios, empleando un voltaje de aceleración de los electrones de 20kV. Las magnificaciones a las cuales se tomaron las imágenes fueron 15000X y 25000X. Adicionalmente, se realizó el microanálisis químico elemental de varias áreas de inspección de la muestra, por medio de la sonda EDS de Oxford Instrument Modelo INCAPentaFETx3. La base del funcionamiento del MEB es similar a la del MET, con una menor resolución, pero, además, hace uso de los rayos x emitidos por los elementos que constituyen la muestra, debido a la interacción de los electrones con la misma, para realizar el microanálisis elemental a través de la sonda EDS. (Renau-Piqueras y Faura, 1994)

2.1.3.6 Espectroscopia de absorción UV-VIS. Para determinar las transiciones electrónicas que se presentarían el ZnO sintetizado debido a la excitación de los electrones ubicados en la banda de valencia o en los estados energéticos localizados en el gap, asociados a los defectos estructurales, a la banda de conducción del material, se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS marca Shimadzu, modelo UV2100 de doble haz, con software de adquisición de datos y calibrado UVPC, empleando una cubeta de cuarzo de paso óptico de un 1cm sobre la muestra en solución. La espectroscopia UV-Visible se fundamenta en la absorción electrónica de la radiación electromagnética cuando ésta interacciona con la materia en el entorno de longitudes de onda entre 190 nm y 800 nm. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano. En esta región del espectro electromagnético, las moléculas experimentan transiciones electrónicas, desde el estado basal al estado excitado. (Talam *et al.*, 2012)

2.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ZnO-NPs

2.2.1 Equipos empleados para realizar los ensayos. A continuación, se listan haciendo una breve descripción en el uso específico de su funcionalidad.

2.2.1.1 Autoclave NAPCO 9000. Este equipo ayudó a eliminar, de forma confiable, microorganismos que pudieron estar presentes en los objetos que se utilizaron en las actividades de diagnóstico, tratamiento y evaluación. El autoclave se empleó para esterilizar, actividad que permitió a través de procedimientos físicos, químicos o gaseosos la destrucción o eliminación de toda forma de vida microbiana presente en objetos inanimados, incluyendo esporas.

2.2.1.2 Cámara de flujo laminar LACONCO PURFIER VERTICAL CLEAN BENCH. Este equipo en acero inoxidable de forma prismática, con una única cara libre (la frontal) la cual daba acceso a su interior, fue donde se localizó la superficie de trabajo que siempre permaneció limpio y estéril. En el recinto había un ventilador que forzó el paso de aire y de todas las partículas que este contenía a través de un filtro HEPA (High Efficiency Particle Arresting), proporcionando aire limpio a la zona de trabajo, Además, se usó una lámpara UV (200-280 nm) para eliminar los microorganismos, afectando su material genético debido a un proceso de fotólisis lo que impidió la división celular y por tanto su crecimiento. Todas estas acciones se realizaron con el fin de mantener el área de trabajo libre de partículas (estado aséptico), especialmente de posibles contaminantes (bacterias u hongos), que pudieran acceder al cultivo vegetal.

2.2.1.3 Horno MEMMERT. Este equipo brindó las condiciones de temperatura, atmósfera y humedad controladas que permitieron conservar organismos vivos en un entorno adecuado, favoreciendo su crecimiento.

2.2.2 Metodología *in vitro* para determinar la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs. Para la evaluación de la actividad antifúngica de ZnO-NPs, considerando su acción sobre los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, a través de la siguiente metodología.

2.2.2.1 Aislamiento del hongo a partir de una naranja afectada. Se escogió una naranja de la variedad Valencia con la afección fúngica correspondiente y se lavó con una solución

de hipoclorito al 0,5 %. De diferentes partes de la naranja afectada, se tomaron cuadrados de 3 mm de espesor, teniendo cuidado de cortar la parte afectada del tejido por *Penicillium digitatum* o por *Penicillium italicum* y parte sana. Cada uno de éstos cortes se colocó en una caja de Petri y se le adicionó hipoclorito al 0,5 %, permitiendo que este actuara durante un minuto, luego se enjuagó con agua destilada; el proceso se realizó por triplicado. Posteriormente, se preparó Patata Dextrosa Agar (PDA), se autoclavó a una temperatura de ± 121 °C, por 30 minutos, y se sirvió en cajas de Petri (15 mL/caja).

Después de gelificado el medio, se realizó la siembra de las muestras obtenidas, actividad que se realizó en el interior de una campana extractora, en medio estéril, para, finalmente incubarlas hasta el crecimiento puro de los hongos objetos del estudio (figura 2).

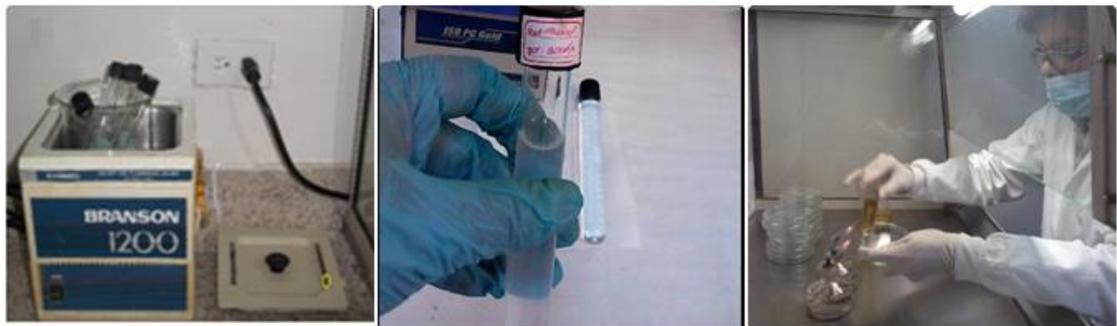
Figura 2. Proceso de aislamiento de *P. digitatum* y *P. italicum*



2.2.2.2 Método de recuento de esporas. Para obtener los patrones de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* a utilizar en los ensayos, se tomó una caja de Petri de cultivo de 7 días de incubación a la cual se le removieron las esporas con la ayuda de un asa redonda. Posteriormente, éstas se depositaron en un Erlenmeyer de 100 mL de volumen que contenía una solución de agua destilada esterilizada (ADE) y Tween 80® al 0,1 %. De esta forma se preparó la solución madre de la cual se tomaron 4 submuestras de 1 mL y se depositaron en tubos de ensayo, con 9 ml de ADE, obteniéndose así la dilución 10^{-1} de cultivo fúngico.

Este procedimiento se repitió llevando 1 mL de esta dilución (10^{-1}) a tubos con 9 mL de ADE para obtener la dilución 10^{-2} ; nuevamente se repitió este proceso indicado para obtener la dilución 10^{-3} que fue a la que se le realizó el conteo de esporas para determinar el número de esporas por mililitro de suspensión. Para el recuento de esporas se utilizó la cámara de Neubauer, para lo cual se sumó el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. Para cada submuestra se realizó este procedimiento por triplicado para obtener un total de seis lecturas. La concentración de esporas se calculó multiplicando el promedio del número de esporas, obtenido del recuento, por el inverso de la dilución empleada para el conteo (Vélez *et al.*, 1997). En la figura 3 se muestran los elementos utilizados para obtener las diluciones y realizar el conteo de esporas.

Figura 3. Proceso de recuento de esporas.



2.2.2.3 Viabilidad de las esporas de los hongos estudiados. Para establecer la viabilidad del hongo, considerando el estimativo de número de esporas, se calculó la cantidad de esporas viables, de una formulación, por unidad de volumen. Este estimativo se realizó con cada una de las cuatro submuestras preparadas, para determinar la concentración de esporas, realizando el siguiente procedimiento. Se prepararon en cajas de Petri 10 mL de agar-agua al 1,5 %, sin acidificar. De la disolución 10^{-3} , de cada submuestra preparada en la prueba anterior y previamente agitada, se tomaron 5 μ L para depositar en las cajas de Petri, a razón de 5 alícuotas por caja de Petri inoculadas, y luego se incubaron a 25 ± 2 °C durante 24 horas. Previamente, en la superficie externa inferior de la caja, se marcaron 5 puntos para indicar los lugares en donde se depositaron las alícuotas que contenían las esporas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó una gota de azul de lactofenol en los lugares donde se depositó cada alícuota, esto con el propósito de detener la germinación y a la vez teñir las esporas del hongo; luego se cortaron las zonas donde se depositaron las alícuotas y los cortes se depositaron sobre una lámina portaobjetos, cubriéndolos con una laminilla. Estas muestras se observaron utilizando el objetivo 40X del microscopio óptico, contando un mínimo de 100 esporas (registrando germinadas y no germinadas) por alícuota. Con los datos obtenidos en las cuatro submuestras, se calculó el porcentaje de germinación teniendo presente que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85%, para un tiempo de incubación de 24 horas (Vélez *et al.*, 1997). En la figura 4 se muestra el microscopio utilizado para observar las muestras de los hongos sembrados y una de las fotografías obtenidas de este estudio.

Figura 4. Viabilidad de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.



2.2.2.4 Determinación de la capacidad antifúngica. El objetivo de este ensayo es establecer, de forma cuantitativa, el efecto de las ZnO-NPs sintetizadas en este trabajo, sobre las cepas de los hongos de interés (*Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*), aislados de los procesos infecciosos que ocurren en la Naranja. El método se basa en el análisis de la relación que se puede establecer entre la cantidad de sustancia aplicada al sistema, para inhibir el crecimiento de una cepa fúngica, y el área de crecimiento del hongo (Bauer *et al.*, 1966; Cantón *et al.*, 2000). Para determinar esta relación se sembró, sobre la superficie de una caja de Petri con medio de cultivo, una alícuota de 10 μ L de concentración conocida (determinada en el recuento de esporas) viable de esporas de *Penicillium*

digitatum y *Penicillium italicum*. El medio de cultivo se preparó con Patata Dextrosa Agar (PDA) y se le adicionaron diferentes cantidades de óxido de cinc (0 mg L^{-1} , 244 mg L^{-1} , 488 mg L^{-1} , 732 mg L^{-1} y 976 mg L^{-1}) correspondientes a los tratamientos TZ3, TZ6, TZ9 Y TZ12 respectivamente, y así determinar, si ellas presentaban efecto antifúngico, el tratamiento óptimo inhibitorio (Ramírez y Castaño, 2009).

Figura 5. Preparación de medios de cultivo PDA con ZnO.



Para conocer la evolución de los cultivos en estudio, se tomó un registro fotográfico diario de las cajas de Petri usando el sistema "Nis Elements" y se midió el área de crecimiento del hongo con el sistema de análisis "Image pro Analyzer", hasta completar un total de 10 días de observación; esta metodología permitió comparar el comportamiento del hongo frente a la acción de los diferentes tratamientos con contenido de nanopartículas de ZnO adicionadas al medio cultivo.

2.3 PREPARACIÓN DEL RECUBRIMIENTO.

2.3.1 Equipos empleados para realizar los ensayos. A continuación, se listan haciendo una breve descripción en el uso específico de su funcionalidad.

2.3.1.1 Ultrasonido. Este equipo se utilizó para evitar la aglomeración de las nanopartículas en la matriz polimérica empleada para el recubrimiento, haciendo uso de ondas de ultrasonido producidas por un sistema mecánico que convierte en vibraciones de alta intensidad una corriente eléctrica aplicada (fig. 6.A.). En la solución líquida, sometida a la acción del equipo de ultrasonido, se generan burbujas microscópicas, las cuales sufren rapidísimos procesos de expansión y colapso transmitiendo esta energía a otros materiales.

2.3.1.2 HL2. Este equipo posee dos sistemas de control, el primero es un sistema de calentamiento a través de enchaquetamiento de dos recipientes donde se produce transferencia de calor por conducción, el primer recipiente contiene agua caliente, regulada por termocupla, el segundo recipiente contiene los materiales que serán procesados. El siguiente sistema, es el de agitación, su función es mezclar los materiales del segundo recipiente, para ello emplea dos aspas de diferente tamaño que giran en contrasentido, el más pequeño en forma espiral evita que el material se sedimente y el aspa grande en forma de W (fig. 6.B.) evita las turbulencias, tras el cierre a presión del equipo en la parte superior se encuentra el motor y el procesador donde se introducen los parámetros de control (temperatura y velocidad de agitación).

2.3.1.3 Aspersor Autojet Modular Spray System 1550⁺. Este equipo emplea una bomba neumática de doble diafragma que regula el paso de la presión del sistema aire / líquido; a través de una boquilla permite bañar con la solución del recubrimiento el material a tratar (Naranja Valencia). El parámetro empleado fue para la presión de líquido 30 bar en un tiempo de 2min, y presión de aire 40 bar.

2.3.2 Metodología empleada para obtener el recubrimiento. Las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) sintetizadas se dispersaron en agua destilada, en diferentes cantidades (determinadas por la concentración óptima de inhibición), empleando agitación y ultrasonido para alcanzar una suspensión homogénea en el medio. Esta dispersión se utilizó para preparar una suspensión de almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*), variedad SM 707-17 modificado por vía enzimática 13% equivalente dextrosa (Bonilla,

2010) la cual se le adicionó un plastificante, glicerol Blamis Dotaciones® grado analítico, para propiciar la gelatinización de la mezcla de almidón, a condiciones de temperatura y agitación controladas, empleando la metodología establecida por Paz, (2014).

Figura 6. Equipo empleado en la elaboración del recubrimiento.



2.4 METODOLOGÍA *in vivo*.

2.4.1 Material vegetal. Para realizar el ensayo se emplearon frutos tipo naranja Valencia, provenientes de la zona de producción cítrica del Departamento del Cauca, con los siguientes parámetros técnicos: Fruto entero, sano, limpio, libre de podredumbre o deterioro, con un requisito de madurez de acuerdo a la norma NTC 4086 color 3, calibre C (72-83 mm de diámetro) y exento de materia extraña visible (plagas y daños causados por ellas), así como de olor y/o sabor extraños, de daños causados por bajas y/o altas temperaturas, de indicios de resequeidad interna y de magulladuras y/o amplias cicatrizaciones por cortes en la cáscara (Códex Stan 245, 2005; ICONTEC, 2003).

2.4.2 Método. Los frutos, que cumplían los requisitos técnicos indicados previamente, se lavaron y desinfectaron en un tren de lavado Marca Javar 360-2, esta máquina permitió una limpieza y desinfección eficaz de las naranjas, ya que su acción propició al fruto lavado (aspersión e inmersión) y cepillado, usando agua potable y desinfectantes TEGO 51® y CITROSAN®. Posteriormente se inocularon los hongos a los frutos a evaluar, tomando los correspondientes referentes (Testigos) para realizar el control absoluto. Las condiciones de manipulación y preparación de los inóculos de esporas en suspensión, para ambos patógenos, se realizaron considerando los tratamientos previamente establecidos en la prueba *in vitro*. Para el presente caso, se realizó una herida en la zona ecuatorial del fruto (sin perforar la pulpa, para simular la condición natural), de 1,5 mm de profundidad y un 0,5 mm de diámetro, para inocular allí el patógeno, usando para ello una micropipeta. Se inoculó una alícuota 20 µL de suspensión, a una concentración de 9.0×10^6 esporas/mL, y después se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente (Álvarez, 2012).

Los frutos con un día de exposición a los patógenos inoculados, se cubrieron con el recubrimiento que contenía las ZnO-NPs sintetizadas, en la dilución correspondiente, empleando aspersión automática; posteriormente se acondicionaron, simulando condiciones comerciales de almacenamiento (Comercialización directa: de una a dos semanas, temperatura ambiente, las cajas se dejaron, en promedio a 23 °C) (Viuda-Martos *et al.*, 2008) para su evaluación temporal. En la figura 7 se muestra el acondicionamiento de las naranjas que se recubrieron, con el material que contenían las ZnO-NPs, para realizar el ensayo de capacidad antifúngica *in vivo*.

Figura 7. Etapas de acondicionamiento de la naranja a evaluar para seguimiento *in vivo*. A. Limpieza y desinfección, B. Inoculación, C. Aspersión y D. Disposición en góndola.

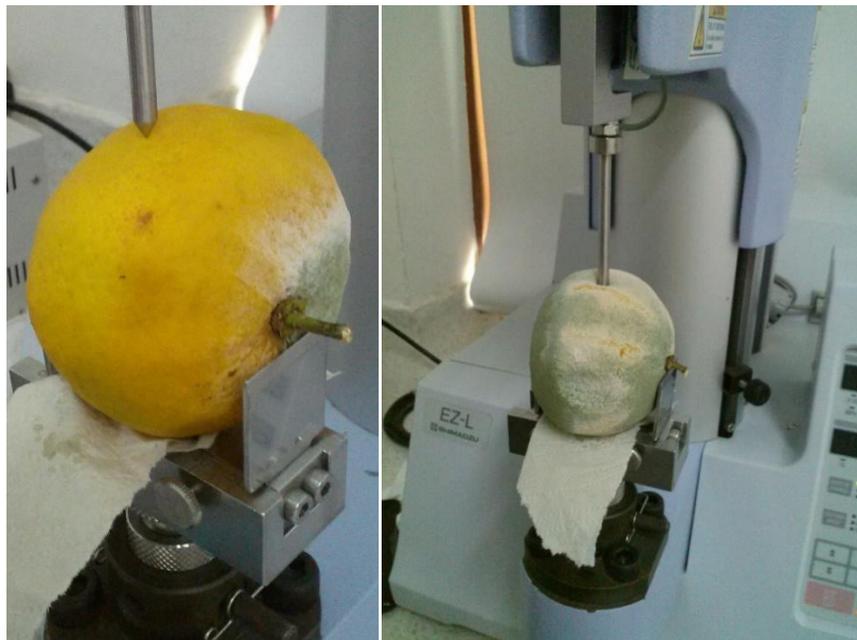


2.5 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y PARÁMETROS POS COSECHA DE LA NARANJA VALENCIA (*Citrus sinensis*).

Para la caracterización fisiológica y la evaluación de los parámetros pos cosecha, de los frutos que contenían el recubrimiento con tratamiento (ZnO-NPs) y patógeno, y recubrimiento sólo y patógeno se usaron las técnicas normalmente empleadas, las cuales se indican a continuación, señalando la información que se obtuvo con cada una de ellas.

2.5.1 Firmeza. Este parámetro se determinó usando la Máquina universal de ensayos marca *SHIMADZU*, referencia EZ-L. La metodología que se utilizó, para medir la firmeza de las naranjas, se estandarizó en el laboratorio de Reología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, mediante ensayos que se realizaron directamente sobre la zona ecuatorial del fruto (Figura 8.), a una velocidad de celda de 5 mm/min. En ella se mide el módulo elástico (la fuerza de impacto en función de la masa y del radio de curvatura del fruto, limitada por la velocidad del fruto en caída libre y el punto de impacto donde no se puede controlar)

Figura 8. Esquema que ilustra la medición de la firmeza a las naranjas en estudio.



2.5.2 Pérdida de peso. Se determinó empleando una balanza de mesa, tomando los frutos que se pesaron del muestreo que previamente se dispuso para estos ensayos. Esta información se registró, a lo largo de 15 días, para todos los tratamientos de los frutos empleados. La pérdida de peso se determinó aplicando la siguiente expresión (Barco, 2011)

(Ec. 1)

$$PP = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

donde:

PP = Pérdida de peso promedio

P_i = Peso inicial

P_f = Peso final

2.5.3 Tasa de respiración. Este parámetro se evaluó cada dos días a la misma hora, durante dos semanas; se realizaron mediciones de producción de dióxido de carbono, para ello se adecuaron los frutos en parejas con los tratamientos en bolsas plásticas, extrayendo la mayor parte de aire dentro de las mismas y sellándolas verificando condiciones óptimas del empaque (Específicamente que no presentará perforaciones) (fig. 9A), luego se dispuso una almohadilla sobre el empaque, permitiendo que el equipo empleando el Oxybaby® (Referencia OXYBABY 6.0 O₂/CO₂) a través del punzón espira, por una pequeña bomba incorporada, una cantidad de muestra de gas, realizando una comparación con valores grabados previamente como patrones de referencia; conduciéndola hacia la célula dióxido de carbono, la medida del CO₂ se realizó con base en el principio de absorción de infrarrojo. A través del análisis de los datos se puede establecer el día donde el fruto alcanza su madurez máxima y empieza el proceso de senescencia.

2.5.4 Sólidos solubles totales. Para evaluar este parámetro, se tomaron muestras de las naranjas empleadas en la prueba de firmeza, las cuales se procesaron usando un extractor para obtener una muestra líquida y de la cual se tomó una alícuota que se dispuso en el prisma del refractómetro digital ATAGO para tomar de él la lectura de grados Brix (fig. 9.B.).

Figura 9. Evaluación de los parámetros fisiológicos de la naranja Valencia a diferentes tratamientos. A. Tasa de respiración, B. Sólidos solubles



2.5.5 Acidez titulable. Usando la muestra líquida de jugo extraído al fruto, este parámetro se determinó empleando titulación potenciométrica y se expresó como porcentaje de ácido cítrico (fig. 10.A.). El cálculo del mismo se realizó empleando la siguiente expresión:

(Ec. 2)

$$\% \text{ Ácido cítrico} = \frac{V_1 * N}{V_2} * K * 100$$

donde:

V_1 = Volumen de NaOH consumido en mL

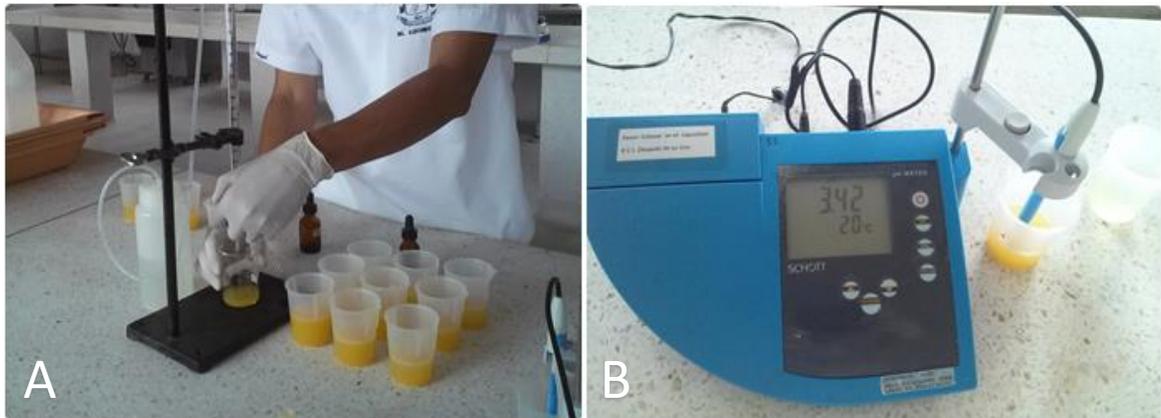
V_2 = Volumen de la muestra (10 mL)

K = peso equivalente del ácido cítrico (0.064 g/meq)

N = Normalidad del NaOH (0.1 meq/mL)

2.5.6 Potencial de hidrógeno pH. Del jugo extraído, para determinar el parámetro anterior, se tomó un volumen de 10 mL y se introdujo en el electrodo del pH-metro SELECTA pH-2006 para obtener el valor de pH del mismo (fig. 10.B)

Figura 10. Evaluación de los parámetros fisiológicos de la naranja Valencia a diferentes tratamientos. A. Acidez titulable y B. pH.



2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para evaluar los atributos de tipo interactivo de los componentes de la matriz, se empleó, un diseño factorial con 3 factores (tratamiento a aplicar, hongo y tiempo) y seis niveles (Cuadro 1) para un total de 8 tratamientos por día. Los valores de los niveles se establecieron según los estudios preliminares y consultas bibliográficas sobre trabajos previos (Achipiz, 2012; Zúñiga y Ordoñez, 2013; Paz, 2014) llevados a cabo con almidón de yuca y ZnO, en los cuales se evaluó el comportamiento del recubrimiento frente a características reológicas y fisiológicas y, con base en estos datos se realizó el ajuste de parámetros para llevar a cabo la caracterización fúngica.

Mediante el software Minitab 16 se realizó el análisis de varianza ($p < 0,05$) para establecer la influencia de los factores y prueba de promedios de Duncan en el caso de existir diferencias significativas en los tratamientos para definir el mejor tratamiento.

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos.

FACTORES	NIVELES	VARIABLE DE RESPUESTA
TRATAMIENTO	Testigo	CAPACIDAD ANTIFÚNGICA ESTABILIDAD FISIOLÓGICA DEL FRUTO ESTABILIDAD DEL EFECTO EN EL TIEMPO
	TZ0	
	TZA	
	TZB	
HONGO	<i>P. digitatum</i>	ESTABILIDAD DEL EFECTO EN EL TIEMPO
	<i>P. italicum</i>	
TIEMPO	Días	

Testigo = Fruto con afección fúngica sin recubrimiento

TZ0 = Fruto con afección fúngica con recubrimiento sin incorporación de ZnO–NPs.

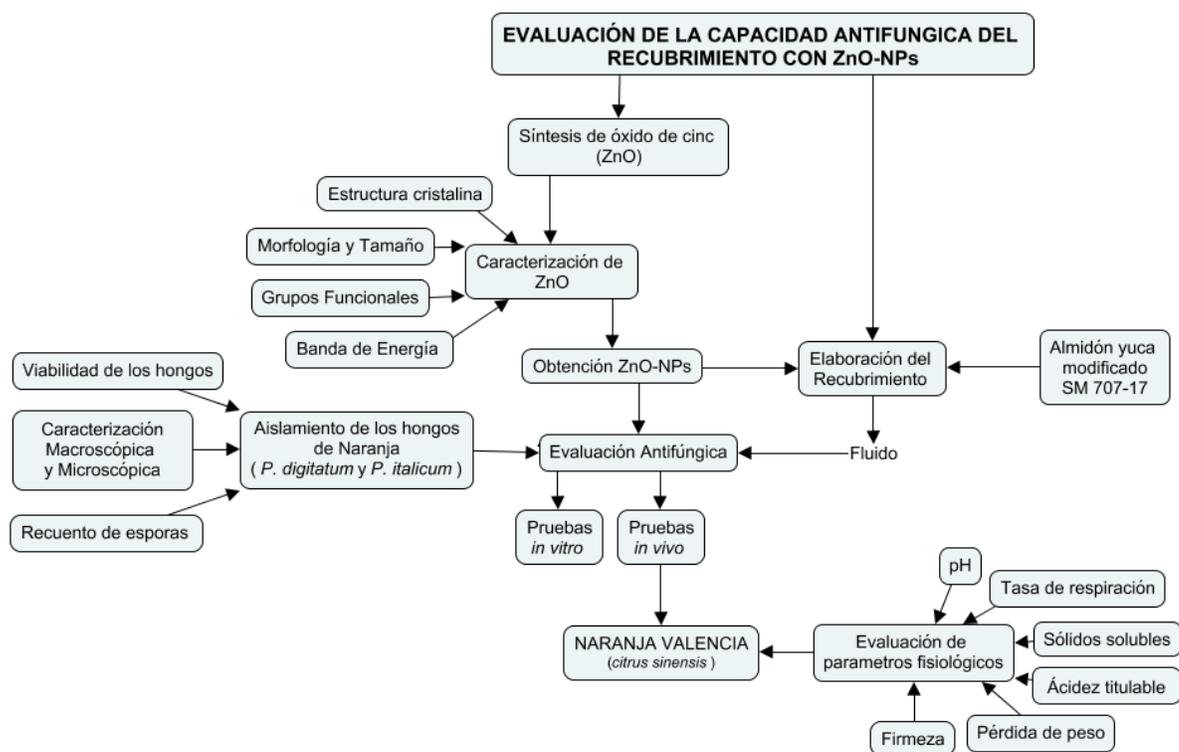
TZA = Fruto con afección fúngica con recubrimiento incorporado una cantidad de ZnO–NPs de los tratamientos *in vitro* con mayor capacidad inhibitoria. (A cambia por la del tratamiento)

TZB = Fruto con afección fúngica con recubrimiento incorporado una cantidad de ZnO–NPs de los tratamientos *in vitro* con mayor capacidad inhibitoria. (B cambia por la del tratamiento)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando las diferentes actividades experimentales realizadas (ver fig. 11) con el fin de analizar las características, propiedades y funcionalidades obtenidas en la elaboración del recubrimiento antifúngico, con la incorporación de óxido de cinc nanoparticulado, a continuación, se presentan los resultados más relevantes obtenidos con el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Figura 11. Diagrama de flujo de las diferentes actividades experimentales realizadas para obtener los resultados que se indican en este documento.



3.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CINC (ZnO-NPs)

Con el fin de obtener un material de alta pureza química y con propiedades fisicoquímicas pre-definidas, se siguió el proceso de síntesis denominado precipitación controlada MPC (Montero *et al.*, 2012), al cual se le realizó una modificación (la etapa de filtrado se eliminó y se continuó calentando hasta lograr una resina, la cual se llevó a tratamiento térmico en horno eléctrico a 300 °C/ 30min), favoreciendo la disminución en el tiempo empleado para la ejecución del proceso y, alcanzando un rendimiento del 95% del producto final (ZnO). Indudablemente, el mayor interés en modificar la metodología, para obtener el ZnO, era determinar los posibles efectos que ella podría generar sobre las características finales del producto obtenido: grupos funcionales presentes, morfología y tamaño de la partícula, estructura cristalina, defectos estructurales y demás propiedades fisicoquímicas del ZnO sintetizado

Figura 12. Registro fotográfico de las etapas realizadas en el proceso de síntesis de óxido de cinc a través de la metodología modificada MPC.



3.1.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros de infrarrojo se tomaron a muestras sólidas sintetizadas tratadas térmicamente a 300 °C/30min y a 600 °C/4h (fig. 13), estos presentaron zonas comunes, como la región entre ~3443 y 3432 cm^{-1} donde se encuentran las bandas típicas asociadas al agua, presente en la muestra, y específicamente a los modos vibracionales de tensión de los grupos funcionales hidroxilos (OH^-) (Gharagozlou y Naghibi, 2016). Aparecen otras bandas alrededor de los 2924 cm^{-1} asociada a grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$, tensión del grupo metilo, por ejemplo, y una pequeña a ~2379 y 2366 cm^{-1} que correspondería al CO_2 adsorbido por el sólido del medio ambiente.

La banda próxima a 1625 también se puede asociar al agua (modo vibracional de flexión) y la ubicada a ~1383 cm^{-1} se podría asociarse a algún grupo carbonato exista en la superficie de la muestra, así como las bandas débiles que aparecen entre ~1047 y 1027 cm^{-1} . La banda intensa a 446 cm^{-1} corresponde al modo vibracional del enlace Zn–O del óxido de cinc (Gharagozlou y Naghibi, 2016). Como se puede observar en la figura 13, es muy poca la presencia de fase orgánica en la muestra por lo que se puede considerar que es el ZnO la fase predominante en las muestras, sobre todo en la muestra calcinada a 600 °C/4h.

En la tabla 1 se indica la asignación de grupos funcionales a las bandas que aparecen en los espectros IR correspondientes a muestras sólidas obtenidas durante el proceso de síntesis. Para obtener una mayor información de los espectros IR, concretamente de la región donde se ubican las bandas asociadas a los enlaces que forma el Zn con el oxígeno y el OH, se realizó deconvolución del espectro IR de la muestra tratada térmicamente a 600 °C, en la zona del espectro comprendida entre 650 ~ 370 cm^{-1} .

Figura 13. Espectros de Infrarrojo (FTIR) correspondientes a muestras sólidas extraídas del sistema durante la etapa de secado (pre-calcinado a 300 °C/30 min) y tratada térmicamente a 600°C/4 h (ZnO–NPs).

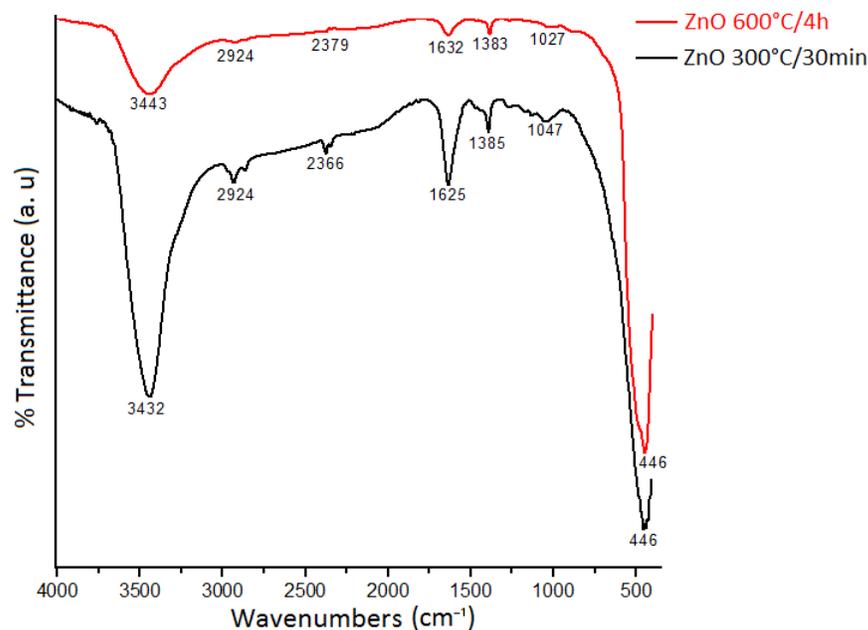


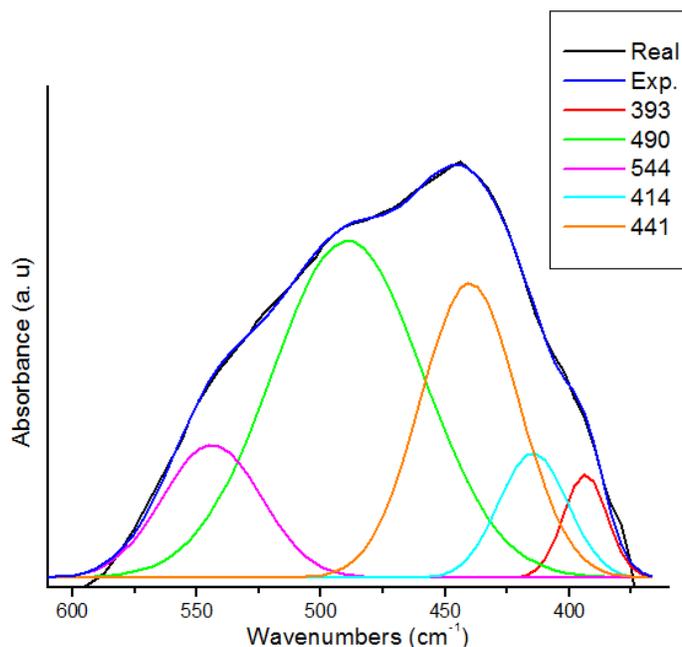
Tabla 1. Asignación de grupos funcionales a las bandas presentes en los espectros IR obtenidos de muestras extraídas durante el proceso de síntesis del ZnO, a diferentes temperaturas.

Muestra	Banda IR (cm ⁻¹)	Intensidad H: Alta, M: Media, L: Baja	Asignación
Pre-Calcinado	3432	H	δ(O–H)
	2924	L	δ(C–H)
	2366	L	δ(C–H)
	1625	M	δ(C=O), δ(O–H)
	1385	L	δ(C–H)
	1047	L	δ(C–H)
	446	H	δ(Zn–O)
ZnO–NPs	3443	M	δ(O–H)
	2924	L	δ(C–H)
	2379	L	δ(C–H)
	1632	L	δ(C=O), δ(O–H)
	1383	L	δ(C–H)
	1027	L	δ(C–H)
	446	H	δ(Zn–O)

Referencia ZnO “bulk” (Gharagozlou y Naghibi, 2016)

Como se puede observar en la deconvolución (fig. 14) las bandas predominantes son las del enlace Zn-O, a 490 cm^{-1} y 441 cm^{-1} . Este resultado indica que el tratamiento térmico y la adición de hidróxido de amonio, favoreció la consolidación del enlace Zn-O y por lo tanto la predominancia del ZnO en esta muestra sólida como única fase.

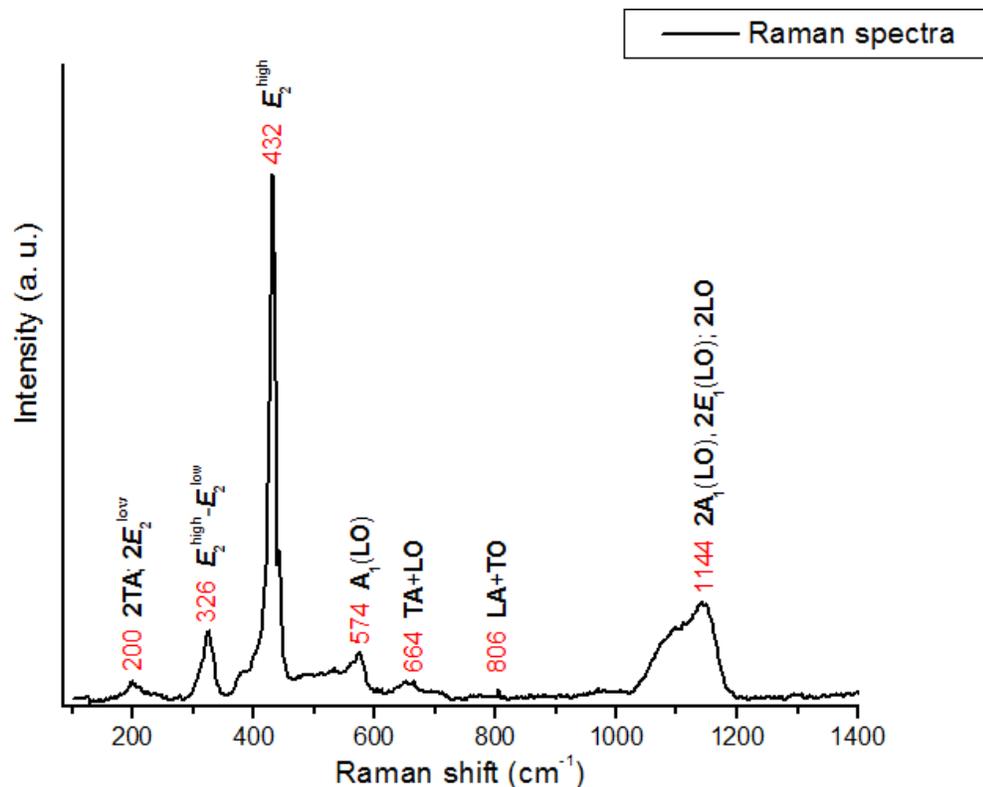
Figura 14. Deconvolución del espectro IR, entre $600 \sim 370\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la muestra sólida sintetizada y tratada térmicamente a 600 °C durante 4 horas.



3.1.2 Espectroscopia Raman. El espectro Raman tomado a la muestra de ZnO tratada térmicamente a 600 °C , por 4 horas, en el rango entre $100 \sim 1400\text{ cm}^{-1}$ se muestra en la figura 15. En el espectro se observan siete modos normales vibracionales activos en Raman, que coinciden con los reportados en la literatura por otros autores (Calleja y Cardona, 1977; Cuscó *et al.*, 2007; Schumm, 2008), y que permite estudiar las propiedades vibracionales de las ZnO-NPs, así como determinar la calidad de la muestra. La estructura wurtzite del ZnO, a condiciones ambientales, corresponde al grupo puntual C_{6v} y presenta cuatro átomos por celda unitaria, dando como resultado 12 ramas de los modos fonónicos (Lorenz *et al.*, 2014). De acuerdo a la teoría de grupos, los modos de los fonones ópticos

de la zona central corresponde a la representación irreducible $\Gamma_{\text{opt}} = A_1 + E_1 + 2E_2 + 2B_1$, donde los modos B_1 son los modos denominados “silenciosos” (no activos ni en Raman ni en IR), A_1 y E_1 los modos polares divididos en fonones ópticos transversales (TO) y longitudinales (LO), y E_2 el modo no-polar, tal que este último contiene dos frecuencias: $E_2(\text{alto}) - E_2^{\text{high}}$, asociada con los átomos de oxígeno, y $E_2(\text{bajo}) - E_2^{\text{low}}$ asociada a la sub-red del cinc (Alim *et al.* 2005; Cuscó *et al.* 2007). En la figura 15 se observan las bandas que fueron asignadas a los modos fonónicos correspondientes, indicados en la literatura (Lorenz *et al.*, 2014), y se compararon tanto con las reportadas por otros investigadores (Calleja *et al.* 1977; Cuscó *et al.* 2007) como con los valores correspondientes al ZnO micrométrico (“bulk”) (Ashkenov *et al.* 2003) (tabla 2).

Figura 15. Espectro Raman correspondiente a la muestra de ZnO sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600 °C por 4 horas.



La banda más intensa del espectro (fig. 15) está ubicada en 432 cm^{-1} (E_2^{high}), asociada a los oxígenos enlazados con el Zinc en configuración tetraedral y desplazada 7 cm^{-1} con

respecto a la del “bulk” (Ashkenov *et al.* 2003), con una forma visiblemente asimétrica debido a la interacción anarmónica entre los fonones acústicos transversales y longitudinales. El espectro Raman no presenta la banda a 99 cm^{-1} (E_2^{low}), asociada a la sub-red del cinc, pero si es evidente la ubicada a 200 cm^{-1} que contiene información de E_2^{low} como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Bandas presentes en el espectro Raman correspondiente al ZnO sintetizado en etilenglicol y tratado térmicamente a $600\text{ }^\circ\text{C}$ a las cuales se les ha asignado su correspondiente simetría y proceso (tipo de modo fonónico y su naturaleza: acústico transversal (TA) o longitudinal (LA), y óptico transversal (TO) o longitudinal (LO)), comparándolas con las obtenidos por otros investigadores.

Trabajo	Frecuencia (cm^{-1})		Simetría	Proceso
	Cuscó <i>et al.</i>	Calleja <i>et al.</i>		
200	203	208	$A_1, (E_2)$	$2TA-2E_2^{\text{low}}$
326	333	332	$A_1, (E_2, E_1)$	$E_2^{\text{high}}-E_2^{\text{low}}$
432	438	437	E_2	E_2^{high}
574	574	574	A_1	$A_1(\text{LO})$
664	666		A_1	$TA+\text{LO}$
806	812		A_1	$LA+\text{LO}$
1144	1158	1160	A_1	$2A_1(\text{LO}), 2E_1(\text{LO}); 2\text{LO}$

*Referencia ZnO “bulk”: 102 cm^{-1} (E_2^{low}); 379 cm^{-1} ($A_1(\text{TO})$); 410 cm^{-1} ($E_1(\text{TO})$); 439 cm^{-1} (E_2^{high}); 574 cm^{-1} ($A_1(\text{LO})$); 591 cm^{-1} ($E_1(\text{LO})$) (Ashkenov *et al.* 2003)

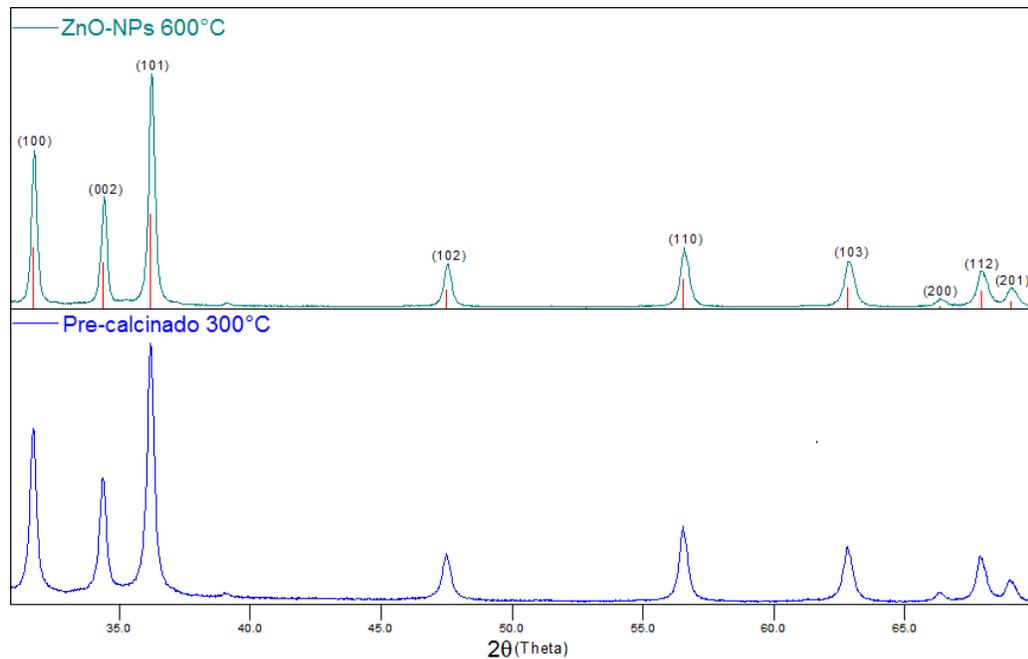
En el espectro de la figura 15 también es evidente la banda ubicada a 326 cm^{-1} la cual puede ser atribuida al proceso $E_2^{\text{high}}-E_2^{\text{low}}$ (Cuscó *et al.* 2007) y, aunque no está indicada en el espectro, también aparecería la de 379 cm^{-1} asociada al modo $A_1(\text{TO})$ (Ashkenov *et al.* 2003). Considerando que la sección transversal de dispersión, tanto de $A_1(\text{LO})$ (574 cm^{-1}) como de $E_1(\text{LO})$ (591 cm^{-1}), es mucho más pequeña que los otros modos en el caso de excitación no-resonante (Calleja *et al.* 1977), estas bandas son muy difíciles de observar en monocristales y nanoestructuras de ZnO (Lorenz *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente trabajo, se observa una banda a 574 cm^{-1} y un pequeño hombro a 589 cm^{-1} , en el espectro, que indicarían presencia de defectos en el ZnO (Friedrich y Nickel, 2007),

posiblemente vacancia de oxígeno, y, como son nanoestructuras como lo indicaran los resultados de MET, el incremento de la superficie específica de las muestras también contribuiría a justificar la presencia de estas bandas (Lorenz *et al.*, 2014).

Por otro lado, la existencia de una banda bastante apreciable a 1144 cm^{-1} (sobretono de los modos $A_1(\text{LO})$ y $E_1(\text{LO}) - 2A_1(\text{LO}), 2E_1(\text{LO})$ – ver tabla 2) ratificaría la presencia de defectos en el ZnO sintetizado. Por último, el grupo de bandas de baja intensidad ubicadas en 200 , 664 y 806 cm^{-1} corresponde a sobretonos o combinación de los modos (espectro Raman de segundo orden) $2TA-2E_2^{\text{low}}$, $TA+\text{LO}$ y $LA+\text{TO}$, respectivamente, tal como se indica en la tabla 2. Las pequeñas diferencias que se observan entre la ubicación de las bandas en los espectros Raman correspondientes al ZnO “bulk” y a las nanoestructuras de ZnO (ver tabla 2) se puede deber, principalmente, al confinamiento espacial dentro de los “puntos cuánticos” (Richter *et al.*, 1981), a efectos de calentamiento local (Alim *et al.* 2005) y a la localización fonónica por la presencia de defectos; considerando la presencia de las bandas ubicadas a 574 , 1144 y el hombro a 589 cm^{-1} , en el espectro Raman (fig. 15), el último mecanismo sería el mayor responsable de estas diferencias.

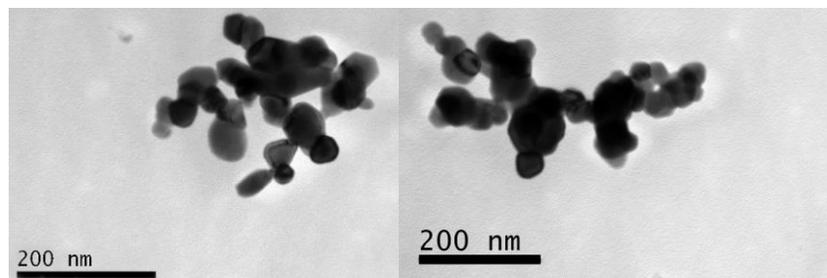
3.1.3 Difracción de Rayos X (DRX). Por medio de esta técnica de caracterización se identificó el tipo de estructura cristalina que presentaban las muestras sintetizadas por el método MPC, en etilenglicol, tanto del pre-calcinado ($300\text{ }^\circ\text{C}$) como de la muestra tratada a $600\text{ }^\circ\text{C}/4$ horas. En la figura 16 se muestran los difractogramas correspondientes a las muestras mencionadas, tal que al compararlos con las fichas patrón, éstos coincidieron con el PDF JCPDS 89-7902, indicando que en ellas predominaba el ZnO con estructura tipo wurtzita. Los picos fueron indexados evidenciándose que los que presentaban mayor intensidad eran los correspondientes a las familias de planos (101), (100) y (002); usando la ecuación de Debye – Scherrer se calculó el tamaño de cristalito, para la muestra de precalcinado, encontrándose un valor de 2 nm . Observando la figura 16 se puede concluir que en la muestra de precalcinado ya se tenía el ZnO como fase cristalina única o sea que el óxido se puede obtener a esta baja temperatura y no se requiere del tratamiento a los $600\text{ }^\circ\text{C}$, salvo que se desee un mayor tamaño de cristalita o sea sólido más cristalizado.

Figura 16. Difractogramas de rayos X correspondientes a muestras precalcinado (300 °C) y la tratada térmicamente a 600 °C/4 horas de ZnO sintetizado por MPC (PDF 89-7902).



3.1.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Para determinar el tamaño y la morfología de las partículas sintetizadas se utilizó la Microscopía Electrónica de Transmisión. En la figura 17 se observa la micrografía (magnificación 150000x) tomada a una muestra sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600° C, donde se ven partículas con morfología esferoidal, dispuestas arbitrariamente, y con un tamaño de partícula menor a los 100nm (nanopartículas de ZnO – ZnO-NPs).

Figura 17. Micrografías obtenidas con MET de sólidos de ZnO sintetizados por el método de precipitación controlada MPC, en etilenglicol, tratada a 600 °C/4 h.



3.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). En la figura 18 se muestran las fotografías obtenidas con MEB de la muestra de ZnO sintetizada en etilenglicol y calcinada a 600 °C donde se reitera que las partículas presentaban forma esferoidal y tamaño nanométrico (menor a 100 nm). Además, se utilizó la microsonda que tenía el equipo de MEB para realizar un análisis elemental puntual - EDS de la muestra, en las zonas marcadas con los círculos azules en la fotografía de magnificación 25000x, encontrándose la composición química indicada en la tabla 3. Las composiciones elementales de la tabla 3 indican menor concentración de oxígeno en la muestra reiterando el carácter no estequiométrico del óxido de cinc (ZnO_{1-x}), así como la presencia de vacancias de oxígeno como defecto estructural principal.

Figura 18. Micrografías tomadas con MEB de la muestra sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600 °C.

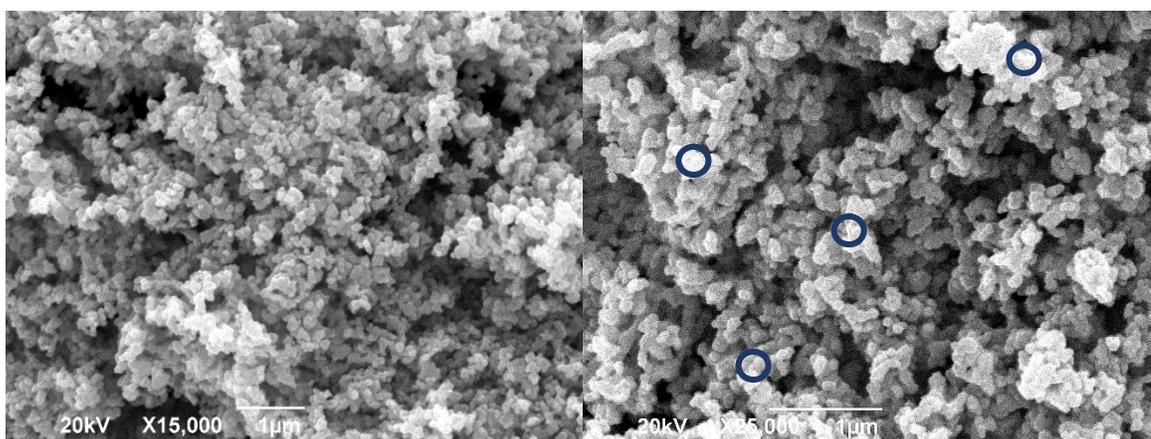
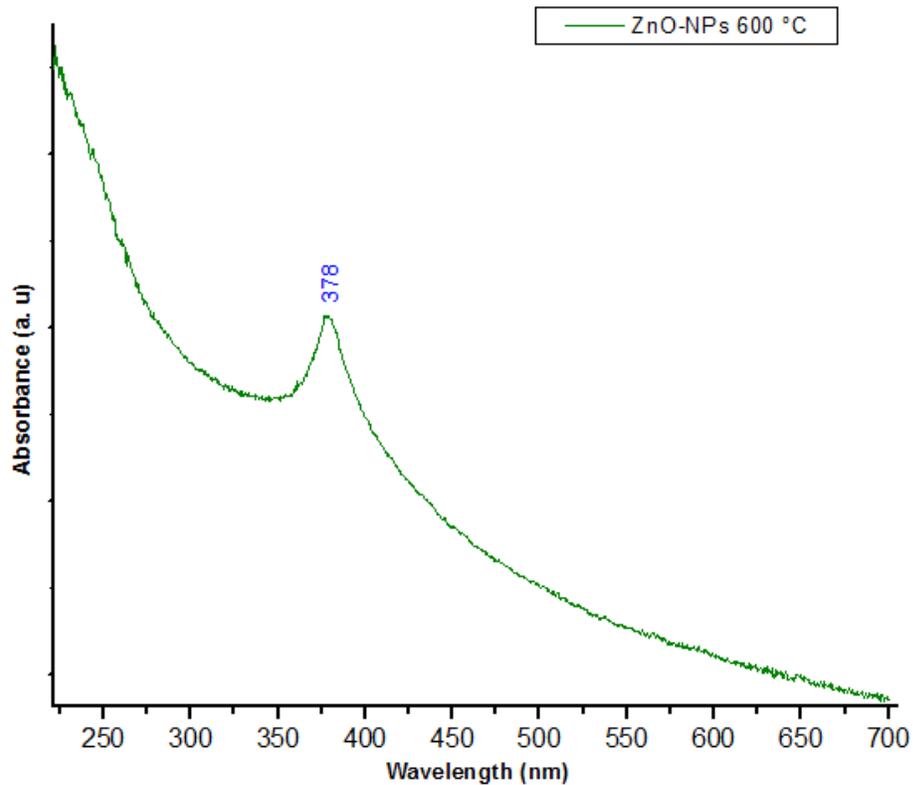


Tabla 3. Determinación elemental porcentual puntual de la muestra sintetizada en etilenglicol y tratada térmicamente a 600 °C/4 horas.

Spectrum	Oxígeno	Cinc	Total
1	29.01	70.99	100.00
2	23.17	76.83	100.00
3	24.80	75.20	100.00
4	27.77	72.23	100.00
Mean	26.19	73.81	100.00

3.1.7 Espectroscopia de absorbancia UV-Vis. En la figura 19 se muestra el espectro de absorción UV-Vis de las ZnO-NPs en el que se registran las transiciones electrónicas que ocurren en el sólido al irradiarlo con radiación en este rango de frecuencias; es posible, por lo tanto, determinar la energía requerida para excitar electrones de la banda de valencia a la banda de conducción considerando el criterio $h\nu \geq E_c - E_v = E_g$, donde ν es la frecuencia de la radiación incidente, E_c el borde inferior de la banda de conducción, E_v el borde superior de la banda de valencia calcular y E_g el ancho de la banda prohibida (gap de energía).

Figura 19. Espectro UV-Vis correspondiente al ZnO sintetizado en etilenglicol y tratado térmicamente a 600 °C.



En el espectro se observa un pico a una longitud de onda $\lambda = 378$ nm. Por lo tanto, se puede determinar la energía asociada a esta transición electrónica utilizando la siguiente expresión:

Ec. 3.

$$E = \frac{h * c}{\lambda}$$

Reemplazando los correspondientes valores: $\lambda = 378$ nm, h constante de Planck (4.135667×10^{-15} eV.s) y c velocidad de la luz (3×10^8 m/s), se obtiene que:

$$E = \frac{4.135667 \times 10^{-15} * 3 \times 10^8 * 378 \text{ eV.s} * \text{m/s}}{378 \text{ nm}} = 3.28 \text{ eV}$$

cantidad que corresponde al valor del gap de energía reportado en la literatura (Coleman y Jagadish, 2006)

3.2 AISLAMIENTO DE HONGOS PATÓGENOS DE LA NARANJA

3.2.1 *Penicillium digitatum*. Observando la microestructura de las colonias (fig. 20A.), ellas presentaron un aspecto aterciopelado, desarrollando micelio blanquecino y conidios de color verde oliva pálido cuando generaron esporas. El reverso de la placa mostró un color marrón claro típico. Un análisis microscópico más detallado (fig. 20B.), permitió observar las hifas septadas, los conidióforos ramificados, las fiálides y sobre éstas los conidios en cadena, con forma típica elipsoidal a globosa (Frisvad y Samson, 2004).

3.2.2 *Penicillium italicum*. Macroscópicamente, las colonias presentan un aspecto aterciopelado, desarrollando micelio blanquecino y conidios de color azul pálido grisáceo cuando generaron esporas (fig. 21A.), el reverso de la placa presentó un color crema típico. Un análisis microscópico detallado (fig. 21B.), permitió observar las hifas lisas hialinas, conidióforos ramificados, fiálides cilíndricas cortas y sobre éstas los conidios en cadena, con forma elipsoidal (Frisvad y Samson, 2004).

Figura 20. A. *P. digitatum* en medio de cultivo PDA 48 horas después de sembrado B. Impronta MOAR magnificación 40X Hifa (hi), conidióforos (cdf), fiálides (fia) y conidios (co) de *P. digitatum*, en observación microscópica.

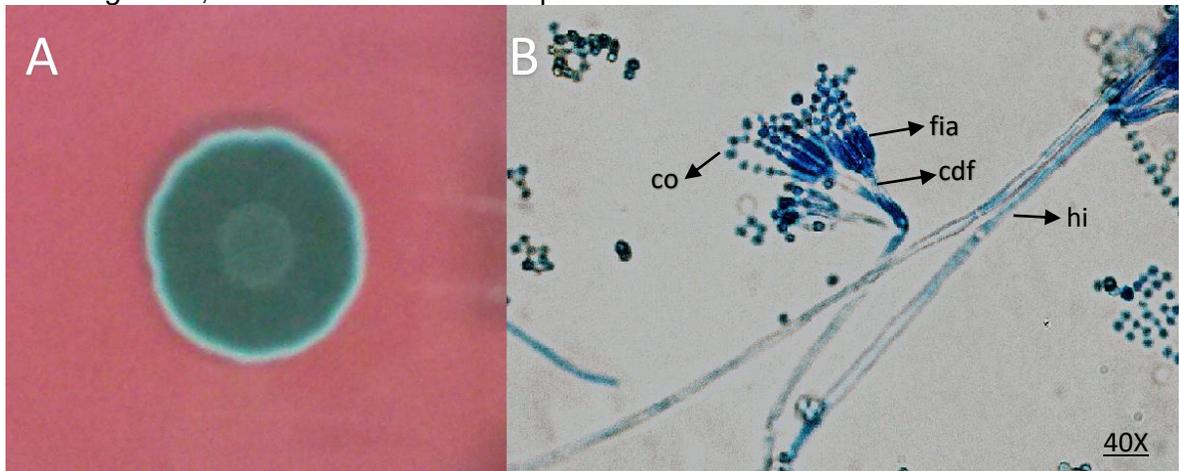
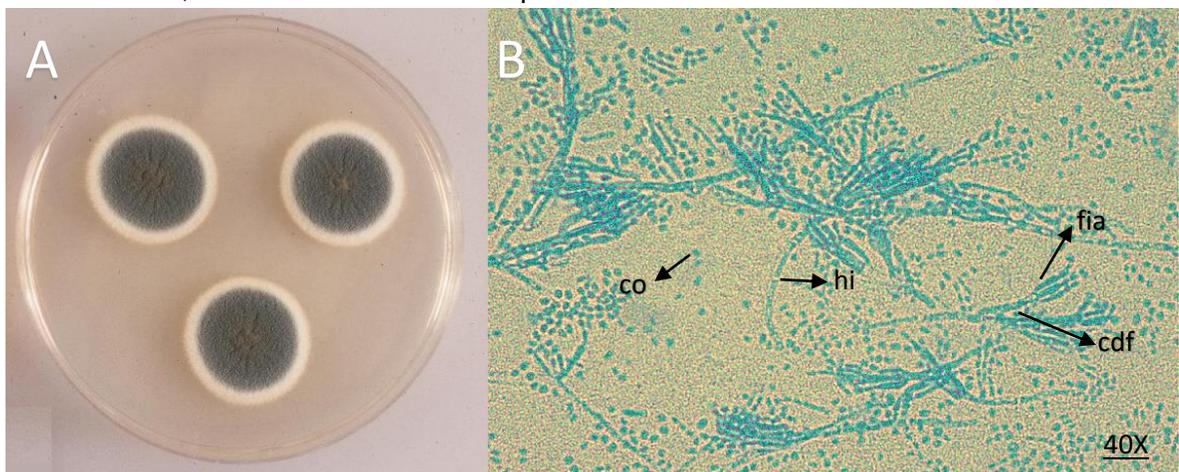


Figura 21. A. *P. italicum* en medio de cultivo PDA 48 horas después de sembrado B. Impronta MOAR magnificación 40X Hifa (hi), conidióforos (cdf), fiálides (fia) y conidios (co) de *P. italicum*, en observación microscópica.



3.2.3 Recuento de esporas y viabilidad de los hongos. Tras la realización de la prueba de conteo esporas se logró determinar el número de unidades infectivas por unidad de volumen obtenido para *P. digitatum* fue $8,83 \times 10^6$ e/mL $\pm 2,98 \times 10^6$ e/mL con una viabilidad

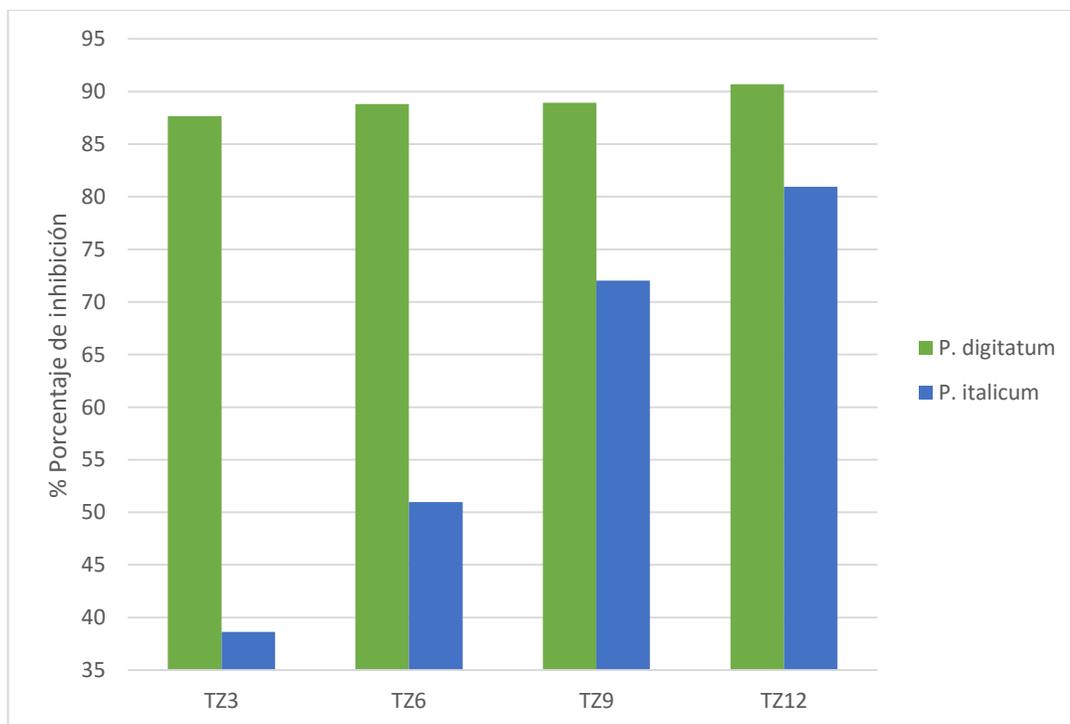
de 94,11 % y para *P. italicum* $9,00 \times 10^6$ e/mL $\pm 2,40 \times 10^6$ e/mL con la viabilidad de 94,67 % (Anexo B.).

3.3 ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA

3.3.1 *in vitro*. A continuación, se presentan los resultados obtenidos al realizar las pruebas en medio de cultivo PDA mencionadas en la metodología numeral 2.2.2.4 concerniente a la valoración y efecto de las ZnO-NPs sobre los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*

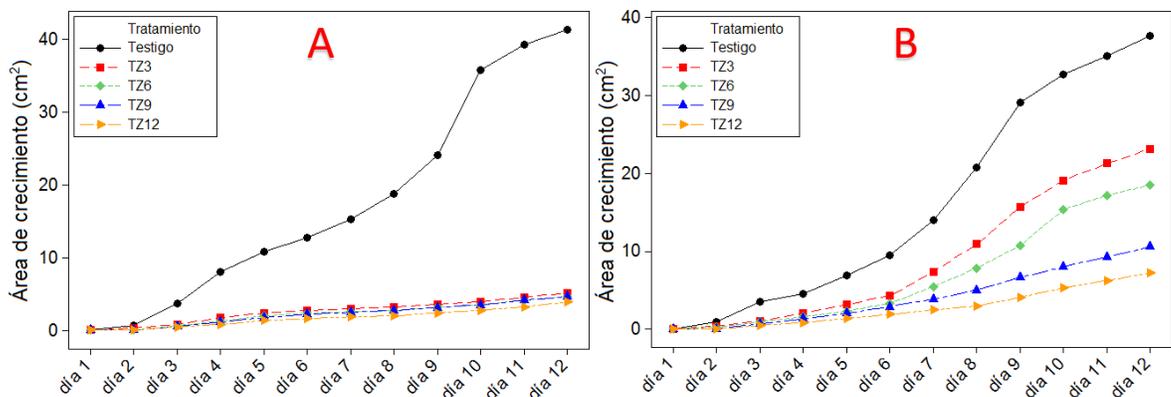
3.3.1.1 Prueba fungistática a los patógenos del género *Penicillium*: Durante el seguimiento llevado a cabo para el ensayo, los tratamientos TZ3, TZ6, TZ9 y TZ12 evaluados presentan capacidad para inhibir el crecimiento micelial de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*, (fig. 22.).

Figura 22. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los tratamientos en patógenos del género *Penicillium*.



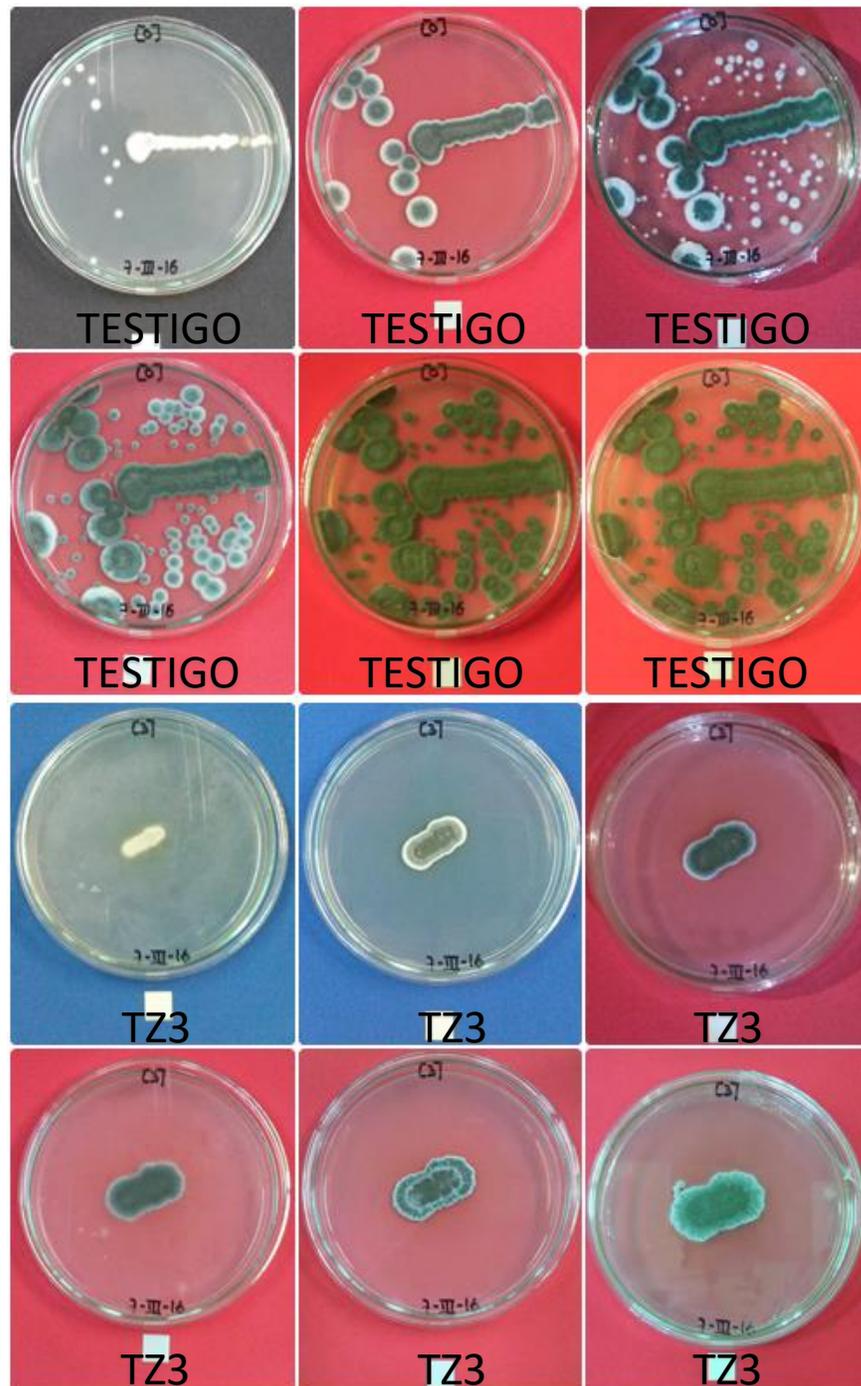
Se evidencia la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs tras la aplicación de las cepas de *Penicillium* de los diferentes tratamientos, correspondientes a distintos tratamientos del óxido. Por ejemplo, para el *P. digitatum* (fig. 24.) se observa un significativo efecto inhibitorio, mayor al 85% del crecimiento del hongo para los diferentes tratamientos, que contrasta con los resultados obtenidos por Sepúlveda *et al.* (2015), quienes utilizando el Imazalil, antifúngico químico comercial, alcanzaron porcentajes de inhibición que comprende rangos de 44.6 – 75%, en soluciones de 1000 mg L⁻¹; mientras para el *P. italicum* sólo los tratamientos TZ9 y TZ12 superan el 70% del crecimiento. El análisis estadístico de los datos presenta un panorama en el que se observa que ambos organismos son susceptibles a los tratamientos con ZnO-NPs (fig. 23.), y existe suficiente evidencia estadística para afirmar, que se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Anexo C.), por lo cual se realizó un análisis de varianza por comparaciones múltiples de un solo factor (LSD de Fisher).

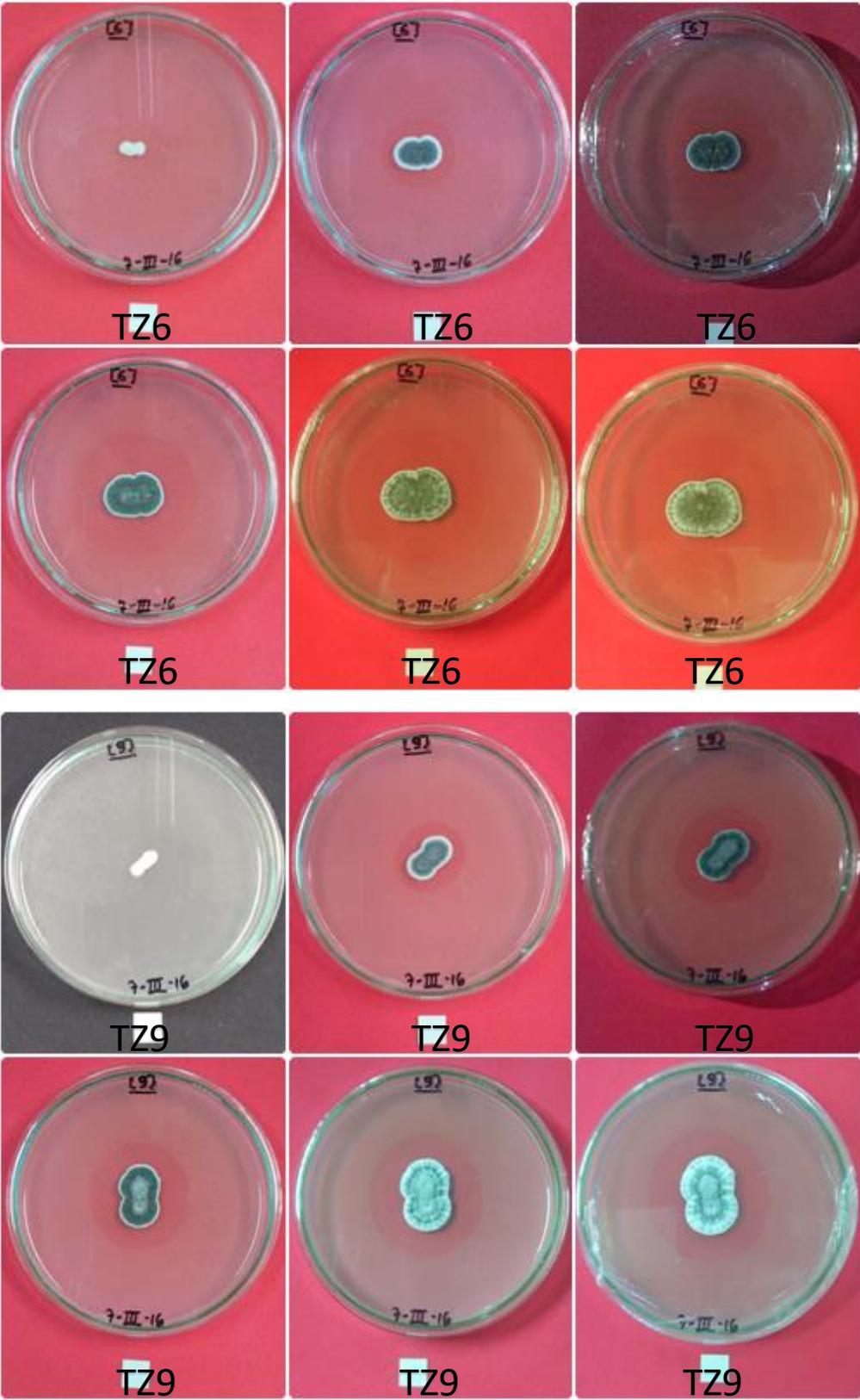
Figura 23. Áreas de crecimiento de los hongos en el tiempo para los diferentes tratamientos A. *P. digitatum* B. *P. italicum*.

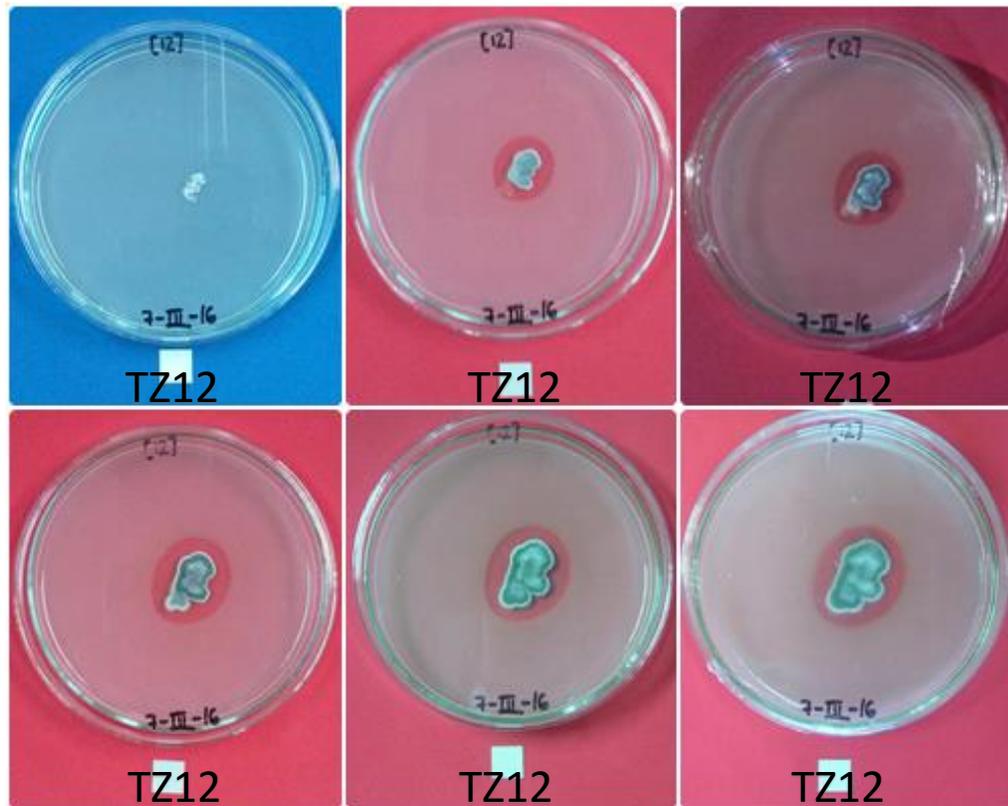


El factor a comparar fue el tratamiento, como resultado se obtuvieron dos modelos de agrupación, el primer modelo se estableció para el *P. digitatum* el cual se le asignó al tratamiento testigo al grupo A y los tratamientos TZ3, TZ6, TZ9 y TZ12 al grupo B; el segundo modelo estableció para el *P. italicum*, la asignación del tratamiento testigo al grupo A, a los tratamientos TZ3 y TZ6 al grupo B, a los tratamientos TZ6 y TZ9 al grupo C y a los tratamientos TZ9 y TZ12 al grupo D.

Figura 24. Registro fotográfico de la valoración *in vitro* de los tratamientos testigo, TZ3, TZ6, TZ9 y TZ12 sobre *P. digitatum*, ordenado para los días, 3 superior izquierda, 5 superior medio, 7 superior derecha, 9 inferior izquierda ,11 inferior medio y 12 inferior derecha respectivamente.





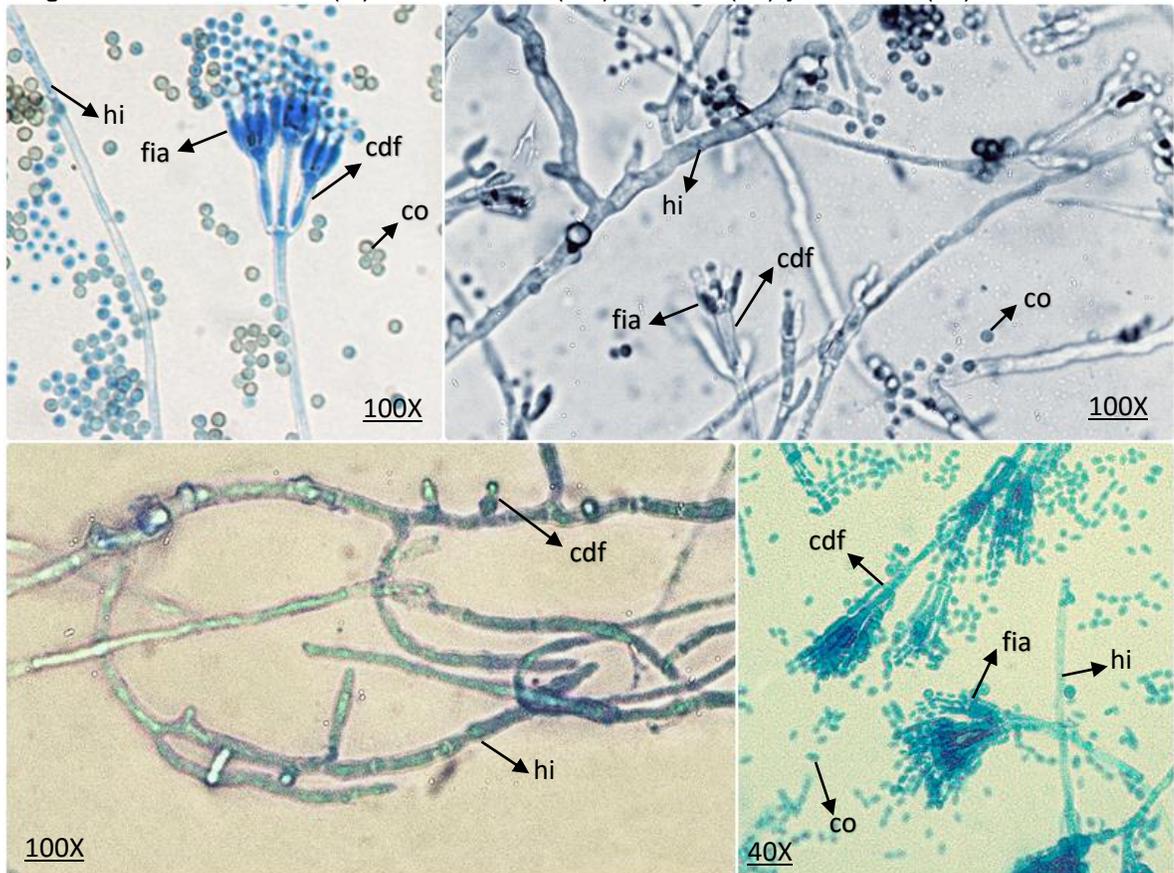


Específicamente para el ensayo con *P. digitatum* y con la finalidad de establecer los mejores tratamientos para la prueba fungistática *in vivo* se realizó un nuevo análisis con el método LSD de Fisher, a través de este se determinaron nuevos agrupamientos así: grupo A tratamientos TZ3, TZ6 y TZ9 y grupo B tratamientos TZ6, TZ9 y TZ12; a este último grupo se le realizó comparación de medias de las muestras, para determinar si entre ellas difieren, obteniendo que no hay evidencia significativa ($p < 0,05$) que permita afirmar que existe un mejor tratamiento entre TZ6, TZ9 y TZ12

Cabe destacar que se presentaron efectos sobresalientes en los tratamientos TZ6, TZ9 y TZ12 en las cepas sembradas artificialmente, alrededor de estas se generó una zona inhibitoria la cual inició después de las 48 horas de inoculado el hongo, esta zona, continuó creciendo a lo largo del tiempo a medida que el hongo lo hacía.

En contraste, los hongos del género *Penicillium* sometidos a los tratamientos TZ9 y TZ12 presentaron cambios específicos a nivel estructural (fig. 25.). Las hifas perdieron su forma lineal y mostraron engrosamiento excesivo y estrangulación, mientras que los fiálides y los conidióforos también evidenciaron deformación estructural, constitución de tamaño pequeño y limitado. Así mismo, los conidios disminuyen considerablemente su cantidad.

Figura 25. Improntas MOAR de los hongos tratados, superior izquierda *P. digitatum* en medio de cultivo PDA 48 horas muestra testigo magnificación 100X, superior derecha *P. digitatum* en medio de cultivo PDA 48 horas tratamiento TZ9 magnificación 100X, inferior izquierda *P. italicum* en medio de cultivo PDA 48 horas tratamiento TZ12 magnificación 100X, inferior derecha *P. italicum* en medio de cultivo PDA 48 horas muestra testigo magnificación 400X, hifa (hi), conidióforos (cdf), fiálides (fia) y conidios (co).



Para tratar de explicar estos cambios en el hongo, propiciados por las ZnO-NPs, se debe considerar que la pared celular del hongo constituye uno de los sitios importantes para la

interacción con, y barrera para, las nanopartículas. Aunque el mecanismo que le permite a estas últimas agredir, o pasar a través de ella, no está bien dilucidado, es muy probable que exista una mayor afinidad de las ZnO-NPs por la pared celular del hongo, debido a la carga superficial de las nanopartículas, y la generación de ROS, acciones que se verían favorecidas por la incidencia de radiaciones visible (400-600 nm), UVA (366 nm) y UVC (254 nm) (Yang y Ma, 2014), podrían ocasionar los daños observados en las hifas, los fiálides y los conidióforos, así como justificar la ineficiencia de los medios de defensa que poseen los hongos. Aún más, sin la incidencia de radiación, los ROS se podrían generar mediante los defectos superficiales que presentan las ZnO-NPs, tal como lo indicaron Lakshmi y Vijayaraghavan en su trabajo (Lakshmi y Vijayaraghavan, 2015).

Estos efectos dependen de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas e incluyen efectos de obstrucción, disolución de las mismas con la generación de iones y/o compuestos tóxicos o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dutta *et al.*, 2012), mecanismos que aún no han sido dilucidados. Para estos resultados obtenidos en el estudio, se consideró pertinente estimar la incorporación de una cantidad determinada ZnO-NPs, por ejemplo, la correspondiente al tratamiento TZ9 y TZ12 al recubrimiento natural de almidón de yuca modificado, para verificar la capacidad antifúngica del mismo en frutos cítricos bajo condiciones poscosecha.

3.3.2 Actividad anti-fúngica *in vivo*: A continuación se presentan los resultados obtenidos al realizar las pruebas de la capacidad antifúngica de los recubrimientos conformados en naranja Valencia (previamente lavadas y desinfectadas, seleccionadas por su estado de madurez, pesadas y calibradas). Inicialmente, a las naranjas se les inoculó, los hongos *P. digitatum* y *P. italicum* y pasadas 24 horas de esta acción se aplicó el recubrimiento elaborado a partir de almidón de yuca, modificado enzimáticamente, y óxido de cinc nanoparticulado ZnO-NPs, en diferentes diluciones [TZ9 y TZ12], en adelante la disposición y denominación será referida en lo mencionado en la metodología numeral 2.6 para los dos sistemas en estudio, que contenían los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*, considerando los mismos parámetros indicados para los tratamientos.

3.3.2.1 Prueba fungistática: Se procedió a hacer una inspección física, cada 3 días, de las naranjas previamente acondicionadas, tal como se indicó en el numeral 3.3.2, identificando aquellas que presentaban afección fúngica (denominadas P_H) y aquellas que no presentaban la afección (denominadas A_H). Realizándoles un seguimiento por 15 días, se consideraron las naranjas con diferente afección fúngica (ver figura 26 y 27), despreciando el porcentaje de crecimiento del hongo en el fruto (parcial o total), y se les asignó el correspondiente P_H . Una vez obtenidos los datos, se cuantificaron las denominaciones estableciendo para P_H un valor de 1 y para A_H el de 0, de esta forma se procedió a elaborar la figura 28 para establecer el porcentaje de inhibición que presentó cada una de las muestras analizadas.

Figura 26. Afección y evolución fúngica causada por el *P. digitatum* (superior) y el *P. italicum* (inferior) para los días 1, 9 y 16 respectivamente, de la muestra testigo.



Para poder enunciar una propuesta de mecanismo de acción fungistático, por parte del recubrimiento, es necesario conocer cómo se da el desarrollo de la infección en el fruto y qué factores deberían considerarse; es necesario tener en cuenta que, por ejemplo, ambos hongos producen enzimas hidrolíticas, en su mayoría poligalacturonasas y celulasas, responsables de la maceración de los tejidos durante el desarrollo de la enfermedad.

A medida que los hongos crecen desarrollan un micelio blanco, en el centro de la lesión, y se expande radialmente. La esporulación puede comenzar entre el tercer y quinto día y estaría condicionada por factores ambientales, como temperatura y humedad relativa, formando una capa coloreada de textura velutinosa, de color verde oliva para el *P. digitatum* y para el *P. italicum*, y la esporulación es de color azul o verde azulado, rodeada de una textura granular.

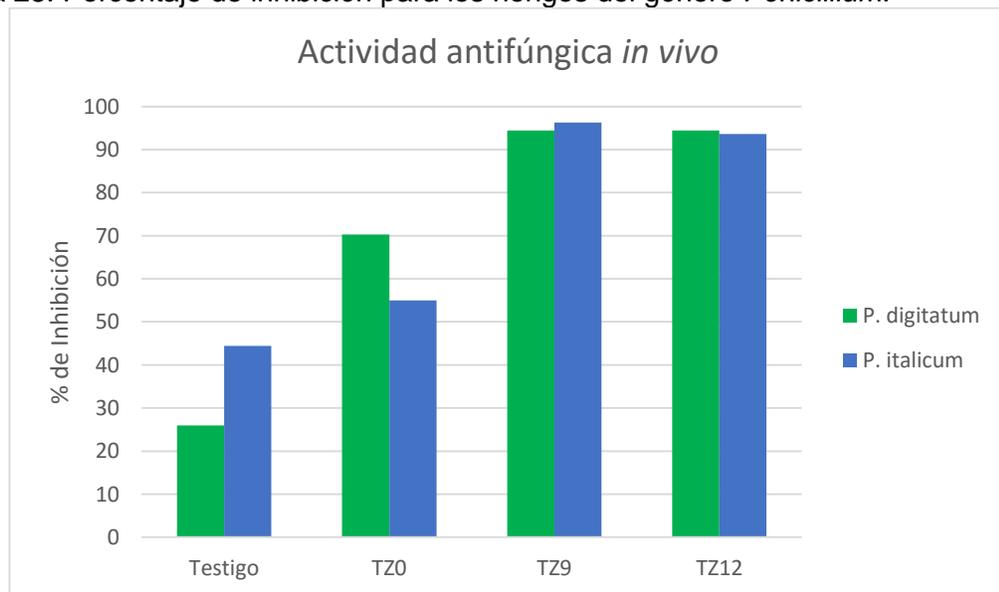
Figura 27. Seguimiento *in vivo* de actividad antifúngica de *P. digitatum*. Réplica del día 13.



Diferentes estudios reportados indican que los compuestos volátiles, emitidos desde la herida del tejido del huésped, juegan un papel importante en la patogenicidad del *P. digitatum* y *P. italicum* (Caccioni *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 2008). Otra información importante a considerar es la composición química de la cascara, específicamente de su aceite donde el componente principal (Stashenko *et al.*, 1996) es el monoterpeno limoneno

(4-isopropenil-1-metilciclohexeno), presente en el flavedo, y que se encuentra entre el 60 y 95% de los componentes totales en los aceites volátiles; en menor concentración se encuentran otros monoterpenos, así como aldehídos alifáticos, alcoholes, y ésteres. Un estudio interesante fue el realizado por Ariza *et al.* (2002), ellos identificaron una serie de sustancias producidas por los cítricos que facilitarían la infección por hongos, particularmente sesquiterpenos, como el valenceno, que junto con cantidades relativamente pequeñas de monoterpenos, como el limoneno, serían las fuentes principales de los metabolitos volátiles liberados a la atmósfera por las naranjas, sin daño mecánico, afectadas por *P. digitatum*. Durante la realización del seguimiento, y teniendo en cuenta la figura 28, se observó el desarrollo micelial de los hongos del género *Penicillium* en algunas naranjas recubiertas con biopolímero, que contenía el tratamiento TZ9 y TZ12, a las 48 horas de iniciada la prueba (día 1 de seguimiento). Este efecto pudo deberse, posiblemente, a que previo al desarrollo del ensayo, ya presentaban la afección.

Figura 28. Porcentaje de inhibición para los hongos del género *Penicillium*.



Los porcentajes de inhibición determinados para los diferentes tratamientos de los sistemas de afección fúngica, propiciados por el *P. digitatum* y el *P. italicum*, fueron, respectivamente: 25.93 % y 44.44 % (Testigo), 70.37 % y 55.55 % (tratamiento TZ0), 94,44 % y 96.30 %

(tratamiento TZ9) y 94.44% y 93.60 % (tratamiento TZ12); estos resultados pueden deberse a que el recubrimiento limitó la liberación de aceites esenciales presentes en la naranja, de manera más contundente para los tratamientos TZ9 y TZ12, afectando las reacciones enzimáticas que hubiesen podido ocurrir.

3.3.2.2 Pérdida de peso. Esta valoración se realizó haciendo registro diario del peso de las naranjas obtenido en una balanza de mesa. Como se observa en las figuras 29 y 30, todos los ejemplares tratados presentaron un incremento en la pérdida de peso durante la evaluación, siendo los “testigo” los de mayor pérdida. Dentro de los posibles factores que pudieron incidir en el comportamiento de este parámetro se encuentran: la respiración como medio de obtención de energía, generando calor en el fruto y la afección fúngica causada por los hongos, lo que propicia una serie de reacciones catalizadas por enzimas, cuyo aumento en la velocidad eleva la temperatura. En consecuencia, una vez que el fruto comienza a calentarse, se estimula aún más la respiración y la generación de calor (Q), haciéndose más difícil su control, y se favorece la evaporación del agua que contiene la naranja, ocasionando una disminución en su peso.

El principal componente de la naranja es el agua (80%) y dado que en condiciones pos cosecha ella sobrevive de sus propias reservas, por transpiración la naranja continúa liberando vapor de agua, hacia la atmósfera por saturación interna, pero a la misma temperatura el aire circundante está menos saturado, lo que propicia la salida de agua de su interior. La pérdida de agua causa una disminución significativa del peso y a medida que transcurren los días, disminuye la elasticidad del fruto perdiendo su turgencia y apariencia. Para las naranjas correspondientes al “Testigo”, con afección fúngica del *P. digitatum*, el gran efecto de pérdida de peso se manifiesta a partir del día 5 mientras que, para las naranjas, con afección fúngica del *P. italicum*, este efecto es evidente sólo hasta el día 12. En las curvas de la figura 30 se observa que las menos pronunciadas, con características lineales, fueron las de los frutos recubiertos con los tratamientos TZ0, TZ9 y TZ12. La presencia de estos recubrimientos, posiblemente debido a sus propiedades de barrera, favorecieron y dieron preferencia al control de humedad, oxígeno y solutos del fruto (Mosquera *et al.*, 2010), propiciando una menor pérdida de peso.

Figura 29. Pérdida de peso (%) en naranja con afección fúngica *P. digitatum* considerando los tratamientos que contenían o no ZnO-NPs.

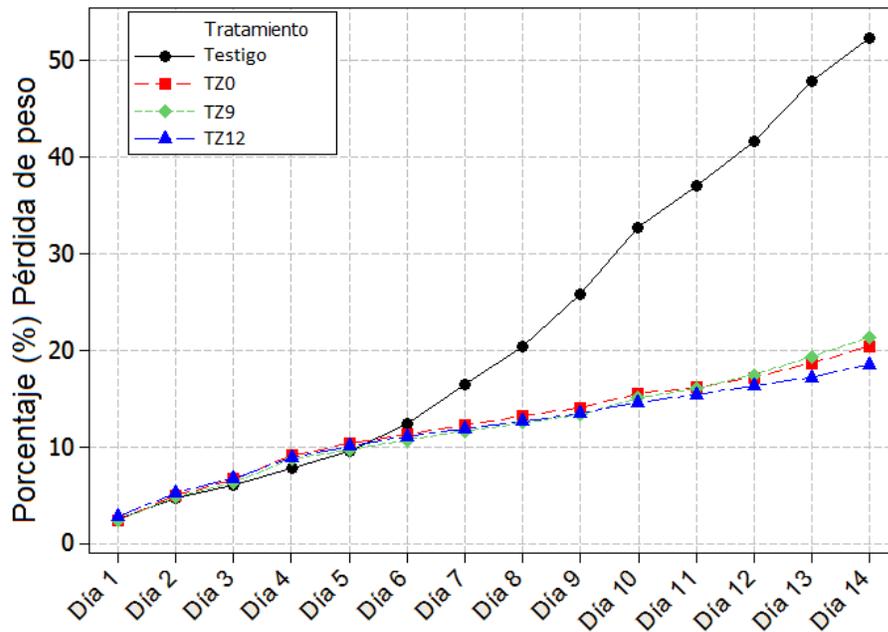
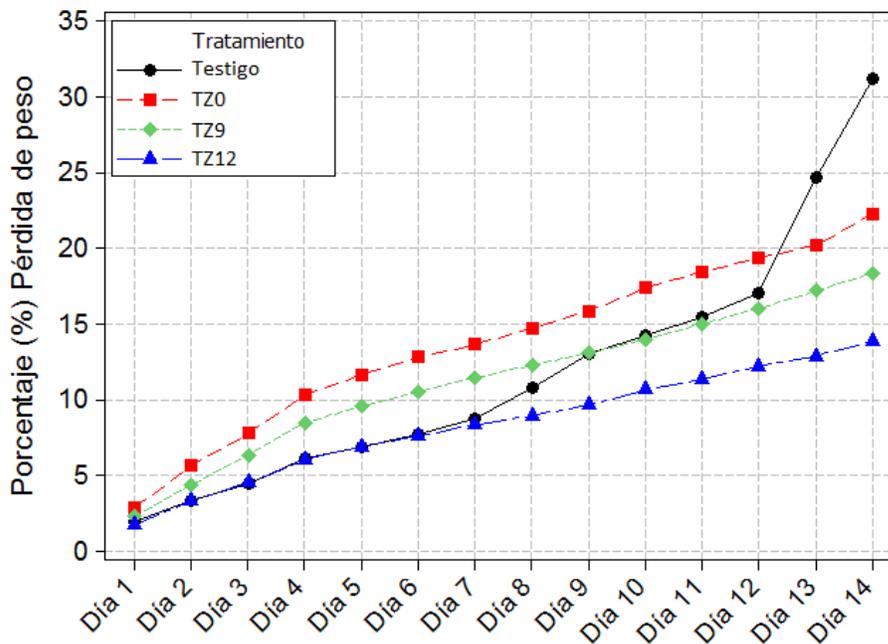


Figura 30. Pérdida de peso (%) en naranja con afección fúngica *P. italicum* considerando los tratamientos que contenían o no ZnO-NPs.



A los resultados de la prueba de pérdida de peso de las naranjas que contenían los hongos de interés, con y sin recubrimiento, se les realizó un análisis estadístico ANOVA (Anexo D.) encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$), por lo que se rechazaron las hipótesis nulas (H_0) planteadas y, en consecuencia, se aceptaron las hipótesis alternas (H_a). Este resultado permitió concluir que la aplicación del recubrimiento incidió sobre el parámetro “pérdida de peso” de las naranjas con afección fúngica y que era de interés aplicar la prueba de LDS de Fischer. Esto llevó a establecer dos grupos para cada sistema. En el sistema *P. digitatum* el grupo A se conformó con los frutos sin recubrir (tratamiento “Testigo”) y el grupo B con los frutos recubiertos que contenían los tratamientos TZ0, TZ9 y TZ12. De este análisis se puede establecer que la aplicación del recubrimiento, a las naranjas con afección fúngica, disminuyó significativamente la pérdida de peso de las mismas tal que para la afección fúngica causada por *P. digitatum*, el control (Testigo) presentó una pérdida del 52.39% de su peso inicial mientras que para los tratamientos con ZnO-NPs fueron del 20.45%, para TZ0, 21.38%, para TZ9 y del 18.58% para TZ12. Por último, para el sistema *P. digitatum* se realizó una prueba de comparaciones múltiples para establecer si había diferencias significativas entre los tratamientos del grupo B. de este análisis se puede concluir que no existen diferencias significativas entre ese grupo de datos, por lo tanto, todos los tratamientos de ese grupo tienen el mismo efecto en la pérdida de peso. Este comportamiento se puede justificar considerando que, probablemente, los recubrimientos produjeron una atmósfera modificada interna que aisló al fruto del medio ambiente, retardando el proceso de maduración y senescencia. (Valencia *et al.*, 2011).

Para el sistema con la afección fúngica *P. italicum* los porcentajes de pérdida de peso fueron: Testigo 31.24%, TZ0 22.21%, y para los tratamientos con ZnO-NPs TZ9 18.36% y TZ12 13.85%. los grupos se establecieron así: grupo A tratamientos (Testigo, TZ0 y TZ9) y grupo B tratamiento (TZ12) a través de este análisis podemos concluir que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el mejor tratamiento es el TZ12.

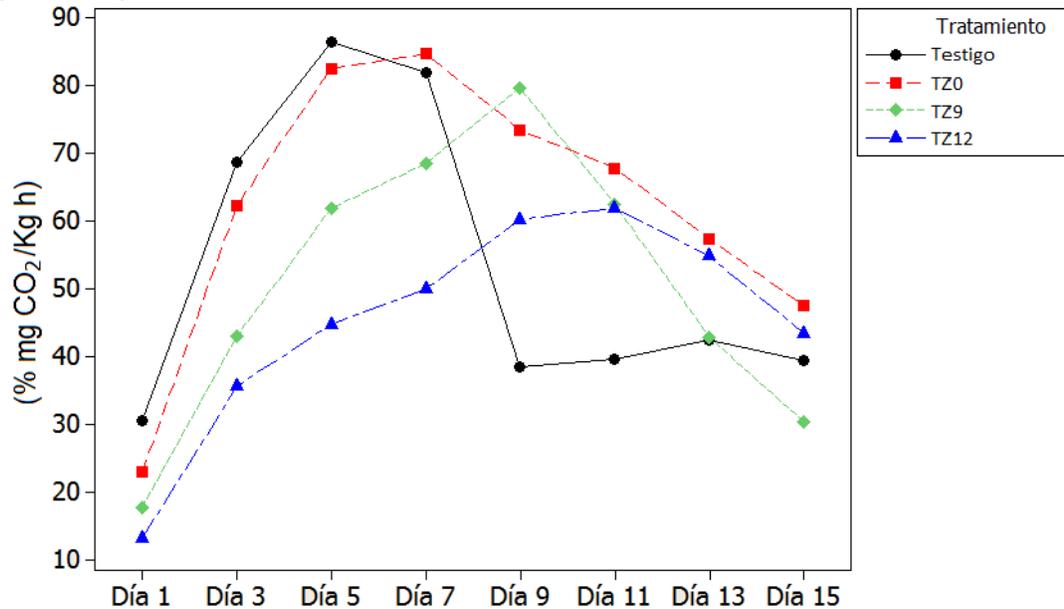
En un segundo análisis se buscó establecer si la incorporación del hongo, por especie, había afectado la pérdida de peso en la naranja, como resultado se encontró evidencia estadística con diferencia de significancia ($p < 0,05$), esto indica que la naranja Valencia se

ve más afectada en el parámetro pérdida de peso por el hongo *P. digitatum* que por el hongo *P. italicum*, por otro lado la incorporación de ZnO-NPs no tuvo un efecto significativo en la pérdida de peso de la naranja para esta especie de hongo en particular, posiblemente el almidón de yuca actuó como barrera semipermeable frente al vapor de agua, resultado similar al encontrado en otros estudios con relación al efecto de los tratamientos respecto a la muestra control (Achipiz, 2012; Zúñiga y Ordoñez, 2013; Perdomo e Insuasty, 2015).

3.3.2.3 Tasa de respiración (CO₂). Con relación a los resultados de este ensayo, figura 31, para el sistema con afección fúngica propiciada por el *P. digitatum* los tratamientos realizados alcanzaron su pico climatérico en diferentes días, desplazándose hacia más días en el siguiente orden: Testigo día 5, para TZ0 al día 7, TZ9 día 9 y para TZ12 en el día 11. Este desplazamiento, que ocurre para los diferentes tratamientos, pudo ocurrir por diferentes causas, sin embargo, es necesario considerar que la naranja es un fruto no climatérico, lo que implica que durante su maduración y senescencia la tasa de respiración y niveles de producción de etileno son bajos (Kader, 1985), condición que está estrechamente relacionada con el periodo de su recolección. Durante la respiración de la fruta se presenta pérdida de moléculas almacenadas que representan reservas de energía, proceso que acelera su senescencia conforme estas se agotan; es por esto que la velocidad de deterioro de las frutas es proporcional a la velocidad de respiración (Álvarez, 2012). Al comparar el tratamiento Testigo con el tratamiento TZ12 se presenta 7 días de diferencia en la aparición del pico climatérico por lo tanto el tratamiento tiene un efecto en la madurez del fruto.

Con la disminución gradual de la tasa de respiración, debido al inicio de la fase de senescencia, no habría consumo de O₂ para convertirlo en CO₂ (Pineda, 2011). Como se observa en la figura 31 la tasa respiratoria fue menor en los frutos con tratamiento “Testigo” que, en los frutos recubiertos, en los primeros cinco días, posiblemente debido a un efecto fúngico que llevo a la limitación en su actividad metabólica (Palou, 2014). En cambio, en los frutos recubiertos, se presentó un retraso en el desarrollo de la fase de agotamiento de las reservas, acción que involucra una elevada actividad debido a los procesos fisiológicos de transformación (Kader, 1985).

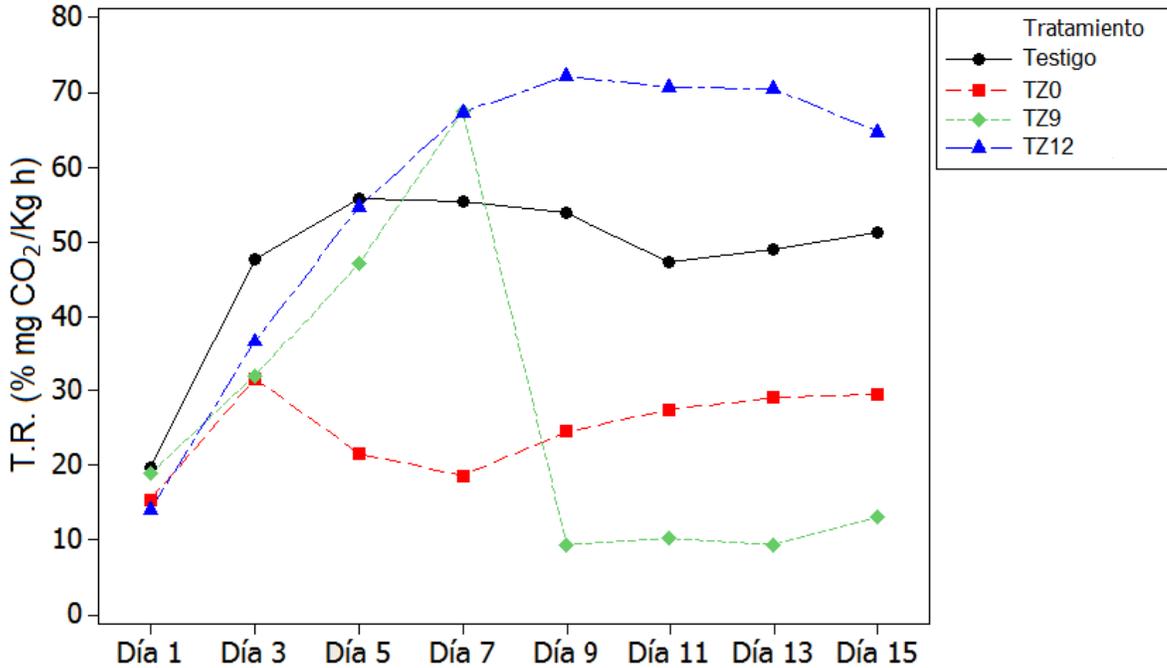
Figura 31. Curvas de tasa de respiración, en función del tiempo, para naranjas con afección fúngica *P. digitatum*, evaluadas a los diferentes tratamientos.



Para el sistema con afección fúngica propiciada por el *P. italicum* (fig. 32.) se observa un comportamiento diferente al que presentó el sistema anterior. En él, una vez alcanzado el pico climatérico se establece un “equilibrio” a la concentración máxima alcanzada de % de CO₂, excepto para el tratamiento TZ9. Esta condición, propiciada por el recubrimiento, probablemente se manifestó por la generación de una atmósfera modificada (Church y Parsons, 1995), en el sistema (empaque, fruto, hongo), tal que el metabolismo del fruto se autorreguló a las condiciones de concentración de los compuestos volátiles y gases presentes en cada uno de los sistemas y por eso el pico climatérico se presentó en ellos a diferente día.

A los resultados de tasa de respiración para el sistema *P. digitatum*, se le realizó ANOVA (Anexo E.) encontrándose diferencias significancias ($p < 0,05$), por lo que se rechazó la hipótesis nula (H_0) y, en consecuencia, se aceptó la hipótesis alterna (H_a). Este resultado permitió establecer que existen diferencias entre los tratamientos, debido a ello fue necesario realizar la prueba de LDS de Fischer. De la prueba anterior se generaron dos agrupaciones así, grupo A conformado por tratamientos (Testigo y TZ0) y el grupo B con los frutos recubiertos que contenían ZnO-NPs (TZ9 y TZ12).

Figura 32. Curvas de tasa de respiración, en función del tiempo, para naranjas con afección fúngica *P. italicum*, evaluadas a los diferentes tratamientos.



Por otro lado, los resultados de tasa de respiración para el sistema *P. italicum*, se analizaron estadísticamente, encontrándose diferencias significancias ($p < 0,05$), por lo que se rechazó la hipótesis nula (H_0) y, en consecuencia, se aceptó la hipótesis alterna (H_a). Este resultado permitió establecer que existen diferencias entre los tratamientos, debido a ello fue necesario realizar la prueba de LDS de Fischer, donde se generaron dos agrupaciones así, grupo A conformado por (Testigo y TZ12) y el grupo B con los frutos recubiertos de los tratamientos (TZ0 y TZ9). Es necesario precisar que, aunque la variabilidad de los datos para el tratamiento TZ0 sea menor no necesariamente significa que sea el mejor tratamiento debido a que para esa evaluación específica gráficamente se puede observar un falso pico climatérico al tercer día de evaluación, mientras que el tratamiento TZ9 presenta un pico climatérico pronunciado al séptimo día, el cual desciende y se mantiene constante a lo largo del seguimiento. De los análisis estadísticos anteriores se puede concluir que la aplicación del recubrimiento con ZnO-NPs, a las naranjas con afección fúngica, incidió favorablemente sobre el parámetro de respiración del fruto, debido al bajo contenido de oxígeno en el medio, es posible que la ruta de respiración del fruto se desplazará hacia vías anaerobias (Hagenmaier, 2000).

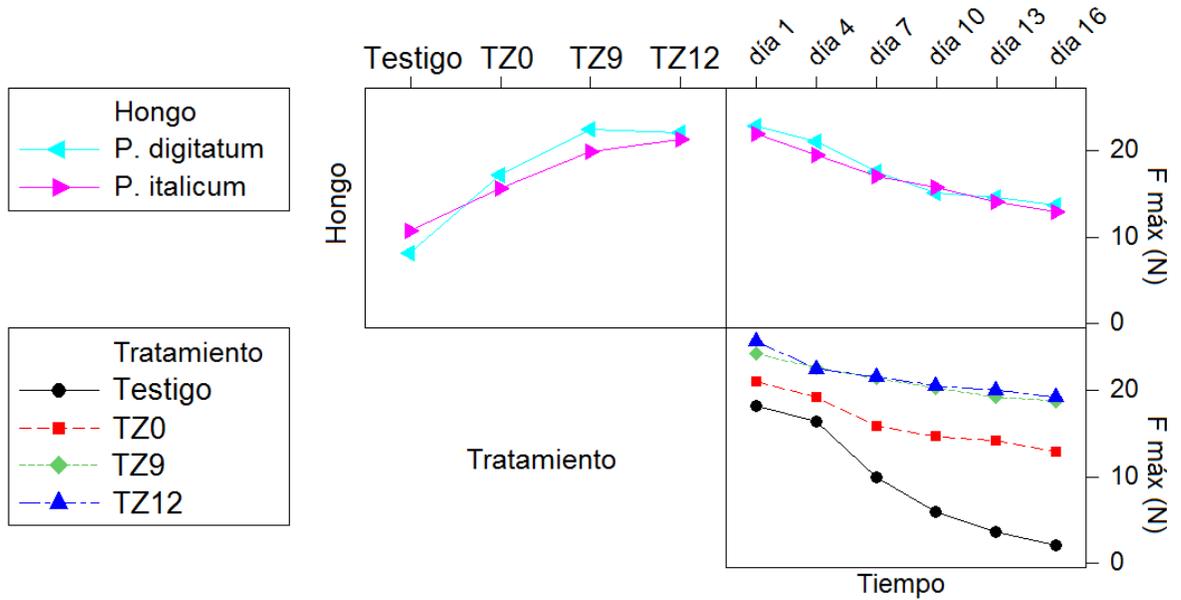
3.3.2.4 Firmeza. Este parámetro está relacionado con las propiedades mecánicas del fruto (naranja en el presente caso) y fue medido en términos de la resistencia del fruto a la penetración. En la figura 33 se observa como la firmeza de las naranjas empleadas para realizar el ensayo disminuyó con el transcurso del tiempo, encontrándose un comportamiento similar para los tratamientos con TZ9 y TZ12. Una de las principales causas de la disminución de la firmeza de la naranja es la pérdida de agua que produce, además, la pérdida de peso y apariencia, siendo la zona ecuatorial una de las más susceptibles y por lo tanto la zona de interés a considerar para determinar la acción enzimática de los hongos inoculados al fruto (*P. digitatum* y *P. italicum*) (Eckert et al., 1994).

Estos microorganismos generan ablandamiento en la corteza de la naranja, degradación de las pectinas y de la hemicelulosa presente en la pared celular, interviniendo, además, procesos de hidrólisis enzimática y no enzimáticos, generando cambios de pH o fuerza iónica del medio que envuelve a la pared celular, que también es afectada por factores como la temperatura, humedad relativa y condiciones de cosecha (Palou, 2014).

Estudios realizados a frutos cítricos muestran una relación directa entre la firmeza del fruto y la pérdida de peso del mismo (Álvarez., 2012), siendo la deshidratación la responsable de la turgencia del fruto y, por lo tanto, de la pérdida de la firmeza. En las evaluaciones realizadas a los frutos con afección fúngica *P. digitatum*, se apreció que, después del cuarto día, hay un efecto lineal en el descenso de la firmeza para el "Testigo". Una posible manifestación de pérdida de firmeza, en las naranjas, es la deshidratación de las mismas tal que en el tratamiento TZ0, ese día, se presentó una significativa disminución de este parámetro que se reguló y luego permaneció constante hasta el final del seguimiento.

Adicionalmente se realizó el análisis estadístico ANOVA a los resultados de la prueba de firmeza realizada a las naranjas con afección fúngica (Anexo F.).

Figura 33. Curvas de firmeza, en función del tiempo para naranjas con afección fúngica, sin y con recubrimientos que contenían diferentes diluciones de ZnO-NPs.



En estos estudios se encontraron diferencias significancias ($p < 0,05$), por lo cual se rechazó la hipótesis nula (H_0) planteada y, en consecuencia, se aceptó la hipótesis alterna (H_a), estableciéndose que la aplicación del recubrimiento incidió sobre el parámetro “firmeza de las naranjas con afección fúngica”, y justificó la aplicación de la prueba de LDS de Fisher. Ésta generó tres grupos: el primero conformado por los frutos sin ningún tratamiento (“Testigo”), el segundo por el tratamiento recubrimiento TZ0 y el tercero por los tratamientos con ZnO-NPs (TZ9 y TZ12); los resultados del análisis indicaron que la aplicación del recubrimiento con ZnO-NPs, a los sistemas con diferente afección fúngica, disminuyó significativamente la pérdida de la firmeza en las naranjas, ya que a los frutos del control se les aplicó una fuerza de 2.1 N y a los que fueron recubiertos con ZnO-NPs TZ9 y TZ12 la fuerza aplicada fue de 18.87 N y 19.36 N, respectivamente, estos resultados confirman la posibilidad de que el recubrimiento actuó como barrera ante el oxígeno, siendo este gas el vector principal en la actividad enzimática causante de la degradación de las paredes celulares de los hongos (Zapata, 2007). La incorporación de ZnO-NPs en el recubrimiento tuvo un efecto significativo sobre la pérdida de la firmeza. Para justificar el comportamiento de este parámetro es necesario considerar que la acción fúngica de los hongos es la principal responsable de la maceración del tejido exterior de la naranja, ejerciendo sobre

ella una elongación exagerada y pérdida de la turgencia (Pérez y Krochta, 2000). Las ZnO-NPs incorporadas al recubrimiento impidieron que este efecto se manifestará drásticamente, favoreciendo las propiedades de barrera y ejerciendo un posible control en las reacciones enzimáticas propias de los microorganismos (Sharma *et al.*, 2010).

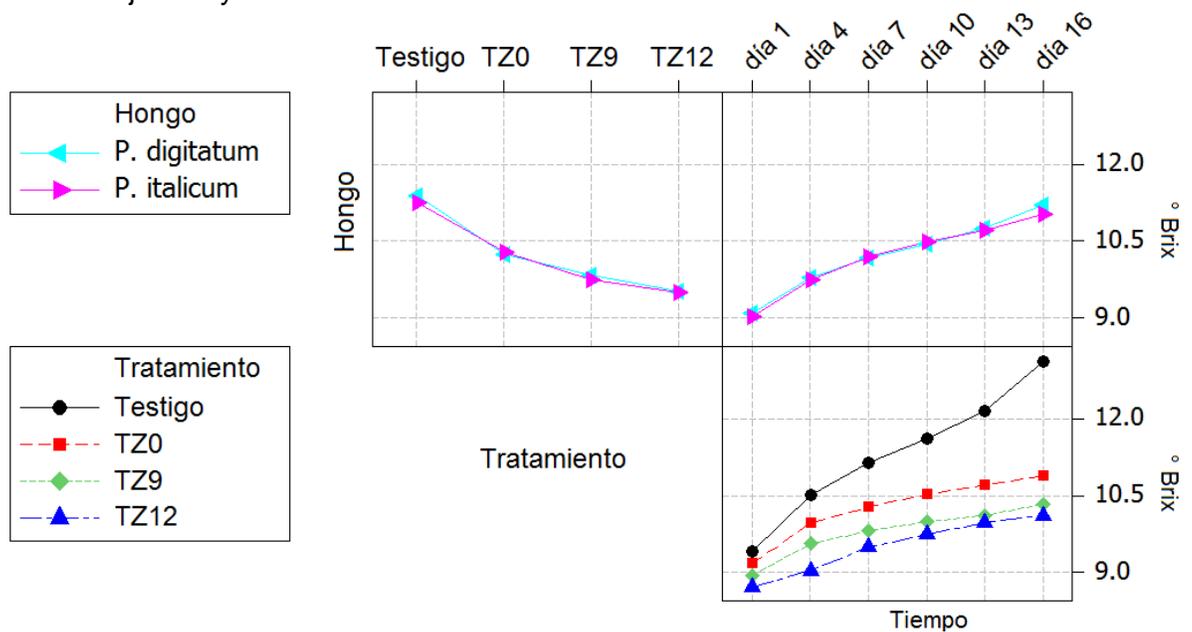
En un segundo análisis LDS de Fisher, se buscó establecer si el factor evaluado incorporación del hongo por especie, afectaba la pérdida de la firmeza naranja encontrándose que no había suficiente evidencia estadística.

3.3.2.5 Sólidos solubles totales (SST). Se encuentran constituidos, principalmente, de azúcares (80-85%). El ácido cítrico y otros ácidos, sus sales, compuestos de nitrógeno y otras sustancias solubles, como las vitaminas, constituyen la composición restante de los SST. Los SST representan 10-20% del peso del fruto. Durante el desarrollo experimental de la prueba, se observó cómo este parámetro aumentaba ligeramente en los tratamientos evaluados en el tiempo (fig. 34.), para ambos sistemas. La unidad en que se enunciaron los valores para este parámetro fueron ° Brix, con respecto al tiempo (días) de seguimiento; es importante recordar que los ° Brix del zumo de naranja indica todos los sólidos solubles existentes en el mismo y no, solamente, la medida de azúcares (Arévalo, 2013).

Como resultado del análisis estadístico ANOVA, realizado a los resultados del ensayo SST en el sistema con afección fúngica por los hongos del género *Penicillium* (Anexo G.), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), lo que llevó a rechazar la hipótesis nula (H_0) y a aceptar la hipótesis alterna (H_a). Por ello se realizó la prueba LDS de Fischer, donde se generaron tres grupos: el primero constituido por el tratamiento "Testigo", el segundo por el tratamiento TZ0 y el tercero por los tratamientos donde el recubrimiento contenía ZnO-NPs TZ9 y TZ12. Considerando los resultados de este análisis se concluyó que la aplicación del recubrimiento incidió sobre la concentración de SST presentes en la naranja. Esta información es importante en la medida en que se posibilita la conservación de factores nutricionales tales como vitaminas, sales minerales, ácidos orgánicos, etc., (Storey y Treeby, 1999). Debido a los procesos normales de maduración la división celular, produce

dos mecanismos de diferenciación celular independientes que establecerán las características específicas de cada tipo de célula y tejido (Schröder *et al.*, 2004) que pueden verse afectadas por la acción fúngica de los hongos, es por ello que el fruto no recubierto “Testigo”, pudo elevar la concentración de los SST, y en consecuencia favorecen el desarrollo excesivo de la maduración, (WANI *et al.*, 2012) algo no deseado desde el punto de vista comercial.

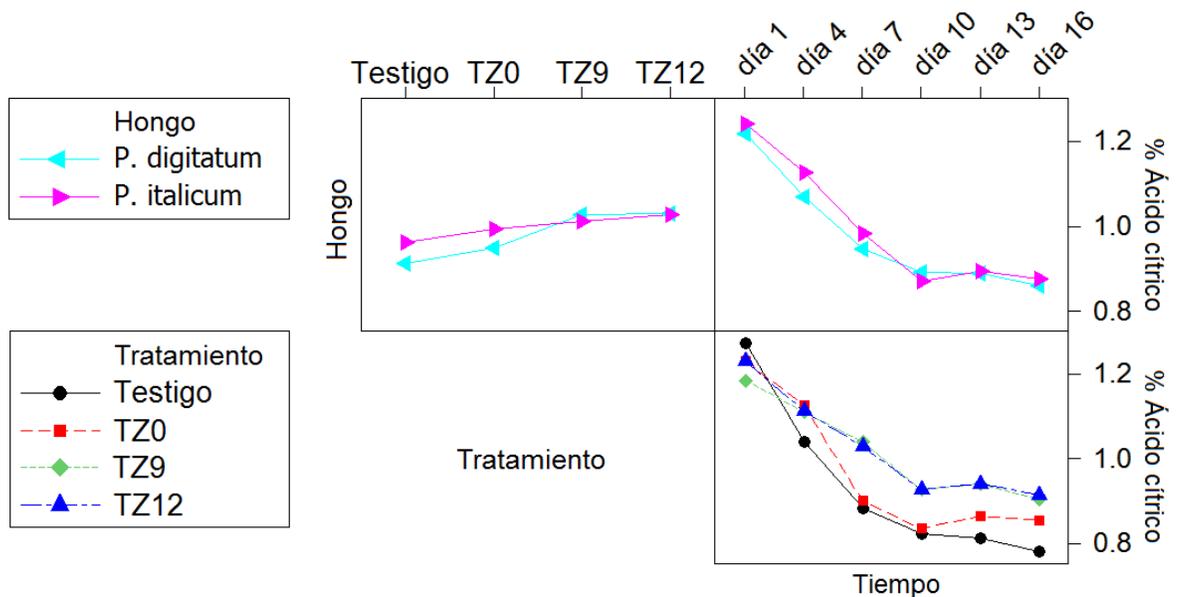
Figura 34. Curvas de sólidos solubles totales, en función del tiempo y agente fúngico, para las naranjas sin y con tratamientos.



Teniendo en cuenta el parámetro de tabla de color, de la norma NTC 4086, es importante destacar que los frutos que fueron recubiertos con biopolímeros que contenían ZnO-NPs presentaron 10.34 °Bx y 10.11 °Bx; tratamientos TZ9 y TZ12 respectivamente. El ANOVA realizado al factor Hongo para el parámetro de SST no presentó evidencia estadística suficiente para establecer diferencias significativas.

3.3.2.6 Acidez titulable. La evaluación de este parámetro permite cuantificar el contenido de acidez de la naranja, expresado como porcentaje de ácido cítrico. Los resultados de esta prueba (fig. 35.) ponen en evidencia la disminución del porcentaje de acidez de estos frutos en el tiempo y se espera, normalmente, que esta pérdida de acidez se incremente después de la cosecha del fruto. En esta prueba se observó, específicamente, cómo los tratamientos TZ9 y TZ12, a partir de décimo día, estabilizaron la pérdida de acidez en un 24%, aproximadamente, para ambos sistemas. Cabe resaltar que la norma NTC 4086, en su tabla de color, reporta porcentajes máximos de acidez que oscilan en valores de 1.3 - 1.1 %.

Figura 35. Seguimiento de la acidez titulable, en función del tiempo y agente fúngico, de naranjas sometidas a tratamientos con o sin ZnO-NPs.

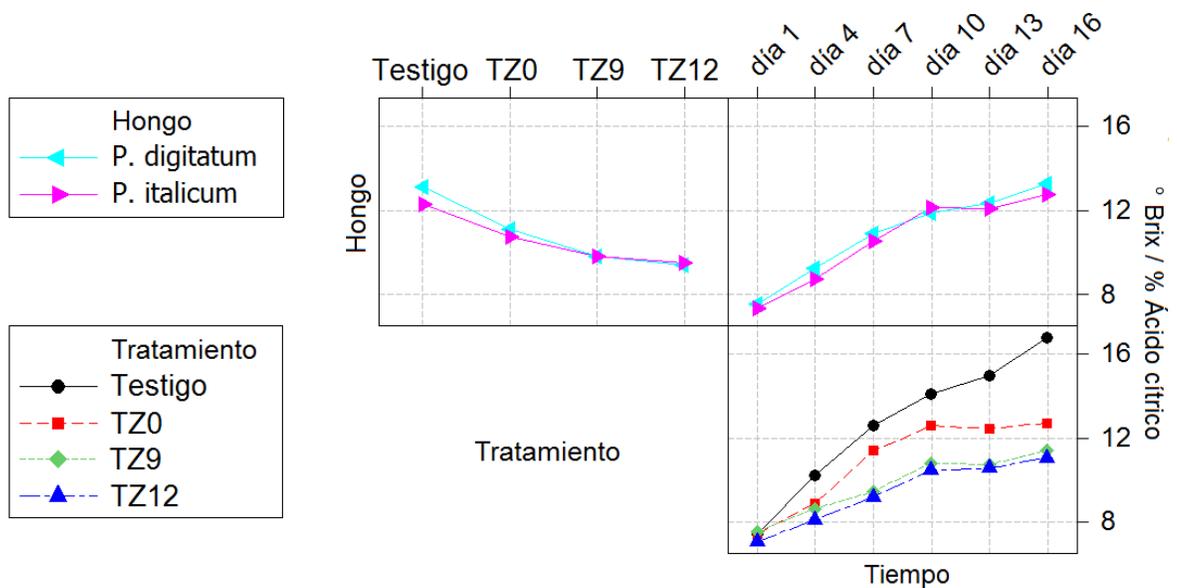


Se realizó el análisis estadístico ANOVA (Anexo H.) para estos resultados encontrándose que no existía suficiente evidencia estadística que indicará que se presentaban diferencias significativas para los factores tratamiento y hongo, por lo que se aceptó la hipótesis nula H_0 : "Todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre el porcentaje de ácido cítrico de la naranja". por lo que no se puede indicar si el recubrimiento tiene o no efecto significativo en la disminución del % de acidez. Este resultado se puede justificar si se considera que, posiblemente, el efecto del recubrimiento es solo a nivel superficial y la disminución del % acidez puede deberse también al fenómeno conversión de ácidos orgánicos a azúcares,

hidrolisis de polisacáridos con liberación de azúcares solubles, propias del metabolismo del fruto (Toğrul y Arslan, 2003) que ocurren, principalmente, al interior del fruto.

3.3.2.6 Índice de madurez. Este parámetro es una medida derivada que se calcula de los datos obtenidos en las pruebas de SST y acidez titulable. Ya que este indicador químico es el resultado de la relación de los dos parámetros anteriores, al tomar los resultados experimentales se observan diferencias apreciables de los tratamientos a partir del cuarto día (fig. 36.), los que se intensifican con el paso del tiempo.

Figura 36. Curvas de índice de madurez, en función del tiempo, para los tratamientos con o sin ZnO-NPs de naranjas con afección fúngica del género *Penicillium*.



Tras el análisis estadístico ANOVA realizado a los datos obtenidos de este ensayo, para los sistemas con afección fúngica del género *Penicillium* (Anexo I.), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el parámetro tratamiento, lo que llevó a rechazar la hipótesis nula (H_0) y a aceptar la hipótesis alterna (H_a). Esto motivó la realización de la prueba LDS de Fisher, donde se generaron tres grupos: el primer compuesto por los tratamientos "Testigo", el segundo por el tratamiento TZ0 y tercero por los tratamientos TZ9

y TZ12. Con base en los resultados obtenidos de esta prueba se concluyó que la aplicación del recubrimiento, con incorporación de ZnO–NPs, incidió sobre el índice de madurez de la naranja. Esto se podría justificar considerando que la conservación de sólidos solubles, en este caso, fue contralada en mayor proporción que para los otros sistemas; de igual forma, la disminución del % de acidez no fue tan significativa a pesar de que el recubrimiento no tuvo un efecto representativo en esta disminución. El análisis estadístico para el factor hongo, para los sistemas con afección fúngica del género *Penicillium* no arrojaron suficiente evidencia estadística debido que no hay diferencias significativas entre los datos analizados.

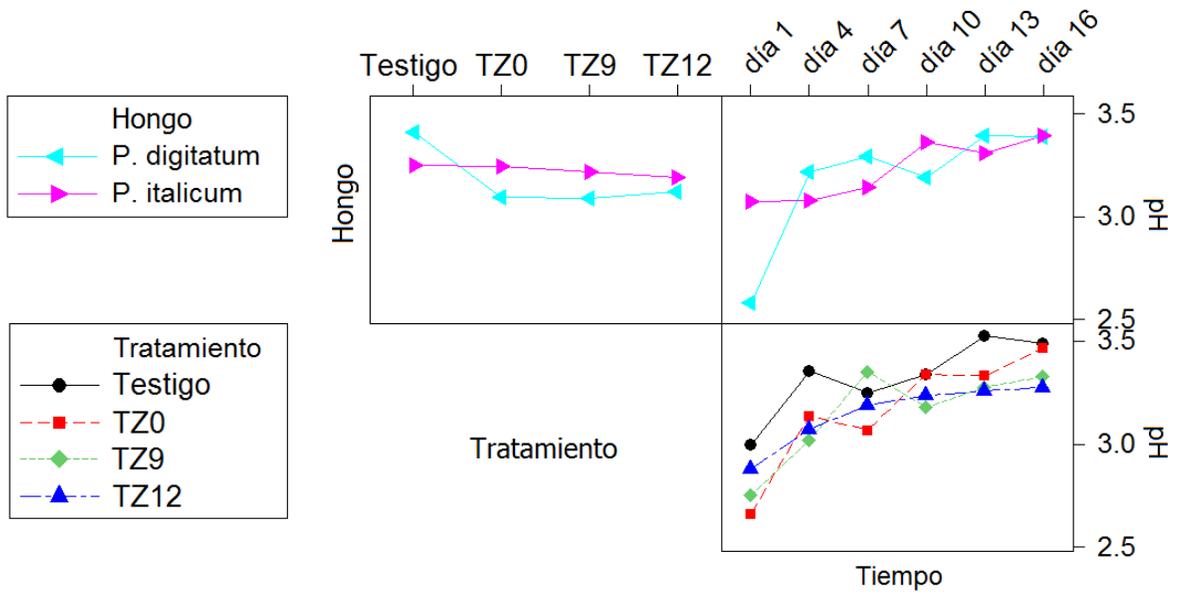
3.3.2.7 Potencial de hidrógeno (pH). Esta valoración se realizó tomando una alícuota del zumo de la pulpa del fruto y luego, haciendo uso de un pHmetro, se registró la lectura de este parámetro. Como se observa en la figura 37, los sistemas presentaron valores descendentes entre los días 7 y 10, valores bastante desviados de los registrados para los tratamientos, con excepción del tratamiento TZ12, que presenta un comportamiento con una tendencia.

De acuerdo al análisis estadístico ANOVA realizado a los resultados anteriormente indicados, para el sistema *P. digitatum* (Anexo J.) No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) lo que llevó a rechazar la hipótesis nula (H_0) y a aceptar la hipótesis alterna (H_a), y a realizar la prueba LDS Fischer. En esta prueba se generó un solo grupo para los factores tratamientos y hongo. Los resultados mostraron que para los tratamientos propuestos no se presentaron efectos sobre el pH del fruto, posiblemente, la regulación de procesos bioquímicos de maduración sería favorecida por las condiciones de análisis para este parámetro (Prusky *et al.*, 2004).

Una posible causa que pudo haber afectado el seguimiento del pH está relacionada con el instrumento de medida, el cual debió cambiarse al día 10 del seguimiento y debido a que

esta prueba específicamente es destructiva no pudieron corroborarse los datos del día 7 que presentan una incertidumbre significativa.

Figura 37. Curvas de pH en función del tiempo de naranjas del sistema con afección fúngica, sometidas a tratamiento sin y con ZnO-NPs.



4. CONCLUSIONES

A través de la modificación del método de síntesis, garantizando su reproducibilidad y empleando un menor tiempo se logró obtener nanopartículas de ZnO, de tamaño menor a 100 nm, con morfología esférica, estructura cristalina tipo wurzita, y con un valor gap de 3.27 eV, alcanzando menor pérdida de óxido con respecto al MPC, considerando las potenciales aplicaciones tecnológicas del ZnO.

Las nanopartículas de ZnO sintetizadas presentaron actividad antifúngica sobre los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, para todos los tratamientos evaluados, siendo los tratamientos TZ9 y TZ12, los más eficientes en el control del crecimiento micelial.

Se obtuvo un recubrimiento con propiedades antifúngicas y de barrera, debido a la incorporación de ZnO-NPs, específicamente, en los tratamientos TZ9 y TZ12, aportando protección contra los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, y favoreciendo la conservación del peso, firmeza y la regulación de la respiración de la naranja Valencia.

El periodo de actividad antifúngica del recubrimiento natural de almidón de yuca modificado con incorporación de ZnO-NPs de los tratamientos TZ9 Y TZ12 en condiciones de góndola para naranja Valencia (*Citrus sinensis*) es de 15 días en los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.

5. RECOMENDACIONES

Realizar el estudio en condiciones pos cosecha en frutos cítricos sin la afección fúngica y evaluar el comportamiento físico-químico de las variables evaluadas, empleando el recubrimiento con la incorporación de las nanopartículas de ZnO

Elaborar una metodología que permita evaluar la capacidad antifúngica del material pre-calcinado, considerando su posible incorporación en la matriz polimérica y efectuar los estudios faltantes de caracterización como posible nanomaterial.

Implementar metodologías de “síntesis verde” para elaborar nuevos recubrimientos que puedan ser evaluados en productos hortofrutícolas, específicamente sobre los parámetros de calidad microbiológica y físico-química.

Identificar las causas de las zonas inhibitorias generadas por los hongos objeto de estudio antifúngico con ZnO en los tratamientos *in vitro*.

Realizar estudios que permitan evaluar otras variables como toxicidad del óxido de cinc, biodegradabilidad, contenido de vitamina C, migración del agente antifúngico al fruto, condiciones de almacenamiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

ACHIPIZ, S. y CASTILLO, A. Conservación de guayaba (*Psidium guajava*) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de almidón de papa (*Solanum tuberosum* L), cristal de sábila (*Aloe barbadensis* Miller) y cera de carnauba (*Copernicia cerifera*). Trabajo de grado Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Agroindustria. Popayán. 2011. p. 14–64.

AGUILAR, P., ESCOBAR, M.J. y PÁSSARO, C.P. Situación actual de la cadena de cítricos en Colombia: limitantes y perspectivas. En: Garcés, L.F. (ed.). Cítricos: Cultivo, poscosecha e industrialización. Serie Lasallista Investigación y Ciencia. Ed. Artes y Letras, Itagüí, Colombia. 2012. 40p.

ALCALDÍA MAYOR DE POPAYÁN. Nuestra geografía. [En línea] 2015. [Citado en septiembre 19 de 2015]. Disponible desde internet en: <http://popayan.gov.co/ciudadanos/popayan/nuestra-geografia>

AL-HINDI, R.R., AL-NAJADA A.R. y MOHAMED, S.A. Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes. En: Afr. J. Microbiol. Res. 2011. vol.5 no. 4, p.443-448.

ALIM, K.A, *et al.* Micro-Raman investigation of optical phonons in ZnO nanocrystals. En: Journal Appl. Phys. Junio, 2005. vol. 97 p. 124313-1–123313-5.

ALOUI, Hajer; *et al.* Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mould caused by *Penicillium digitatum*. En: International Journal of Food Microbiology. 2015, vol. 200, p. 22–30.

ÁLVAREZ BARRETO, Cristina Inés Visión general de la nanotecnología y sus posibilidades en la industria de alimentos En: Revista RECITEIA Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos. 2011, vol. 11, no 1b, p. 142–185.

ALVAREZ QUINTERO, Rafael M. Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha. Trabajo de investigación (Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias: Bioorgánica) Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica Medellín, 2012. 207p.

ARÉVALO MARTÍN, Margarita. Determinaciones cuantitativas relacionadas con la madurez de la naranja por tecnologías NIRS. Máster en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias. Pamplona (España) Universidad Pública de Navarra, 2013. 62p.

ARNONA, Hadar; ZAITSEV, Yana; PORAT, Ron; POVERENOV, Elena. Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. En: Postharvest Biology and Technology, 2014, vol. 87, p. 21-26.

ASHKENOV, N. Infrared dielectric functions and phonon modes of high-quality ZnO films. En: Journal Appl. Phys. Diciembre, 2002. vol. 93, no 1, p. 126–133.

ASOCIACIÓN HORTIFRUTÍCOLA DE COLOMBIA, Estado actual de los cítricos. [En línea]. 2014, [Citado en julio 21 de 2015] Disponible desde internet en: <http://sioc.minagricultura.gov.co/index.php/opc-documentoscadena?ide=9>

BARCO HERNÁNDEZ, Paola Liceth, *et al.* Efecto del recubrimiento a base de almidón de yuca (*Manihot esculenta crantz*) modificado sobre la maduración del tomate de mesa (S L) bajo condiciones ambientales. En: Lasallista de Investigación. 2011. vol. 8, no. 2, p. 96-103.

BARKAI-GOLAN, Rivka. Molecular Diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* Species on Fruits and Vegetables. En: Mycotoxins in fruits and vegetables. 2011, ed.1, p. 211–212.

BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility by a standardized single disk method. En: Am. J. Clin. Pathol. 1966. vol. 45, p. 493–496.

BELTRAN, M; MARCILLA, A. Tipos de plásticos, aditivación y mezclado. En: Tecnología de polímeros, 2011. Tema 2, p. 61–72.

BODBODAK, S. y Rafiee, Z. Recent trends in active packaging in fruits and vegetables. En: Siddiqui, M.W. (ed.). Eco-friendly technology for postharvest produce quality. Elsevier, Amsterdam. 2016. 48p.

BONILLA MÉNDEZ, Rocío. Modificación enzimática de almidón obtenido de siete variedades de yuca (*Manihot esculenta crantz*) para el desarrollo de películas flexibles. Trabajo de grado Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Popayán. 2010

BOUKRAÂ, Laïd; BOUCHEGRANE, Sarah. Acción aditiva de la miel y el almidón frente a *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. En: Revista Iberoamericana de Micología. 2007, vol. 24, no 4, p. 309–311.

CACCIONI, Duccio RL, *et al.* Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. En: International Journal of Food Microbiology. 1998, vol. 43, no 1, p. 73-79.

CALLEJA, J.M. y CARDONA, Manuel. Resonant Raman scattering in ZnO. En: Physical Review B. Octubre, 1977. vol. 16, no 8, p. 3753–3761.

CANTÓN, Rafael, *et al.* Evaluation of the Wider system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing. En: Journal of clinical microbiology. 2000, vol. 38, no 4, p. 1339–1346.

CAO, Guozhong y WANG, Ying. Influences of polymer stabilizer En: Nanostructures and Nanomaterials Synthesis, Properties and Applications, 2011 vol. 2, ed. 2, p. 83–96

CAO, Gouzhong y WANG, Ying. Characterization and Properties of Nanomaterials. En: Reed, M. (Eds.). Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. Vol. 2. World Scientific Publishing, Hackensack, NJ. 2011. 75p.

CHURCH, Ivor J.; PARSONS, Anthony L. Modified atmosphere packaging technology: a review. En: Journal of the Science of Food and Agriculture. 1995, vol. 67, no 2, p. 143–152.

CODEX, STAN. STAN 245-2004, Amd. 1-2005. Codex standard for oranges.

COLEMAN, V. A. y JAGADISH, C. Basic properties and applications of ZnO. En.; JAGADISH, C. y PEARTON, S.J. Zinc Oxide Bulk, Thin Films and Nanostructures: Processing, Properties, and Applications. Amsterdam, Elsevier Ltd., 2006, p. 1-20.

CUSCÓ, Ramon. *et al.* Temperature dependence of Raman scattering in ZnO. En: Physical Review B. Abril, 2007. vol. 75, no 16, p. 165202-2–165202-11.

DE AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro. Antimicrobial activity of nanomaterials for food packaging applications. En: Nano-antimicrobials: progress and prospects. 2012, p. 375–394

DROBY, Samir, *et al.* Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. En: Postharvest Biology and Technology. 2008, vol. 49, no 3, p. 386-396.

DUTTA, R. K., *et al.* Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation. En: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2012, vol. 94, p. 143–150.

ECHEGOYEN, Yolanda. Nano-developments for food packaging and labeling applications. En: Nanotechnologies in food and agricultural. 2015, p. 141–166.

ECKERT, J. W. y RATNAYAKE, M. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. En: Phytopathology. Abril, 1994. vol. 84, no 7, p. 746–750.

EL-OTMANI, Mohamed; AIT-OUBAHOU, Ahmed; ZACARÍAS, Lorenzo. Citrus spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. En: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. 2011, vol. 2, p. 437–514.

ERASMUS, A. *et al.* Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. En: Postharvest Biol. Technol. 2015. vol.107, p. 66-76.

ESPITIA, P.J.P., *et al.* Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. En: Food Bioprocess Technol. 2012. vol.5, no.5, p.1447-1464.

FAN, Feng; TAO, Nengguo; JIA, Lei; HE, Xiangli. Use of citral incorporated in postharvest wax of citrus fruit as a botanical fungicide against *Penicillium digitatum*. En: Postharvest Biology and Technology, 2013, vol. 90, p. 52–55.

FAGUNDES, Cristiane, *et al.* Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. En: International Journal of Food Microbiology. 2013, vol. 166, no 3, p. 391-398

FISCHER, Ivan Herman, *et al.* Doenças pós-colheita em laranja 'Pêra' produzida em sistema orgânico e convencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas. En: Summa Phytopathologica. 2013, vol. 39, p. 28–34.

FORNER, Cassiano, *et al.* Controle em Pós-Colheita de *Penicillium digitatum* em laranja-pera com microrganismos e tratamento térmico. En: Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP. 2013, vol.35, no 1, p 23–31.

FRIEDRICH, F. y NICKEL, N. H. Resonant Raman scattering in hydrogen and nitrogen doped ZnO. En: Applied Physics Letters. Septiembre, 2007. vol. 91, no 11, p. 111903-1–111903-3.

FRISVAD, Jens Christian y SAMSON, Robert A. *Penicillium* subgenus *Penicillium*-A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. En: Studies in mycology, 2004. vol. 49, p. 1–174.

GHARAGOZLOU, Mehrnaz y NAGHIBI, Sanaz. Sensitization of ZnO nanoparticle by vitamin B 12: Investigation of microstructure, FTIR and optical properties. En: Materials Research Bulletin. Julio, 2016. vol. 84, p. 71-78.

GUNALAN, Sangeetha; SIVARAJ, Rajeshwari; RAJENDRAN, Venckatesh. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science*. En: *Materials International*. 2012, vol. 22, no 6, p. 693-700.

HAGENMAIER, Robert D. Evaluation of a polyethylene–candelilla coating for ‘Valencia’ oranges. En: *Postharvest biology and technology*, 2000, vol. 19, no 2, p. 147-154.

HE, Lili; LIU, Yang; MUSTAPHA, Azlin; LIN, Mengshi. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. En: *Microbiological Research*. 2011, vol. 166, p. 207–215.

HEYDARI, Amir; ALEMZADEH, Iran; VOSSOUGH, Manouchehr. Functional properties of biodegradable corn starch nanocomposites for food packaging applications. En: *Materials & Design*. 2013, vol. 50, p. 954–961.

HONG, Jie; PERALTA VIDEA, José R; GARDEA-TORRESDEY, Jorge. Nanomaterials in Agricultural Production: Benefits and Possible Threats. En: *Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements ACS Symposium Series*. 2013, vol. 1124, p. 74–75.

HOYOS CONCHA, José Luis. Seminario de Investigación II. Permeabilidad en empaques elaborados con polímeros biodegradables a base de almidón. Cali (Colombia): Programa de doctorado en Ingeniería con énfasis en alimentos, Universidad del Valle. 2010.

HWANG, Chyi-Ching; WU, Tsung-Yung. Synthesis and characterization of nanocrystalline ZnO powders by a novel combustion synthesis method. En: *Materials Science and Engineering: B*. 2004. vol. 111, no 2, p. 197–206.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Frutas frescas. Naranja Valencia. Especificaciones. Edición actualizada. Santafé de Bogotá: ICONTEC. (NTC 4086), 2003

KADER, Adel A. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. En: *HortScience*. Febrero, 1985. vol. 20, no 1, p. 54–57.

KANMANI, Paulraj; RHIM, Jong-Whan. Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. En: Carbohydrate polymers, 2014, vol. 106, p. 190–199.

KAVYA-SHREE, D. *et al.* ZnO Superstructures as an antifungal for effective control of *Malassezia furfur*, dermatologically prevalent yeast: prepared by Aloe Vera assisted combustion method. En: ACS Sustain. Chem. Eng. 2015. vol.3, no.6, p.1066-1080.

KLABUNDE, Kenneth J; RICHARDS, Ryan M. Nanoscale materials in chemistry. En: Foundations of Chemistry. 2012, vol. 14, ed.2, p 183–184.

KROCHTA, Jonh. M. y DE MULDER-JOHNSTON, Cathérine. Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. En: Food Technology. 1997, vol. 51, ed. 2, p. 61–74.

LAKSHMI PRASANNA, V. & VIJAYARAGHAVAN, Rajagopalan. Insight into the mechanism of antibacterial activity of ZnO-surface defects mediated reactive oxygen species even in the dark. En: Langmuir. Agosto 2015, vol. 31, no 33, p. 9155–9162.

LEPOT, N., *et al.* Synthesis of ZnO nanorods from aqueous solution. En: Materials Letters. 2007. vol. 61, no 13, p. 2624-2627.

LI, W., *et al.* 2011. Development of nano-ZnO coated food packaging film and its inhibitory effect on *Escherichia coli In Vitro* and in actual tests, En: Adv. Mater. Res. 2011. p152–153, 489–492.

LOGOTHETIDIS, Stergios. Nanotechnology: Principles and Applications. En: Nanostructured materials and their applications. 2012, p. 1–22.

LOPES, Franceline Aparecida, *et al.* Conservation of bakery products through cinnamaldehyde antimicrobial films. En: Packaging Technology and Science. 2014, vol. 27, no 4, p. 293–302.

LÓPEZ, Olivia V., *et al.* Food packaging bags based on thermoplastic corn starch reinforced with talc nanoparticles. En: Food Hydrocolloids. 2015, vol. 43, p. 18–24.

LORENZ, Michael, *et al.* Raman and Infrared Spectra from Nanostructures. En: WILLANDER Magnus (ed.). Zinc Oxide nanostructures advances and applications. 2014, p. 70–74.

MA, Hongbo, *et al.* Impact of solar UV radiation on toxicity of ZnO nanoparticles through photocatalytic reactive oxygen species (ROS) generation and photo-induced dissolution. En: Environmental Pollution. 2014, vol. 193, p. 165–172.

MAGNUSON, Bernadene A. Nanoscale materials in foods: existing and potential sources. En: Intentional and Unintentional Contaminants in Food and Feed ACS symposium series. 2009, vol. 1020, p. 47–55.

MANNA, Adhar C. Synthesis characterization and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. En: Cioffi, N. y M. Rai (eds.). Nano-antimicrobials: progress and prospects. Springer Verlag, Berlin. 2012. 29p.

MARSH, Kenneth; BUGUSU, Betty. Food packaging roles, materials, and environmental issues. En: Journal of food science. 2007. vol. 72, no 3, p. R39–R 55.

MARTINEZ, Oscar., *et al.* Manual del usuario espectrofotómetro IR-FT. En: Espectrometría por Infrarrojo Universidad Autónoma de Coahuila. 2011, p. 7–16.

MAZUELAS ESTEBAN, Ángel. Caracterización por difracción de rayos X de heteroestructuras de semiconductores III-V: aplicación al diseño de superredes tensadas para epitaxias de GaAs-Si. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2002

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas. Resultados evaluaciones agropecuarias municipales 2011.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo no. 107. La cadena de cítricos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991–2005.

MONTERO MUÑOZ, Marly., RODRÍGUEZ, Jorge Enrique y ANACONA, Gentil. El óxido de cinc (ZnO): Síntesis y usos tecnológicos. En: Capacidad fotodegradante de las nanopartículas de ZnO. 2012, ed.1, p. 25–78.

MOSQUERA, Silvio A.; VILLADA, Héctor.; HOYOS, José L. Fisiología de la maduración de frutas. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Primera edición. Popayán. 2011. p. 43–114.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, Leading to a revolution in technology and industry that benefits society. [En línea]. 2010, [Citado en julio 27 de 2015] Disponible desde internet en: <http://www.nano.gov/node/164>

NAVARRO, Enrique, *et al.* Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. En: Ecotoxicology. 2008, vol. 17, no 5, p. 372–386.

NAVARRO, Yanine Trujillo; PÉREZ, Jhon; DURÁN, Daniel. Empleo de recubrimientos comestibles con base en almidón de papa y yuca en la conservación del mango cv. Zapote. En: @ limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2011, vol. 10, no 1. p. 5–17.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO), Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos), [En línea]. 2007, p 98–132 [Citado en julio 21 de 2015] Disponible desde internet en: <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.html>

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO), Citrus Fruit Statistics 2015, [En línea]. 2015, p 16 [Citado en noviembre 17 de 2016] Disponible desde internet en: <http://www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>

PALOU VALL, Lluís. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). En: Postharvest Decay Control Strategies. 2014, vol. 1, p. 45–102.

PASQUET, Julia, *et al.* Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. En: International Journal of Pharmaceutics. 2014, vol. 460, p. 92–100.

PÁSSARO CARVALHO, Catarina Pedro *et al.* Poscosecha. En: Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización. 2012, p. 223–284.

PAZ PEÑA, Sandra P. Evaluación de la permeabilidad de un recubrimiento comestible a partir de almidón nativo y modificado de yuca. Popayán. Trabajo de grado Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Popayán, 2014

PERDOMO Paola Andrea e INSUASTI Alexandra. Efecto de recubrimiento a base de propóleo y proteína de soya sobre la calidad de la fresa (*Fragaria ananassa Duch*). Trabajo de grado Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Agroindustria. Popayán, 2015. 66p.

PEREZ-GAGO, M. B., & Krochta, J. M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Junio, 2000. vol. 48, no 7, p. 2687–2692.

PINEDA, L. y SOLÍS, D. Efecto de la aplicación de un recubrimiento de almidón hidrolizado de yuca (*Manihot esculenta crantz*) sobre la maduración del aguacate (*Persea americana Miller*) variedad Hass. Trabajo de grado Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Agroindustria. Popayán, 2011. p. 32–38.

PRUSKY, Dov, *et al.* Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium spp.* on apple and citrus fruit. En: Phytopathology. 2004, vol. 94, no 1, p. 44–51.

QIU, Miao, *et al.* Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. En: Food chemistry, 2014, vol. 155, p. 105–111.

RAM, Manoj K; ANDREESCU, Silvana; DING, Hanming: Persistent Pesticides: Detection and Control Using Nanotechnology. En: Nanotechnology for Environmental Decontamination. 2011, Chapter 11.

RAMIREZ, Luz Stella; CASTAÑO, Darwin Marin. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. En: Scientia et Technica. 2009, vol. 2, no 42. p. 263–266.

RENAU-PIQUERAS, Jaime; FAURA, Magdalena. Principios básicos del microscopio electrónico de barrido. Centro de Investigación. Hospital " La Fé", Sección de microscopía electrónica. Valencia, España, 1994.

RICHTER, H.; WANG, Z. P. y LEY, L. The one phonon Raman spectrum in microcrystalline silicon. En: Solid State Communications. Agosto, 1981. vol. 39, no 5, p. 625–629.

RODRÍGUEZ-PÁEZ, Jorge Enrique. *et al.* Controlled precipitation methods: formation mechanism of ZnO nanoparticles. En: J. Eur. Ceramic Soc. 2001. vol. 21, p. 925–930.

RUELAS-CHACÓN, Xochitl, *et al.* Conservación de frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas con recubrimientos comestibles. En: Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2013, vol. 5, no 9. p. 31–37.

SAAVEDRA H., Nataly; ALGECIRA E., Néstor A. Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas. En: Revista NOVA. 2010, vol.8, no 14, p. 171–182.

SCHUMM. Marcel. ZnO-based semiconductors studied by Raman spectroscopy: semimagnetic alloying, doping and nanostructures. Trabajo de investigación (Doctorado en Física) Julius-Maximilians Universität Würzburg. Würzburg, 2008. p. 45–54.

SCHRÖDER, Roswitha, *et al.* Pectins from the albedo of immature lemon fruitlets have high water binding capacity. En: Journal of plant physiology, 2004, vol. 161, no 4, p. 371–379.

SEPULVEDA, M., *et al.* Improvement in imazalil treatments in commercial packinglines to control green mold on lemon fruit. En: Scientia Horticulturae. 2015 vol. 192, p. 387–390.

SHARMA, Deepali, *et al.* Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. En: Thin Solid Films. 2010, vol. 519, no 3, p. 1224–1229.

SHARMA, Ravi Kant; GHOSE, Ranjana. Synthesis of zinc oxide nanoparticles by homogeneous precipitation method and its application in antifungal activity against *Candida albicans*. En: Ceramics International. 2015, vol. 41, ed.1, p. 967–975.

STASHENKO, Elena E., *et al.* Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (*Citrus sinensis*). En: Journal of Chromatography A. Noviembre, 1996. vol. 752, no 1, p. 217–222.

STOREY, R.; TREEBY, M. T. Short-and long-term growth of navel orange fruit. En: The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 1999, vol. 74, no 4, p. 464–471.

TALAM, Satyanarayana; KARUMURI, Srinivasa Rao; GUNNAM, Nagarjuna. Synthesis, characterization, and spectroscopic properties of ZnO nanoparticles. En: ISRN Nanotechnology. 2012. p. 1–6.

TOĞRUL, Hasan; ARSLAN, Nurhan. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. En: Carbohydrate Polymers. 2003, vol. 54, no 1, p. 73–82.

VALENCIA-CHAMORRO, Silvia, *et al.* Performance of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) lipid edible coatings with antifungal food additives during cold storage of 'Clemenules' mandarins. En: LWT - Food Science and Technology, 2011. vol. 44, ed. 10, p. 2342–2348.

VAN LONG, N. Nguyen; JOLY, Catherine; DANTIGNY, Philippe. Active packaging with antifungal activities. En: Int. Journal of Food Microbiology, 2016. vol. 220, p. 73–90.

VÉLEZ, P., *et al.* Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. En: Boletín Técnico CENICAFÉ. 1997, no 17. p. 7–16.

VIUDA–MARTOS, Manuel, *et al.* Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. En: Journal of food science, 2008, vol. 73, no 9, p. R117–R124.

WANI, A. H., *et al.* Antimycotic activity of nanoparticles of MgO, FeO and ZnO on some pathogenic fungi. En: International Journal of Manufacturing, Materials, and Mechanical Engineering (IJMMME), 2012, vol. 2, no 4, p. 59–70.

YANG, Qingbo; MA, Yinfa. Irradiation-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles. En: International Journal of Toxicology, 2014, vol. 33, ed. 3, p. 187–203.

ZOLFI, Mohsen, *et al.* The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. En: Carbohydrate polymers. 2014, vol. 109, p. 118–125.

ZUÑIGA, Danyeli y ORDOÑEZ, Diana Yamile. Efecto de recubrimiento de almidón de yuca modificado y aceite de tomillo aplicado al pimiento (*Capsicum annuum*). En: Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. México. Diciembre. 2014, vol. 5. no. 6, p. 115–123.

ANEXOS

ANEXO A.

Datos promedios obtenidos durante los seguimientos *in vitro* e *in vivo* de las variables de respuesta. (Tto = Tratamiento)

Cuadro 1. Seguimiento del área crecimiento del hongo *P. digitatum* en cm²

Día\Tto	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	TZ3-1	TZ3-2	TZ3-3	TZ6-1	TZ6-2	TZ6-3	TZ9-1	TZ9-2	TZ9-3	TZ12-1	TZ12-2	TZ12-3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.88	0.358	0.729	0.522	0.109	0.293	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3.997	3.335	3.651	0.937	0.694	0.706	0.608	0.817	0.382	0.561	0.476	0.524	0.599	0.415	0.371
4	7.093	9.327	7.517	2.029	1.604	1.498	1.15	1.571	1.049	1.154	0.983	1.15	0.941	0.713	0.646
5	8.391	13.1	10.746	2.777	2.32	2.044	1.706	2.442	1.732	1.776	1.724	1.739	1.458	1.245	1.293
6	9.496	16.071	12.784	3.2	2.687	2.309	2.016	2.946	2.141	2.221	2.113	2.197	1.615	1.538	1.556
7	10.164	20.397	15.281	3.418	3.014	2.417	2.178	3.183	2.298	2.532	2.361	2.496	1.846	1.791	1.812
8	13.949	23.553	18.751	3.667	3.327	2.641	2.291	3.223	2.546	2.812	2.556	2.794	2.012	1.944	1.951
9	20.818	27.402	24.11	4.041	3.727	3.013	2.603	3.912	2.892	3.281	2.902	3.189	2.422	2.362	2.428
10	32.242	39.032	35.993	4.395	3.992	3.326	3.011	4.26	3.207	3.696	3.256	3.493	2.728	2.696	2.739
11	35.757	42.692	39.589	5.112	4.346	4.135	3.533	5.04	3.878	4.29	3.974	4.098	3.271	3.108	3.304
12	37.23	44.841	42.133	5.855	4.869	4.586	3.81	5.652	4.446	4.782	4.442	4.536	3.816	3.795	3.966

Cuadro 2. Seguimiento del área crecimiento del hongo *P. italicum* en cm²

Día\Tto	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	TZ3-1	TZ3-2	TZ3-3	TZ6-1	TZ6-2	TZ6-3	TZ9-1	TZ9-2	TZ9-3	TZ12-1	TZ12-2	TZ12-3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.905	0.832	0.908	0.388	0.348	0.396	0.209	0.287	0.177	0	0	0	0	0	0
3	3.621	3.335	3.651	1.062	0.902	0.975	0.817	0.935	0.79	0.658	0.629	0.557	0.449	0.408	0.452
4	4.514	4.471	4.619	2.104	1.918	1.97	1.571	1.633	1.362	1.309	1.286	1.287	0.823	0.797	0.839
5	6.817	6.765	6.928	3.272	2.993	3.133	2.246	2.409	2.152	2.003	1.998	1.993	1.365	1.312	1.38
6	9.479	9.37	9.504	4.326	4.181	4.297	3.223	3.48	3.167	2.884	2.833	2.832	1.866	1.85	1.883
7	13.568	14.012	14.16	7.557	7.009	7.436	5.364	5.612	5.232	3.876	3.813	3.815	2.422	2.409	2.431
8	20.64	20.397	21.074	11.065	10.624	10.901	7.693	8.164	7.587	5.074	4.905	4.911	2.928	2.911	2.952
9	28.403	28.578	29.982	15.872	15.267	15.672	10.415	11.272	10.327	6.893	6.469	6.504	4.029	4.017	4.1
10	32.717	32.606	32.778	19.251	18.933	19.014	15.147	15.795	15.041	8.154	7.805	7.892	5.206	5.199	5.284
11	35.011	34.943	35.047	21.387	21.036	21.274	16.84	17.763	16.747	9.392	9.109	9.126	6.197	6.191	6.269
12	37.639	37.57	37.706	23.179	23.012	23.101	18.157	19.165	18.054	10.734	10.425	10.442	7.153	7.148	7.223

Cuadro 3. Seguimiento del % pérdida de peso de la naranja con afección fúngica por *Penicillium digitatum*.

Día\Tto	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	TZ0-1	T 2	TZ0-3	TZ9-1	TZ9-2	TZ9-3	TZ12-1	TZ12-2	TZ12-3
1	1.74	3.56	2.29	2.87	2.49	1.89	2.23	2.84	2.27	2.19	4	2.3
2	4.44	5.64	4.04	4.39	5.41	5.15	4.71	5.57	4.19	4.57	6.46	4.7
3	5.77	7.01	5.19	5.97	6.96	7.05	6.24	7.16	5.76	6.15	8.07	6.14
4	7.65	8.99	6.93	8.26	9.28	9.84	8.37	9.97	7.87	8.21	10.36	8.26
5	8.68	11.13	8.74	9.37	10.54	11.17	9.49	10.77	8.92	9.3	11.54	9.34
6	10.27	14.86	11.93	10.25	11.55	12.16	10.44	11.75	9.97	10.29	12.63	10.43
7	16.53	19.91	13.16	11.03	12.47	13.19	11.36	12.9	10.74	11.05	13.53	11.19
8	18.86	23.63	18.95	11.79	13.43	14.4	12.47	13.52	11.49	11.76	14.27	11.92
9	22.2	29.45	25.85	12.63	14.46	15.19	13.56	14.15	12.32	12.72	15.09	12.76
10	28.99	36.17	33.19	14.25	15.84	16.5	16.48	15.04	13.73	13.26	16.34	14.18
11	33.78	40.04	37.46	14.47	16.49	17.67	18.05	16.06	14.13	14.38	17.2	14.75
12	37.97	44.34	42.64	15.33	17.43	18.86	20.76	16.76	14.95	15.23	18.11	15.62
13	44.55	50.1	49.22	16.58	18.88	20.64	24.73	17.71	15.75	16.16	19.09	16.35
14	48.22	54.13	54.82	18.01	20.52	22.83	28.19	18.78	17.16	17.72	20.74	17.29

Cuadro 4. Seguimiento del % pérdida de peso de la naranja con afección fúngica por *Penicillium italicum*.

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	2.50	1.62	1.59	3.05	2.27	3.18	1.95	2.93	2.06	1.35	1.90	1.96
2	4.03	3.03	2.87	5.44	5.35	6.09	5.64	3.73	3.73	3.07	3.38	3.43
3	5.10	4.00	4.17	7.97	7.37	7.93	7.05	6.00	5.97	4.23	4.39	4.91
4	6.64	5.54	6.08	10.36	10.06	10.63	9.07	8.13	8.25	5.99	5.88	6.15
5	7.41	6.28	7.03	11.54	11.46	11.97	10.11	9.17	9.40	6.84	6.72	7.08
6	8.15	7.05	7.94	12.68	12.68	13.05	11.05	10.16	10.44	7.59	7.48	7.79
7	9.31	8.65	8.13	13.41	13.49	14.01	11.91	11.03	11.37	8.29	8.20	8.53
8	10.72	11.01	10.73	14.22	14.81	15.13	12.68	12.01	12.13	8.96	8.86	9.00
9	12.52	13.71	12.77	15.96	15.52	16.11	13.56	12.66	13.05	9.64	9.54	9.70
10	13.70	14.02	14.99	16.34	17.84	18.04	14.71	13.16	14.07	10.71	10.62	10.65
11	14.95	15.38	16.11	17.72	18.80	18.74	15.29	14.63	15.11	11.19	11.23	11.62
12	16.02	17.12	18.09	18.88	19.30	19.85	16.24	15.84	15.95	11.94	12.12	12.57
13	20.45	22.05	31.59	19.37	20.13	21.11	17.22	17.45	16.87	12.64	12.78	13.23
14	27.26	29.93	36.54	21.98	21.70	22.96	18.48	18.79	17.81	13.57	13.79	14.20

Cuadro 5. Seguimiento de la tasa de respiración de la naranja con afección fúngica por *Penicillium digitatum* en % mgCO₂ / Kg h

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	32	27.9	32	22.9	23.2	22.9	17.8	17.9	17.9	13.2	13.1	13.2
3	69.9	69.7	67	62.2	62.2	62.5	43.1	42.9	43.1	35.8	35.7	35.5
5	86.2	86.9	86.3	83.2	83	81.7	64.1	60.9	60.9	44.7	44.9	44.9
7	82.6	81.6	81.6	84.8	84.9	84.8	68.5	68.9	68.4	50	50.2	50
9	39.1	38.5	38.1	73.3	73.6	73.6	80.1	80.2	79.1	60.4	60.4	60.3
11	39.9	39.2	40	69.3	67.7	66.8	62.3	62.7	62.9	62.1	61.9	62.2
13	42.3	42.8	42.3	57.8	58.1	56.7	42.9	43	43.1	55.1	54.9	54.8
15	39.4	40	39.4	47.6	47.7	47.6	30.6	30.5	30.2	42.1	44.6	44

Cuadro 6. Seguimiento de la tasa de respiración de la naranja con afección fúngica por *Penicillium italicum* en % mgCO₂ / Kg h

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	19.6	19.6	19.7	15.3	15.4	15.3	18.8	18.9	19	13.9	13.9	14
3	47.7	47.7	47.7	30.7	30.4	33.5	33.2	29.5	33.1	36.5	36.6	36.5
5	55.9	55.7	55.9	21.5	21.7	21.4	7.6	7	6.6	51.5	56.3	56.3
7	55.5	55.5	55.4	18.4	18.7	18.7	67.6	67.3	67.6	67.4	67.4	67.4
9	54	53.9	53.8	24.8	24.5	24.1	10.1	9.1	8.9	71.9	72.5	72.2
11	47.5	47.2	47.1	27.3	27.5	27.4	10.7	10.1	9.8	70.6	70.8	70.8
13	49	49	49.2	29.2	29.3	28.6	9.4	9.4	9.2	70.4	70.6	70.5
15	51.6	51.4	51.1	30.1	28.9	29.4	13.1	12.9	13	64.7	64.8	64.8

Cuadro 7. Seguimiento de los sólidos solubles totales de la naranja con afección fúngica por *Penicillium digitatum* en ° Bx

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	9.17	9.33	9.13	9.07	9.17	9.17	9.1	9.13	9.03	9	8.83	8.93
4	10.57	10.57	10.63	10.03	10	9.9	9.57	9.57	9.63	9.07	8.97	8.97
7	11.1	11.1	11.07	10.33	10.27	10.33	9.83	9.8	9.83	9.47	9.4	9.47
10	11.67	11.63	11.67	10.43	10.47	10.47	10.07	9.93	10.03	9.67	9.67	9.7
13	12.27	12.47	12.1	10.67	10.6	10.63	10.17	10.17	10.17	9.97	9.97	9.97
16	13.37	13.67	13.47	10.9	10.9	10.83	10.33	10.33	10.37	10.07	10.13	10.13

Cuadro 8. Seguimiento de los sólidos solubles totales de la naranja con afección fúngica por *Penicillium italicum* en ° Bx

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	9.53	9.63	9.6	9.23	9.07	9.33	8.7	8.83	8.87	8.4	8.43	8.63
4	10.43	10.47	10.47	9.93	10.03	9.9	9.53	9.53	9.5	8.93	9.2	9.07
7	11.17	11.2	11.23	10.17	10.23	10.33	9.83	9.73	9.87	9.57	9.47	9.57
10	11.53	11.6	11.6	10.63	10.57	10.6	9.93	9.97	10	9.73	9.77	9.9
13	11.97	12.2	11.9	10.77	10.77	10.8	10.07	10.07	10.03	9.97	9.97	9.97
16	12.6	12.7	13	10.93	10.87	10.9	10.33	10.33	10.33	10.13	10.13	10.1

Cuadro 9. Seguimiento de la acidez titulable de la naranja con afección fúngica por *Penicillium digitatum* en % de ácido cítrico.

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	1.28	1.34	1.11	1.23	1.19	1.17	1.25	1.21	1.18	1.32	1.12	1.21
4	1.05	0.93	0.97	1.02	1.03	1.17	1.02	1.15	1.18	1.19	1.08	1.03
7	0.84	0.83	0.87	0.86	0.95	0.9	1.03	0.99	1.03	1.03	1.01	1.01
10	0.81	0.79	0.86	0.81	0.86	0.86	1.03	0.88	0.93	0.92	0.97	0.97
13	0.81	0.76	0.84	0.76	0.89	0.86	0.97	0.96	0.92	0.97	0.94	0.97
16	0.77	0.74	0.79	0.79	0.87	0.84	0.92	0.9	0.9	0.9	0.97	0.9

Cuadro 10. Seguimiento de la acidez titulable de la naranja con afección fúngica por *Penicillium italicum* en % de ácido cítrico.

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	1.32	1.36	1.22	1.25	1.22	1.32	1.1	1.23	1.14	1.28	1.25	1.2
4	1.23	0.92	1.14	1.12	1.32	1.1	1	1.21	1.1	1.12	1.12	1.14
7	0.96	0.9	0.9	0.9	0.88	0.92	1.06	1.14	0.99	1.03	1.02	1.08
10	0.86	0.82	0.81	0.81	0.84	0.84	0.87	1.01	0.85	0.88	0.91	0.92
13	0.82	0.87	0.78	0.86	0.91	0.91	0.94	0.99	0.87	0.94	0.92	0.91
16	0.77	0.84	0.79	0.87	0.89	0.88	0.92	0.91	0.88	0.91	0.92	0.9

Cuadro 11. Seguimiento del índice de madurez de la naranja con afección fúngica por *Penicillium digitatum* en °Bx / % de ácido cítrico.

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	7.19	6.96	8.2	7.36	7.72	7.82	7.26	7.55	7.65	6.82	7.88	7.39
4	10.08	11.35	10.99	9.85	9.68	8.44	9.39	8.31	8.16	7.59	8.32	8.68
7	13.17	13.4	12.69	12.05	10.77	11.46	9.58	9.9	9.51	9.16	9.29	9.36
10	14.34	14.69	13.6	12.82	12.2	12.2	9.81	11.29	10.78	10.47	9.92	10.02
13	15.18	16.43	14.39	14.06	11.9	12.4	10.45	10.63	11.05	10.24	10.6	10.24
16	17.4	18.41	16.97	13.73	12.52	12.82	11.21	11.53	11.57	11.24	10.42	11.31

Cuadro 12. Seguimiento del índice de madurez de la naranja con afección fúngica por *Penicillium italicum* en °Bx / % de ácido cítrico.

Día\Tto	Testigo 1	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	7.23	7.1	7.89	7.41	7.41	7.07	7.91	7.17	7.75	6.59	6.73	7.18
4	8.47	11.33	9.15	8.86	7.6	9	9.49	7.88	8.64	7.97	8.2	7.93
7	11.63	12.42	12.46	11.28	11.63	11.19	9.32	8.51	9.97	9.26	9.29	8.88
10	13.45	14.13	14.26	13.07	12.64	12.57	11.39	9.85	11.76	11.07	10.68	10.72
13	14.51	13.96	15.35	12.55	11.87	11.91	10.71	10.17	11.48	10.6	10.79	10.99
16	16.41	15.03	16.38	12.56	12.24	12.4	11.21	11.32	11.74	11.1	11	11.22

Cuadro 13. Seguimiento del pH de la naranja con afección fúngica por *P. digitatum*.

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	3.43	2.73	2.77	2.4	2.2	2.5	2.3	2.3	2.4	2.43	2.53	2.97
4	3.43	3.53	3.53	3.17	3.23	3.07	3.23	3.03	3.03	3.2	3.1	3.07
7	3.77	3.4	3.27	3.53	3.1	2.9	3.33	3.23	3.27	3.27	3.27	3.13
10	3.33	3.5	2.97	3.17	3.13	3.2	3.13	3.17	3.17	3.27	3.03	3.23
13	3.45	3.65	3.77	3.22	3.43	3.37	3.29	3.31	3.32	3.37	3.34	3.21
16	3.65	3.56	3.59	3.08	3.5	3.52	3.23	3.39	3.44	3.38	3.16	3.19

Cuadro 14. Seguimiento del pH de la naranja con afección fúngica por *P. italicum*.

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	2.97	3.03	3.07	2.93	3.13	2.83	3.07	3.37	3.07	3.1	3.2	3.07
4	3.1	3.27	3.27	3.4	2.97	3	2.97	2.9	2.97	3.13	2.9	3.03
7	2.97	3.03	3.07	2.93	3.13	2.83	3.33	3.33	3.63	3.27	3.1	3.1
10	3.17	3.62	3.47	3.48	3.72	3.34	3.26	3.35	3	3.38	3.18	3.34
13	3.54	3.59	3.18	3.25	3.28	3.45	3.24	3.14	3.37	3.26	3.19	3.19
16	3.35	3.29	3.51	3.38	3.26	4.08	3.31	3.43	3.19	3.25	3.44	3.24

Cuadro 15. Seguimiento de la firmeza de la naranja con afección fúngica por *P. digitatum* en N

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	17.83	17.82	16.98	24.65	20.54	21.87	25.77	24.42	25.40	25.06	26.71	26.54
4	16.37	15.00	16.92	22.01	19.39	22.03	24.74	25.70	22.96	21.84	22.70	22.73
7	10.59	10.28	8.91	18.31	13.20	14.63	22.46	23.90	23.06	19.11	23.35	23.64
10	2.32	3.11	2.52	12.03	15.81	17.82	19.76	24.18	20.18	21.33	21.02	21.37
13	2.05	1.44	1.68	16.59	16.35	13.83	18.76	22.15	19.61	21.87	21.05	19.61
16	0.63	1.33	1.43	15.70	14.62	9.53	21.91	19.69	19.53	17.53	21.91	20.64

Cuadro 16. Seguimiento de la firmeza de la naranja con afección fúngica por *P. italicum* en N

Día\Tto	Testigo	Testigo	Testigo	T	T	T 0 3	T 1	T 9 2	T 9 3	T 2 1	T 12	T 12 3
1	19.88	17.01	19.97	19.94	19.13	20.50	23.54	23.51	23.57	25.35	25.22	25.93
4	15.51	16.16	18.55	15.97	17.89	18.59	20.84	21.19	20.96	22.64	24.35	21.25
7	11.51	8.83	10.16	15.66	16.62	17.70	19.45	19.46	20.76	21.38	20.66	21.91
10	9.16	7.89	11.03	13.18	15.66	13.97	19.82	19.54	18.78	20.19	20.00	19.84
13	6.24	5.07	5.90	12.60	14.40	11.76	18.65	18.51	18.13	19.60	19.25	19.42
16	3.53	2.98	2.71	11.46	13.19	13.54	17.90	16.48	17.75	17.99	19.14	18.96

ANEXO B.

Viabilidad para los hongos del género *Penicillium*

Cuadro 1. Conteo de esporas en cámara Neubauer para los hongos del género *Penicillium* aislados de la naranja

MUESTRA		Submuestra	Lectura en cámara						Σ	\bar{X}	δ	
			1	2	3	4	5	6				
Código:	MJP-01	6	9	13	7	5	12	9	55	9.17	2.99	
Dilución:	1x10 ⁻²	10	14	5	7	6	9	9	50	8.33	3.20	
Volumen:	500 mL	15	8	12	6	7	7	14	54	9.00	3.22	
Origen:	Naranja valencia (<i>Citrus sinensis</i>)	[] e/mL = 8.83x10 ² x 1x10 ⁴ = 8.83x10 ⁶ e/mL ± 2.98x10 ⁶ e/mL									8.83	2.98
Localización:	Plaza de mercado Barrio Bolívar (Popayán)											
Hongo o Cepa:	<i>Penicillium digitatum</i>											
Fecha:	01/03/2016											
Observaciones:												
Código:	MJP-02	7	8	7	12	13	6	7	53	8.83	2.93	
Dilución:	1x10 ⁻²	12	9	10	8	12	6	13	58	9.67	2.58	
Volumen:	500 mL	19	11	9	10	6	7	8	51	8.50	1.87	
Origen:	Naranja valencia (<i>Citrus sinensis</i>)	[] e/mL = 9.00x10 ² x 1x10 ⁴ = 9.00x10 ⁶ e/mL ± 2.40x10 ⁶ e/mL									9.00	2.40
Localización:	Finca "El Porvenir" (Timbio Cauca)											
Hongo o Cepa:	<i>Penicillium italicum</i>											
Fecha:	11/04/2016											
Observaciones:												

Cuadro 2. Viabilidad del hongo en conteo en placa

MUESTRA		Submuestra	Número de esporas observadas por submuestra										TOTAL			%G	δ
			1		2		3		4		5		G	NG	G+NG		
			G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G+NG		
Código:	MJP-01	8	98	8	116	3	152	2	119	3	103	7	588	23	611	96.24	
Dilución:	1x10 ⁻²	13	94	9	96	7	103	8	95	15	93	8	481	47	528	91.10	
Volumen:	500 mL	18	104	2	106	5	99	4	107	6	97	10	513	27	540	95.00	
Origen:	Naranja valencia (<i>Citrus sinensis</i>)	% G =	% G = [+C16(G + NG)/G]													94.11	
Localización:	Plaza de mercado Barrio Bolívar (Popayán)																
Hongo o Cepa:	<i>Penicillium digitatum</i>																
Fecha:	04/03/2016																
Observaciones:																	
Código:	MJP-02	6	102	6	102	0	95	7	116	3	106	5	521	21	542	96.13	
Dilución:	1x10 ⁻²	11	96	5	113	6	97	8	99	7	102	4	507	30	537	94.41	
Volumen:	500 mL	17	105	8	106	2	96	7	103	6	91	12	501	35	536	93.47	
Origen:	Naranja valencia (<i>Citrus sinensis</i>)	% G =	% G = [+C16(G + NG)/G]													94.67	
Localización:	Finca "El Porvenir" (Timbio Cauca)																
Hongo o Cepa:	<i>Penicillium italicum</i>																
Fecha:	14/04/2016																
Observaciones:																	

ANEXO C.

Análisis de estadístico de la actividad antifúngica del ZnO-NPs *in vitro*.

Cuadro 1. ANOVA para la actividad antifúngica del ZnO-NPs *in vitro* *P. digitatum*.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	32.34	32.34	16.17	8.97	0
Tratamiento	4	6817.55	6817.55	1704.39	944.94	0
Tiempo	11	2767.03	2767.03	251.55	139.46	0
Tratamiento*Tiempo	44	4643.75	4643.75	105.54	58.51	0
Error	118	212.84	212.84	1.8		
Total	179	14473.52				

Cuadro 4. Diferencias entre las medias de un factor para establecer los tratamientos con mejor actividad antifúngica para *P. digitatum*, utilizando el método LDS Fischer

Tratamiento	N	Media	Desv. stand.	Agrupación
Testigo	36	17.539	14.49	A
TZ3	36	2.6	1.627	B
TZ6	36	2.237	1.554	B
TZ9	36	2.17	1.5	B
TZ12	36	1.677	1.207	B

Cuadro 3. ANOVA para la actividad antifúngica del ZnO-NPs *in vitro* *P. italicum*.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	0	0	0	0.05	0.95
Tratamiento	4	4020.58	4020.58	1005.15	20691.49	0
Tiempo	11	8419.94	8419.94	765.45	15757.21	0
Tratamiento*Tiempo	44	2860.98	2860.98	65.02	1338.52	0
Error	118	5.73	5.73	0.05		
Total	179	15307.24				

Cuadro 4. Diferencias entre las medias de un factor para establecer los tratamientos con mejor actividad antifúngica para *P. italicum*, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Desv. stand.	Agrupación
Testigo	36	16.182	13.738	A
TZ3	36	8.996	8.411	B
TZ6	36	6.912	6.672	B C
TZ9	36	4.156	3.576	C D
TZ12	36	2.708	2.388	D

ANEXO D.

Análisis de estadístico de la pérdida de peso, en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PÉRDIDA DE PESO DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR *P. digitatum*

HIPÓTESIS

Ho: “La aplicación del recubrimiento no incide sobre la pérdida de peso de la naranja”.

Ha: “La aplicación del recubrimiento incide sobre la pérdida de peso de la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para la pérdida de peso sistema *P. digitatum*.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocks	2	100.07	100.07	50.03	15.22	0
Tratamiento	3	3550.49	3550.49	1183.50	360.04	0
Tiempo	13	9965.39	9965.39	766.57	233.20	0
Tratamiento*Tiempo	39	4384.86	4384.86	112.43	34.20	0
Error	110	361.58	361.58	3.29		
Total	167	18362.39				

S = 1.81304 R-cuad. = 98.03% R-cuad. (ajustado) = 97.01%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias de un factor para la pérdida de peso sistema *P. digitatum*, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Testigo	42	22.691	A
TZ0	42	12.321	B
TZ9	42	12.126	B
TZ12	42	11.801	B

Nivel de confianza individual = 98.97% Nivel de confianza simultánea = 79.81%

Cuadro 3. ANOVA de un factor entre las medias de la pérdida de peso sistema *P. digitatum*, para determinar si difieren significativamente utilizando el método de comparaciones múltiples.

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand	IC individual 95%
TZ0	42	12.321	5.24	(10.687,13955)
TZ9	42	12.126	5.71	(10.347,13906)
TZ12	42	11.801	4.67	(10.344,13.259)

2. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PÉRDIDA DE PESO DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR *P. italicum*

HIPÓTESIS

Ho: “La aplicación del recubrimiento no incide sobre la pérdida de peso de la naranja”.

Ha: “La aplicación del recubrimiento incide sobre la pérdida de peso de la naranja”.

Cuadro 4. ANOVA para la pérdida de peso sistema *P. italicum*.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Blocks	2	10.16	10.16	5.08	4.14	0.018
Tratamiento	3	616.44	616.44	205.48	167.61	0
Tiempo	13	4716.80	4716.80	362.83	295.96	0
Tratamiento*Tiempo	39	669.21	669.21	17.16	14.00	0
Error	110	134.85	134.85	1.23		
Total	167	6147.47				

S = 1.10722 R-cuad. = 97.81% R-cuad. (ajustado) = 96.67%

Cuadro 5. Diferencias entre las medias de un factor para la pérdida de peso sistema *P. italicum*, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
TZ0	42	13.77	A
Testigo	42	11.83	A
TZ9	42	11.35	A
TZ12	42	8.42	B

Nivel de confianza individual = 97.86% Nivel de confianza simultánea = 78.79%

Cuadro 6. Prueba t comparaciones múltiples para establecer si la especie de *Penicillium* afectó la pérdida de peso.

Estadísticas	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>
Tamaño de muestra	168.00	168
Media	14.74	11
IC de 95%	(13.138, 16.332)	(10.42, 12.27)
Desv. Stand	10.49	6

ANEXO E.

Análisis de estadístico de la tasa de respiración, en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA TASA DE RESPIRACIÓN DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR *P. digitatum*

HIPÓTESIS

Ho: “La aplicación del recubrimiento no incide sobre la tasa de respiración de la naranja”.

Ha: “La aplicación del recubrimiento incide sobre la tasa de respiración de la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para la tasa de respiración en el sistema *P. digitatum*.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Blocks	2	2.1	2.1	1	1.88	0.161
Tratamiento	3	3559.9	3559.9	1186.6	2157.94	0
Tiempo	7	22874.7	22874.7	3267.8	5942.69	0
Tratamiento*Tiempo	21	10238.7	10238.7	487.6	886.65	0
Error	62	34.1	34.1	0.5		
Total	95	36709.5				

S = 0.741545 R-cuad. = 99.91% R-cuad. (ajustado) = 99.86%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias de un factor para la tasa de respiración, en el sistema *P. digitatum*, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand	Agrupación
Testigo	36	9.424	6.494	A
TZ0	36	16.407	3.501	A
TZ9	36	21.195	2.54	B
TZ12	36	21.695	2.416	B

Nivel de confianza individual = 98.96% Nivel de confianza simultánea = 79.93%

2. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA TASA DE RESPIRACIÓN DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR *P. italicum*.

HIPÓTESIS

Ho: “La aplicación del recubrimiento no incide sobre la tasa de respiración de la naranja”.

Ha: “La aplicación del recubrimiento incide sobre la tasa de respiración de la naranja”.

Cuadro 3. ANOVA para la tasa de respiración en el sistema *P. italicum*.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Blocks	2	0.3	0.3	0.2	0.29	0.747
Tratamiento	3	17991.3	17991.3	5997.1	11067.53	0
Tiempo	7	8396.9	8396.9	1199.6	2213.76	0
Tratamiento*Tiempo	21	14010	14010	667.1	1231.2	0
Error	62	33.6	33.6	0.5		
Total	95	40432.2				

S = 0.736115 R-cuad. = 99.92% R-cuad. (ajustado) = 99.87%

Cuadro 4. Diferencias entre las medias de un factor para la tasa de respiración, en el sistema *P. italicum*, utilizando el método de LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
TZ12	24	56.35	A
Testigo	24	47.53	A
TZ9	24	25.91	B
TZ0	24	24.67	B

Nivel de confianza individual = 98.93% Nivel de confianza simultánea = 79.85%

ANEXO F.

Análisis de estadístico de la firmeza en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA FIRMEZA DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR LOS HONGOS DEL GÉNERO *Penicillium*.

HIPÓTESIS

Ho: “La aplicación del recubrimiento no incide sobre la firmeza de la naranja”.

Ha: “La aplicación del recubrimiento incide sobre la firmeza de la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para el parámetro Firmeza

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	0.45	0.45	0.23	0.12	0.887
Hongo	1	12.55	12.55	12.55	6.66	0.011
Tratamiento	3	3501.19	3501.19	1167.06	618.94	0
tiempo	5	1497.04	1497.04	299.41	158.79	0
Hongo*Tratamiento	3	127.09	127.09	42.36	22.47	0
Hongo*tiempo	5	15.06	15.06	3.01	1.6	0.168
Tratamiento*tiempo	15	443.8	443.8	29.59	15.69	0
Hongo*Tratamiento*tiempo	15	62.17	62.17	4.14	2.2	0.011
Error	94	177.25	177.25	1.89		
Total	143	5836.6				

S = 1.37317 R-cuad. = 96.96% R-cuad. (ajustado) = 95.38%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias del factor tratamiento para el parámetro firmeza, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
Testigo	36	9.424	6.49	A
TZ0	36	16.407	3.50	B
TZ9	36	21.195	2.54	C
TZ12	36	21.695	2.41	C

Nivel de confianza individual = 98.97% Nivel de confianza simultánea = 79.84%

Cuadro 3. Diferencias entre las medias del factor hongo para el parámetro firmeza, utilizando el método LDS Fischer.

Hongo	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
<i>P. digitatum</i>	72	17.476	7.206	A
<i>P. italicum</i>	72	16.885	5.487	A

Nivel de confianza individual = 95.00% Nivel de confianza simultánea = 95.00%

ANEXO G.

Análisis de estadístico de los sólidos solubles totales, en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR LOS HONGOS DEL GÉNERO *Penicillium*.

HIPÓTESIS

Ho: “La aplicación del tratamiento no incide sobre el contenido de SST de la naranja”.

Ha: “La aplicación del tratamiento incide sobre contenido de SST de la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para el parámetro sólidos solubles totales.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	0.017	0.017	0.009	1.52	0.224
Hongo	1	0.077	0.077	0.077	13.75	0
Tratamiento	3	69.056	69.056	23.019	4109.59	0
tiempo	5	64.742	64.742	12.948	2311.69	0
Hongo*Tratamiento	3	0.152	0.152	0.051	9.06	0
Hongo*tiempo	5	0.185	0.185	0.037	6.59	0
Tratamiento*tiempo	15	13.790	13.790	0.919	164.13	0
Hongo*Tratamiento*tiempo	15	1.320	1.320	0.088	15.71	0
Error	94	0.527	0.527	0.006		
Total	143	149.866				

S = 0.0748414 R-cuad. = 99.65% R-cuad. (ajustado) = 99.47%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias del factor tratamiento para el parámetro sólidos solubles totales, utilizando el método LDS Fischer

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación		
Testigo	36	11.328	1.22	A		
TZ0	36	10.256	0.58		B	
TZ9	36	9.692	0.463			C
TZ12	36	9.509	0.521			C

Nivel de confianza individual = 98.97% Nivel de confianza simultánea = 79.84%

Cuadro 3. Diferencias entre las medias del factor hongo para el parámetro sólidos solubles totales, utilizando el método LDS Fischer.

Hongo	N	Media	Desv.Est.	Agrupación
<i>P. digitatum</i>	72	10.245	1.068	A
<i>P. italicum</i>	72	10.198	0.984	A

Nivel de confianza individual = 95.00% Nivel de confianza simultánea = 95.00%

ANEXO H.

Análisis de estadístico de la acidez titulable, en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA ACIDEZ TITULABLE DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR LOS HONGOS DEL GÉNERO *Penicillium*.

HIPÓTESIS

Ho: “Todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre el porcentaje de ácido cítrico de la naranja”.

Ha: “Al menos un tratamiento incide sobre porcentaje de ácido cítrico de la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para el parámetro acidez titulable.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	0.005	0.005	0.0026	0.74	0.482
Hongo	1	0.014	0.014	0.0136	3.92	0.051
Tratamiento	3	0.196	0.196	0.0654	18.85	0
Tiempo	5	2.569	2.569	0.5138	148.08	0
Hongo*Tratamiento	3	0.029	0.029	0.0095	2.74	0.048
Hongo*Tiempo	5	0.023	0.023	0.0045	1.30	0.271
Tratamiento*Tiempo	15	0.171	0.171	0.0114	3.29	0
Hongo*Tratamiento*Tiempo	15	0.022	0.022	0.0015	0.42	0.968
Error	94	0.326	0.326	0.0035		
Total	143	3.355				

S = 0.0589050 R-cuad. = 90.28% R-cuad. (ajustado) = 85.21%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias del factor tratamiento para el parámetro acidez titulable, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
Testigo	36	0.9361	0.1861	A
TZ0	36	0.9694	0.1635	A
TZ9	36	1.0183	0.1181	A
TZ12	36	1.0267	0.1222	A

Nivel de confianza individual = 98.97% Nivel de confianza simultánea = 79.84%

Cuadro 3. Diferencias entre las medias del factor hongo para el parámetro acidez titulable, utilizando el método LDS Fischer.

Hongo	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
<i>P. digitatum</i>	72	0.9779	0.1481	A
<i>P. italicum</i>	72	0.9974	0.1585	A

Nivel de confianza individual = 95.00% Nivel de confianza simultánea = 95.00%

ANEXO I.

Análisis de estadístico del índice de madurez, en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ÍNDICE DE MADUREZ DE LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR LOS HONGOS DEL GÉNERO *Penicillium*.

HIPÓTESIS

Ho: “Todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre el índice de madurez en la naranja”.

Ha: “Al menos un tratamiento incide sobre el índice de madurez en la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para el parámetro índice de madurez.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	0.284	0.284	0.142	0.420	0.657
Hongo	1	2.489	2.489	2.489	7.380	0.008
Tratamiento	3	233.034	233.034	77.678	230.480	0
Tiempo	5	553.923	553.923	110.785	328.710	0
Hongo*Tratamiento	3	4.419	4.419	1.473	4.370	0.006
Hongo*Tiempo	5	2.818	2.818	0.564	1.670	0.149
Tratamiento*Tiempo	15	78.343	78.343	5.223	15.500	0
Hongo*Tratamiento*Tiempo	15	3.199	3.199	0.213	0.630	0.841
Error	94	31.681	31.681	0.337		
Total	143	910.190				

S = 0.580543 R-cuad. = 96.52% R-cuad. (ajustado) = 94.70%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias del factor tratamiento para el parámetro índice de madurez, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
Testigo	36	12.68	3.24	A
TZ0	36	10.92	2.12	B
TZ9	36	9.78	1.47	C
TZ12	36	9.42	1.48	C

Nivel de confianza individual = 98.97% Nivel de confianza simultánea = 79.84%

Cuadro 3. Diferencias entre las medias del factor hongo para el parámetro índice de madurez, utilizando el método LDS Fischer.

Hongo	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
<i>P. digitatum</i>	72	10.831	2.626	A
<i>P. italicum</i>	72	10.568	2.427	A

Nivel de confianza individual = 95.00% Nivel de confianza simultánea = 95.00%

ANEXO J.

Análisis de estadístico el potencial de hidrógeno, en naranjas con afección fúngica causada por *P. digitatum* y *P. italicum*.

1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL POTENCIAL DE HIDRÓGENO EN LAS NARANJAS CON AFECCIÓN FÚNGICA CAUSADA POR LOS HONGOS DEL GÉNERO *Penicillium*.

HIPÓTESIS

Ho: “Todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre el pH de la naranja”.

Ha: “Al menos un tratamiento incide sobre el pH de la naranja”.

Cuadro 1. ANOVA para el parámetro pH.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Bloques	2	0.009	0.009	0.004	0.15	0.861
Hongo	1	0.081	0.081	0.081	2.83	0.096
Tratamiento	3	0.787	0.787	0.262	9.14	0
Tiempo	5	5.017	5.017	1.003	34.97	0
Hongo*Tratamiento	3	0.535	0.535	0.178	6.22	0.001
Hongo*Tiempo	5	1.823	1.823	0.365	12.71	0
Tratamiento*Tiempo	15	0.833	0.833	0.056	1.93	0.029
Hongo*Tratamiento*Tiempo	15	0.544	0.544	0.036	1.26	0.241
Error	94	2.698	2.698	0.029		
Total	143	12.327				

S = 0.169405 R-cuad. = 78.12% R-cuad. (ajustado) = 66.71%

Cuadro 2. Diferencias entre las medias del factor tratamiento para el parámetro índice de madurez, utilizando el método LDS Fischer.

Tratamiento	N	Media	Desv.Stand.	Agrupamiento
Testigo	36	3.3286	0.2725	A
TZ0	36	3.1697	0.3558	A
TZ9	36	3.1528	0.2947	A
TZ12	36	3.1533	0.2049	A

Cuadro 3. Diferencias entre las medias del factor hongo para el parámetro índice de madurez, utilizando el método LDS Fischer.

Hongo	N	Media	Desv.Stand.	Agrupación
<i>P. digitatum</i>	72	10.831	2.626	A
<i>P. italicum</i>	72	10.568	2.427	A

Nivel de confianza individual = 95.00% Nivel de confianza simultánea = 95.00%