



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO: ITV/DEPI/No.101/2020

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por medio de la presente el que suscribe Dr. Benigno Ortiz Muñiz, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz me permito hacer **CONSTAR** que, de acuerdo a los archivos de esta División de Estudios, el (la) **Dr. Oscar González Ríos** fungió como **Co-Director(a)** de la Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada: **"Formulación de un fungicida a base de aceite esencial de *Pimenta dioica* L. contra hongos del género *Aspergillus* evaluado en café verde"** desarrollada por el (la) **C. Lucía Jiménez Beltrán**, número de control **M16020027**.

Se extiende la presente a la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®



BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c. Archivo





CERTIFICACIÓN DE ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA

El suscrito Director del Instituto Tecnológico de Veracruz, certifica que en el Libro para Actas de Examen de Grado de Maestría N° 1 autorizado el día 18 del mes de Agosto del 2014 por la Dirección de Servicios Escolares y Estudiantiles de la Dirección General del Tecnológico Nacional de México, se encuentra asentada en la foja número 103 el Acta que a la letra dice: En la H. Veracruz, Veracruz a los 9 días del mes de enero de 2019, siendo las 13:00 horas, se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

Presidente(a): Doctora en Ciencias de los Alimentos Mirna Leonor Suárez Quiroz 5691003

Secretario(a): Doctor en Ciencia de Alimentos Hugo Sergio García Galindo 3509139

Vocal: Doctor en Ciencias de los Alimentos Oscar González Ríos 5691004

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. LUCIA JIMENEZ BELTRAN, número de control M16020027 aspirante al Grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA.

Tomando en cuenta el contenido de la TESIS cuyo título es: "Formulación de un fungicida a base de aceite esencial de Pimenta dioica L. contra hongos del género Aspergillus evaluado en café verde" que fue dirigida por Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz; Dr. Oscar González Ríos, una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera APROBADO (A).

El (la) Presidente (a) del jurado le hizo saber a el (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las 15:00 horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

Rubrican.

Se extiende esta certificación a los seis días del mes de febrero de dos mil diecinueve.

COTEJÓ

Ing. Vicente Antonio Mier Ponce
Jefe del Departamento
de Servicios Escolares



SRIA. DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE VERACRUZ
DIRECCION

M.C. DAVID REYNIER VALDÉS
DIRECTOR



ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA

En la H. Veracruz, Veracruz a los 9 días del mes de ENERO de 2019, siendo las 13:00 horas., se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

- Presidente(a): Doctorado en Ciencias de los Alimentos
MIRNA LEONOR SUAREZ QUIROZ
- Secretario(a): Doctorado en Ciencia de Alimentos
Hugo Sergio Garcia Galindo
- Vocal: Doctorado en Ciencias de los Alimentos
Osca Gonzalez Rios

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. LUCIA JIMENEZ BELTRAN número de control M16020027, aspirante al Grado de Maestro en CIENCIAS EN INGENIERIA
BIQUIMICA

Tomando en cuenta el contenido de la tesis cuyo título es: Formulación de un fungicida a base de aceite esencial de Pimenta deica L. contra hongos del género Aspergillus evaluado en café verde

que fue dirigida por MIRNA LEONOR SUAREZ QUIROZ y OSCAR GONZALEZ RIOS una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera APROBADA

El (la) Presidente(a) del jurado le hizo saber a él (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las 15:00 horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

PRESIDENTE (A)

[Signature]

DR. MIRNA LEONOR SUAREZ QUIROZ

Cédula de Grado: 5691003



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
DIRECCIÓN DE SERVICIOS
ESCOLARES Y ESTUDIANTILES

SECRETARIO (A)

[Signature]

Dr. Hugo Sergio Garcia Galindo

Cédula de Grado: 3509139

VOCAL

[Signature]

Dr. Oscar Gonzalez Rios

Cédula de Grado: 5691004



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

Formulación de un fungicida a base de aceite esencial de *Pimenta dioica* L. contra hongos del género *Aspergillus* evaluado en café verde.

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Ing. Lucía Jiménez Beltrán

Asesores:

Dra. Mirna Leonor Suárez Quíroz

Dr. Oscar González Ríos

Resumen

Jiménez Beltrán Lucía. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Diciembre de 2018. **Formulación de un fungicida a base de aceite esencial de *Pimenta dioica* L. contra hongos del género *Aspergillus* evaluado en café verde.** Asesores: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos

Durante el almacenamiento el grano de café es susceptible a la contaminación por hongos toxigénicos principalmente del género *Aspergillus* productores de Ocratoxina A (OTA) y Aflatoxinas (AF), lo que compromete la inocuidad del mismo. El aceite esencial de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.) ha mostrado tener una excelente capacidad fungicida y antitoxigénica en concentraciones menores de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En el presente trabajo se evaluó el efecto antifúngico de formulaciones a base de aceite esencial de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) sobre café verde almacenado. Se determinó la CMI del aceite esencial de *P. dioica* sobre café verde inoculado con cepas de *A. flavus* y *A. carbonarius*; se formuló y evaluó la estabilidad de una microemulsión a base de aceite esencial de *P. dioica*. Se determinó la CFM del fungicida elaborado frente a cepas de *A. flavus* y *A. carbonarius*. Posteriormente se evaluó el efecto del fungicida sobre el crecimiento de hongos filamentosos y sobre la producción de Ocratoxina A y Aflatoxinas en granos de café verde almacenado. La extracción de aceite esencial de pimienta se realizó por el método de hidrodestilación obteniendo rendimientos de 1.52 mL/100 g b.s. La CMI en café inoculado con las cepas de estudio fue de 2.5 $\mu\text{L}/\text{g}$ para *A. carbonarius* y de 2.0 μL para *A. flavus*. Se elaboraron 12 microemulsiones utilizando 3% de AE de pimienta y diferentes concentraciones de etanol y tween 80. Las formulaciones fueron sometidas a pruebas de estabilidad y se seleccionó la formulación con 3% de aceite esencial, 0.5% de etanol y tween 80, a 5000 rpm en 1 ciclo de trabajo para ser usada como fungicida. Se determinó que la CFM fue de 3 μL de fungicida por mL de medio para ambas cepas. Muestras de café verde tratadas con el fungicida fueron almacenadas durante 4 meses y cada mes fue evaluado el % de infección de hongos toxigénicos y la producción de OTA y AF. Los resultados mostraron una reducción del crecimiento y producción de toxinas con respecto al café sin tratamiento, sin embargo no se

alcanzó el efecto fungicida. Con lo anterior se puede concluir que un fungicida formulado con 3% de AE de pimienta tiene efecto fungistático contra hongos del genero *Aspergillus* y sobre la producción de micotoxinas.

Contenido

Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
Resumen.....	ii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Generalidades del café.....	3
2.1.1. Importancia económica.....	3
2.1.2. Estadísticas del periodo 2016-2017.....	3
2.1.3. Almacenamiento.....	4
2.1.4. Hongos de almacenamiento.....	4
2.1.5. Género <i>Aspergillus</i>	5
2.2. Micotoxinas.....	5
2.2.1. Aflatoxinas.....	6
2.2.2. Ocratoxinas.....	6
2.3. Métodos de control.....	6
2.3.1. Métodos físicos.....	7
2.3.2. Métodos biológicos.....	7
2.3.3. Métodos químicos.....	7
2.4. Aceite esencial de plantas y especias.....	8
2.4.1. Definición.....	8
2.4.2. Clasificación.....	9
2.4.3. Método de obtención.....	10
2.4.4. Composición química.....	12
2.4.5. Aceites esenciales estudiados con actividad fungicida.....	13
2.5. Pimienta gorda (<i>Pimenta dioica</i> L.).....	14
2.5.1. Origen.....	14
2.5.2. Distribución.....	14
2.5.3. Composición química.....	15
2.6. Fungicidas.....	15
2.6.1. Formulación.....	16
2.7. Emulsiones.....	17
2.7.1. Microemulsiones.....	18

2.7.3. Nanoemulsiones versus microemulsiones: similitudes y diferencias.....	21
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos.....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24
6. Materiales y métodos.....	25
6.1. Materiales.....	25
6.1.1. Material biológico.....	25
6.1.2. Medios de cultivo.....	25
6.1.3. Reactivos químicos.....	25
6.1.4. Equipo para la extracción de aceite esencial.....	26
6.1.5. Equipos especiales.....	26
6.2. Métodos.....	27
6.2.1. Extracción y purificación de aceite esencial.....	28
6.2.2. Efecto del aceite esencial en hongos y producción de micotoxinas.....	28
6.2.3. Conservación y propagación de cepas.....	29
6.2.4. Preparación del inóculo.....	29
6.2.5. Preparación de ≠ concentraciones de AE.....	29
6.2.6. Preparación de la microemulsión.....	30
6.2.7. Pruebas de estabilidad.....	31
6.2.8. Cálculo de la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas en presencia de microemulsiones de aceite esencial de Pimenta dioica.....	32
6.2.9. Estudio del efecto in vivo de las microemulsiones de AE de Pimenta dioica en café almacenado.....	32
6.2.10. Porcentaje de infección.....	33
6.2.11. Prueba cuantitativa para micotoxinas.....	33
7. Resultados y discusiones.....	35
7.1. Extracción y purificación de aceite esencial.....	35
7.2. Obtención del aceite esencial.....	35
7.3. Efecto del aceite esencial en hongos y producción de micotoxinas.....	36
7.4. Formulación de microemulsiones.....	40
7.5. Resultado del cálculo de la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas en presencia de aceite esencial de Pimenta dioica.....	47

7.6.	Estudio del efecto in vivo de las microemulsiones de AE de Pimenta dioica en café almacenado.....	50
8.	Conclusiones.....	54
9.	Bibliografía.....	55

Lista de figuras

Figura 1 Tipos de emulsión	17
Figura 2 Diagrama esquemático de microemulsiones y nanoemulsiones fabricadas a partir de aceite, agua y surfactante. La estructura de las partículas en ambos tipos de dispersión coloidal es bastante similar: un núcleo hidrofóbico de colas de aceite y surfactante.....	20
Figura 3. Las microemulsiones de aceite en agua consisten en micelas de surfactante con moléculas de aceite incorporadas en ellas. Las moléculas de aceite se pueden incorporar entre las colas de tensioactivo y / o dentro del núcleo de la micela.	20
Figura 4. Aparato tipo Clevenger.....	26
Figura 5 Cámara de Neubauer.....	26
Figura 6 Ultraturrax	27
Figura 7 Zetasizer ZS90.....	27
Figura 8 Metodología general.....	28
Figura 9 Metodología de preparación de emulsiones.....	30
Figura 10 Efecto medio de diferentes concentraciones de aceite esencial (AE) de pimienta (Pimenta dioica) sobre el conteo de <i>Aspergillus carbonarius</i> durante el almacenamiento a 25°C de café inoculado.....	37
Figura 11 Efecto medio de diferentes concentraciones de aceite esencial (AE) de pimienta (Pimenta dioica) sobre el conteo de <i>Aspergillus flavus</i> durante el almacenamiento a 25°C de café inoculado.....	39
Figura 12 Velocidad de crecimiento de <i>A. Carbonarius</i>	48
Figura 13 Velocidad de crecimiento de <i>A. Flavus</i>	50
Figura 14 Concentración de Aflatoxinas.....	53
Figura 15 Concentración de Ocratoxina.....	53

Lista de tablas

Tabla 1 Ejemplo de formulaciones a partir de una materia activa	16
Tabla 2 Microemulsiones vs Nanoemulsiones	21
Tabla 3 Concentración de aceite para experimentación in vivo.	30
Tabla 4. Formulación de las microemulsiones	31
Tabla 5. Formulación de medio de cultivo adicionado con aceite de pimienta	32
Tabla 6 Comparación de rendimientos de frutos de Pimenta dioica reportados en otros trabajos	36
Tabla 7 Comparación entre condiciones de almacenamiento y condiciones de experimentos In vivo	37
Tabla 8 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.5 Tween 80 con 5000 rpm	41
Tabla 9 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.5 Tween 80 con 10000 rpm	41
Tabla 10 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.5 Tween 80 con 15000 rpm	41
Tabla 11 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.5 Tween 80 con 5000 rpm	42
Tabla 12 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.5 Tween 80 con 10000 rpm	42
Tabla 13 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.5 Tween 80 con 15000 rpm	43
Tabla 14 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.1 Tween 80 con 5000 rpm	43
Tabla 15 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.1 Tween 80 con 10000 rpm	44
Tabla 16 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.1 Tween 80 con 15000 rpm	44
Tabla 17 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.1 Tween 80 con 5000 rpm	45
Tabla 18 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.1 Tween 80 con 10000 rpm	45
Tabla 19 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.1 Tween 80 con 15000 rpm	45
Tabla 20 Análisis estadístico de resultados	46
Tabla 21 Resumen de pruebas de estabilidad	47
Tabla 22 Crecimiento radial en cm de A. Carbonarius frente a concentraciones de fungicida	48
Tabla 23 Crecimiento radial en cm de A. Flavus frente a concentraciones de fungicida	49
Tabla 24 Porcentaje de infección de hongos	52

Lista de abreviaturas

AE	Aceite esencial
AF	Aflatoxinas totales
Anacafe	Asociación Nacional del café
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DG18	Agar-Diclorán-Glicerol-Cloranfenicol
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
ICO	Organización Internacional del Café
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OTA	Ocratoxina A
PDA	Agar de Papa y Dextrosa
PDI	Índice de polidispersidad
rpm	revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar

1.1. Introducción

El café es uno de los productos agroindustriales más importantes en el comercio internacional. Se estima que el consumo mundial del aromático en 2017 ascendió a un nivel máximo histórico de 9,562,500 toneladas de café verde, impulsado principalmente por el aumento en la demanda de este en los países productores y en los mercados emergentes (ICO, 2018).

Durante la cadena productiva del café se ha encontrado que en la etapa de almacenamiento, el grano es susceptible a la contaminación por hongos filamentosos debido a malas prácticas de almacenamiento (temperaturas elevadas, humedad del grano, entre otros), siendo principalmente los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Broissin-Vargas, 2017); estos se caracterizan por la producción de micotoxinas como **Ocratoxina A** (OTA) y **Aflatoxinas** (AF). Existen compuestos químicos sintéticos que controlan el crecimiento de hongos toxigénicos y la producción de micotoxinas, sin embargo, diversas investigaciones demuestran que estos tienen efectos adversos como pérdida de calidad del producto, desarrollo de resistencia por las cepas contaminantes, toxicidad y altos costos económicos.

El desarrollo de productos de protección con origen natural como alternativas a los fungicidas sintéticos está actualmente en el centro de atención, se han estudiado compuestos naturales que tengan efecto fungicida como los aceites esenciales (AE) de plantas y especias para proteger granos y cultivos evitando que se afecten sus características (Montes-Belmont, 2009); Stevic *et al.*, 2014), los AE más estudiados son los de clavo, canela, tomillo, orégano, menta, pimienta gorda, por mencionar algunos, dichos AE han demostrado tener efectos inhibitorios en el crecimiento de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* evaluados en laboratorio (Stevic *et al.*, 2014; Zabka *et al.*, 2009; Gibriel *et al.*, 2011).

Esto es debido que los AE de plantas son fuentes ricas de terpenoides volátiles y compuestos fenólicos; y dichos compuestos han demostrado tener efecto potencial para inactivar bacterias y hongos (Salinas-Zavaleta, en curso; Zabka *et al.*, 2014; Il-Kwon *et al.*, 2007).

Dentro de éstos, el aceite esencial de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.) ha mostrado tener una excelente capacidad fungicida y antitoxigénica en concentraciones menores de 1 µL/mL (Zabka *et al.*, 2009; Juárez-Caballero *et al.*, 2015, Zabka *et al.*, 2014; Il-Kwon *et al.*, 2007), ya que se encuentra constituido principalmente de eugenol, metil-eugenol y β-pineno (Juárez-Caballero *et al.*, 2015, Salinas-Zavaleta, en curso, Il-Kwon *et al.*, 2007). Estos compuestos han sido estudiados comprobándose su poder fungicida en cepas de toxigénicas (Zabka *et al.*, 2014).

Con los reportes existentes sobre los efectos antimicrobianos del AE de *Pimenta dioica* y ya que México es el segundo productor en el mundo de pimienta, con presente trabajo se propone evaluar el efecto antifúngico de formulaciones a base de aceite esencial de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.) sobre café verde almacenado.

1.2. Antecedentes

1.3. Generalidades del café

El café pertenece al género *Coffea* y a la familia de las rubiáceas (*Rubiaceae*), el más importante económicamente mundialmente dicho grupo engloba unos 500 géneros y más de 6.000 especies, la mayoría árboles y arbustos tropicales. Dentro del género *Coffea* el NCBI en los Estados Unidos de América describe más de 100 especies, todas ellas autóctonas de África tropical y de algunas islas de Océano Índico, como Madagascar; de las cuales 25 han sido ampliamente estudiadas pero solo 2 tienen gran importancia comercial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (ICO, 2018).

1.4. Importancia económica

En la actualidad, el café tiene un valor económico y social de suma importancia, es uno de los principales productos agrícolas; después del petróleo, es el producto comercial natural que mueve las mayores cifras de dinero en el mercado mundial llegando a generar ingresos anuales superiores a los 25 mil millones de dólares para los países exportadores y dado ocupación directa a poco más de 20 millones de personas (AMECAFE, 2012); está presente en las costumbres de muchos pueblos. Actualmente más de 80 países lo cultivan en sus diferentes tipos y poco más de 50 lo exportan (Temis-Pérez, Vigil, y Sosa-Morales, 2011). El área ocupada por el cultivo de café en todo en México es de 732,036.00 hectarias (FIRA, 2017).

Los principales productores de café a nivel mundial son Brasil, Colombia, Vietnam, Indonesia, India y México. México ocupa el treceavo lugar mundial en cuanto al volumen de producción, el quinto en extensión de terreno y el noveno en rendimiento. Además, México es el mayor exportador de café orgánico del mundo, 50% que representa una quinta parte del volumen total de café. En los años buenos los ingresos en divisas generados por las exportaciones de café sólo han sido superadas por las ventas externas de petróleo (ICO, 2018).

1.5. Estadísticas del periodo 2016-2017

En la cosecha del año 2016-2017 se cosecharon 157,4 millones de sacos de

elevada que el año pasado. En los periodos 2014- 2015 y 2015-2016 existió un déficit en la producción de café verde; sin embargo para el periodo 2016-2017 dicho déficit recuperado y se consiguió superar los valores de consumo quedando una producción a favor cercana a los 2.4 millones de sacos de café verde (ICO, 2017).

1.6. Almacenamiento

Se sabe que el café es un producto que se cosecha de manera estacional, sin embargo se consume durante todo el año. Debido a los esquemas bajo los cuales se organizan los mercados de los productos del café, este debe almacenar durante meses o años antes según la producción que se tenga en el año, cuidando conservar el abastecimiento para todo el año (FIRA, 2016).

El almacenamiento de granos de café constituye una de las labores primordiales para la conservación de los mismos. Esta práctica depende de las condiciones climáticas de las diferentes zonas cafetaleras, tales como la temperatura, la humedad relativa del ambiente y el lugar.

El café verde se conserva durante meses en ambientes frescos con temperaturas máximas de 20°C y humedades relativas alrededor del 65%. La humedad del café almacenado en estas condiciones se mantiene entre el 10% y el 12% (Puerta-Quintero, 2006).

Se ha descubierto que los hongos que atacan el café almacenado pueden formar micotoxinas que no se destruyen con el tostado y pueden constituir limitantes para su consumo en los países importadores por considerarse cancerígenos.

1.7. Hongos de almacenamiento

Los hongos de almacenamiento en café verde son principalmente del género *Aspergillus* y *Penicillium*, se desarrollan en semillas que tienen un contenido de humedad del 12-18 % (Greig y Reeves, 1985) y estos son los principales causantes de deterioro durante el almacenamiento.

La relación de la humedad relativa y la humedad del grano con el crecimiento de hongos está claramente demostrada, la razón por la que hongos del género

se adaptan mejor a las condiciones ambientales en que generalmente se almacena el grano (temperaturas máximas de 20°C y humedades relativas alrededor del 65%).

1.8. Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conoidal de este hongo se parecía a un "asperguillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita) (Alcalá et al., 2006).

Los hongos del género *Aspergillus* poseen hifas septadas y hialinas. Los conidióforos se originan en la célula basal, situada en la base de las hifas soporte y terminan en una vesícula en el ápice. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio 4 formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato. El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*, los cuales varían entre distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro (Bennett, 2010, Prakash y Jha, 2014).

Los *Aspergillus* tienen la capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diversas actividades de agua (dependiendo de la especie), la cual va de 0.71-0.94. El rango de temperatura óptima varía de 30-33 °C para la mayoría de las especies (Prakash & Jha, 2014) En este género encontraremos alrededor de 600 hongos.

1.9. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos capaces de desencadenar alteraciones en el ser humano. Son moléculas de bajo peso molecular y suelen ser específicas para un grupo de especies de un mismo género. Las micotoxinas son estables y no se destruyen fácilmente durante el proceso de elaboración de los alimentos. Cuanto más compleja es la ruta biosintética de una micotoxina menor será el número de especies capaces de producirla. Las micotoxinas descritas están producidas por especies de los

géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Abarca, Bragulat, y Castellá, 2000; Bennett & Klich, 2003).

1.10. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son toxinas naturales producidas por ciertos hongos, sobre todo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Es la micotoxina más tóxica y está entre las más ampliamente distribuidas y bien conocidas (Benbrook, 2005). Existen cuatro tipos principales de aflatoxinas; B1, B2, G1 y G2; siendo B1 la más tóxica, carcinógena y más prevalente. Las aflatoxinas pueden afectar a una amplia gama de productos básicos, incluyendo cereales, semillas oleaginosas, especias y frutos secos (Neme & Mohammed, 2017). La exposición a las aflatoxinas es difícil de evitar ya que no es fácil prevenir el crecimiento de los hongos en los granos y otros productos.

1.11. Ocratoxinas

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas principalmente por especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, particularmente *A. ochraceus* y *P. verrucosum*, siendo la Ocratoxina A (OTA) la micotoxina más prevalente de este grupo (Channaiah, 2011; Richard et al., 2003). La infección de las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* ocurre principalmente durante la fase de almacenamiento poscosecha (Channaiah, 2011). En los granos de cereales y, en menor medida, en las uvas, el vino, el jugo de uva y los frutos de vid secados se han encontrado los mayores casos de contaminación por OTA (Clark y Snedeker, 2006). Una característica relevante de la ocratoxina es que ocurre en una amplia variedad de productos básicos tales como pasas, cebada, productos de soja y café en cantidades variables pero a niveles relativamente bajos (Richard et al., 2003). Los niveles pueden acumularse en los tejidos y fluidos corporales de los seres humanos o animales que consumen alimentos contaminados debido a que la toxina parece ser eliminada lentamente del cuerpo (Richard, 2007).

1.12. Métodos de control

En países industrializados con climas cálidos es difícil asegurar el impacto de las micotoxinas en la salud humana y animal, ya que el aislamiento y la

confirmación de especies fúngicas toxigénicas en alimentos no indica la presencia de micotoxinas (Zain, 2011). Dado que las micotoxinas tienen un efecto perjudicial para la salud, la pérdida económica y problemas con la seguridad alimentaria.

Algunos investigadores han encontrado que existen varios factores, que operados de maneras independientes, pueden afectar la colonización fúngica o la producción de micotoxinas. Varias estrategias de mitigación han sido desarrolladas para prevenir el crecimiento de hongos, así como para descontaminar y desintoxicar los alimentos contaminados con micotoxinas (Kabak *et al.*, 2006). Existen estrategias de mitigación antes y después de la cosecha para reducir la contaminación de las micotoxinas en los granos. D'mello y MacDonald en 1997 categorizaron estas estrategias como factores físicos, químicos y biológicos.

1.13. Métodos físicos

Durante el almacenamiento de café verde existen métodos de físicos donde se busca evitar las condiciones ambientales propicias a la colonización fúngica y la producción de micotoxinas tales como la temperatura, humedad relativa y las plagas por insectos.

Estos métodos buscan que los granos no eleven su humedad (10 -12%) cuidando temperaturas máximas de 20°C y humedades relativas alrededor del 65% (Anacafe, 2018)

1.14. Métodos biológicos

Los factores biológicos se basan en interacciones entre el hongo toxigenicos y el sustrato. (Zain, 2011).

Estos métodos de control en café se propician en el cafeto para evitar contaminación por plagas que pudieran afectar los granos de café en el almacenamiento.

1.15. Métodos químicos

Entre los controles químicos se encuentran el uso de fungicidas. Un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fúngicas

inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad. El uso de fungicidas en el almacenamiento de bienes agrícolas es relevante, ya que en México se pierden entre el 5 y el 25% de la producción total de los granos básicos como el trigo, maíz y frijol (SAGARPA, 2016). Para eliminar las especies fúngicas que contaminan los granos durante el almacenamiento, convencionalmente se han usado diversos químicos como carbendazim, difenoconazole y tebuconazole con trimedinol (Juarez-Caballero et. al., 2015).

El uso de compuestos naturales, biodegradables y amigables con el medio ambiente como el ácido acético, jasmonatos, cumarinas, taninos, quitosano, compuestos fenólicos y aceites esenciales de algunas plantas han llamado la atención para prevenir el crecimiento de hongos y la acumulación de micotoxinas en el grano parcialmente seco se han tomado como un método alternativo siendo una alternativa más segura que los productos sintéticos (Magan y Aldred, 2007; Shaman & Pongener, 2010; Zain, 2011).

1.16. Aceite esencial de plantas y especias

1.17. Definición

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas, destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Hüsnü, *et al*, 2010).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos.

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

Se definen, según AFNOR (1998), como:

Productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los Citrus, o bien por destilación seca. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención; puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición [por ejemplo, redestilación, aireación...].

1.18. Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios:

- Consistencia
- Origen
- Naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias fluídas
- Bálsamos
- Oleorresinas.

Las esencias fluídas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las Oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.) (Bruneton, J., 2001).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales
- Artificiales
- Sintéticas.

Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencia de rosa, geranio y jazmín, o la esencia de anís. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Bruneton, J., 2001).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.). Aunque esta clasificación es muy general nos resultará útil para propósitos de estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos, sin embargo existen clasificaciones más complejas como la de González Patiño que tienen en cuenta otros aspectos químicos (Sena, s.f.)

1.19. Método de obtención

Los aceites esenciales y extractos de plantas se han utilizado desde hace mucho tiempo para obtener aromas y sabores. En años recientes se han estudiado los extractos y aceites esenciales de condimentos y especias desde un punto de vista funcional. Es decir, se ha estudiado si dichos extractos o aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana, si actúan como agentes

antioxidantes o si aportan nutrimentos. Los métodos de obtención de los aceites esenciales determina el uso de los mismos. EL tipo de disolvente puede contaminarlo o limitar su uso, dependiendo de la toxicidad del disolvente y de las técnicas utilizadas para su eliminación. De ahí la importancia de investigar métodos nuevos y/o alternativos para la obtención de extractos y aceites esenciales (Schmidt, 2010).

Las propiedades funcionales de los extractos varían con la proporción de los compuestos presentes. Para especias diferentes se obtienen respuestas diferentes a su actividad microbiana de acuerdo a las condiciones en las que se procesan (Thongson et al., 2004). Diversas investigaciones demuestran que la composición de los aceites esenciales y extractos puede variar de acuerdo al método de extracción utilizado. Aunque estas variaciones pueden no ser importantes, son detectables por técnicas sensibles como la cromatografía de gases. Las variaciones radican en diferencias en la proporción de los compuestos e incluso en diferencias en el número de los compuestos (Sefidkon et al., 2006; Guan et al., 2007; Da Porto et al., 2009). Es importante identificar los efectos de diversos métodos de extracción sobre las propiedades y composición de los aceites esenciales y otros extractos obtenidos.

Los aceites esenciales son los principales constituyentes del aroma y sabor de las especias. Estos son destilados por arrastre de vapor sencillo, en seco, a vacío u obtenidos por presión en frío (Farrel, 1985). Las especias y sus aceites esenciales presentan la propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos, expresada como actividad antimicrobiana, actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos. Estas propiedades se han conocido durante siglos. La canela, el comino y el tomillo se utilizaban en el antiguo Egipto en los embalsamientos; en India y China para conservar los alimentos y como remedios medicinales. Otra propiedad funcional de los aceites esenciales es la de actuar como antioxidantes, retrasado o inhibiendo la oxidación de aceites y lípidos en general. La canela presenta este tipo de actividad, pero no es tan efectiva como la mostrada por los aceites de romero, salvia y orégano (Hirasa y Takemasa, 2002).

Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas, como densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica. La mayoría de los aceites esenciales tiene una densidad menor a la del agua excepto los aceites de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo. El índice de refracción es una propiedad característica de cada aceite esencial y cambia cuando éste se diluye o mezcla con otras sustancias (Ortuño, 2006)

Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final.

Sin embargo, en materia de rendimiento es importante establecer que ninguna cantidad de mejoras en los aspectos tecnológicos compensará la mala calidad del material vegetal (Schmidt, 2010).

1.20. Composición química

Los aceites esenciales son mezclas complejas que pueden contener de 20-60 componentes en diferentes concentraciones que pueden ser:

- Terpenos (Monoterpenos, sesquiterpenos)
- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (Alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)

Los terpenos derivan, de unidades de isopreno (C₅) unidas en cadena. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C₁₀), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C₁₅) y los diterpenos (C₂₀). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos (Schmidt, 2010).

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles (timol, carvacrol)
- Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor, thuyona)

- Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, α y β pineno)

1.21. Aceites esenciales estudiados con actividad fungicida

Las propiedades antimicrobianas de hierbas y especias se han reconocido y utilizado desde tiempos ancestrales para la preparación de alimentos y en la medicina. Reportes científicos de los agentes antimicrobianos naturales se remontan a más de un siglo. Los AE o sus compuestos bioactivos pueden ser usados como agentes protectores contra hongos fitopatogenicos y microorganismos patogénicos en los sectores de salud e inocuidad alimentaria (Suhr y Nielsen, 2003; Saad et al., 2013).

Diversos estudios han puesto en evidencia el poder fungicida de los AE de diversas plantas, se han probado cerca de 60 aceites esenciales así como sus principales componentes activos y estos se han estudiado sobre más de 20 microorganismos. Entre los más estudiados se encuentran el clavo, la menta, el tomillo, la canela, el ajo y la pimienta por inhibir patógenos alimentarios y organismos esporulados (Smith- Palmer et al., 1998; Hammer et al., 1999; Zabka et al., 2009).

Zabka y colaboradores (2009) estudiaron AE de plantas y especias como Manzanilla (*Anthemis nobilis* L.), Marihuana (*Cannabis sativa* L.), Naranja agria (*Citrus aurantium* L.), Citronela (*Cymbopogon nardus* L.), Mejorana (*Origanum majorana* L.), Pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.), Geranio (*Pelargonium roseum* L.), Tomillo (*Thymus vulgaris* L.), Alcaravea (*Carum carvi* L.); entre otros; de estos aceites destacaron los aceites de Citronela (3.47 $\mu\text{L}/\text{mL}$), Geranio (2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), Alcaravea (2.28 $\mu\text{L}/\text{mL}$), Tomillo (1.55 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y Pimienta (0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) ya que fueron los que inhibieron los hongos estudiados a concentraciones mas bajas.

1.22. Pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.)

1.23. Origen

El nombre botánico de la pimienta de Jamaica es *Pimenta dioica* (L.) pertenece a la familia *Myrtaceae*. Posee un sabor y aroma que se asemejan a una mezcla de canela, clavo y nuez moscada, de ahí su nombre en inglés como allspice (Neal, 1965; Weiss, 2002). La pimienta es un pequeño árbol de hoja perenne de hasta 15 metros de altura con una corteza café pálido. Las hojas son simples, opuestas, enteras, oblongelípticas, de 6 a 20 cm de largo, puntuadas con glándulas pelúcidas que desprenden el olor de todas las especias al ser trituradas. Las flores son pequeñas y blanquecinas con un aroma peculiar. Los árboles que no dan fruto son los árboles machos en los que las flores tendrán más de 100 estambres y las flores en los árboles femeninos que llevan alrededor de 50 estambres. El receptáculo tiene cuatro lóbulos color crema de cáliz, que se extienden en anthesis y persistentes en la fruta. Los pétalos son cuatro, blanquecinos y rápidamente caducifolios. Las plantas florecen durante marzo-junio y la fruta, que es una baya, madura 3-4 meses más tarde. Para el propósito de la especia, se recoge cuando está totalmente desarrollado, pero todavía verde. Los frutos tienen dos semillas en forma de riñón (Weiss, 2002; Parthasarathy, 2007).

1.24. Distribución

El género *Pimenta* consta de 15 especies que viven en el neotrópico, la mayor parte de ellas en Centroamérica y la región del Caribe, y solamente una especie en el sudeste de Brasil. Hay dos especies de interés económico notable: *P. dioica* y *P. racemosa*. La segunda especie, de las Antillas Menores, desde Santo Tomás hasta Trinidad, Puerto Rico y Cuba, tiene gran importancia comercial por la obtención de su aceite esencial (LANDRUM, 1986). En México solamente se cultiva *P. dioica* (L.) Merrill, la más importante del género desde el punto de vista de botánica económica y objeto de este estudio.

P. dioica es nativa de la región del Caribe, especialmente Jamaica y Cuba; los árboles crecen naturalmente a una temperatura promedio de 18 °C - 24 °C. Al igual que el clavo, el pimiento puede requerir condiciones ambientales muy

cálidas del mundo como una planta ornamental valorada por su fragancia y atractivo hábito (Weiss, 2002).

En México se encuentra preferentemente en la vertiente del Golfo desde el norte de Puebla y Veracruz hasta el sur de la Península de Yucatán y planicie costera del sureste.

1.25. Composición química

Los extractos acuosos, de acetona y de metanol de *P. dioica* han revelado de glucósidos, saponinas, esteroides, fenoles, proteínas, resinas, taninos y terpenoides (Khadelwal y Upendra, 2012).

La pimienta gorda contiene aceite esencial tanto en hojas como en frutos. El contenido de aceite esencial varía de acuerdo a la procedencia del fruto: Jamaica (4.1-5.3%), Granada (3.7-4.4%), Belice (2.5-4.0%), Honduras (1.3-4.1%) y México (1.4-2.9%) (Green, 1988).

1.26. Fungicidas

La palabra fungicida deriva de los términos latinos "fungus"; hongos y "caedo"; matar. Etimológicamente, fungicida, es todo agente con habilidad para destruir organismos fúngicos. El calor, los ácidos y la luz ultravioleta, son agentes fungicidas físicos: sin embargo, el término fungicida se refiere a los productos químicos usados en la prevención y en algunos casos en la erradicación de hongos fitopatógenos. En otras palabras se habla de fungicida cuando la sustancia química produce la destrucción del hongo ocasionando una acción irreversible; en cambio cuando se trata de una acción fungistática ocurre una actividad reversible, produciendo un efecto inhibitorio temporal en la germinación de las esporas, diferenciándose así la acción fungicida de la acción fungistática (Ochoa, 2004).

En la actualidad se cuenta con un amplio espectro de compuestos fungicidas, los cuales pueden adaptarse a las formulaciones que satisfagan necesidades precisas. De acuerdo con Ochoa (2004), entre las características deseables en un fungicida se encuentra que debe ofrecer un control eficaz y consistente; no debe ser tóxico a la concentración recomendada y no debe afectar

adversamente a otras partes del ecosistema del cultivo. Además los residuos que queden en el cultivo no deben ser un problema para el ser humano y la formulación deber ser segura al almacenarse y transportarse.

1.27. Formulación

El proceso de formulación es complejo debido a la diversidad de las materias activas, de sus propiedades físicas y químicas, de su modo de acción, de la biología de los microorganismos a combatir, de las modalidades de tratamientos, de la naturaleza de las plantas a proteger, de las superficies a tratar, entre otros. Así mismo cabe destacar que con la adecuada elección de aditivos y procesos de fabricación, se puede presentar la materia activa de formas variadas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Formulaciones a partir de una materia activa

	-Diluyentes	Polvo para espolvoreo
	-Absorbentes y tensoactivos	Polvos mojables
Molido en seco	-Agentes diversos y posterior granulación	Gránulos para dispersar en agua
	-Comburentes	Fumígenos
	-Adhesivos	Tratamientos de semillas
Molido húmedo	-Agentes diversos	Suspensiones concentradas
	-En concentración débil	Soluciones
	-Gas propulsor	Aerosoles
Solubilización	-Concentración elevada	Solución UVL
	-Emulsionantes	Concentrados emulsionables
	-Seguidas de adsorción sobre gránulos	Gránulos para esparcir

1.28. Emulsiones

Para que la definición de emulsión se pueda entender mejor, primero hay que explicar qué es un coloide. Los coloides son sistemas heterogéneos compuestos por dos fases: una dispersora y otra dispersa. La segunda posee partículas de uno o varios de sus componentes, y tienen tamaños aproximados de 10 a 2000 Å; mientras que en la primera, que son las partículas restantes, tienen un tamaño menor a 10 Å (Dezhong, Qiuyu, Hepeng y Changjie, 2010).

Los coloides se pueden clasificar en varios sistemas, dependiendo del estado físico de las fases que los componen. En este caso sólo interesa el sistema coloidal en el que éstas son líquidas, y que es conocido como emulsión (Valenzuela, 1995).

Las emulsiones son sistemas heterogéneos que constan de dos líquidos no miscibles entre sí, o miscibles solamente en grado limitado, lo que habitualmente se denomina fases. En una emulsión uno de los dos líquidos está dispersado en forma de gotas dentro del otro.

Con esta definición podemos clasificar a las emulsiones en el caso de que los líquidos se refieran al agua y al aceite de dos formas: si las gotitas de aceite están finamente repartidas dentro del agua se le llama emulsión de aceite en agua (u O/W, por el inglés oil in water). La segunda es cuando las gotitas de agua están dispersas dentro del aceite (o W/O, por el inglés water in oil) (Patente ES 2, 276, 495, 2007). En la Figura 1 se ilustran ambas emulsiones.

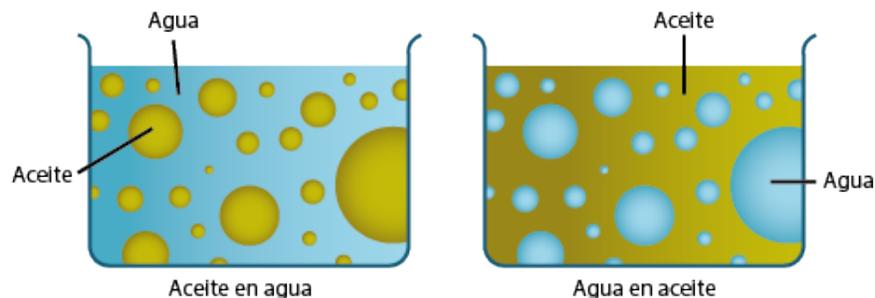


Figura 1 Tipos de emulsión

Es importante conocer el tamaño de las gotas dispersas en la emulsión, pues si la medida de éstas es 0.01-0.2 mm, se le conoce como microemulsión, lo cual indica que está estabilizada termodinámicamente, a diferencia de las

macroemulsiones, que poseen un tamaño de gota aproximadamente de 0.2-50 mm (Aranberri, 2009).

Para estabilizar una emulsión y que ésta pueda llegar a ser duradera, se requiere la adición de un tensoactivo o emulsionante, los cuales presentan una estructura molecular anfifílica, es decir, que una parte de la molécula tiene la característica hidrófila (afín al agua), y la otra parte es lipófila (afín al aceite) (Aranberri, 2009; Farías, 2009).

Para que en las emulsiones agua-aceite o aceite-agua se encuentren bien dispersadas y estables, el emulsionante va a reducir la tensión superficial de la superficie límite entre las fases, por el hecho de estar ubicado en la superficie límite entre ambos líquidos, gracias a que tiene una estructura molecular anfífila (Farías, 2009).

1.29. Microemulsiones

El término "microemulsión" generalmente se usa para referirse a líquidos isotrópicos termodinámicamente estables formados al mezclar aceite, agua y surfactantes. Las mezclas de aceite (O), agua (W) y surfactante (S) pueden formar una variedad de sistemas diferentes según su composición y las condiciones ambientales (particularmente la temperatura). Pueden formar una, dos, tres o más fases separadas que están en equilibrio entre sí. Estas fases pueden ser continuas en agua, continuas en aceite o bicontinuas dependiendo de las concentraciones, la naturaleza y las disposiciones de las moléculas presentes. Las estructuras dentro de estas fases pueden ser esferoides (por ejemplo, micelas o micelas inversas), tipo cilindro (tales como micelas de varilla o micelas inversas), de tipo plano (por ejemplo, estructuras lamelares) o de tipo esponja (por ejemplo, bicontinuo). Se requieren métodos analíticos apropiados para identificar con precisión las estructuras formadas dentro de un sistema SOW bajo un conjunto particular de condiciones, tales como microscopía (por ejemplo, luz, electrón o fuerza atómica), métodos de dispersión (p. ej., luz, X-rayo o neutrones), conductividad eléctrica, resonancia magnética nuclear y reología. Cuando se usa el término "microemulsión", se debe indicar claramente qué tipo de sistema de microemulsión se está considerando. Las microemulsiones de aceite en agua que consisten en pequeñas partículas

esferoidales compuestas por aceite y moléculas tensioactivas dispersas dentro del agua. Este tipo de dispersión coloidal también se conoce como una "microemulsión de gotas" o un "sistema de micelas hinchadas". Se propone la siguiente definición para describir este tipo de microemulsión de aceite en agua (McClements, 2012).

“Una microemulsión de aceite en agua es una dispersión coloidal termodinámicamente estable que consiste en pequeñas partículas esféricas (compuestas de aceite, agente tensioactivo y posiblemente tensioactivo auxiliar) dispersadas dentro de un medio acuoso” (McClements, 2012).

Las moléculas tensioactivas en una microemulsión aceite-agua están organizadas de modo que sus colas no polares se asocian entre sí formando un núcleo hidrófobo (figura 3), ya que esto reduce el área de contacto termodinámicamente desfavorable entre los grupos no polares y el agua. Los grupos de cabeza hidrófilos de las moléculas tensioactivas sobresalen en la fase acuosa circundante. Las moléculas de aceite pueden incorporarse en el interior hidrofóbico de una micela como un núcleo separado o entre las colas de tensioactivo (Figura 4). Si las moléculas de aceite tienen algunos grupos polares, entonces pueden incorporarse en la micela de tal manera que estos grupos interactúen con grupos polares en los grupos de cabeza de tensioactivo o que sobresalgan una cierta distancia en el agua.

1.30. Nanoemulsiones

Una nanoemulsión puede considerarse una emulsión convencional que contiene partículas muy pequeñas. Las nanoemulsiones pueden ser del tipo aceite en agua (O / W) o agua en aceite (W / O) dependiendo de si el aceite se dispersa como gotitas en agua, o viceversa (McClements, *et al.*, 2011).

En principio, una nanoemulsión podría formarse a partir de aceite y agua sin usar un surfactante. En la práctica, este sistema sería altamente inestable a la coalescencia de gotas y se necesita un surfactante para facilitar la formación de la nanoemulsión y asegurar su estabilidad cinética durante el almacenamiento. Algunas veces se usa una combinación de surfactantes en lugar de un surfactante individual para formar y estabilizar nanoemulsiones. Por lo tanto, una nanoemulsión generalmente se prepara usando los mismos

componentes que una microemulsión: aceite, agua, agente tensioactivo y posiblemente un cotensioactivo. La estructura de las partículas en una nanoemulsión también es muy similar a las que se encuentran en una microemulsión: las colas no polares de las moléculas tensioactivas sobresalen en el núcleo hidrofóbico formado por la fase oleosa, mientras que los grupos de cabeza polar de las moléculas tensioactivas sobresalen la fase acuosa circundante (Fig. 3). La principal distinción entre una nanoemulsión y una microemulsión es, por lo tanto, su estabilidad termodinámica: las nanoemulsiones son termodinámicamente inestables, mientras que las microemulsiones son termodinámicamente estables.

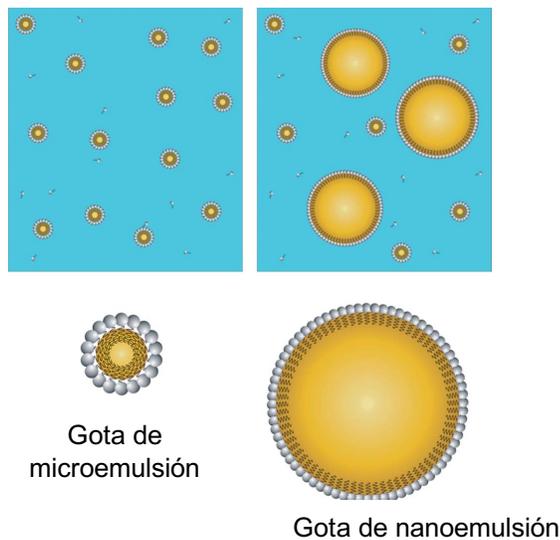


Figura 2 Diagrama esquemático de microemulsiones y nanoemulsiones fabricadas a partir de aceite, agua y surfactante. La estructura de las partículas en ambos tipos de dispersión coloidal es bastante similar: un núcleo hidrofóbico de colas de aceite y surfactante.

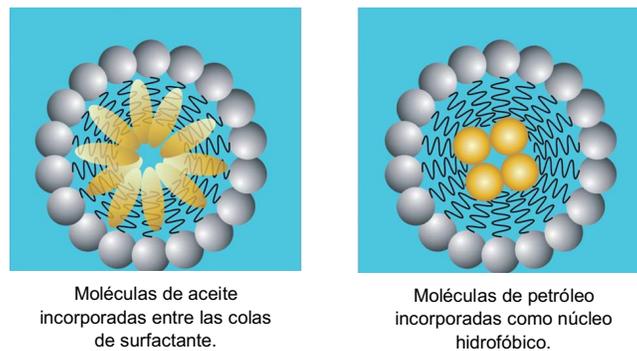


Figura 3. Las microemulsiones de aceite en agua consisten en micelas de surfactante con moléculas de aceite incorporadas en ellas. Las moléculas de aceite se pueden incorporar entre las colas de tensioactivo y / o dentro del núcleo de la micela.

1.31. Nanoemulsiones versus microemulsiones: similitudes y diferencias.

En esta sección, se destacan las similitudes y diferencias entre la composición, estructura, preparación y propiedades de las nanoemulsiones y microemulsiones. Además, el origen de parte de la confusión en torno al uso de los términos "microemulsiones" y "nanoemulsiones" se identifica en función de las similitudes en sus propiedades (McClements, *et al.*, 2011).

Tabla 2 Microemulsiones vs Nanoemulsiones

Característica	Nanoemulsión	Microemulsión
Composición	Fase oleosa, fase acuosa, agente surfactante y agente cosurfactante.	Fase oleosa, fase acuosa, agente surfactante y agente cosurfactante.
Tamaño de partícula	10^{-9}	10^{-6}
Estructura de partícula	Esféricas	Esféricas o no-esféricas (Depende el surfactante)
Método de elaboración	Métodos de alta energía (Microfluidizador, ultrasonidos)	Métodos de baja energía y/o generación espontánea
Estabilidad	No	Si

1.32. Justificación

El impacto económico y a la salud que causan los hongos toxigénicos a los granos almacenados y la dificultad para lograr un control de los mismos debido al desarrollo de resistencia secundaria a los antifúngicos, ha incrementado la investigación de alternativas basadas en productos naturales. El efecto antifúngico de los aceites esenciales y sus compuestos ha sido estudiado mostrando resultados favorables

1.33. Hipótesis

El uso de un fungicida a base de aceite esencial de pimienta gorda evitará el crecimiento de hongos filamentosos y la aparición de altos niveles toxigénicos en granos de café almacenados

1.34. Objetivos

1.35. Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico de formulaciones a base de aceite esencial de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.) sobre café verde almacenado.

1.36. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de la concentración del aceite esencial de *P. dioica* sobre café verde inoculado con cepas de *A. flavus* y *A. carbonarius*.
- Formular y evaluar la estabilidad de un fungicida a base de aceite esencial de *P. dioica* por el método de microemulsión.
- Evaluar el efecto de la concentración del fungicida de aceite esencial de *P. dioica* en cepas de *A. flavus* y *A. carbonarius*.
- Evaluar el efecto del fungicida seleccionado, sobre el crecimiento de hongos filamentosos en granos de café verde almacenado.
- Evaluar el efecto del fungicida seleccionado, sobre la producción de Ocratoxina A y Aflatoxina B1 en granos de café verde almacenados.

1.37. Materiales y métodos

1.38. Materiales

El material y equipo utilizado para el desarrollo del presente trabajo se describe a continuación.

1.38.1. Material biológico

Muestras secas y molidas de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.), proveniente del municipio de Tlapacoyan, Veracruz. Las muestras se almacenan congeladas.

Para las pruebas de concentración mínima inhibitoria, se utilizaron cepas de colección de *Aspergillus flavus* SN9 y *Aspergillus carbonarius*.

Se utilizó café verde variedad arabica de finca “La Vequía” de calidad prima lavado con humedad inicial del 10.8%; el cual fue recibido y tratado al momento para ser almacenado en los criterios de experimentación.

1.39. Medios de cultivo

Se utilizó medio Agar Papa Dextrosa (PDA) (Agar, 15 g; Dextrosa, 20g; infusión de papa, 4g); medio Dicloran-Glicerol (DG18) (Dextrosa 10g; Peptona 5g; Fosfato monosódico 1 g; Sulfato de magnesio 0.5 g; Cloranfenicol 0.1 g; Dicloran 0.002 g; Agar bacteriologico 15 g)

1.40. Reactivos químicos

Tween 80, éter de petróleo, metanol grado reactivo, kits ELISA para micotoxinas (Tabla , etanol grado reactivo.

Micotoxinas	Límite mínimo de detección	Rango de cuantificación	Anticuerpos contra
Aflatoxinas	2 ppb	5-50 ppb	Aflatoxinas totales (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)
Ocratoxina A	1 ppb	2-25 ppb	OTA 100%

1.40.1. Equipo para la extracción de aceite esencial

Se utilizará un aparato de destilación tipo Clevenger, el cual es un equipo para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en las mezclas.



Figura 4. Aparato tipo Clevenger

1.41. Equipos especiales

Lector de micropozos ELISA

El equipo para cuantificar la producción de micotoxinas, fue un lector ELISA automático para tiras de pozos. STAT FAX 4700 con longitud de onda de 300-700 nm y un rango de medición de 0.00 a 3.00 abs

Cámara de Neubauer

Para el conteo de esporas se utilizara una cámara de recuento Neubauer.



Figura 5 Cámara de Neubauer

Ultraturrax

El equipo para realizar las emulsiones fue un Ultraturrax modelo T-25 ULTRA-TURRAX



Figura 6 Ultraturrax

Zetasizer

Se utilizó un analizador de tamaño de partícula marca Malvern modelo Nano ZS90 con medición de tamaño de 0.3 nm (diámetro) a 5 micras utilizando óptica de dispersión de 90 grados.



Figura 7 Zetasizer ZS90

1.42. Métodos

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se llevó a cabo la siguiente metodología:

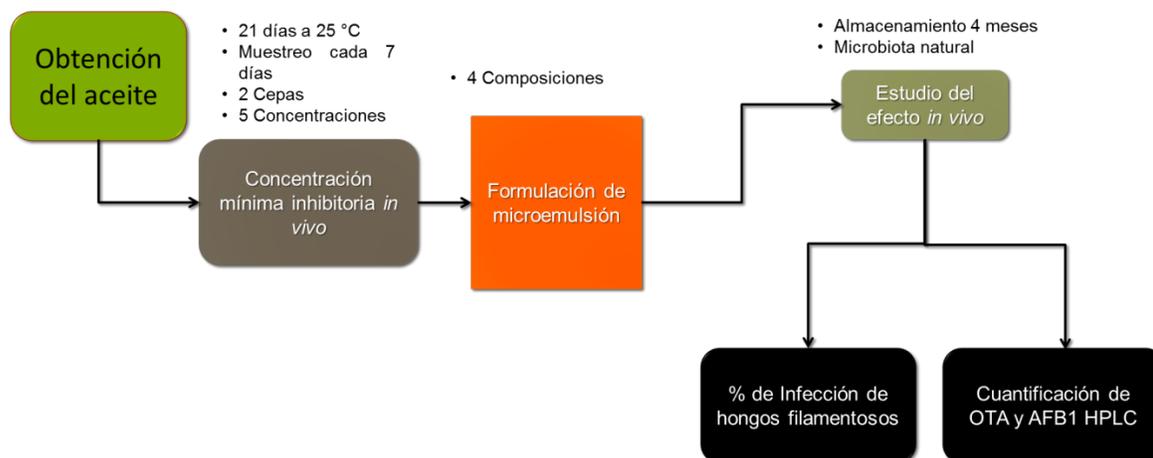


Figura 8 Metodología general

1.43. Extracción y purificación de aceite esencial

Para la extracción se colocaron 100 g de pimienta gorda, secados, molidos y tamizado, con 500 mL de agua destilada en un matraz balón de 1L. Posteriormente se conectó al equipo de destilación tipo Clevenger y al refrigerante. El matraz se colocó sobre una mantilla de calentamiento y se elevó la temperatura a 100°C durante 4 horas. Como producto del proceso de condensación se obtuvieron 2 fases una de aceite esencial y otra de agua.

Posteriormente el extracto obtenido fue llevado a separación por embudo y se sometió a extracción liquido-liquido con éter de petróleo, se recuperó la fase orgánica y se repitió el proceso 2 veces.

Por último la fase orgánica se concentró mediante evaporación del éter de petróleo. El aceite obtenido se colocó en un frasco ámbar y se almacenó a 4°C para su posterior uso.

1.44. Efecto del aceite esencial en hongos y producción de micotoxinas

Se tomaron 100 g de café verde esterilizado a 121°C, 15 lb/in² durante 15 min, con un contenido de humedad del 18% y se colocaron en matraces de 500 mL. Cada matraz se inoculó con cepas de *A. flavus* o *A. carbonarius*, se incubaron durante 2 días a 25°C

Pasados los 2 días se añadieron a los matraces aceite esencial en concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 μL . A la par se utilizó un testigo de café estéril sin aceite.

Se tomaron muestras cada 7 días a las cuales se les cuantificó unidades formadoras de colonia por método de dilución y vaciado en placa

1.45. Conservación y propagación de cepas

Para la activación de la cepa se utilizó medio sólido PDA que fue colocado en cajas Petri, para lo cual se usó la campana de flujo laminar ubicada en el laboratorio. Para la inoculación se usó una cepa de *A. y A. flavus* previamente descrita proporcionada por el mismo laboratorio.

La inoculación se realizó con un asa de inoculación bajo mechero. Las cajas inoculadas fueron colocadas en la incubadora a 25 °C, y se dejó en crecimiento por aproximadamente 7 días.

1.46. Preparación del inóculo

Una vez que tuvieron las cepas activadas se recuperaron los conidios y se preparó una suspensión de conidios. Los cuáles se recuperaron con una solución estéril de Tween 80 al 0.01% y se pasaron a matraz. Una vez obtenida la suspensión, ésta se agita vigorosamente por 1 min en vortex, para prevenir que se aglomeren las esporas y se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidias/mL mediante cuenta directa en cámara de Neubauer

1.47. Preparación de \neq concentraciones de AE

Se tomaron con pipeta y puntas estériles el volumen de AE necesario para colocar en cada matraz (50, 100, 150, 200 y 250 μL) y se agitó hasta quedar uniforme. Se cerraron los matraces con tapón de algodón y se inició la incubación a 25°C.

Tabla 3 Concentración de aceite para experimentación *in vivo*.

Café (g)	Aceite esencial (µL/100g)	Aceite esencial (µL/g)
100	50	0.5
100	100	1.0
100	150	1.5
100	200	2.0
100	250	2.5

1.48. Preparación de la microemulsión

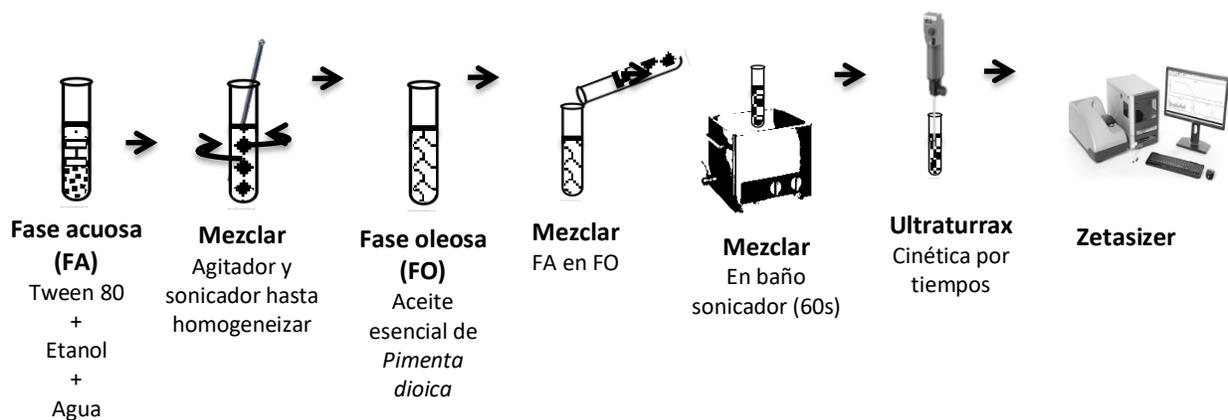


Figura 9 Metodología de preparación de emulsiones

correspondiente (Tabla 4), pesando primero el agua, posteriormente el etanol y por último el Tween 80. Posteriormente se mezclaron la fase acuosa hasta que se observe una mezcla homogénea, se agitó primero con agitador y posteriormente con baño sonicador. Se preparó de manera separada la fase oleosa, en este caso el AE de *Pimenta dioica*, al igual que en la fase acuosa, está se mantuvo estable al 0.3% del volumen final para todas las muestras. Una vez que se tenían preparadas ambas fases se agregó lentamente la FA en la FO. Para asegurar una pre-emulsión se mezclaron durante 60 s en baño sonicador. La pre-emulsión se llevó a ultraturrax en ciclos de 1 min de trabajo por 1 min de descanso donde se tomaran alícuotas por ciclo de trabajo haciendo un total de 5 ciclos; cada muestra fue analizada en el zetasizer.

Tabla 4. Formulación de las microemulsiones

AE	Tween 80	Etanol	Agua	RPM
0.3	0.5	0.5	8.7	5000
0.3	0.5	0.1	9.1	5000
0.3	0.1	0.5	9.1	5000
0.3	0.1	0.1	9.5	5000
0.3	0.5	0.5	8.7	10000
0.3	0.5	0.1	9.1	10000
0.3	0.1	0.5	9.1	10000
0.3	0.1	0.1	9.5	10000
0.3	0.5	0.5	8.7	15000
0.3	0.5	0.1	9.1	15000
0.3	0.1	0.5	9.1	15000
0.3	0.1	0.1	9.5	15000

1.49. Pruebas de estabilidad

La estabilidad física de una formulación de nanoemulsión depende de su preparación y relaciones de mezcla de la fase oleosa y la fase acuosa. Además, una formulación deficiente puede conducir a la separación de fases, lo que afecta no solo el rendimiento de la formulación, sino también el aspecto visual (Saranya, 2012; Shafiq-un-Nabi, 2007). Se realizaron pruebas de estabilidad termodinámica para superar la formulación metaestable.

Para superar el problema de la formulación metaestable, se realizaron pruebas de estabilidad termodinámica se siguió la metodología propuesta por Shafiq-un-Nabi (2007). Las formulaciones seleccionadas se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos. Aquellas formulaciones que no mostraron ninguna separación de fase se tomaron para el ciclo de calentamiento y enfriamiento. Se realizaron seis ciclos entre temperaturas de refrigeración de 4-C y 30-C durante 48 horas. Las formulaciones que fueron estables a estas temperaturas se sometieron a la prueba del ciclo de congelación y descongelación. Se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación para las formulaciones

1.50. Cálculo de la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas en presencia de microemulsiones de aceite esencial de Pimenta dioica

Se hicieron diluciones de la microemulsión de aceite esencial seleccionada equivalentes a 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 μL de microemulsión de aceite de pimienta/mL de medio (Tabla 5).

Se depositaron 5 μL de la suspensión de esporas de cada cepa de hongo en el centro de las cajas Petri que contienen el medio PDA suplementado con el fungicida a las concentraciones mencionadas anteriormente. Se incubaron a 25 °C y se midió el crecimiento diario en 4 puntos con la ayuda de un calibre de vernier para poder realizar un promedio del crecimiento de las cepas.

Se tuvo 1 cepa control donde no se adicionó fungicida con la cual se midió el final del experimento una vez que esta alcanzó los bordes de la caja.

La velocidad de crecimiento se reportó en cm/día.

Tabla 5. *Formulación de medio de cultivo adicionado con aceite de pimienta*

A.E. $\mu\text{L}/100\text{g}$	A.E. $\mu\text{L}/\text{g}$	PDA mL	Concentración $\mu\text{L AE}/\text{mL}$ medio
100	1.0	150	1.0
150	1.5	150	1.5
200	2.0	150	2.0
250	2.5	150	2.5
300	3.0	150	3.0
350	3.5	150	3.5
0	0	150	0

1.51. Estudio del efecto in vivo de las microemulsiones de AE de Pimenta dioica en café almacenado

La fumigación de las muestras de café se aplicó por microemulsión con cepas, el café se colocó en sacos de venta de 0.5 Kg cada uno. Se tuvo una

muestra control sin fungicida. Se almacenó el café por 4 meses tomando muestras mensualmente.

Estas muestras se analizaron en % de infección y producción de toxinas (AF y OTA).

1.52. Porcentaje de infección

Se toman 50 granos y se sembraron directamente en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA) y en medio Dichloran 18% agar glicerol (DG18) (Pitt y Hocking, 2009) con el fin de obtener el mejor crecimiento de hongos para su identificación. Las placas se incuban durante 7 días a 25°C y se analizaron visualmente las colonias. La infección para cada una de los géneros y especies se expresa como el porcentaje de infección.

1.53. Prueba cuantitativa para micotoxinas.

Las producciones de micotoxinas por hongos filamentosos se determinó mediante kits ELISA competitivo directo (Veratox®, Neogen Corporation Ltd) por duplicado y las concentraciones se expresaron en ppb. El ensayo ELISA se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

A partir de las muestras mensuales se realizó una molienda y tamizado (malla 20). Las micotoxinas (AF y OTA) se extrajeron con los protocolos del fabricante (para OTA: 10 g de muestra en 40 mL de metanol al 70%; y para AF: 5 g en 25 mL de metanol al 70%).

Los extractos fueron filtrados en filtros Millipore con una membrana de 0.45 µm (Previamente esterilizados).

Posteriormente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se colocaron 100 µL de conjugado en cada pozo ELISA, 100 µL de controles y cada extracto filtrado. Utilizando una pipeta de 12 canales, se mezcló el líquido en los pozos pipeteándolos hacia arriba y abajo 3 veces. Se transfirió 100 µL a los pozos recubiertos de anticuerpos y se mezcló deslizándolos hacia atrás y adelante sobre una superficie plana durante 20-30 segundos.

Se incubaron durante el tiempo específico para cada micotoxina, a temperatura ambiente. Después de lavar con agua destilada 5 veces y eliminar el agua

restante de los pozos, se añadió el sustrato e incubo durante el tiempo indicado, donde el sustrato fue catalizado por la enzima enlazada y produjo un color azul.

Se añadió una solución para terminar la reacción enzimática después del tiempo indicado para la incubación. Dentro de los siguientes 20 minutos, las pruebas se transfirieron a un espectrofotómetro (STAT FAX 321 PLUS).

1.54. Resultados y discusión

1.55. Extracción y purificación de aceite esencial

Los métodos de extracción de aceites esenciales más comúnmente usados son: **destilación por arrastre de vapor, expresión, hidrodestilación y extracción por fluidos supercríticos**. El rendimiento del aceite esencial es dependiente en gran medida de la planta de la cual fue extraído y el método de extracción (Peredo, 2009).

Para el caso de pimienta gorda mexicana Cruz-Olivares y colaboradores (2011) encontraron que el mejor método de extracción es la hidrodestilación. Tomando en cuenta eso, en el presente se realizó la extracción por hidrodestilación tipo Clevenger, ya que diversos autores la demuestran como el más apropiado para plantas aromáticas.

1.56. Obtención del aceite esencial.

La obtención del aceite esencial de los frutos secos y molidos de *Pimenta dioica* de la región de Tlapacoyan, Veracruz, se llevó a cabo durante 3 horas a 100 °C en un equipo de hidrodestilación Clavenger.

El rendimiento del aceite esencial del fruto de *Pimenta dioica*, expresado en mL/100g de muestra seca, fue de 1.52 ± 0.20 mL.

Los resultados se compararon con aceite esencial obtenido de frutos de pimienta de la región de Tabasco y Pimienta Jamaica; y se observó que la pimienta Tlapacoyan (1.52 mL/100 g b.s.) tiene mayores rendimientos que la Tabasco (1.03 mL/100 g b.s.) más no se logra obtener el rendimiento de la pimienta Jamaica (2.8 mL/100 g b.s.) (Garcia-Fajardo *et al.*, 1997; Juarez-Caballero, 2015).

Se llegó a la conclusión que puede deberse a las condiciones climáticas de crecimiento de la planta, la estación en la que se recolectó el fruto y los métodos de extracción utilizados (Tabla 5) (Gonzalez y Pino, 1990; Garcia-Fajardo *et al.*, 1997; Cruz- Olivares, 2011; Monteiro *et al.*, 2011; Juarez-Caballero, 2015).

Tabla 6 Comparación de rendimientos de frutos de *Pimenta dioica* reportados en otros trabajos

Trabajo	Rendimiento mL/100 g b.s.
Fruto pimienta gorda (Juarez-Caballero, 2015)	1.03
Fruto pimienta gorda (Salinas <i>et al.</i> , 2013)	0.4 (SA) 1.37 (SC)
Fruto de Pimienta gorda Mexicana (Garcia-Fajardo <i>et al.</i> , 1997)	2.5
Pimienta Jamaica (Garcia-Fajardo <i>et al.</i> , 1997)	2.8
Fruto pimienta gorda (este trabajo)	1.52

1.57. Efecto del aceite esencial en hongos y producción de micotoxinas

El diseño de experimentos *In vivo* fue diseñado para simular las condiciones de almacenamiento del café (Tabla 6) y estudiar el efecto del aceite esencial de pimienta gorda (*P. dioica*) en el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas.

Tabla 7 Comparación entre condiciones de almacenamiento y condiciones de experimentos *In vivo*

Variable	Almacenamiento	Experimento <i>In vivo</i>
Contenido de humedad	<12%	18%
Cepas	Diversidad fúngica	Esterilizado e inoculado con <i>A. flavus</i> o <i>A. carbonarius</i>
Temperatura	Temperatura ambiente	25 °C
Periodo de almacenamiento	> 6 meses	3 semanas

Los datos de la figura 7 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de AE de Pimienta en el crecimiento de *A. carbonarius*.

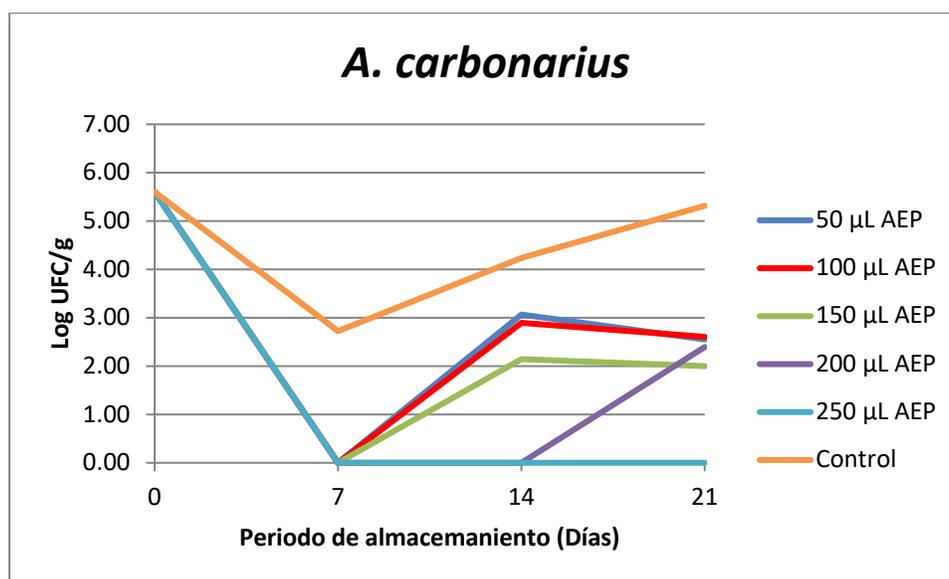


Figura 10 Efecto medio de diferentes concentraciones de aceite esencial (AE) de pimienta (*Pimenta dioica*) sobre el conteo de *A. carbonarius* durante el almacenamiento a 25°C de café inoculado

Los datos en la Fig. 7 ilustran el efecto de diferentes concentraciones de AE de pimienta en el recuento de *A. carbonarius* en café inoculado durante el período de almacenamiento. El recuento de *A. carbonarius* para la muestra control (sin agregar AE) se incrementó en el transcurso del período de almacenamiento (21 días). Los conteos fueron de 5.60, 2.72, 4.24 y 5.32 log ufc/g en el período de almacenamiento de 0, 7, 14 y 21 días, respectivamente. El recuento de *A. carbonarius* aumentó a pesar de agregar 50 μ L de AE de pimienta al café inoculado, pero en comparación con la muestra de control, este tratamiento causó una reducción en el recuento de *A. carbonarius* durante el almacenamiento. Los recuentos fueron 5.60, 0.00, 3.07 y 2.56 log ufc/g en el mismo período de almacenamiento 0, 7, 14 y 21 días, respectivamente. El aumento de la concentración de AE de pimienta a 100 μ L causó una mayor reducción en el recuento de *A. carbonarius* y la redujo a 5.60, 0.00, 2.89 y 2.60 log ufc/g a los 7, 14 y 21 días de período de almacenamiento, respectivamente. Un aumento adicional en la concentración de AE de pimienta usando 150 μ L disminuyó el recuento de *A. carbonarius* en comparación con los recuentos obtenidos en el tratamiento de 100 μ L, 5.60, 0.00, 2.15 y 2.00 ufc/g resultados durante 7, 14 y 21 días, respectivamente; en el caso de las muestras donde se usaron 200 μ L se presentó un efecto fungistático hasta el día 14 donde se vio una concentración de 2,39 ufc/g. La concentración de AE de pimienta en 250 μ L detuvo completamente el crecimiento de *A. carbonarius* después de 7 días y hasta 21 días al final del período de almacenamiento.

Los datos de la figura 8 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de AE de Pimienta en el crecimiento de *A. flavus*.

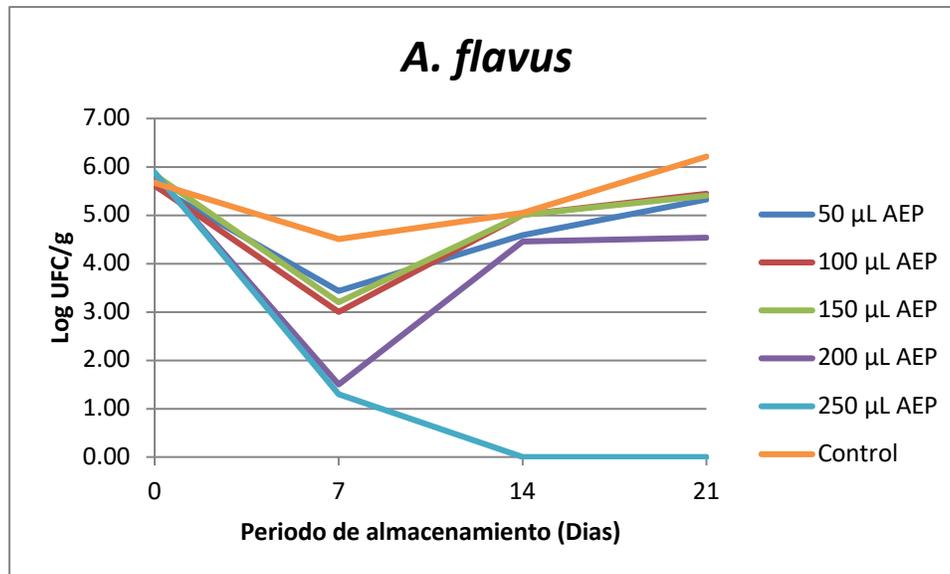


Figura 11 Efecto medio de diferentes concentraciones de aceite esencial (AE) de pimienta (*Pimenta dioica*) sobre el conteo de *A. flavus* durante el almacenamiento a 25°C de café inoculado

Los datos en la Fig. 8 ilustran el efecto de diferentes concentraciones de AE de pimienta en el recuento de *A. flavus* en café inoculado durante el período de almacenamiento. El recuento de *A. flavus* para la muestra control (sin agregar AE) se incrementó en el transcurso del período de almacenamiento (21 días). Los conteos fueron de 5.67, 4.51, 5.05, 6.21 log ufc/g en el período de almacenamiento de 0, 7, 14 y 21 días, respectivamente. El recuento de *A. flavus* aumentó a pesar de agregar 50 µL de AE de pimienta al café inoculado, pero en comparación con la muestra de control, este tratamiento causó una reducción en el recuento de *A. flavus* durante el almacenamiento. Los recuentos fueron 5.61, 3.43, 4.58 y 5.33 log ufc/g en el mismo período de almacenamiento 0, 7, 14 y 21 días, respectivamente. El aumento de la concentración de AE de pimienta a 100 µl causó de igual manera una reducción en el recuento de *A. flavus* y la redujo a 5.62, 3.00, 5.01, 5.44 ufc/g a los 0, 7, 14 y 21 días de período de almacenamiento, respectivamente. Un aumento adicional en la concentración de AE de pimienta usando 150 µl disminuyó el recuento de *A. flavus* en comparación con los recuentos obtenidos en los demás tratamiento, 5.84, 3.20, 5.01 y 5.40 ufc/g resultados durante 0, 7, 14 y 21 días, respectivamente; en el caso de las muestras donde se usaron 200 µl se presentó un efecto fungiestatico durante todo el almacenamiento con concentraciones de 5.86.1.50. 4.45 v 4.54 loq ufc/a en los 0. 7. 14 v 21 días. La

concentración de AE de pimienta en 250 μL detuvo completamente el crecimiento de *A. flavus* después de 7 días y hasta 21 días al final del período de almacenamiento. Para el caso de esta cepa Gibriel y colaboradores en 2011 estudiaron el efecto del aceite esencial de menta en granos de maíz inoculados donde encontraron que a concentraciones de 700 μL por cada 100 gramos de maíz inoculado se encontraba el efecto fungicida con esto podemos comprobar que el aceite esencial de *P. dioica* tiene un efecto a concentraciones más bajas por que se requiere de menos aceite para obtener los mismos resultados.

1.58. Formulación de microemulsiones

Se realizaron las emulsiones bajo lo estipulado en el apartado 9.2.4 obteniendo 60 muestras, se seleccionó para cada conjunto formulación / velocidad de agitación las que mostraban la mejor estabilidad siendo las formulaciones A1.1; A2.2, A3.5; B1.4, B2.3; B3.2; C1.3; C2.2; C3.4; D1.3; D2.3 y D3.4. Se muestran las condiciones de cada una de estas formulaciones en las tablas 9 – 20 que se muestran a continuación.

En la Tabla 8 podemos encontrar las formulaciones para relación de etanol Tween 80 de 0.5 – 0.5 mezclado a 5000 rpm; en ella podemos observar que aun cuando en el ciclo 5 se obtuvo un menor tamaño de partícula, sin embargo el PDI fue más bajo en el ciclo 1 donde se alcanzó un PDI de 0.194 con un tamaño de partícula de 72.87 nm de diámetro. En la Tabla 9 encontramos la misma relación de compuestos pero con 10000 rpm y podemos observar que se alcanzaron valores de PDI mas altos y se obtuvieron tamaños de partícula de 68.92 nm. Por ultimo en la tabla 10 podemos observar el comportamiento de la formulación a 15000 rpm donde de igual manera los valores de PDI aumentaron siendo el más bajo el de 0.444 con tamaños de partícula de 35.72 nm. Con los resultados anteriores se puede concluir que para la formulación A, cuando se aumentó la velocidad de agitación los valores de PDI se incrementaban provocando que no se consiguieran tamaños de partícula más pequeños.

Tabla 8 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.5 Tween 80 con 5000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
A1.1 1	72,87	36,43	0,194	37,3	56,3	95,8
A1.1 2	70,72	35,36	0,231	35	53	89,9
A1.1 3	73,05	36,53	0,207	32	49	87,4
A1.1 4	265,8	132,9	0,199	183	337	565
A1.1 5	263,8	131,9	0,281	59,4	278	538
Promedio	149,2	74,62	0,202	69,3	155	275
SD	105,5	52,75	0,019	64,5	141	252

Tabla 9 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.5 Tween 80 con 10000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
A2.1 1	74,64	37,32	0,275	10,3	13,9	44,6
A2.1 2	68,92	34,46	0,252	31,5	48,3	86,3
A2.1 3	69,82	34,91	0,24	31,9	49,5	89
A2.1 4	41,24	20,62	0,352	7,17	11,3	30,6
A2.1 5	41,65	20,83	0,37	7,99	12	29,9
Promedio	59,25	29,63	0,298	17,8	27	56,1
SD	16,4	8200	0,059	12,8	20	29,4

Tabla 10 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.5 Tween 80 con 15000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
A3.1 1	60,69	30,34	0,538	7,84	11,6	27,9
A3.1 2	50,21	25,11	0,682	7,17	10,7	23,5
A3.1 3	51,37	25,68	0,461	8,77	12,4	24,7
A3.1 4	48,88	24,44	0,313	2,6	3,48	6,26
A3.1 5	35,72	17,86	0,444	9	12,9	24,3
Promedio	49,37	24,69	0,488	7,08	10,2	21,3
SD	8936	4466	0,135	2,61	3,86	8,59

En las Tablas 11-13 a la podemos encontrar las formulaciones para relación de Etanol - Tween 80 de 0.1 – 0.5, la Tabla 11 muestra las formulaciones mezcladas a 5000 rpm; en ella podemos observar que aun cuando en el ciclo 4 se obtuvo un menor PDI siendo este de 0.345 con un tamaño de partícula de

48.13 nm de diámetro. En la Tabla 12 encontramos la misma relación de compuestos pero con 10000 rpm y podemos observar que se alcanzaron valores de PDI mas altos y se obtuvieron tamaños de partícula de 36.24 nm. Por ultimo en la tabla 13 podemos observar el comportamiento de la formulación a 15000 rpm donde de igual manera los valores de PDI aumentaron siendo el más bajo el de 0.213 con tamaños de partícula de 47.98 nm. Con los resultados anteriores se puede concluir que para la formulación B, cuando se modificó la relación entre el Tween y el etanol los valores de PDI fueron en aumento lo que provoco más dispersidad que al momento de evaluar la estabilidad se vio reflejado.

Tabla 11 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.5 Tween 80 con 5000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
B1.1 1	57,12	28,56	0,414	19,7	29,4	50,4
B1.2 1	54,77	27,39	0,352	21,4	32,7	58,6
B1.3 1	51,96	25,98	0,382	7,39	10,6	34,5
B1.4 1	48,13	24,07	0,345	18,9	28,6	50,5
B1.5 1	48,78	24,39	0,419	8,02	11,6	32,9
Promedio	52,15	26,08	0,382	15,1	22,6	45,4
SD	3844	1922	0,034	6,8	10,6	11,2

Tabla 12 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.5 Tween 80 con 10000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
B2.1 1	41,49	20,75	0,402	8,83	12,9	29
B2.2 1	39,75	19,88	0,374	7,3	11,5	27,2
B2.3 1	36,24	18,12	0,343	9,38	13,8	27,5
B2.4 1	37,01	18,51	0,415	7,86	11,6	27,1
B2.5 1	35,31	17,66	0,359	7,16	10,8	26
Promedio	37,96	18,98	0,379	8,11	12,1	27,4
SD	2576	1289	0,03	0,969	1,21	1,08

Tabla 13 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.5 Tween 80 con 15000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
B3.1 1	61,29	30,65	0,938	13,6	23,5	29,6
B3.2 1	47,98	23,99	0,213	8,39	17	36,6
B3.3 1	24,26	12,13	0,561	9,87	14,3	28,8
B3.4 1	45,71	22,86	0,719	11	19,6	25,9
B3.5 1	26,41	13,2	0,538	7,69	17,7	28
Promedio	41,13	20,57	0,594	10,1	18,4	29,8
SD	15,62	7812	0,266	2,34	3,42	4,05

En las emulsiones tipo C fueron formuladas con una relación de Etanol - Tween 80 de 0.5 – 0.1, la Tabla 14 muestra las formulaciones mezcladas a 5000 rpm; en la Tabla 15 encontramos la misma relación de compuestos pero con 10000 rpm y por ultimo en la tabla 16 podemos observar el comportamiento de la formulación a 15000 rpm; en este conjunto de formulaciones al igual que en las formulaciones tipo B podemos observar que los valores de PDI fluctúan entre 0.287 y 0.375 para sus valores más bajos y tamaños de partícula más bajos siendo estos entre 90 y 200 nm. Con los resultados anteriores se puede concluir que para la formulación C, cuando se modificó la relación entre el Tween y el etanol los valores de PDI fueron en aumento lo que provoco más dispersidad sin embargo las partículas de entre 90 y 150 nm.

Tabla 14 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.1 Tween 80 con 5000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
C1.1 1	160,2	80,12	0,293	29,7	45,5	214
C1.2 1	155,2	77,62	0,36	68,8	166	5850
C1.3 1	155,1	77,57	0,287	22,9	32,4	133
C1.4 1	150,8	75,39	0,327	16,8	23,6	122
C1.5 1	128,4	64,19	0,384	19,6	29,6	134
Promedio	149,9	74,98	0,33	31,6	59,4	1290
SD	12,49	6259	0,042	21,4	60,1	2550

Tabla 15 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.1 Tween 80 con 10000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
C2.1 1	102,7	51,36	0,286	10,3	15,7	52,5
C2.2 1	112,8	56,38	0,306	16,3	22,6	61,7
C2.3 1	97,52	48,76	0,42	15,4	21	77,2
C2.4 1	103,2	51,6	0,36	14,6	19	28,4
C2.5 1	120,1	60,04	0,462	18,9	26,9	48,3
Promedio	107,3	53,63	0,367	15,1	21	53,6
SD	9051	4518	0,074	3,13	4,17	17,9

Tabla 16 Formulación relación 0.5 Etanol- 0.1 Tween 80 con 15000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
C3.1 1	87,79	43,89	0,374	11,8	16,6	32
C3.2 1	98,47	49,24	0,275	31,2	53,7	195
C3.3 1	96,76	48,38	0,256	45,4	69,9	129
C3.4 1	98,06	49,03	0,375	31,5	49,4	104
C3.5 1	105,1	52,56	0,264	12,3	18,1	71,2
Promedio	97,24	48,62	0,309	26,4	41,5	106
SD	6195	3103	0,06	14,3	23,4	61,5

Por último se estudió una relación de Etanol - Tween 80 de 0.1 – 0.1 denominadas D, la Tabla 17 muestra las formulaciones mezcladas a 5000 rpm; en la Tabla 18 encontramos la misma relación de compuestos pero con 10000 rpm y por último en la tabla 19 podemos observar el comportamiento de la formulación a 15000 rpm; en este conjunto de formulaciones se espera un comportamiento similar a las formulaciones tipo A ya que la relación entre Tween - Etanol era la misma sin embargo no se consiguieron valores de PDI muy bajos siento el más bajo de 0.2 con un tamaño de partícula de 119.4 nm. Con los resultados anteriores se puede concluir que para la formulación D, cuando la relación entre el Tween y el etanol era la misma a valores bajos los valores de PDI fueron en aumento lo que provoco más dispersidad que fue comprobada al hacer las pruebas de estabilidad.

Tabla 17 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.1 Tween 80 con 5000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
D1.1 1	136,6	68,29	0,235	16,2	23,3	109
D1.2 1	120,6	60,29	0,25	57,4	104	5450
D1.3 1	119,4	59,71	0,265	16,5	23,6	81,3
D1.4 1	119,1	59,57	0,259	48,4	88	5020
D1.5 1	117	58,51	0,268	18,8	29,7	97,5
Promedio	122,54	61,274	0,2554	31,46	53,72	2151,56
SD	7,97	3,97	0,01	19,85	39,09	2818,90

Tabla 18 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.1 Tween 80 con 10000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
D2.1 1	219,6	109,8	0,407	29	41,3	209
D2.2 1	206,4	103,2	0,471	23,1	36,9	4060
D2.3 1	188,4	94,21	0,454	50,3	140	5360
D2.4 1	193,1	96,53	0,442	13,2	18,8	85,8
D2.5 1	180,4	90,2	0,432	57,8	106	771
Promedio	197,58	98,788	0,4412	34,68	68,6	2097,16
SD	15,51	7,75	0,02	18,75	51,79	2442,76

Tabla 19 Formulación relación 0.1 Etanol- 0.1 Tween 80 con 15000 rpm

Muestra	Z-Ave		Pdl	D(v)		
	d.nm	r.nm		10%	50%	90%
D3.1 1	150,9	75,45	0,447	8,94	12,4	35,3
D3.2 1	108,1	54,06	0,526	14,2	20,1	31,2
D3.3 1	86,74	43,37	0,565	8,23	11,8	32
D3.4 1	61,66	30,83	0,439	17,3	26,6	53,1
D3.5 1	67,27	33,64	0,672	7,6	10,6	31,6
Promedio	94,934	47,47	0,5298	11,254	16,3	36,64
SD	36,21	18,11	0,10	4,27	6,86	9,34

En la tabla 21 se resumen los mejores resultados de las tablas 9-19 con los análisis estadísticos de la misma donde podemos observar que no hay diferencia significativa para los valores de PDI sin embargo para los tamaños

de partícula existe diferencia significativa según el tipo de formulación con el que fueron elaborados.

Tabla 20 Análisis estadístico de resultados

Muestras	Z-Ave d.nm	Pdl
A1.1 1	72,87 ^{AB}	0,194 ^A
A2.1 2	68,92 ^{AB}	0,252 ^A
A3.1 5	35,72 ^{AB}	0,444 ^A
B1.4 1	48,13 ^A	0,345 ^A
B2.3 1	36,24 ^A	0,343 ^A
B3.2 1	47,98 ^A	0,213 ^A
C1.3 1	155,1 ^B	0,287 ^A
C2.2 1	112,8 ^B	0,306 ^A
C3.4 1	98,06 ^B	0,375 ^A
D1.3 1	119,4 ^B	0,265 ^A
D2.3 1	188,4 ^B	0,454 ^A
D3.4 1	61,66 ^B	0,439 ^A

A dichas muestras se le realizaron pruebas de estabilidad establecidas en el apartado de metodología donde podemos observar que la primera prueba que era un ciclo de centrifugación 3 de las emulsiones presentaron separación de fases; las 9 formulaciones restantes fueron llevadas a ciclos de calor y frío donde 5 de ellas mantuvieron la estabilidad, como última prueba se realizaron pruebas de congelación-descongelación donde solo 4 de estas emulsiones consiguieron mantenerse estables. Esto puede explicarse con las características de cada una de estos formulados, ya que como se explicó anteriormente las formulaciones conforme se fueron modificando sus formulaciones presentaban PDI más elevados lo que resultaba en una estabilidad más baja.

Tabla 21 Resumen de pruebas de estabilidad

Pruebas de estabilidad			
Muestra	Centrifugado	Ciclo C/D	Ciclo C/F
A1	SI	SI	SI
A2	SI	SI	SI
A3	SI	SI	SI
B2	SI	SI	SI
C3	SI	SI	NO
B3	SI	NO	-
D1	SI	NO	-
D2	SI	NO	-
D3	SI	NO	-
B1	NO	-	-
C1	NO	-	-
C2	NO	-	-

Siendo entonces la emulsión A1 con 5000 revoluciones y 1 ciclo de trabajo la seleccionada para la siguiente etapa de trabajo, dado que presenta el mejor PDI de las 4 muestras favorables.

1.59. Resultado del cálculo de la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas en presencia de aceite esencial de Pimenta dioica

Para cotejar los resultados obtenidos en el estudio de características *In vivo*, se realizó el estudio de velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas; para ello se evaluaron las concentraciones de 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 μL de fungicida /mL de medio frente a las 2 cepas estudiadas. El incremento del crecimiento radial fue utilizado para evaluar la velocidad de crecimiento (cm/día). El ensayo se realizó por triplicado hasta alcanzar el tamaño total de la caja Petri.

En la tabla 22 se muestran los valores de crecimiento para *A. carbonarius*, en las diferentes concentraciones de aceite esencial en la cual observamos que a concentraciones de 3.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se presenta la actividad fungicida lo cual concuerda con lo visto en el estudio *in vivo*.

Tabla 22 Crecimiento radial en cm de *A. carbonarius* frente a concentraciones de fungicida

<i>A. carbonarius</i>							
Días	Testigo	1.0 μL/mL	1.5 μL/mL	2.0 μL/mL	2.5 μL/mL	3.0 μL/mL	3.5 μL/mL
1	0.8	0.5	0.5	0.5	0	0	0
2	1.7	0.6	0.6	0.6	0.1	0	0
3	2.7	0.7	0.7	0.6	0.2	0	0
4	3.7	0.8	0.8	0.7	0.4	0	0
5	4.6	0.9	0.9	0.7	0.5	0	0
6	5.9	1.1	1.1	0.8	0.5	0	0
7	6.6	1.2	1.1	0.8	0.6	0	0
8	7.9	1.4	1.2	0.8	0	0	0
9	8.1	1.5	1.2	0.9	0	0	0

Los valores representan el promedio de 3 réplicas

En la Figura 12 podemos observar la velocidad de crecimiento para la cepa de *A. carbonarius* donde a concentraciones de **3.0 μL de fungicida /mL de medio** ejercen un efecto fungicida en la cepa.

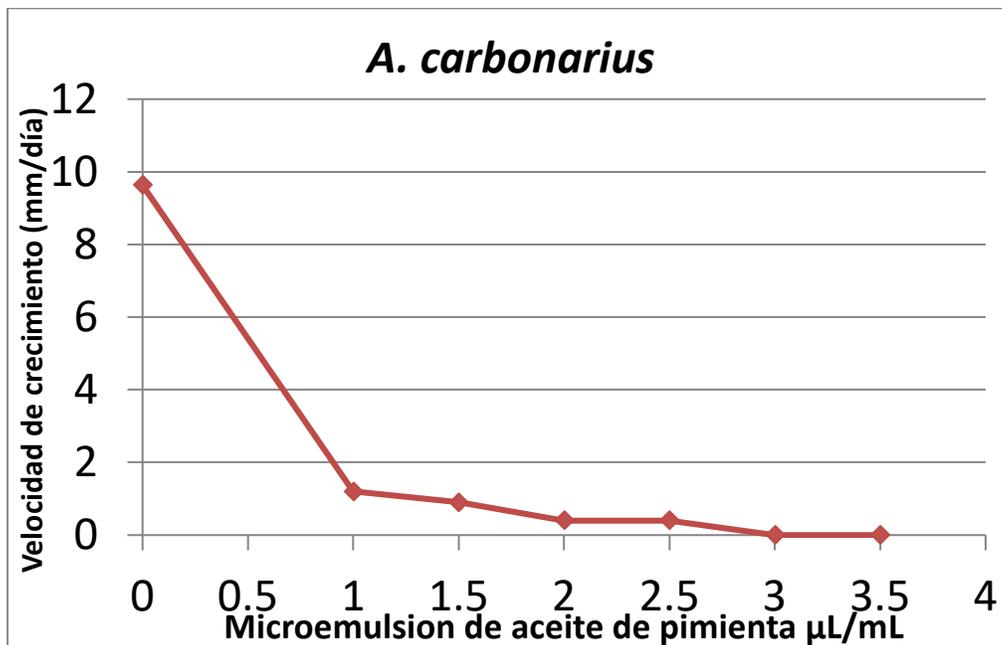


Figura 12 Velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*

En la tabla 23 se muestran los valores de crecimiento para *A. flavus*, en las diferentes concentraciones de aceite esencial en la cual observamos que a concentraciones de 3.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se presenta la actividad fungicida lo cual concuerda con lo visto en el estudio *in vivo*.

Tabla 23 Crecimiento radial en cm de *A. flavus* frente a concentraciones de fungicida

<i>A. flavus</i>							
Días	Testigo	1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	2.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$	2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	3.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$	3.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$
1	0.7	0.6	0.6	0.70	0	0	0
2	1.4	0.6	0.6	0.7	0	0	0
3	2.4	0.7	0.6	0.7	0.4	0	0
4	3.0	0.8	0.8	0.8	0.4	0	0
5	3.9	1.0	0.8	0.8	0.5	0	0
6	4.6	1.1	1.0	0.8	0.5	0	0
7	5.1	1.2	1.0	0.9	0.7	0.4	0
8	6.4	1.3	1.2	0.9	0.7	0.4	0
9	7.2	1.4	1.2	0.9	0.9	0.5	0
10	8.1	1.5	1.2	1.0	0.9	0.5	0

Los valores representan el promedio de 3 réplicas

En la ilustración 13 podemos observar la velocidad de crecimiento para la cepa de *A. flavus* donde a concentraciones de **3.0 μL de fungicida /mL de medio** ejercen un efecto fungicida en la cepa.

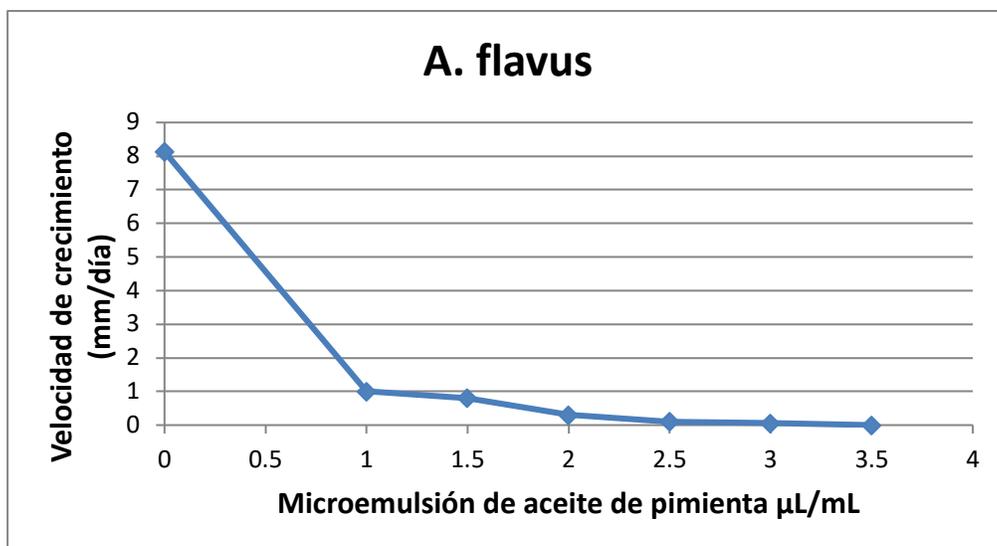


Figura 13 Velocidad de crecimiento de *A. flavus*

1.60. Estudio del efecto *in vivo* de las microemulsiones de AE de Pimenta dioica en café almacenado

Para el estudio del efecto *in vivo* del fungicida desarrollado se llenaron sacos con 500 g de café verde de los cuales la mitad fueron tratados con el fungicida, estos fueron almacenados a temperatura ambiente.

Cada mes se tomaba un saco muestra, empezando con el mes cero donde se tomó la muestra para ver el estado inicial del café, este fue sembrado en medio PDA y DG18 de los cuales nos interesaba el crecimiento de los hongos negros posibles *A. carbonarius* y verdes posibles *A. flavus* ya que son los que producen las toxinas de interés, se utilizaron las características de la morfología colonial y las claves taxonómicas reportadas por Pitt y Hocking (2009) que para el caso de *A. carbonarius* consiste de colonias con micelio blanco y conidioforos densos de color negro, incoloras al reverso, los conidios alcanzan más de 6 mm de diámetro, de forma espinosa, producción de esclerocios de color amarillo grisáceo. Para *A. flavus* se observaron colonias de color verde amarillento a verde olivo, moderadamente densas, conidios con paredes delgadas, lisas o finamente rugosas, esféricas o elípticas; vesículas arriba de 50 µm de diámetro, usualmente con métulas presentes. El % de infección total para el tiempo 0 fue del 24% en medio PDA de los cuales el 6% eran hongos verdes y el 8% de hongos negros; mientras que en DG18 se presentó un 14% de infección siendo el 4% para verdes y el 2% para negros.

Para el mes 1 se muestrearon sacos con tratamiento y sin tratamiento en donde se encontró que para medio PDA se tuvo un 24% de infección por hongos verdes y un 16% para hongos negros en las muestras que no fueron tratadas con el fungicida mientras que las muestras tratadas con el fungicida presentaron 4% en hongos verdes y 2% de hongos negros. En el medio DG18 se encontró que para las muestras tratadas no hubo presencia de hongos mientras que las no tratadas presentaron un 34% tanto para hongos verdes como negros.

Para el segundo mes se encontró un 24% de infección por hongos verdes y un 16% para hongos negros en las muestras no fueron tratadas con el fungicida mientras que las muestras tratadas presentaron 8% en hongos verdes y 14% de hongos negros para el medio PDA. En el medio DG18 se encontró que para las muestras tratadas tenían un 24% para hongos verdes y 16 % de negros mientras que las no tratadas presentaron un 36% tanto para hongos verdes y un 44% de negros.

Para el tercer mes en el medio PDA el porcentaje de hongos negros se mantuvo en 14% para las muestras tratadas mientras que los hongos verdes aumentaron al 12% y en las no tratadas aumentaron ambos hongos a 24% para hongo verdes y 34% para hongos negros. Mientras que para el medio DG18 las muestras tratadas presentaron 36% de hongos verdes y 24% de infección por hongo negro, mientras que los no tratados presentaron un 82% para verdes y un 28% para negros.

En el último mes en PDA para las muestras tratadas se encontró con un crecimiento del 14% y del 8% para hongos verdes y negros respectivamente siendo que las muestras no tratadas presentaban crecimientos del 20% para ambos hongos; y en medio DG18 fue del 24% para verdes y del 12% para negros en muestras tratadas y de 60% y 14% para muestras no tratadas.

Tabla 24 Porcentaje de infección de hongos

Medio	Tratamiento	%Infección Verdes	%Infección negros
Mes 0			
PDA	Sin Pimienta	6%	8%
DG18	Sin Pimienta	4%	2%
Mes 1			
PDA	Sin Pimienta	24%	16%
	Con pimienta	4%	2%
DG18	Sin Pimienta	34%	34%
	Con pimienta	0%	0%
Mes 2			
PDA	Sin Pimienta	16%	24%
	Con pimienta	8%	14%
DG18	Sin Pimienta	36%	44%
	Con pimienta	24%	16%
Mes 3			
PDA	Sin Pimienta	24%	34%
	Con pimienta	12%	14%
DG18	Sin Pimienta	82%	28%
	Con pimienta	56%	24%
Mes 4			
PDA	Sin Pimienta	20%	20%
	Con pimienta	14%	8%
DG18	Sin Pimienta	60%	14%
	Con pimienta	24%	12%

Para el caso de las toxinas se encontró que consiguió una disminución en la concentración de toxinas tanto Aflatoxinas como Ocratoxina a comparación con el testigo sin embargo no se consiguió un efecto inhibitorio total ya que ambas toxinas se encontraron en el café .

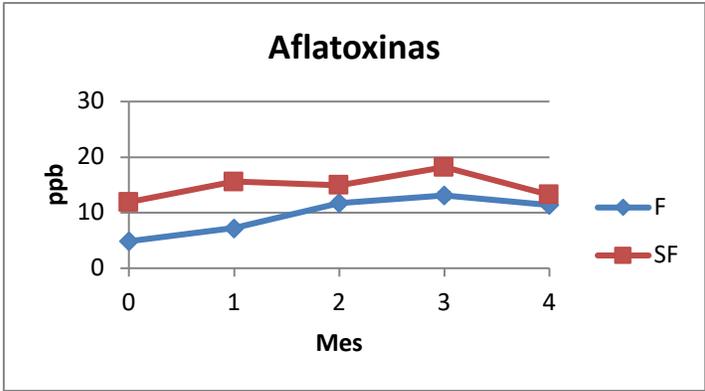


Figura 14 Concentración de Aflatoxinas

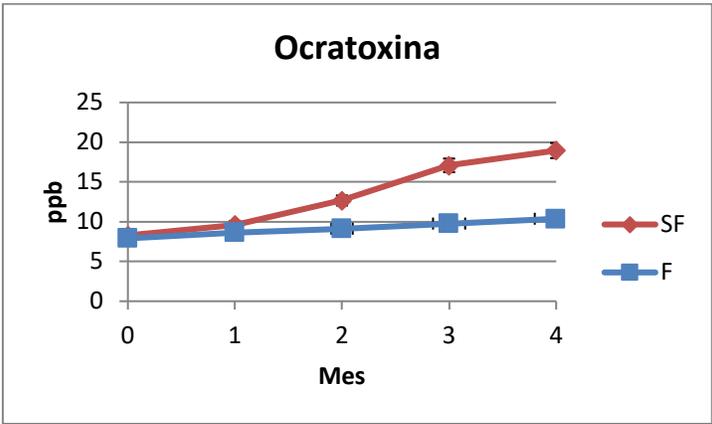


Figura 15 Concentración de Ocratoxina

1.61. Conclusiones

Se obtuvo un rendimiento de aceite esencial de *Pimenta dioica* de 1.52 mL por cada 100 g, siendo este mayor que lo reportado para pimienta mexicana.

La Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Pimenta dioica* frente a cepas de *A. carbonarius* fue de 2.5 μ L por gramo de café, mientras que para *A. flavus* se necesitan de 2.0 μ L de aceite por gramo de café.

De las 12 microemulsiones de aceite esencial de *Pimenta dioica* estudiadas solo 4 presentaron estabilidad termodinámica por lo que se seleccionó la formulación con 0.5% de etanol y tween 80, a 5000 rpm en 1 ciclo de trabajo para ser usada como fungicida.

La Concentración Fungicida Mínima del fungicida fue de 3 μ L/mL de medio para ambas cepas, lo que comprueba que se tiene mayor efecto fungicida al emulsionar el aceite.

El café verde tratado con el fungicida formulado a base de aceite esencial de *Pimenta dioica* y almacenado durante 4 meses presentó una disminución en el % de infección de hongos filamentosos y en el contenido de OTA y AF en comparación con el café no tratado.

El presente estudio comprobó que el aceite esencial de *Pimenta dioica* puede ser utilizado como fungicida para el tratamiento de café verde almacenando constituyendo una alternativa sustentable frente al uso de fungicidas sintéticos altamente tóxicos para los consumidores y contaminantes para el medio ambiente. Asimismo, constituye una alternativa para el uso de productos aprobados para la agricultura orgánica.

1.62. Bibliografía

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., Accensi, F., & Cabañes, F. J., (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S63-S68.
- Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., & Bouza, E., (2006). *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid Introducción.
- AMECAFE. (2012). Obtenido de Asociación Mexicana de Café.
- Benbrook, C. (2005). Breaking the mold: impacts of organic and conventional farming systems on mycotoxins in food and livestock feed. *Organic Center State of Science Review*, 58.
- Bennett, J. M. (2010). An overview of the genus *Aspergillus* (pp. 1-17). *Caiser Academic Press*, Portland.
- Broissin- Vargas, L. M., 2017. Estudio de la dinamica de poblaciones fúngicas y su impacto en los marcadores de calidad durante el almacenamiento de cefé verde. UNIDA-ITVER
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2014). 7 good food-processing techniques: Stability of mycotoxins in processed maize-based foods. In *Mycotoxin reduction in grain chains* (p. 89)
- Channaiah, L., & Maier, D. E. (2014). Best stored maize management practices for the prevention of mycotoxin contamination. In *Mycotoxin reduction in grain chains* (p. 78).
- Channaiah, L. (2011). Mycotoxin. *World-Grain.com*. <http://www.world-grain.com/News/News%20Home/Features/2011/6/Mycotoxins.aspx?cck141>
- García-Fajardo, J., Martínez-Sosa, M., Estarrón-Espinosa, M., Villare, G., Gaset, A., & de Santos Avila, J. M. (1997). Comparative study of the oil and supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merril). *Journal of Essential Oil Research*, 9 August 1995, 181-185
- Gibriel, Y., Hamza, A., Gibriel, A. And Mohsen, S. (2011). In Vivo Effect Of Mint (*Mentha Viridis*) Essential Oil On Growth And Aflatoxin Production By *Aspergillus Flavus* Isolated From Stored Corn. *Journal Of Food Safety*, 31(4), pp.445-451.
- Gonzalez A. y J. A. Pino (1990). Effect og aging of *Pimenta dioica* L. tree on yield and composition of the fruit essential oil. *Revista de agroquímica y Tecnología de alimentos*, 30, 277-281
- Green, C. L. y Espinosa F. (1988). Jamaican and Central American Pimento (Allspice; *Pimenta dioica*): Characterization of flavour differences and other distinguishing features. *Food Science*, 1, 3-20

Hammer, M. E., Ramos J., Setó, L., Purroy, P., Sanchis, V., & Marin, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899

He, J., Zhou, T., Young, J. C., Boland, G. J., & Scott, P. M. (2010). Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2).

International Coffee Organization. (28 de Mayo de 2017). Obtenido de ICO: http://www.ico.org/es/botanical_c.asp

International Coffee Organization. (28 de Octubre de 2017). Obtenido de ICO: http://www.ico.org/es/botanical_c.asp

Kabak, B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4)

Kabak, B., Dobson, A. D., & Var, I. I (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 593-619.

Kaushik, G. (2015). Effect of processing on mycotoxin content in grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12).

Khadelwal, P., & Upendra, R. (2012) Assessment of biotherapeutic potential of *Pimenta dioica* (allspice) leaf extract. *International Journal*, 3(09), 3379-3383

Kim, J., Seo, S., Lee, S., Shin, S. and Park, I. (2008). Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), pp.7316-7320.

Lund, F., & Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1117-1123.

Magan, N., & Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1).

Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7).

McClements, D. and Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), pp.285-330.

McClements, D. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology,

- Milani, J., & Maleki, G. (2014). Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12).
- Mills, J. (1996). Quality of stored cereals. In *Cereal grain quality* (pp. 441-478). Springer.
- Monteiro, O. S., Souza, A. G., Soledade, L. E. B., Queiroz, N., Souza, A. L., Mouchrek Filho, V. E., & Vasconcelos, A. F. F., (2011). Chemical evaluation and thermal analysis of the essential oil from fruits of the vegetable species *Pimenta dioica* L. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106(2), 595-600
- Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatogenos. *Revista Mexicana de Micología*, (29) 1-15.
- Ochoa, D, 2004. Determinación de los niveles de sensibilidad en aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* hacia tres fungicidas comúnmente utilizados en su control. Pontificia Universidad Javeriana.
- Olsen, M., Jonsson, N., Magan, N., Banks, J., Fanelli, C., Rizzo, A., et al. (2003). Prevention of ochratoxin A in cereals. OTA PREV. Quality of life and management of living resources. Final Report.
- Onzima, J., Coulibaly, N., & Montagnon, C. (2002). The role of the African Coffee Research Network in developing sustainable coffee production and quality. *Recherche et caféiculture*, 75-83
- Pitt, J., Taniwaki, M. H., & Cole, M. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32(1)
- Prakash R. & Jha s. N., (2014). Review Article Basics of the Genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany*, 2, 26-30
- Richard, J., Payne, G., Desjardins, A., Maragos, C., Norred, W., & Pestka, J. (Eds.). (2003). *Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems* (Vol. 139, pp. 101-103). CAST Task Force Report.
- Richard, J. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 3-10.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and fragrance Journal*, 28(5), 269-279.
- Schmidt, C. W. (2013). Breaking the mold: New strategies for fighting aflatoxins. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), A270.
- Scott, P. (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47(6), 489-499.
- Sharma, R. R., & Pongener, A. (2010). Natural products for postharvest decay control in horticultural produce: a review. *Stewart Postharvest Review* 6(4) 1-9

Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118-122

Stevic, T., Beric, T., Savikin, K., Sokovic, M., Godevac, D., Dimkic, I., y otros. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products* 55, 116–122.

Stirling, H. (1980). Storage research on Kenya Arabic coffee. In the 9th Colloque Scientifique International sur le café.

Suarez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 501-507.

Sudini, H., Rao, G. R., Gowda, C., Chandrika, R., Margam, V., Rathore, A., et al. (2015). Purdue Improved Crop Storage (PICS) bags for safe storage of groundnuts. *Journal of Stored Products Research*, 64, 133-138.

Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of applied microbiology*, 94(4), 665-674

Temis-Pérez, A. L., Vigil, A. L.-M., & Sosa-Morales, M. E. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 54-74.

Wild, C., Miller, J. D., & Groopman, J. D. (2015). Mycotoxin control in low-and middle-income countries. IARC Working Group Report.

Wintgens, N. J. (2001). *Coffee: Growing, processing, sustainable production*. Weinheim: WILEY-VCH

Zabka, M., Pavela, R., & Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and products*, 30(2), 250-253

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.