



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**“ELABORACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO ANTIFÚNGICO A PARTIR DE
PÉPTIDOS PRODUCTO DE HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE HOJA DE JACA
(*ARTOCARPUS HETEROPHYLLUS* LAM)”**

POR:

ITB. IRVING ANTONIO BRION ESPINOZA

TESIS PROPUESTA A LA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

**MESTRIA EN CIENCIAS
EN ALIMENTOS**

DIRECTOR: DRA. MONTSERRAT CALDERÓN SANTOYO

CO- DIRECTOR: DR. JUAN ARTURO RAGAZZO SÁNCHEZ

TEPIC, NAYARIT

OCTUBRE, 2020



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

Tepic, Nayarit, **08/OCTUBRE/2020**

CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 29-2020

M.C. Luz del Carmen Romero Islas
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **ITB. Irving Antonio Brion Espinoza** con número de control **G1840001**, cuyo título es **“Elaboración de un recubrimiento antifúngico a partir de péptidos producto de hidrólisis de proteínas de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)”** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

Dra. Montserrat Calderón Santoyo
(Presidente)

Dr. Juan Arturo Ragazzo Sánchez
(Secretario)

Dra. María de Lourdes García Magaña
(Vocal)

Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica®

Dr. Ulises Miguel López García
Presidente del Consejo de Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

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

Tepic, Nayarit, **06/10/2020**

No. Oficio: 25-610-2020

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "Elaboración de un recubrimiento antifúngico a partir de péptidos producto de hidrólisis de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam." para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos del I.T.B. **Irving Antonio Brion Espinoza** con numero de control **G1840001**, cuenta con un nivel de **originalidad Aceptable** según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican articulos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

ATENTAMENTE

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


MANUEL ANGEL URIBE VAZQUEZ
DIRECTOR



OGTM/LCRI/agvl

Ccp. Archivo DEPI





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

Tepic, Nayarit 8/Octubre/2020

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
25/608/2020

**ITB. IRVING ANTONIO BRION ESPINOZA
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado **“ELABORACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO ANTIFUNGICO A PARTIR DE PÉPTIDOS PRODUCTO DE HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE HOJA DE JACA (*Artocarpus heterophyllus cam*)”**

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.



**SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.*

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo DEPI.

**agvl



Carta de cesión de derechos

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el 20 del mes de Octubre, el que suscribe alumno BRION ESPINOZA IRVING ANTONIO del Programa de Doctorado en Ciencias en Alimentos con número de control G18400001, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección de la Dra. Montserrat Calderón Santoyo pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

ATENTAMENTE,

Irving Antonio Brion Espinoza



Irving
GONA

*Lo que sabemos es una gota de agua; lo
que ignoramos es el océano.*

Isaac Newtonn

AGRADECIMIENTO

A **Dios**, por darme la oportunidad de cumplir mis sueños y objetivos, de nunca dejarme solo

A la Directora de tesis **Dra. Montserrat Calderón Santoyo** por brindarme la oportunidad de ser parte del equipo de trabajo, por su paciencia y dedicación, así mismo por guiarme durante el proceso de la investigación y compartir su conocimiento en el proyecto.

Así mismo al Co-director **Dr. Juan Arturo Ragazzo Sánchez** y revisores **Dra. María de Lourdes García Magaña** y **Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto** por sus valiosas aportaciones y observaciones con el fin de mejorar.

A **CONACYT** por otorgarme la beca con número 713902 para desarrollar dicha investigación.

A la **Dra. Maricarmen, M.C. Carolina, Dr. Ramsés**, por su valioso apoyo durante el proceso de formación.

A mi **Familia** por su apoyo incondicional, para poder cumplir mis objetivos de vida.

DEDICATORIA

A mis padres, **Reina Espinoza** y **Antonio Brion**, por ser los pilares de mi vida y darme la oportunidad de ser una persona preparada, para cumplir mis sueños. Admiro su inteligencia de cada uno, los cuales me impulsan y deseo ser como ustedes. Agradezco los valores que me han inculcado para ser mejor cada día, los amo.

A mis hermanos **Tania**, **Abraham** y **Cristian** por su apoyo incondicional y consejos que me han brindado en todo momento.

A **Oswaldo** por su gran apoyo y escucharme cuando más lo necesite, por impulsarme para no desistir en momentos difíciles.

A mis compañeros y amigos, por compartir momentos especiales durante este proceso, en especial a **Calorina Chiu** quien siempre me motivo para seguir adelante, admiro su dedicación y empeño que realiza todos los días.

Con Cariño y respeto:

Irving Antonio Brion Espinoza

RESUMEN

Brion-Espinoza I. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Agosto, 2019. Elaboración de un recubrimiento antifúngico a partir de péptidos producto de hidrólisis de proteínas de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam). Directora: Calderón-Santoyo, M., Co-Director: Ragazzo-Sánchez, J. A.

Estudios en nuestro grupo de trabajo, han reportado en la hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) concentraciones de proteínas insolubles que van de un 10 a 12.7%. Las proteínas pueden ser hidrolizadas mediante hidrólisis ácida o enzimática, obteniendo péptidos con actividad biológica. Se ha reportado una variedad de péptidos bioactivos obtenidos de plantas con propiedades microbicidas. Por ello es de interés evaluar la actividad antifúngica de estos péptidos frente a fitopatógenos de postcosecha en frutos.

El objetivo de esta investigación fue formular una película antifúngica a base de pectina, adicionado con péptidos de hoja de jaca, para el control *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya.

La hoja de jaca fue lavada con NaClO al 2%. La extracción de proteínas se realizó por altas presiones hidrostáticas a 300 MPa por 20 min. Se cuantificó proteína por el método de Bradford. Para la obtención de péptidos se realizó hidrólisis ácida y enzimática con pepsina o pancreatina (2, 4, 6 h). Los péptidos obtenidos se liofilizaron y solubilizaron en buffer Citrato/NaOH/HCl pH 2.0, fraccionaron en membrana ultracel de celulosa 10kDa y se almacenaron a 4°C hasta su uso. La prueba de inhibición de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* se realizó en agar PDA en concentraciones de 340 y 680 µg de péptidos/mL. Se evaluó la germinación en 200 esporas en concentraciones desde 85 hasta 850 µg de péptidos/mL en PDB. Por otra parte, se determinó CMI por microcalorimetría (TAM Air) mediante el monitoreo en tiempo real de la generación de energía por el fitopatógeno. Las películas se formularon con pectina de bajo metoxilo, glicerol, CaCl₂ y agua. Se realizó la prueba de inhibición de crecimiento micelial, así mismo se determinó la inhibición de germinación de esporas. Por otra parte, se realizaron pruebas fisicoquímicas a las películas como pH, color, espesor, humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua.

Se obtuvieron 76.4 mg de proteína/g de hoja de jaca. Se obtuvieron rendimientos de los hidrolizados de 13% con pepsina, 47% con pancreatina y un 70% por hidrólisis ácida. Los hidrolizados con pepsina con tiempo de hidrólisis de 2 h y concentración de 680 µg de péptidos/mL presentaron 90±0.08% de inhibición de crecimiento micelial. Se atribuye esta inhibición a la probable obtención de péptidos de cadena corta, probablemente ricos en cisteína, a los cuáles se les atribuye propiedades antifúngicas. Los péptidos actúan formando poros en la membrana de los hongos generando la lisis celular. Se obtuvo 100% de inhibición de germinación de esporas a partir de concentraciones de 510 µg de péptidos/mL. La CMI se determinó en 894.4 µg de péptidos/mL. Las películas conteniendo 680 µg de péptidos/mL produjeron 82±0.08% de inhibición en crecimiento micelial y 91±1.2 % de inhibición de germinación de esporas. Respecto a las pruebas fisicoquímicas, se observó que el gel que contenía péptidos era más ácido con un valor de pH de 3.23. Con respecto al color, las P s/p son más luminosas en comparación con las P c/p, que son más amarillentas y verdosas. Las P c/p tienen un espesor mayor con 0.0686 mm, respecto a 0.0491 mm de P s/p, así mismo una mayor solubilidad de 90.84% comparando con 86.63% de la P s/p, esto se debe a que los péptidos generan una modificación estructural de la película. Las P c/p tienen una mayor humedad de 28.80%, así mismo son más permeables al vapor de agua 1.25 x10⁻¹³ kg/m.s.Pa (respecto a 1.31x10⁻¹³ kg/m.s.Pa de P s/p), debido al material con las que están constituidas y al carácter hidrofílico de los aminoácidos.

Los resultados obtenidos en la inhibición de *C. gloeosporioides* mediante películas adicionales de péptidos obtenidos por hidrólisis con pepsina a partir de proteína de hoja de jaca, resultan prometedores para aplicaciones en el control de este fitopatógeno en postcosecha.

Palabra clave: Hoja de jaca, proteína, péptidos antifungicos, recubrimiento.

ABSTRACT

Brion-Espinoza I. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Agosto, 2019. Elaboration of an antifungal films with peptides resulting from hydrolysis of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) proteins. Directora: Calderón-Santoyo, M., Co-Director: Ragazzo-Sánchez, J. A.

Studies in our working group have reported concentrations of insoluble proteins in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) ranging from 10 to 12.7%. Proteins can be hydrolyzed by acidic or enzymatic hydrolysis, obtaining peptides with biological activity. A variety of bioactive peptides obtained from plants with microbicidal properties have been reported. Therefore, it is of interest to evaluate the antifungal activity of these peptides against postharvest phytopathogens in fruits.

The objective of this investigation was to formulate a pectin-based antifungal film, added with jackfruit peptides, for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya.

Jackfruit leaf was washed with 2% NaClO. Protein extraction was performed by high hydrostatic pressures at 300 MPa for 20 min. Protein was quantified by the Bradford method. To obtain peptides, acid and enzymatic hydrolysis was carried out with pepsin or pancreatin (2, 4, 6 h). The obtained peptides were lyophilized and solubilized in Citrate/NaOH/HCl buffer pH 2.0, fractionated on 10kDa cellulose ultracell membrane and stored at 4 °C until use. The *C. gloeosporioides* mycelial growth inhibition test was performed on PDA agar at concentrations of 340 and 680 µg of peptides/mL. Germination in 200 spores was evaluated in concentrations from 85 to 850 µg of peptides/mL in PDB. On the other hand, MIC was determined by microcalorimetry (TAM Air) by real-time monitoring of energy generation by the plant pathogen. Films were formulated with low methoxyl pectin, glycerol, CaCl₂ and water. The mycelial growth inhibition test was performed, and the inhibition of spore germination was also determined. On the other hand, physicochemical tests were performed on the films such as pH, color, thickness, humidity, solubility and permeability to water vapor.

76.4 mg of protein/g of jackfruit leaf were obtained. Hydrolyzate yields of 13% were obtained with pepsin, 47% with pancreatin and 70% by acid hydrolysis. Those hydrolyzed with pepsin with a hydrolysis time of 2 h and a concentration of 680 µg of peptides/mL presented 90 ± 0.08% of inhibition of mycelial growth. This inhibition is attributed to the probable obtaining of short chain peptides, probably rich in cysteine, to which antifungal properties are attributed. The peptides act by forming pores in the fungal membrane, generating cell lysis. 100% inhibition of spore germination was obtained from 510 µg concentrations of peptides/mL. The MIC was determined in 894.4 µg of peptides/mL. Films containing 680 µg of peptides/mL produced 82 ± 0.08% inhibition in mycelial growth and 91 ± 1.2% inhibition of spore germination. Regarding the physicochemical tests, it was observed that the gel containing peptides was more acidic with a pH value of 3.23. Regarding color, P s/p are brighter compared to P c/p, which are more yellowish and greenish. The P c/p have a greater thickness with 0.0686 mm, with respect to 0.0491 mm of P s/p, likewise a greater solubility of 90.84% compared to 86.63% of the P s / p, this is because the peptides generate a structural modification of the film. The P c/p have a higher humidity of 28.80%, and are also more permeable to water vapor than 1.25 x10⁻¹³ kg/m.s.Pa. (Compared to 1.31x10⁻¹³ kg/m.s.Pa. of P s/p), due to the material with which they are made and the hydrophilic character of amino acids.

The results obtained in the inhibition of *C. gloeosporioides* by means of additional films of peptides obtained by hydrolysis with pepsin from the protein of jackfruit, are promising for applications in the control of this phytopathogen in postharvest.

Key word: Jackfruit leaf, protein, antifungal peptides, coating.

CONTENIDO

	Pág
AGRADECIMIENTO	II
DEDICATORIA	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Generalidades de la jaca.....	4
2.1.1. Descripción botánica.....	4
2.2. Producción de jaca.....	5
Siembra y poda del árbol de jaca.....	5
2.3. Estimación de hoja podada.....	6
2.4. Propiedades de la hoja de jaca.....	6
2.5. Actividad antifúngica de péptidos vegetales.....	7
2.5.1. Defensinas.....	9
2.5.2. Propiedades antifúngicas.....	10
2.6. Mecanismo de acción de péptidos en las esporas.....	11
2.7. Fitopatógenos presentes en frutas u hortalizas.....	12
2.8. Altas presiones hidrostáticas para obtención de proteínas.....	12

2.8.1. Efecto de las APH en las proteínas.....	14
2.9. Hidrólisis para la obtención de péptidos	14
2.9.1. Hidrólisis ácida	14
2.9.2. Hidrólisis enzimática para obtención de péptidos	15
2.9.3. Hidrólisis enzimática con pepsina.	15
2.9.4. Hidrólisis enzimática con pancreatina:	16
2.10. Recubrimiento comestible con pectina.	16
2.11. Método de casting	17
2.12. Análisis termogravimétrico (TGA).....	17
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	19
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Preparación de la muestra.....	23
5.2. Extracción de proteína.....	23
5.2.1. Extracción de proteínas de hoja de jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam) asistida por alta presión hidrostática y punto isoeléctrico.....	23
5.2.2. Cuantificación de proteína por método de Bradford.	24
5.3. Método para la obtención de péptidos.....	25
5.3.1. Hidrólisis ácida (H.A).	25
5.3.2. Hidrólisis enzimática.....	26
5.3.3. Cálculo de rendimiento de hidrolizado.....	27
5.4. Grado de hidrólisis.....	27
5.5. Preparación de inóculo	28

5.6. Pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	28
5.6.1. Prueba de Inhibición de crecimiento micelar	29
5.6.2. Prueba de inhibición de germinación de esporas.....	30
5.6.3. Concentración mínima inhibitoria por calorimetría	31
5.7. Preparación de las películas por método de casting.	32
5.8. Pruebas de inhibición in vitro con biopelículas.	32
5.8.1. Prueba de inhibición de crecimiento micelar con biopelículas.....	32
5.8.2. Prueba de Inhibición de germinación de esporas con biopelículas	32
5.9. Características fisicoquímicas del recubrimiento.....	33
5.9.1. pH.....	33
5.9.2. Color.....	33
5.9.3. Espesor	34
5.9.4. Contenido de humedad	34
5.9.5. Solubilidad.....	35
5.10. Propiedades mecánicas del recubrimiento.¡Error! Marcador no definido.	
5.10.1. Permeabilidad al vapor de agua	35
5.10.2. Análisis termogravimétrico (TGA).....	36
5.11. Análisis estadístico de datos	37
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1. Obtención y cuantificación de proteína.....	39
6.2. Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática.	39
6.2.1. Obtención de péptidos de proteína de hoja de jaca.	39
6.3. Inhibición de crecimiento micelial	42

6.3.1. Evaluación de actividad antifúngica de los péptidos obtenidos por hidrólisis ácida.....	42
6.3.2. Evaluación de actividad antifúngica de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con pancreatina.....	43
6.3.3. Evaluación de actividad antifúngica de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con pepsina.....	44
6.4. Inhibición de germinación de esporas.....	46
6.5. Concentración mínima inhibitoria.....	49
6.6. Formación de película de pectina de bajo metoxilo adicionada con y sin péptidos de hoja de jaca.....	50
6.7. Evaluación de actividad antifúngica del recubrimiento.....	50
6.7.1. Inhibición de crecimiento micelial.....	50
6.7.2. Inhibición de germinación de esporas.....	51
6.8. Características físicas y mecánicas.....	52
6.8.1. pH del recubrimiento en fase líquida.....	52
6.8.2. Color.....	53
6.8.3. Espesor.....	54
6.8.4. Contenido de humedad.....	55
6.8.5. Solubilidad.....	55
6.9. Propiedades mecánicas del recubrimiento.....	56
6.9.1. Permeabilidad al vapor de agua.....	56
6.10. Análisis termogravimétrico (TGA).....	57
CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN.....	62
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam).....	4
Figura 2. Mecanismo catalítico de una proteasa.....	15
Figura 3. Crecimiento micelial del hongo <i>Colletrotrichum gloeosporioides</i> en presencia de los hidrolizados de la enzima pancreatina e hidrolizados de HCl.	44
Figura 4. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de hongo <i>Colletrotrichum gloeosporioides</i> con péptidos obtenidos por HEPe con tiempos de hidrólisis de 4 y 2 h.....	46
Figura 5. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> de papaya mediante aplicación de péptidos de proteína de hoja de jaca obtenidos mediante HEPe por 2 h.....	47
Figura 6. Inhibición de germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> de papaya mediante aplicación de péptidos de proteína de hoja de jaca obtenidos mediante HEPe por 2 h.	48
Figura 7. CMI calculado por cantidad de energía total producido por <i>C. gloeosporioides</i> aislado de papaya, en presencia o no de los péptidos de hoja de jaca.	49
Figura 8. Película de pectina de bajo metoxilo sin (A) y con péptidos de hoja de jaca (B).....	50
Figura 9. Actividad antifúngica de películas sin péptidos (A) y con péptidos (B).	51
Figura 10. Inhibición de germinación de esporas en discos de PDA por aplicación de biopelículas de pectina adicionadas de péptidos (680 µg de péptidos/ml) de hoja de jaca.	52
Figura 11. Permeabilidad al vapor de agua de la película antifúngica, • Película sin péptidos, • Película con péptidos.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. Superficie sembrada de jaca en México en 2018.....	5
Cuadro 3. Clasificación de familias descritas para los AMP de plantas.....	10
Cuadro 4. Péptidos con actividad antifúngica	11
Cuadro 5. Especies fúngicas presentes en frutas y hortalizas.....	12
Cuadro 6. Preparación de dilución de albumina (BSA) standards	24
Cuadro 7. Características físicas de los Hidrolizados de proteína de hoja de jaca por diferentes métodos.....	40
Cuadro 8. Porcentaje de rendimiento de hidrolizados enzimáticos.....	41
Cuadro 9. Porcentaje de rendimiento de hidrolizados ácidos.	41
Cuadro 10. Inhibición de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> mediante péptidos obtenidos por hidrólisis ácida con HCl en concentración de 340 µg de péptido/mL.	43
Cuadro 11. Inhibición de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> mediante péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Pancreatina.	44
Cuadro 12. Inhibición de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> mediante péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Pepsina.	45
Cuadro 13. Valores de color L*, a* y b* en la biopelícula con péptidos (680 µg de péptidos/mL) y sin péptidos.	53
Cuadro 14. Valores medios L*a*b* y diferencial ΔE* promedio entre fruto y la película.	54

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) es un árbol tropical de hoja perenne, que pertenece a la familia de las Moráceas, alcanza una altura de 8-25 m y un diámetro del tallo de 30-80 cm. El árbol puede crecer en suelos salados y arenosos. Las hojas que crecen en la superficie tienden a ser más alargadas y las de los brotes jóvenes más oblongas y más estrechas.

El SIAP en 2017 reporta que en Nayarit hubo una producción de 20,370 frutos de jaca, estas fueron cosechadas en 1383.70 Ha, de los cuales se calcula que hay 520,000 árboles. Los árboles de jaca se podan 2 veces al año con el fin de favorecer la fructificación debido a la entrada de luz y aire al interior de la copa del árbol, lo cual genera alrededor de 10,377.76 ton/año de residuos orgánicos. Las hojas provenientes de la poda, se utiliza aproximadamente un 30% como material de forraje en ganado, el resto de hojas es materia orgánica, y acumulación de residuos sólidos, causantes de contaminación ambiental. Las hojas de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) se han utilizado por sus propiedades curativas, para tratar enfermedades y síntomas como anemia, asma, dermatosis, diarrea, tos y fiebre

Estudios en nuestro grupo de trabajo han reportado en la hoja de jaca, concentraciones de proteínas insolubles que van de un 10 a 12.7%. La hidrólisis de estas proteínas produjeron péptidos con propiedades antimicrobianas frente a bacterias *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella boydii* por lo que es de interés evaluar la actividad antifúngica de estos péptidos frente a fitopatógenos que causan pérdidas de hasta el 20% de frutos perecederos, así como adicionarlos en la formulación de recubrimientos a base de pectinas, para evaluar la inhibición de enfermedades como antracnosis en frutos tropicales causadas por *Colletotrichum gloeosporioides*

proveniente de papaya, mediante pruebas de inhibición de crecimiento micelial y de inhibición de la germinación *in vitro*.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la jaca

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) es un árbol tropical, que pertenece a la familia de las Moraceae (Fig. 1). Es originaria de Ghats occidental de la India. La jaca se siembra principalmente en el sur de Asia, Indonesia, Brasil, Malasia, México (Luna-Esquivel y cols., 2015).



Figura 1. Árbol de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam).

2.1.1. Descripción botánica.

El árbol de la jaca alcanza una altura de 10-15 m y un diámetro del tallo de 30-80 cm, pueden crecer en suelos salados y arenosos, se desarrolla en climas cálidos, obtiene alrededor de 500 frutos/año que miden hasta 90 centímetros +de largo y llegan a pesar de 4.5 a 27.3 kg. Las hojas miden de 2 a 25 cm de largo y 2 a 12 cm de ancho (Crane y cols., 2006)

2.2. Producción de jaca.

Las hectáreas sembradas y su producción, reporta el SIAP del año 2018 se expresa en el (Cuadro 1).

Cuadro 1. Superficie sembrada de jaca en México en 2018.

	Superficie sembrada (Ha)	Producción de hoja (Ton/año)
Nacional	1509.70	11,322.69
Estatal	1383.70	10,377.76
Municipal San Blas (Mayor productor)	650.00	4,468.14

Fuente: (SIAP, 2017)

Nayarit es el principal productor a nivel nacional, a pesar de que el fruto es muy poco conocido.

Siembra y poda del árbol de jaca

Los árboles adultos de jaca son grandes y requieren amplios espacios para permitir las operaciones de fumigación, corte y recolección de frutos, etc. La distancia entre árboles, dentro de cada fila, puede ser de 4-8 m y una separación de 6-8 m entre filas. Las filas deben estar orientadas de norte a sur. Se recomienda la eliminación selectiva de algunas de las ramas que crecen erectas. La eliminación de la rama principal que crece vertical hará el crecimiento en esa dirección más lento y favorecerá el desarrollo de la copa. Las ramas viejas que produjeron frutos deben eliminarse después de la cosecha, debido a que no resisten el peso de los futuros frutos que puedan desarrollarse. La eliminación de las ramas viejas al final del periodo de cosecha incrementará la penetración de la luz en las copas. La altura de los

árboles puede mantenerse a 10 a 20 metros mediante la poda selectiva periódica (Morales, 2017)

Los árboles después de su primer año se cortan las puntas de las ramas, una o dos veces durante la primavera y el verano para que el árbol sea más compacto e inducir una mayor producción de ramas. Los árboles que no son podados usualmente desarrollan un tronco débil. Durante el segundo año, los árboles deben ser podados hasta la primera rama lateral, lo cual hará que el crecimiento vertical sea más lento y aumentará la ramificación de las copas. A medida que los árboles crecen, las ramas vigorosas que se desarrollan hacia arriba deben eliminarse y las copas entresacarse al final del periodo de cosecha (Crane y cols., 2006)

2.3. Estimación de hoja podada

Las hojas de jaca provenientes de la poda, son aprovechadas como material de forraje en ganado (Pina-Dumouliny cols., 2010) pero se utiliza muy pocos volúmenes, el resto de hojas es materia orgánica que genera acumulación de residuos sólidos, causantes de contaminación ambiental (Moreno-Nájera y cols., 2020).

Se estima que en Nayarit cuenta con 518,888 árboles, del cual son podados 2 veces al año, en marzo solo se monda 1/10 parte del árbol y en la temporada Agosto-Septiembre se corta 1/3 parte de follaje total del árbol, del cual se calcula un total de 10,377, 760 kg/año de desecho entre hojas y ramas (SIAP, 2017)

2.4. Propiedades de la hoja de jaca

Las hojas de las plantas son reconocidas como una fuente potencial de proteínas, dependiendo la matriz de extracción. La aplicación alimentaria

depende de su perfil nutricional y su gran disponibilidad en las corrientes de desechos agrícolas. Para la mayoría de los cultivos industrializados, solo se cosechan y procesan partes específicas de las plantas (por ejemplo, raíces, flores y frutos), mientras que las hojas, que representan numerosas toneladas de biomasa por año, solo una parte es utilizado para consumo para ganado y el resto no se utilizan (Moreno-Nájera y cols., 2020).

Se han estudiado varios cultivos para la extracción de proteínas de la hoja, incluida la alfalfa (Lamsal y cols., 2003) espinaca (Korotych y cols., 2019), tabaco (Shi y cols 2019), entre muchos cultivos locales en diferentes países. El contenido de proteínas de las hojas varía entre 10 y 12.5% en base seca, y las variaciones dependen del cultivo, la edad de la planta y las condiciones ambientales y de crecimiento. Además de las proteínas, las hojas contienen abundantes carbohidratos y fibra dietética (Moreno-Nájera y cols., 2020).

2.5. Actividad antifúngica de péptidos vegetales

Los péptidos y proteínas se obtienen de partes que conforman las plantas, como lo son las semillas, raíces, tallos, hojas y flores. Poseen actividad contra fitopatógenos así como patógenos para los seres humanos. Se caracterizan por tener bajo peso molecular con actividad antimicrobiana (Cabello-Ruiz y cols., 2016).

Las propiedades microbicidas de proteínas y péptidos han sido estudiadas por décadas, debido al incremento en la resistencia de los microorganismos a los fármacos disponibles. El tamaño de las secuencias activas puede variar de 2 a 30 aminoácidos, de tal manera que tanto el tamaño como la secuencia en los péptidos, les confiere una cierta funcionalidad, algunos péptidos son conocidos por sus propiedades multifuncionales (Cabello-Ruiz y cols., 2016).

Los péptidos y proteínas expresan su actividad antimicrobiana y antifúngicos ocasionando lisis por unión y ruptura de la membrana de los microorganismos, otros penetran la membrana e interactúan con el interior de la célula y ocasionan la formación de poros produciendo fuga del contenido intracelular y por ende, causando su muerte (Huang y cols., 2000).

Normalmente la mayoría de los péptidos antifúngicos poseen dos características comunes sin importar su tamaño o estructura. Primero, tienen carga positiva debido a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos (en su mayoría lisina y arginina), y segundo, aproximadamente 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (Rivas-Santiago y cols., 2006).

Los péptidos bioactivos obtenidos de las plantas poseen propiedades microbicidas, forman parte de la señalización celular. La acción biológica de péptidos bioactivos inicia con la unión a la membrana diana seguido por permeabilización de la membrana y ruptura (Cabello-Ruiz y cols., 2016).

La resistencia de patógenos a fungicidas es un factor crítico que limita la eficiencia de los programas de manejo integrado del hongo, al incrementar dosis o frecuencias de aspersiones, pone en riesgo a los agricultores por posibles intoxicaciones y al consumidor por ingerir frutas u hortalizas con altas concentraciones de químicos o pesticidas que propician a enfermedades futuras. Ejemplo de ello es la capacidad de *M. fijiensis* para desarrollar resistencia a fungicidas sistémicos de los grupos benzimidazoles, triazoles (Martínez-Bolaños y cols., 2012).

Los péptidos que provienen de plantas son ricos en cisteína, esto genera la formación de numerosos puentes disulfuro (entre dos y seis) les confieren una alta estabilidad química, térmica y contra peptidasas. La mayoría de los AMP de plantas tienen un peso molecular entre 2-10 kDa y se clasifican según la

identidad de su secuencia de aminoácidos y el número y la posición de las cisteínas que forman enlaces desulfuro.(Cardillo y cols., 2018).

Las plantas producen pequeños péptidos ricos en cisteína y compuestos aromáticos como tirosina y triptófano como mecanismo de defensa natural, que puede expresarse constitutivamente o inducirse en respuesta a un ataque de patógeno (Taylor y cols., 2015).

2.5.1. Defensinas

La mayoría de los péptidos de las plantas tienen un peso molecular entre 2 y 10 kDa, son básicos y contienen 4, 6, 8 o 12 cisteínas que forman enlaces disulfuro que confieren estabilidad estructural y termodinámica (Guzmán-Rodríguez y cols., 2015). Blanco-Labra y cols. (2002) especularon que las propiedades antifúngicas de *Mirabilis jalapa* están relacionadas con el tamaño de las moléculas de péptidos. Existen dos hipótesis para explicar el carácter antifúngico de los péptidos, aunque éstas no están comprobadas al 100%.

La hipótesis de la despolarización de la membrana; se basa en que los péptidos exhiben carga eléctrica a pH fisiológico, comportándose como cationes. En este modelo se postula que los péptidos actúan formando poros en la membrana de los hongos. Se propone que una vez que los péptidos cargados positivamente entran, interaccionan con los fosfolípidos (cargados negativamente) de las membranas de los patógenos. De esta forma los péptidos se insertan en la membrana celular del patógeno y forman estructuras parecidas a canales iónicos, que permiten la salida de los iones celulares.

La segunda hipótesis explica que los péptidos actúan permeabilizando la membrana celular de los patógenos. Se cree que esto ocurre cuando los péptidos se unen de manera individual a las cabezas aniónicas de los lípidos de la membrana, produciendo arreglos parecidos a “carpetas” o “manchas” de

péptidos. La neutralización de las cabezas aniónicas lipídicas rompe la integridad de la bicapa en las células del patógeno, ocasionando la formación transitoria de huecos que permiten que iones y macromoléculas salgan de las células del patógeno(Flores y cols., 2005).

Existen doce clasificaciones de AMP de provenientes de plantas y sus distintas aplicaciones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de familias descritas para los AMP de plantas.

Clase	Función
(I) Tioninas	Se sintetizan en hojas, flores y semillas y tienen actividad contra hongos y bacterias.
(II) Denfesinas	Se sintetizan en las semillas durante la germinación y tienen actividad contra hongos y bacterias.
(III) Ciclotidos	Son péptidos macrocíclicos, resistentes a la degradación de la proteasa y tienen actividad contra bacterias, virus e insectos.
(IV-VI) similares a knottin, Ib-AMPs y Heveinlike.	Son efectivos solo contra bacterias y hongos Gram-positivos.
(VII-XI) shepherdins, MBP-1, LTP, Snakins y 2S.	Las albúminas tienen actividad antibacteriana y antifúngica.
(XII) β -barriles	Son solo activos contra hongos.

Fuente: Huerta-cantillo y cols (2016)

2.5.2. Propiedades antifúngicas

Algunos péptidos de origen vegetal utilizados para la inhibición fúngica son enunciados en el (Cuadro 3).

Cuadro 3. Péptidos con actividad antifúngica

Péptido	Especie	Patógeno	Referencia
HA-AP10	Helianthis annus (Semilla)	<i>Fusarium solani</i>	(Regente y cols., 1997)
DmAMP1	Dahlia merckii (Hoja)	<i>Neurospora crassa</i>	(Taylor y cols., 1997)
AjAFP	Medicago sativa (Semilla)	<i>Verticillium dahliae</i>	Ai-Guon y cols., 2000
CsTL1	Castanea sativa (Semilla)	<i>Trichoderma viride</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	(Huerta-cantilly cols., 2016)
MBP-1	Zae mays (Endospermo)	<i>Fusarium graminearum</i>	Duvick y cols., 1992
Snakin 2	Solanum (Tuberculo)	<i>Rhizoctonia solani kühn</i>	(Rodr y cols., 2001)

2.6. Mecanismo de acción de péptidos en las esporas.

De Lucca (1999) mención que los mecanismos de acción de los péptidos de plantas contra las esporas aún no se han elucidado, aunque se ha eliminado la posibilidad de permeabilización a través de interacciones directas proteína-lípidos.

En este sentido, se puede decir que las paredes de esporas, que generalmente están conformadas por una compleja red tridimensional de polisacáridos como α -glucano, manano, quitina, quitosano y glucoproteínas, confieren resistencia mecánica. Los grupos hidroxilos (OH) de los polisacáridos al ser negativos interactúan con los grupos aminos de los péptidos con polaridad positiva, generando la lisis celular de las células. En este sentido, una vez que las esporas realizan el proceso de germinación, el primer paso es generar un poro para que se desarrolle el tubo germinativo, el cual al estar expuesto, los péptidos penetran por el poro, interactúan con el citoplasma, afectando la pared celular y genera la lisis de la célula (Jones y cols., 2002).

2.7. Fitopatógenos presentes en frutas u hortalizas.

Las frutas y hortalizas son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos en pre o poscosecha, así como durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos fitopatógenos, los cuales, de acuerdo con Trigos y cols. (2008) pueden provocar grandes pérdidas en la producción. Según datos de SIAP (2017) se obtuvo una cosecha nacional de 327,678.01 ton, de las cuales se estima que las pérdidas causadas por hongos son del 20%. Este tipo de microorganismos son capaces de producir sustancias, como resultado de su metabolismo secundario, como las micotoxinas Gómez (2007). En el (Cuadro 4) se muestra las principales frutas y hortalizas que se cosechan en México, así como los hongos fitopatógenos que las atacan (Trigos y cols., 2008)

Cuadro 4. Especies fúngicas presentes en frutas y hortalizas.

Especie	Producto	Especie	Producto
<i>Alternaria alternata</i>	Aguacate, coliflor, durazno, manzana, pimiento, plátano	<i>Fusarium</i> sp.	Papaya
<i>A. citri</i>	Naranja, limón	<i>P. italicum</i>	Limón
<i>A. cucumerina</i>	Calabaza, pepino	<i>Curvularia lunata</i>	Plátano, tomate
<i>A. porri</i>	Cebolla	<i>Curvularia</i> sp	Haba
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ,	Mango, papaya	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Cebolla, durazno, ejote, jitomate guayaba.
<i>A. solani</i>	Jitomate, tomate	<i>Penicillium italicum</i>	Cebolla, papa, Limón.

Fuente: Trigos y cols (2008)

2.8. Altas presiones hidrostáticas para obtención de proteínas.

Las altas presiones hidrostáticas están comprendidas entre los 100 y los 1000 MPa. Normalmente el medio que se utiliza para transmitir la presión es el agua, este tratamiento se le conoce como altas presiones hidrostáticas.

Existen dos principios fundamentales en los que se basa la aplicación de las altas presiones.

a) El primero indica que la presión se transmite al material biológico tratado por alta presión de manera uniforme y rápida, tratándose así de un proceso isostático. Esto evita la presencia de zonas sobre tratadas, así como la deformación del producto y hace que éste sea más homogéneo.

b) El segundo principio es el de Le Chatelier que indica que los fenómenos acompañados de una disminución de volumen (reacciones químicas, modificación de las conformaciones moleculares) son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Según este principio, la aplicación de la alta presión desplaza el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupa menos volumen. En principio en una macromolécula proteica, la formación de enlaces de hidrógeno, la ruptura de interacciones hidrófobas y también de pares de iones, son acompañados de una restricción de volumen favorecida por la presión. Sin embargo, otros estudios suponen que los puentes de hidrógeno son prácticamente insensibles a la presión Daoudi (2006).

Los efectos de la disociación iónica son favorecidos en general por el fenómeno de electrostricción. Así, la presión causa la separación de las cargas eléctricas, ya que el agua se organiza de manera más compacta alrededor de las cargas iónicas y de los centros polarizados de las moléculas, lo que causa una reducción del volumen total Cheftel (1991).

Se ha observado que los enlaces covalentes tienen baja compresibilidad y no se ven afectados por presiones inferiores a 1000-2000 MPa, de esta manera la estructura de las biomoléculas de bajo peso molecular (hidratos de carbono, péptidos y lípidos) y la estructura primaria de las moléculas no se ven modificadas Daoudi (2006).

2.8.1. Efecto de las APH en las proteínas.

Las modificaciones de las proteínas se deben a cambios en las interacciones entre grupos funcionales de los aminoácidos. La presión afecta la estructura cuaternaria (a través de las interacciones hidrófobas), y a la estructura terciaria (provocando desdoblamiento irreversible). En general, la aplicación de presiones superiores a 100-200 MPa a temperatura ambiente, provoca la disociación de macroestructuras en subunidades, así como, el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas (Pradas y cols., 2016).

2.9. Hidrólisis para la obtención de péptidos

La esencia de la hidrólisis proteica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos con ácidos o bases o biológicos con enzimas Vioque y cols. (2001).

2.9.1. Hidrólisis ácida

Se basa en la ebullición prolongada de las proteínas con soluciones ácidas fuertes (HCl y H₂SO₄). Este método genera la destrucción total de triptófano y la pérdida severa de cisteína, así como pérdidas menores de serina y treonina y la conversión en sus formas ácidas de la asparagina y glutamina. En consecuencia se obtiene una ruptura parcial de la estructura primaria, es decir la ruptura de la secuencia de una proteína y termina por fragmentar las proteínas en α -aminoácidos. En la hidrólisis parcial se obtienen fragmentos (péptidos), así como aminoácidos aislados. La hidrólisis total de las proteínas da lugar sólo aminoácidos (Coscueta y cols.,2019).

2.9.2. Hidrólisis enzimática para obtención de péptidos

Benítez y cols. (2008) La hidrólisis proteolítica es un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. (Fig. 2) se representa el esquema de la proteólisis.



Figura 2. Mecanismo catalítico de una proteasa.

2.9.3. Hidrólisis enzimática con pepsina.

Heda y cols. (2018) Durante la digestión de las proteínas se hidrolizan los enlaces peptídicos a nivel de los aminoácidos de las moléculas. La pepsina utiliza un par de residuos de aspartato para llevar a cabo la división de las proteínas, cortar los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano en los grupos amino. La enzima es más activa con un pH ácido y se desactiva permanentemente con un pH superior a 7 o al exponerla a temperatura de ebullición.

Aunque producida por las células parietales la pepsina es secretada por las células principales en forma inactiva llamada pepsinógeno, que en contacto

con el ácido clorhídrico, se convierte en la enzima activa pepsina, la cual a su vez estimula la transformación de más pepsinógenos.

2.9.4. Hidrólisis enzimática con pancreatina:

Su y cols. (2012) La pancreatina es una mezcla de enzimas liberadas por el páncreas y se ha caracterizado recientemente para dividir preferentemente la región fosforilada N-terminal, la región hidrófoba C-terminal y la región media de b-caseína, las regiones terminales de α 1-caseína y ambos terminales y la región media de α 2-caseína.

Si la proteína se desnaturaliza irreversiblemente antes de la hidrólisis, el número de enlaces de péptidos disponibles se incrementa notablemente y la degradación de la proteína debería proceder de acuerdo con un tipo de reacción “cremallera”. Para estas proteínas desnaturalizadas otros factores tales como la disminución de la solubilidad media influyen en la velocidad de reacción inicial.

2.10. Recubrimiento comestible con pectina.

El principal objetivo de un recubrimiento comestible (RC) es reducir la exposición al medio ambiente del producto a conservar. Un (RC) es una matriz continua, delgada, que se pliega alrededor del fruto generalmente por la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento (Quintero, y cols., 2010).

Los RC generan una atmósfera modificada que puede influir en el fruto tanto fresco y mínimamente procesados, en aspectos tales como actividad antioxidante, calidad sensorial, color, firmeza, producción de etileno, inhibición del crecimiento microbiano y compuestos volátiles como resultado de anaerobiosis.

La pectina es uno de los componentes principales de la pared celular primaria y media en los tejidos de las plantas, es uno de los carbohidratos complejos que se encuentran en las frutas, y la pectina es un biopolímero no tóxico, biocompatible y biodegradable, por lo que se ha empleado como recubrimiento comestible (Quintero, y cols., 2010).

2.11. Método de casting

Es el proceso mediante el cual un líquido es vertido en una caja teflonada y mediante el secado se genera el endurecimiento y forma un objeto rígido dependiendo los compuestos que lo conforman.

2.12. Análisis termogravimétrico (TGA)

Sánchez-Aldana y cols. (2015). El análisis termogravimétrico (TGA) permite conocer la resistencia del material de empaque con la determinación de la variación de peso del material (pérdida o ganancia) con el incremento de la temperatura. En función de la temperatura y el tiempo, mientras la muestra es sometida a un incremento controlado de la temperatura. Esta determinación en las películas define las condiciones de temperatura a la cual el material comienza a descomponerse.

CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 5. JUSTIFICACIÓN

Nayarit es uno de los principales productores de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) a nivel nacional, se estima que hay alrededor de 518,888 árboles que son podados 2 veces al año, lo que contribuye a la generación de residuos sólidos orgánicos en 10,377,760 kg/año, entre hojas y ramas. En estudios anteriores se reporta alto contenido de proteínas solubles en la hoja de jaca, que van de un 10 a 12.7%, de las cuales por hidrólisis ácida, se pueden obtener péptidos con potencial acción fungicida.

Las frutas y hortalizas son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos en cosecha y durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos fitopatógenos, que pueden provocar pérdidas en la producción de hasta un 20%. La resistencia de patógenos a fungicidas es un factor crítico que limita la eficiencia de los programas de manejo integral, incrementando la dosis y/o frecuencias de su aplicación, esto pone en riesgo a los agricultores por posibles intoxicaciones y al consumidor por ingerir frutas u hortalizas con altas concentraciones de éstos.

Un recubrimiento a base de pectinas adicionado con péptidos antifúngicos obtenidos de hojas de jaca, podría utilizarse como una barrera al ataque de patógenos, disminuyendo así el uso de químicos para la conservación de los mismos, así como el impacto ambiental causado por los desechos orgánicos de la poda de los árboles de jaca.

CAPÍTULO 6. OBJETIVOS

CAPÍTULO 7. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Formular un recubrimiento antifúngico, adicionado con péptidos de hoja de jaca, para el control de hongos fitopatógenos.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener péptidos antifúngicos por hidrólisis de las proteínas de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam).
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los péptidos obtenidos contra *C. gloeosporioides*.
- Caracterizar una película a base de pectinas de bajo metoxilo, adicionada con péptidos antifungicos de jaca.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de la película a base de pectinas de bajo metoxilo, adicionada con péptidos antifungicos de jaca contra *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO 8. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 9. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Preparación de la muestra

La hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) se obtuvo de comunidad de Las Varas municipio de Compostela en el estado de Nayarit (latitud 21.178 y longitud -105.136) a 20 msnm. Fue lavada con hipoclorito de sodio al 2%.

5.2. Extracción de proteína

5.2.1. Extracción de proteínas de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) asistida por alta presión hidrostática y punto isoeléctrico.

La extracción de proteína se realizó empleando el método propuesto por Moreno-Nájera y cols. (2020). A 100 g de hoja fresca de jaca, se suspendió en 720 mL de agua, ajustando el pH a 9.0 con hidróxido de sodio 0.2 M. La suspensión se mantuvo en agitación durante 20 min a temperatura ambiente. La solución se colocó en bolsas de vacío de polipropileno (FoodSaver KITFSV2240) y ésta se sometió al equipo de altas presiones hidrostáticas Avure autovlave systems (L400-2-VES, Alemania) a 300 MPa por 20 min. Para eliminar el residuo de la hoja molida, se centrifugó (Z326 K, HERMLE, Alemania) por 10 min a 6,000 rpm. La proteína soluble de hoja de jaca (PHJ) se fraccionó con membrana ultracel de celulosa regenerada de 30 kDa y se ajustó a pH 2.0 con HCl 1M (20 mL), la suspensión se mantuvo en reposo durante 20 min para que precipite la proteína insoluble, se centrifugó

nuevamente a 11,000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante, el precipitado obtenido se lavó sucesivamente con acetona, etanol, éter dietílico y agua (Yang y cols., 2004) en un embudo buchner hasta que el solvente filtrado fue incoloro, posteriormente fue congelada a -80 °C (Freezer, Nor-Lake Scientific, USA) y finalmente liofilizada a -50 °C y 0.12 mbar usando un liofilizador (Labconco, FreeZone 4.5, USA), los polvos de PHJ fueron almacenados en un desecador.

5.2.2. Cuantificación de proteína por método de Bradford.

La cuantificación de proteína se realizó por el método Bradford (Bradford, 1976) de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Cuadro 5).

Cuadro 5. Preparación de dilución de albumina (BSA) standards

VIAL	Volumen del diluyente	BSA	Final de la concentración de BSA
A	0	300 µL stock	2000 µg/mL
B	125 µL	375 µL stock	1500 µg/mL
C	325 µL	325 µL stock	1000 µg/mL
D	175 µL	175 µL del vial B diluido	750 µg/mL
E	325 µL	375 µL del vial C diluido	500 µg/mL
F	325 µL	375 µL del vial E diluido	250 µg/mL
G	325 µL	375 µL del vial F diluido	125 µg/mL
H	400 µL	100 µL del vial G diluido	25 µg/mL
I	400 µL	0	0 µg/mL= blanco

Fuente: thermo scientific

El rango de trabajo lineal con BSA = 125–1500 µg/mL.

Se tomaron 0.05 mL de cada muestra estándar o desconocida en tubos de ensayo debidamente etiquetados. Agregando 1.5 mL de reactivo Coomassie Plus a cada tubo y se homogenizó. Se incubó la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se realizó la lectura de todas las muestras a 595 nm, primeramente calibrando con una muestra de agua, posteriormente se mide la absorbancia de todas las muestras. Se determinó la curva estándar, trazando la medición del blanco para cada estándar BSA versus su concentración en µg/mL, con respecto al resultado, se determinó la concentración de proteína de cada muestra desconocida.

5.3. Método para la obtención de péptidos.

5.3.1. Hidrólisis ácida (H.A).

Se empleó la metodología de Dai y cols. (2019) con algunas modificaciones. La proteína de hoja de jaca insoluble se dispersó en ácido clorhídrico (HCl) 2, 4 y 6 M. La hidrólisis se realizó a 25 °C por 2, 4 y 6 h, una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción mediante la neutralización de la dispersión con NaOH 2 M a pH 7.0. Los hidrolizados se centrifugaron (Z326 K, HERMLE, Alemania) a 5,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se congeló a -80°C y liofilizó a -50 °C y 0.12 mbar usando un liofilizador (Labconco, FreeZone 4.5, USA). Los hidrolizados una vez liofilizados, se hidrataron nuevamente con H₂O. Para obtener fracciones menores a <10 kDa, se utilizó una

membrana ultracel de celulosa regenerada. Los péptidos fraccionados fueron almacenados a 4 °C en refrigeración hasta su previo uso.

5.3.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó con pepsina empleando la metodología de Yang y cols. (2004) con algunas modificaciones. Se preparó una solución con proteína de hoja de jaca y buffer pH 2.0 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 21.014 g/l+ 200 mL NaOH + HCl 0.1 mol/l a concentración de proteína fue de (0.01 g/mL), esta se sometió a temperatura (90 ± 5 °C) en baño de calentamiento durante 5 min. La relación de enzima/sustrato fue de (2/100), ésta se sometió a diferentes tiempos de hidrólisis 2, 4 y 6 h a 37 °C en incubadora, con el fin de evaluar la actividad antifúngica de los hidrolizados obtenidos. La reacción se detuvo colocando las muestras en baño de calentamiento a temperatura de (90 ± 5 °C) durante 10 min, posteriormente se centrifugó (Refrigerated centrifuge Hermle Z 326 K, Germany) a 5000 rpm durante 10 min para eliminar la proteína no hidrolizada. El sobrenadante se congeló a -80°C y se liofilizó -50 °C y 0.12 mbar utilizando un liofilizador (Labconco, FreeZone 4.5, USA) para conservar los hidrolizados. Se aplicó la misma metodología pero empleando la enzima de pancreatina y utilizando el buffer pH 7.0 con (KH_2PO_4 (1/15 mol/l)+ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (1/15 mol/l)). Los hidrolizados una vez liofilizados, se hidrataron nuevamente con el buffer pH 2.0 y pH 7.0. Para obtener fracciones menores a <10 kDa, se utilizó una membrana ultracel de celulosa regenerada. Los péptidos fraccionados fueron almacenados a 4 °C en refrigeración hasta su previo uso.

5.3.3. Cálculo de rendimiento de hidrolizado

El rendimiento del hidrolizado de proteínas se calculó utilizando la metodología de Noman y cols. (2018), aplicando la (ecuación 5.1).

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Peso de PeHJ}}{\text{PHJ}} * 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

Donde:

PeHJ: Péptido de hoja de jaca (g)

PHJ: Proteína de hoja de jaca (g)

5.4. Grado de hidrólisis

Se tomaron alícuotas (1 mL) de los hidrolizados después de 120, 240 y 360 min de digestión in vitro con las enzimas. El contenido de -NH₂ residual se determinó mediante un método modificado de o-ftaldialdehído (OPA). El reactivo OPA y el estándar de serina se preparó de acuerdo a Nielsen y cols. (2001). Se mezcló 1.5 mL de reactivo OPA con 50 µL de serina, muestra o agua (como blanco). Después de 2 minutos, la absorbancia de la mezcla se midió espectrofotométricamente a 340 nm. La concentración de grupos amino libres en el hidrolizado se calculó como restos -NH₂ de serina empleando un estándar de L-serina como referencia. El número total de grupos amino primarios en la PHJ se determinó por hidrólisis ácida (HCl 6 N a 110 °C durante 24 h) asumiendo que se logró una hidrólisis completa de todos los enlaces peptídicos de la proteína durante la digestión ácida Marambe y cols. (2008). El % DH se calculó de acuerdo con la (ecuación 5.2).

$$\%DH = \frac{[NH_2]_{Tx} - [NH_2]_{T0}}{[NH_2]_{Total} - [NH_2]_{T0}} \times 100 \quad \text{Ec. 5.2}$$

Donde:

$[NH_2]_{T0}$ = número de grupos $-NH_2$ libres a los 0 min de la hidrólisis (control).

$[NH_2]_{Tx}$ = número de grupos $-NH_2$ libres después de cada tiempo de hidrólisis con la enzima.

$[NH_2]_{Total}$ = número de grupos $-NH_2$ libres debido a la hidrólisis acida (asumiendo la hidrólisis completa de la PHJ).

5.5. Preparación de inóculo

Se utilizó el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya. Fue cultivado en agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días a 28°C. Se preparó la solución salina utilizando (NaCl 0.85%) con Tween 80 (0.05%) previamente estériles. Añadiendo 10 mL en las cajas con crecimiento del hongo, posteriormente se raspó el cultivo utilizando un asa bacteriológica, continuando con el proceso de filtración con una gasa estéril y se recuperó el filtrado en un matraz de dilución. La concentración de esporas se ajustó a 1×10^6 esporas mL^{-1} mediante conteo microscópico en un hemocitómetro.

5.6. Pruebas de inhibición *in vitro*.

5.6.1. Prueba de Inhibición de crecimiento miceliar

Se aplicó la metodología de Gonzalez-Estrada y cols. (2017) con algunas modificaciones. Se partió de la preparación de 20 mL de agar PDA estéril en un tubo falcón, una vez que descendió la temperatura a 40°C, se agregaron los péptidos, esta prueba se realizó agregando 2 concentraciones diferentes 340 µg/mL y 680 µg/mL de péptidos, con el fin de evaluar cuál de las concentraciones tiene mayor actividad antifúngica. Para ello se partió de una solución madre con 1 g de péptido se suspendió en 58 mL de buffer pH 2.0 o pH 7.0 dependiendo el tipo de enzima con el que se trabajó, en el caso de los péptidos provenientes de H.A. se suspendieron en agua destilada. Se tomaron alícuotas de (2, 4 mL) de la solución madre y se agrega en agar PDA, la solución se homogenizará en vortex y vaciada en cajas de Petri por triplicado. A partir de cajas con el hongo patógeno con crecimiento de 7 días, se tomaron con el sacabocado en la periferia de la colonia de *C. gloeosporioides* y fue sembrada en el centro de la caja, se incubaron a 27°C y se midió el diámetro miceliar diariamente durante 7 días. La prueba testigo se realizará de la misma manera pero sin la adición de péptidos. Los cálculos de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial se realizaron con la (ecuación 5.3).

$$\% \text{ Inhibicion crecimiento} = \frac{DC - DT}{DT} * 100 \quad \text{Ec. 5.3}$$

Donde:

DC: Diámetro de control

DT: Diámetro de tratamiento

5.6.2. Prueba de inhibición de germinación de esporas.

La inhibición de germinación de esporas se realizó empleando el método propuesto por Gonzalez-Estrada y cols. (2017) con algunas modificaciones, previo al experimento *Colletotrichum gloeosporioides* fue cultivado durante 7 días en PDA a 28 °C. Se realizó una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^6 esporas/mL por recuento microscópico en cámara Neubauer. En caldo papa dextrosa (PDB por sus siglas in inglés) se agregaron 810 μ L de suspensión de esporas del hongo y diferentes concentraciones de péptidos (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mL). Los tubos se incubaron en un baño maría con agitación rotatoria de 110 rpm a 25 °C; la tasa de germinación de las esporas se determinó microscópicamente en un periodo de 8 h y 30 min, midiendo el porcentaje de esporas germinadas en muestras de aproximadamente 200 esporas. Se consideraron las esporas germinadas cuando la longitud del tubo germinal fue igual o mayor al diámetro de la espora inicial se usó como control tubos con PDB sin péptidos. Para determinar el porcentaje de inhibición de germinación de esporas se aplicó la (ecuación 5.4).

$$\% \text{ Inhibición de la germinación} = \frac{EGC - EGT}{EGT} * 100 \quad \text{Ec. 5.4}$$

Donde:

EGC= Esporas germinadas en control

EGT= Esporas germinadas en tratamiento

5.6.3. Concentración mínima inhibitoria por calorimetría

Para la determinación de CMI, se realizó una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^6 esporas/mL. Se prepararon ámpulas con 10 mL de PDA a diversas concentraciones (85, 170, 340, 510, 680, y 850 μg de péptidos/mL). Se agregaron 810 μL de suspensión de esporas del hongo *C. gloeosporioides* (1×10^6 esporas/mL), se sellaron herméticamente y luego se colocaron en los canales del microcalorímetro de 8 canales (TAM Air, DE 19720, New Castle, EE. UU) a 28 °C. Se obtuvieron curvas de flujo de calor. El calor acumulado a lo largo del tiempo se obtuvo integrando la curva de flujo de calor. La curva de calor en función del tiempo se ajustó utilizando el modelo modificado de Gompertz (ecuación 5.5) (Zwietering y cols., 1990) para determinar la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), el tiempo de fase de retardo (λ) y el calor total (Q). El mejor ajuste lineal se obtuvo relacionando $\log Q$ VS concentración de péptidos, obteniéndose la (ecuación 5.6), mediante la cual se calculó CMI. Para calcular CMI se utilizó un valor cercano a 0 ($Q=0.01$).

$$y = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{\text{max}} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Ec. 5.5}$$

Donde A es el calor total producido por los microorganismos, μ_{max} corresponde al crecimiento máximo, λ pertenece a fase lag y t es el tiempo.

$$\text{Log}(Q) = -0.001 * \text{péptidos} - 1.1056 \quad \text{Ec. 5.6}$$

$$\text{Péptidos} = \frac{\text{Log}(0.01) + 1.1056}{-0.001}$$

Donde Q (Joules) es el calor total producido por *C. gloeosporioides* y péptidos es la concentración en péptidos en mg/mL.

5.7. Preparación de las películas por método de casting.

Para la preparación de las películas se siguió la metodología de García-Muro (2016) hidrató la pectina de bajo metoxilo (29-33%) al 1% (p/v), glicerol como plastificante al 50% p/p en base seca de la pectina y 20 mg de CaCl₂ por cada gramo de pectina como agente entrecruzante, y agrego 680 µg de péptidos/mL, una vez realizada la mezcla, se homogenizo por 12 h a 35°C, una vez transcurrido el tiempo se vaciaron en placas de teflón, dejándolo secar en flujo laminar por 12 h.

5.8. Pruebas de inhibición in vitro con biopelículas.

5.8.1. Prueba de inhibición de crecimiento micelar con biopelículas.

Se aplicó la metodología de inhibición del apartado 4.6.1, con la variante que en esta prueba, los péptidos se adicionaron en la biopelícula, misma que se colocará sobre la caja de agar. Se preparó un control en el que se colocará una biopelícula sin péptidos en la caja y otro control con el patógeno sin la película.

5.8.2. Prueba de Inhibición de germinación de esporas con biopelículas

Se aplicó la metodología de González-Estrada y cols. (2018). Se realizaron discos de PDA de 2 cm de diámetro, se adicionaron 0.810 mL de suspensión de esporas del hongo (1×10^6 esporas / mL), se dejaron secar, a continuación se

adicionaron los recubrimientos con y sin tratamiento a los discos, así mismo se prepararon discos sin recubrimiento pero con esporas, para evaluar si el tratamiento es fungistático o fungicida. Se incubaron a 27°C, realizando lecturas de los discos sin recubrimiento cada 2 h por 8 h 30 min hasta contar 200 esporas germinadas, realizando los cálculos con la (ecuación 5.7).

$$\% \text{ Inhibición de la germinación} = \frac{EGC - EGT}{EGT} * 100 \quad \text{Ec.5.7}$$

Donde:

EGC= Esporas germinadas en control

EGT= Esporas germinadas en tratamiento

5.9. Características fisicoquímicas del recubrimiento.

5.9.1. pH

Se determinó por el método 981.12 de la AOAC (2000), de forma directa sumergiendo el electrodo del potenciómetro ORION, modelo 420A (EE.UU) en el recubrimiento comestible cuando está en fase líquida.

5.9.2. Color

El color de las películas se evaluó utilizando la metodología de Konica Minolta (2006) con un colorímetro Konica-Minolta modelo CR-400 y escala CIELAB L* a* b* Calibrando con una placa blanca, las muestras se leen de 3 a 5 puntos aleatoriamente. Para determinar la diferencia de color (ΔE^*) se utilizó la (ecuación 5.8).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad Ec.5.8$$

Para determinar la diferencia de color se compararon las lecturas de la superficie de la papaya por triplicado y obteniendo un promedio, en las tonalidades de verde ($L^*= 49.60$, $a= -4.48$, $b^*=32.55$), amarillo ($L^*= 62.97$, $a= 8.53$, $b^*= 50.93$) y naranja ($L^*= 53.63$, $a= 22.47$, $b^*= 44.40$), sobreponiendo los recubrimientos con y sin péptidos, evaluando el efecto que tendría durante el proceso de maduración.

5.9.3. Espesor

Empleando la metodología de González-Estrada y cols. (2018) el espesor de las películas fue medido con un micrómetro de mano (Mitutoyo No. 2412F) con una resolución de 0.001 pulgadas (in).

5.9.4. Contenido de humedad

El contenido de humedad en las películas fue determinado acorde al método 925.10 de la AOAC (2000), las muestras se secaron a 70 ± 1 °C por 6 h, el contenido de humedad se calculó mediante la (ecuación 5.9).

$$Humedad (\%) = \frac{(P1-P2)}{P1} \times 100 \quad Ec. 5.9$$

Donde:

P1= peso del objeto más muestra humedad

P2= peso del objeto más muestra seca

5.9.5. Solubilidad

Para medir el porcentaje de solubilidad, se realizaron capsulas con filtros Whatman no.1, registrando su peso, posteriormente se pusieron en peso constante durante 24 h a 105°C, por otra parte en un frasco de dilución se agregaron 50 mL de agua destilada, adicionando fragmentos del recubrimiento 5 cm de diámetro registrando su peso, estos se agitaron durante 2 h a 25°C en baño maría a 100 RPM, a continuación fueron filtrados con las capsulas y estos fueron secados a 105 °C por 24 h a peso constante, registrando el peso final. (Vázquez y Guerrero, 2017)

La solubilidad se calculará usando la (ecuación 5.10).

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{Ec. 5.10}$$

Donde:

M_i = masa inicial de la muestra en g

M_f = masa final de la muestra en g

5.9.6. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad se determinó mediante el método de González-Estrada y cols. (2018) Las películas se cortaron en discos de 4 cm de diámetro. Los discos se colocaron entre las ámpulas de cristal las cuales contenían 5 mL agua destilada para proveer una humedad relativa del 100% y un tapón azul sin cubierta. Las celdas de permeabilidad se mantuvieron en un desecador a

25 °C con sílica gel para asegurar un 0% de humedad relativa. Las mediciones se realizaron para un gradiente de 100% de humedad relativa, las celdas se pesaron periódicamente durante 7 días; por triplicado. Cuando la relación de pérdida de peso y el tiempo es lineal se utilizó la pendiente de la gráfica para calcular la velocidad de transferencia de vapor de agua a través de la película. Se calculó la PVA con la (ecuación 5.11).

$$PVA = \frac{\Delta W \times E}{A \times \Delta P} \quad \text{Ec. 5.11}$$

Donde:

ΔW = es la pendiente de la recta de cambios de peso de la pesa sustancias (g/h)

E= espesor de la película (m)

A= el área expuesta de la película (m²)

ΔP = diferencia de presión de vapor de agua a través de la película (Pa).

5.10.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se realizó en un equipo TGA 550 (TA Instruments, U.S.A.) para obtener el termograma característico de la variación de masa de cada uno de los componentes que conforman la película, así mismo la película con y sin péptidos para determinar las temperaturas de descomposición y su comportamiento térmico. Se analizaron muestras de 5 a 10 mg, la cual se colocó en la charola de platino del equipo previamente limpia y tarada, se realizó el análisis mediante una rampa de calentamiento desde la temperatura ambiente hasta 500 °C a velocidad de 10 °C/min, bajo una atmosfera controlada de N₂ de ultra alta pureza. La temperatura del equipo se verificó con níquel. Las mediciones se realizaron por triplicado y los

resultados fueron analizados con el software TRIOS Versión 5.0 (TA Instruments-Waters LLC).

5.11. Análisis estadístico de datos

Las mediciones obtenidas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias de medias, se utilizó la prueba de LSD para comparación de medias con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, se utilizará el software STATISTICA versión 12.

CAPÍTULO 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención y cuantificación de proteína

Se obtuvo un polvo fino, color café, insoluble en agua, con una cantidad cuantificada por el método de Bradford (1976) de 76.4 mg de proteína /g de hoja en base seca. Este contenido es similar al reportados por Moreno-Nájera y cols. (2020) quien obtuvo 84.1 mg de proteína /g de hoja.

Safi y cols. (2014) Menciona que la rigidez de las paredes celulares es un factor crítico que limita la extracción de proteínas y pigmentos, cuando las hojas de las plantas se someten a altas presiones hidrostáticas genera la disrupción de la pared celular y los agregados de proteínas, propicia alteraciones en su estructura debido al rompimiento de enlaces iónicos, di-sulfuro, se favorece la disociación de las proteínas oligoméricas, lo que provoca el desdoblamiento de sus cadenas

Se cree que el pH alcalino propiciado por la adición del hidróxido de sodio, ayuda a romper los enlaces de hidrógeno y disociar el hidrógeno del carboxilo y grupos sulfato. El aumento de la carga de la superficie de las moléculas de proteínas provoca un aumento de solubilidad en agua, esto ha sido demostrado por Zhan y cols. (2015), quien utiliza una solución de NaOH 0.1 M y consigue el 80 % de extracción de proteínas de hojas de té.

6.2. Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática.

6.2.1. Obtención de péptidos de proteína de hoja de jaca.

Los hidrolizados en polvo presentaron tonalidades que van desde color beige hasta café, con una buena capacidad de disolverse y contenidos de humedad de del 7 a 8% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características físicas de los Hidrolizados de proteína de hoja de jaca por diferentes métodos.

Hidrólisis	Características de la fracción	
Enzimática (Pepsina)	Físicamente: polvo café, soluble en agua, con 7% humedad	
Enzimática (Pancreatina)	Físicamente: polvo beige, solubles en agua, con 8% de humedad	
Ácida con HCl	Físicamente: polvo café rojizo, soluble en agua, con 7% de humedad	

El porcentaje de rendimiento de los hidrolizados, se determinó mediante la fórmula propuesta por Noman y cols. (2018). En las HEPa en tiempo de 2, 4 y 6 h se obtuvieron rendimientos mayores a 45%, en contraparte, en los HEPe se obtienen rendimientos menores al 14% en los mismos tiempos (Cuadro 7 y 8). Este comportamiento se puede deber a que las enzimas, como pepsina, son específica en los sitios catalíticos y el tiempo de incubación, utiliza un par de residuos de aspartato para llevar a cabo la división de las proteínas, hidroliza los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano en los grupos amino, es por ello que su rendimiento se ve mayormente reducido. Por otra parte la pancreatina es una mezcla de enzimas (lipasa, proteasa y amilasas) capaces de dividir preferentemente la región fosforilada N-terminal, la región hidrófoba C-terminal y la región media de b-caseína; las regiones terminales de α 1-caseína y ambos terminales y la región media de α 2-caseína. Al ser un

conjunto de enzimas pueden generar una hidrólisis total, por lo que sus rendimientos son mayores (Su y cols., 2012).

Cabe mencionar que los rendimientos son mayores para HA con HCl cuando se aplica el tratamiento con HCl 6M durante 6h. Esto se puede relacionar con el tiempo de incubación y la concentración de HCl. En consecuencia se obtiene una ruptura parcial de la estructura primaria de la proteína, es decir la ruptura de la secuencia de una proteína y termina por fragmentar las proteínas en α -aminoácido. Debido a que la hidrólisis no es específica con respecto a la hidrólisis de los enlaces peptídicos, lo que puede generar cadenas de diferentes tamaño, así como residuos aminoacídicos (hidrólisis total), hidrolizando la proteína por completo o casi por completo (Dai y cols., 2019).

Cuadro 7. Porcentaje de rendimiento de hidrolizados enzimáticos.

Hidrólisis	Tiempo de Hidrólisis (h)	Rendimiento (%)
Pepsina	2	12.50
	4	13.00
	6	13.50
Pancreatina	2	46.00
	4	47.00
	6	47.50

Cuadro 8. Porcentaje de rendimiento de hidrolizados ácidos.

Hidrólisis	Tiempo de hidrólisis (h)	Rendimiento con 2M (%)	Rendimiento con 4M (%)	Rendimiento con 6M (%)
HCL	2	29.50	37.00	40.00
	4	55.00	53.00	81.50
	6	90.00	95.00	98.00

6.3. Inhibición de crecimiento micelial

Una vez fraccionadas las muestras de los diferentes hidrolizados con tamaño <10kDa, se realizó la prueba *in vitro* de inhibición de crecimiento micelial con *C. gloeosporioides*, fitopatógenos de papaya.

6.3.1. Evaluación de actividad antifúngica de los péptidos obtenidos por hidrólisis ácida

Para los hidrolizados de la proteína de hoja de jaca obtenidos por el método de HA con HCl, con diferentes concentraciones de molaridad y tiempos, se observa que el crecimiento micelial se potencia (Cuadro 9). Este comportamiento se puede deber a que el fitopatógeno utiliza péptidos como fuente de Nitrógeno, ya que en este método de hidrólisis se rompen los enlaces que unen la estructura primaria de la proteína. En este sentido, Guadix (2000) ha reportado que mediante hidrólisis ácida es posible la total destrucción de triptófano y la pérdida severa de cisteína, así como pérdidas menores de serina y treonina, además, se provoca la conversión en sus formas ácidas de la asparagina y glutamina. La hidrólisis ácida genera cadenas cortas de péptidos probablemente pobres en cisteína. Dado que se atribuye la actividad antifúngica a la presencia de cisteína en péptidos vegetales, los obtenidos por hidrólisis ácida, no presentan esta actividad. Esto se evidencia dado que en ninguno de los tratamientos, en comparación con el testigo se observó inhibición. La concentración de 340 µg de péptido/mL, aumentó el diámetro de crecimiento micelial en 20% con respecto al testigo ($p < 0.05$) (Fig. 3A).

Cuadro 9. Inhibición de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* mediante péptidos obtenidos por hidrólisis ácida con HCl en concentración de 340 µg de péptido/mL.

Concentración de HCl (M)	Tiempo de hidrólisis (h)	Diámetro	% de inhibición
2	2	7.50±0.10a	-
2	4	7.30±0.08b	-
2	6	7.30± 0.09bc	-
4	2	7.20±0.08cd	-
4	4	7.20±0.10fg	-
4	6	7.13±0.09df	-
6	2	7.13±0.15fh	-
6	4	6.93±0.10i	-
6	6	6.84±0.12jk	-
Testigo	-	6.83±0.12ij	-

Los diámetros de crecimiento representan la media de tres tratamientos. Tratamientos con la misma letra no muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

6.3.2. Evaluación de actividad antifúngica de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con pancreatina

Los tratamientos con péptidos de la proteína de hoja de jaca, obtenidos por hidrólisis enzimática con pancreatina, presentan crecimiento micelial (superior 25%) con respecto al testigo (Fig. 3B, Cuadro 10), esto se puede deber a que el hongo *C. gloeosporioides* toma posiblemente a los péptidos como fuente de Nitrógeno y potencializa su desarrollo. Morais y cols. (2013) realizan una comparación entre diferentes tiempos de hidrolizado (1 a 5 h), obteniendo péptidos de diferentes tamaños, con lo que evidenciaron que la pancreatina genera mayor cantidad de cadenas cortas, inclusive hasta residuos de aminoácidos, a mayores tiempos de hidrólisis. Esto indica que, probablemente los péptidos obtenidos por hidrólisis con pancreatina estén constituido por cadenas muy cortas, menores a 7 aminoácidos, con secuencias pobres en cisteína. Cabello-Ruiz y cols. (2016) menciona que los péptidos con actividad antifúngica están conformados por 30 aminoácidos.

Cuadro 10. Inhibición de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* mediante péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Pancreatina.

Tiempo de hidrólisis (h) Pancreatina	Concentración μg de péptidos /mL	Diámetro de crecimiento (cm)	% de inhibición
2	340	6.30 \pm 0.15 d	-
2	680	6.80 \pm 0.18 a	-
4	340	6.40 \pm 0.10 e	-
4	680	6.90 \pm 0.09 b	-
6	340	6.80 \pm 0.10 f	-
6	680	7.10 \pm 0.15 c	-
Testigo	-	5.00 \pm 0.15 g	-

Los diámetros de crecimiento representan la media de tres tratamientos. Tratamientos con la misma letra no muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

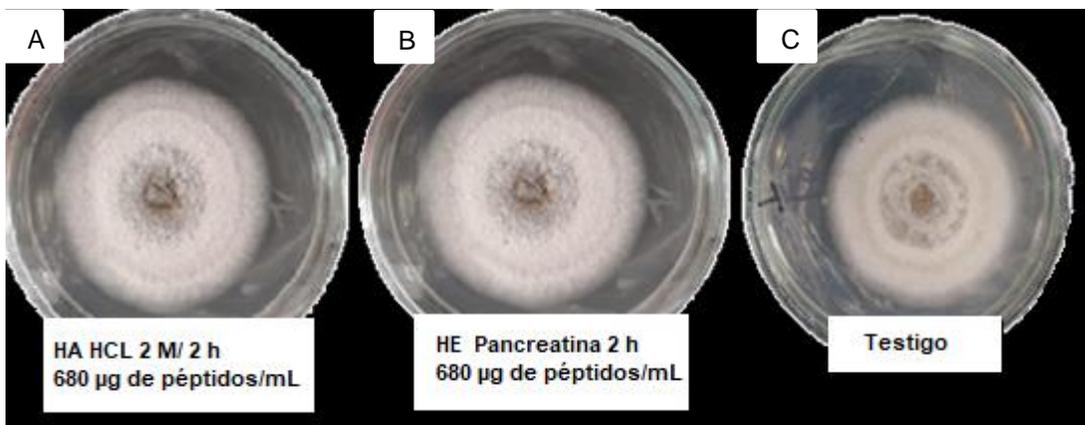


Figura 3. Crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de los hidrolizados de la enzima pancreatina e hidrolizados de HCl.

6.3.3. Evaluación de actividad antifúngica de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con pepsina

Con respecto a los péptidos de proteína de hoja de jaca obtenidos con la enzima pepsina, la concentración que presentó mayor porcentaje de inhibición fue la de 680 µg de péptidos /mL con un tiempo de hidrolizado de 2 h. Este tratamiento logró 90±0.08% de inhibición. Los ensayos realizados, a la misma concentración, pero con 4 h de hidrólisis, inhibieron sólo 76±0.08%. En cambio, con una concentración menor de 340 µg de péptidos/mL con tiempo de hidrólisis de 6 h se obtuvo un 48±0.09% de inhibición, prosiguiendo un 69±0.09% proveniente de la misma concentración pero durante 4 h. Esto refleja un efecto de tiempo de hidrolizado, debido a que a mayor tiempo de exposición enzima/sustrato las cadenas de péptidos probablemente serán más cortas, así mismo se requiere una mayor concentración de péptidos aplicados en el medio de cultivo para generar mayor actividad antifúngica, esto se puede observar en el (Cuadro 11).

Cuadro 11. Inhibición de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* mediante péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Pepsina.

Tiempo de hidrolizado (h)	Concentración µg de péptidos /mL	Diámetro de crecimiento (cm)	Porcentaje de inhibición
2 h	340	1.60	77±0.08 b
2 h	680	0.70	90±0.08 a
4 h	340	2.20	69±0.09 d
4 h	680	1.70	76±0.08 c
6 h	340	3.70	48±0.09 f
6 h	680	3.10	56±0.08 d
Testigo	-	7.00	-

Los diámetros de crecimiento representan la media de tres tratamientos. Tratamientos con la misma letra no muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Los tratamientos de 2 h y 4 h de hidrolizado con pepsina, a concentración de 680 µg de péptidos /mL, presentan mayor inhibición del patógeno de *C. gloeosporioides*, destacando el de 2 h (Fig. 4C). Este comportamiento se puede deber a que en tiempos más cortos, se pueden generar péptidos de

diversos tamaño con secuencia aminoacídica ricos en cisteína mismos que son asociados con la actividad antifúngica (Guzmán-Rodríguez y cols., 2015). Probablemente a mayor tiempo de exposición enzima/sustrato, se generan cadenas más cortas debido a que las enzimas primero hidrolizan cadenas polipeptídicas que se encuentran libremente unidas en la superficie, posteriormente las cadenas compactadas que se encuentran en el interior de la proteína (Benítez y cols.,2008).

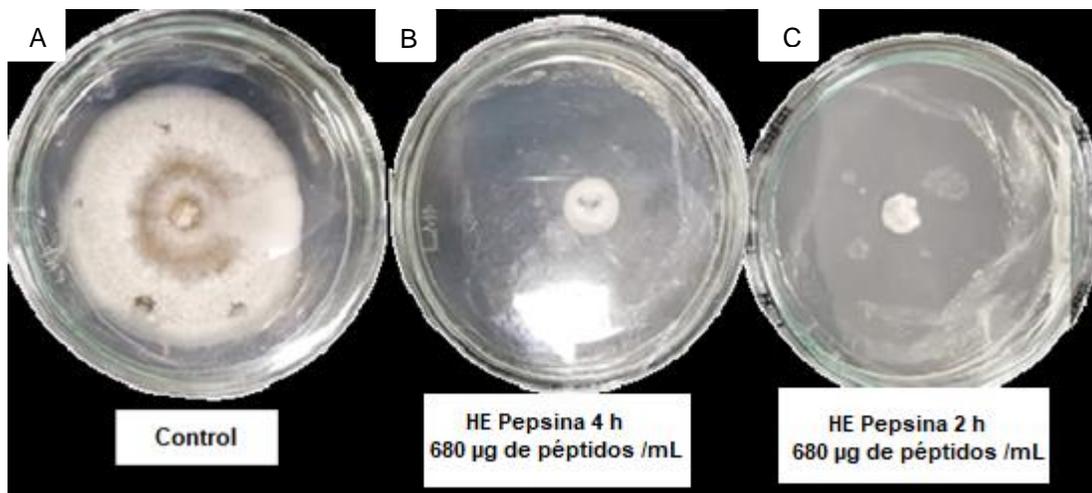


Figura 4. Comparación de inhibición de crecimiento micelial de hongo *Colletotrichum gloeosporioides* con péptidos obtenidos por HEPe con tiempos de hidrólisis de 4 y 2 h.

Los péptidos provenientes de hoja de jaca con una concentración de 680 µg/mL, lograron 90 % de inhibición de crecimiento micelial, estos valores son superiores a los reportados por Khani y cols. (2019), quienes obtuvieron un 80% de actividad antifúngica en *A. niger* utilizando 62.5×10^3 mg de péptidos/mL proveniente de hoja de *Satureja khuzestanica*.

6.4. Inhibición de germinación de esporas

Los resultados muestran que los péptidos de hoja de jaca con 2 h de hidrólisis y concentraciones mayores a 510 μg de péptidos/mL inhiben el 100% de la germinación de esporas del hongo de *C. gloeosporioides*, debido a que no hay presencia de esporas germinadas con un tiempo estimado de 8.5 h, comparándolo con el control, el cual presentó 200 esporas germinadas. Así mismo, el tratamiento que obtuvo menor porcentaje de inhibición de germinación (86%) fue con la concentración de 85 μg de péptidos/mL con un tiempo de hidrolizado de 2 h (Fig. 5). Los tratamientos desde 510 hasta 850 μg de péptidos/mL no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$). Por otra parte, los tratamientos con concentraciones menores a 340 μg de péptidos/mL presentaron menor porcentaje de inhibición de germinación de esporas, así mismo se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos desde 85 hasta 340 μg de péptidos/mL ($p > 0.05$).

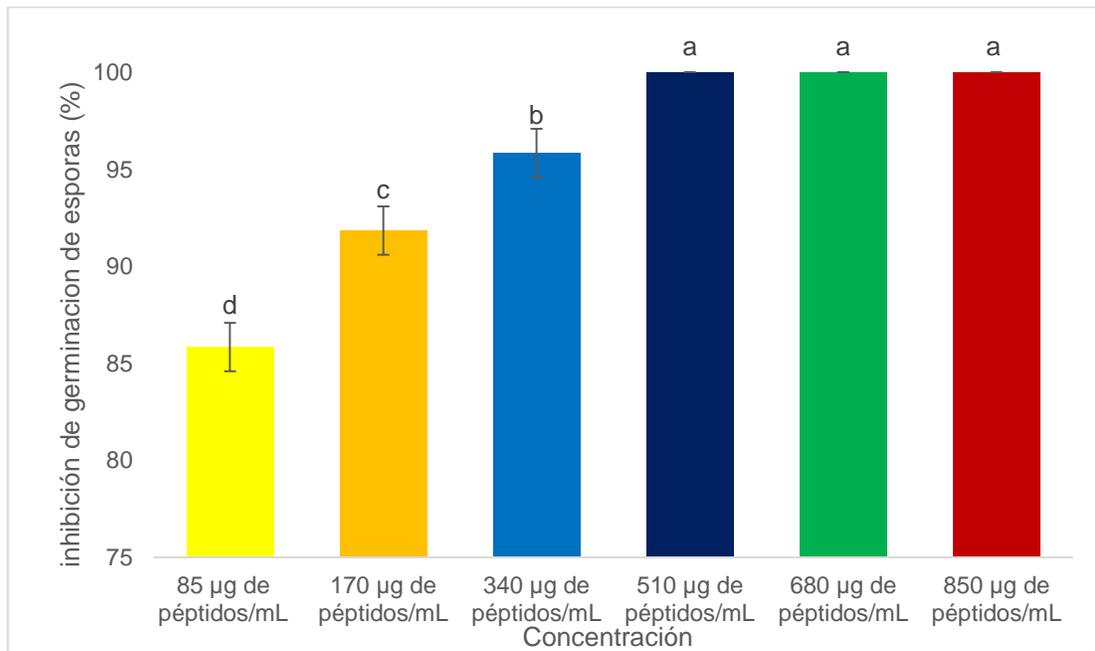


Figura 5. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *C. gloeosporioides* de papaya mediante aplicación de péptidos de proteína de hoja de jaca obtenidos mediante HEPe por 2 h.

En la (Fig. 6) se muestra la prueba de inhibición de germinación de esporas del hongo de *C. gloeosporioides* con diferentes concentraciones de péptidos, y el testigo con un tiempo de 8.5 h. El cual se evidencia que concentraciones menores a 340 μg de péptidos/mL no presentan efecto de inhibición (Fig. 6 a, b, c, d).

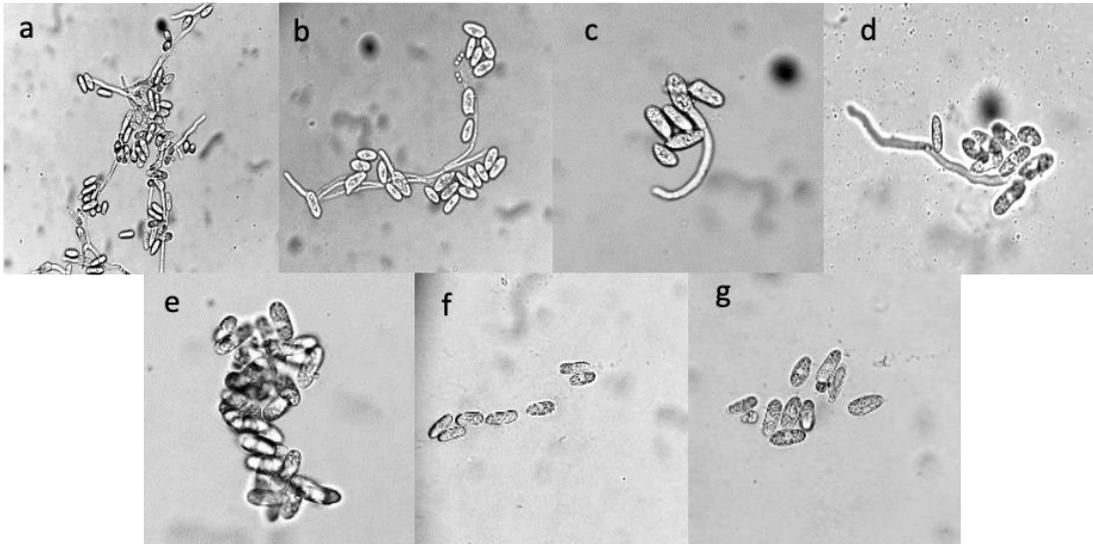


Figura 6. Inhibición de germinación de esporas de *C. gloeosporioides* de papaya mediante aplicación de péptidos de proteína de hoja de jaca obtenidos mediante HEPe por 2 h.

a) Testigo, b) 85 μg de péptido/mL, c) 170 μg de péptido/mL, d) 340 μg de péptido/mL, e) 510 μg de péptido/mL, f) 680 μg de péptido/mL, g) 850 μg de péptido/mL

Las concentraciones mayores a 510 μg de péptidos/mL, inhibieron el 100% de germinación de esporas (Fig. 5 e, f, g), esto se debe a que probablemente se encuentren residuos de cisteína que forman puentes disulfuro intramoleculares, que son encargados de generar dicha actividad. En comparación con Rogozhin y cols. (2015), quienes reportaron que se requiere una concentración de $18 \times 10^3 \mu\text{g}$ de péptidos/ mL de maleza de *Stellaria media* L, para inhibir un 67% a *B. Cinerea* y el 52% para *A. alternata*,

Las esporas son el principal vehículo de infección, persistencia en el hospedero y de transmisión, por lo que es importante erradicar su propagación y germinación, con el fin de parar/obstaculizar el crecimiento del micelio, la formación del apresorio y haustorio. Por ello, es sustancial la detención de desarrollo de las esporas en postcosecha.

6.5. Concentración mínima inhibitoria

Al realizar el cálculo entre el logaritmo del calor total y la concentración de péptidos, se deduce que se requiere una CMI de 894.4 μg de péptidos/mL para obtener un 100% de inhibición (Fig. 7). Esto se debe a que todos los seres vivos producen calor durante su desarrollo a causa de su metabolismo. La tasa de producción de calor es una medida adecuada de la actividad metabólica de los organismos y sus constituyentes; partes, células y niveles subcelulares. Los microorganismos producen pequeñas cantidades de calor el orden de 1-3 pW por celda. A pesar de los bajos niveles del calor producido, su crecimiento exponencial en medio de cultivo permite su detección utilizando microcalorimetría en pocas horas (Castañeda-Andrade, 2019).

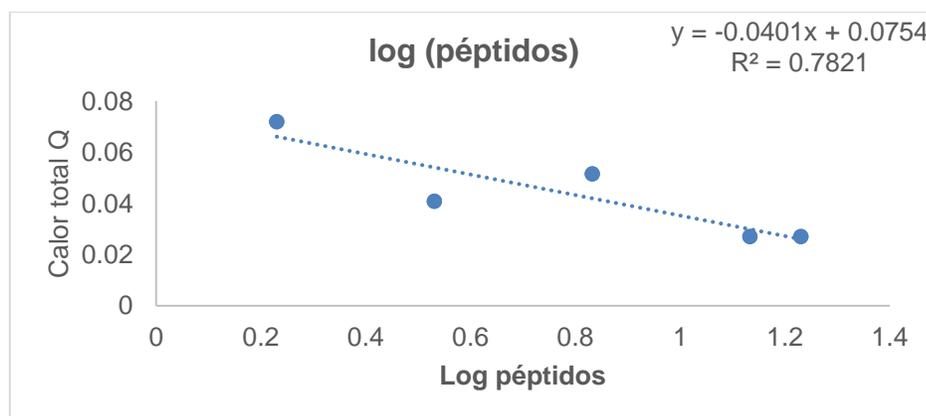


Figura 7. CMI calculado por cantidad de energía total producido por *C. gloesporioides* aislado de papaya, en presencia o no de los péptidos de hoja de jaca.

6.6. Formación de película de pectina de bajo metoxilo adicionada con y sin péptidos de hoja de jaca.

Las películas de pectinas de bajo metoxilo adicionadas con y sin péptidos de hoja de jaca presentan una superficie aparentemente uniforme. Las películas sin péptidos son más cristalinas y transparentes, eso se debe a los materiales que las conforman, en comparación con las que tiene péptidos que son más opacas y amarillosas. Esto se debe a que los péptidos tienen una tonalidad amarilla y al homogeneizar con los componentes del recubrimiento generan este aspecto (Fig. 8).

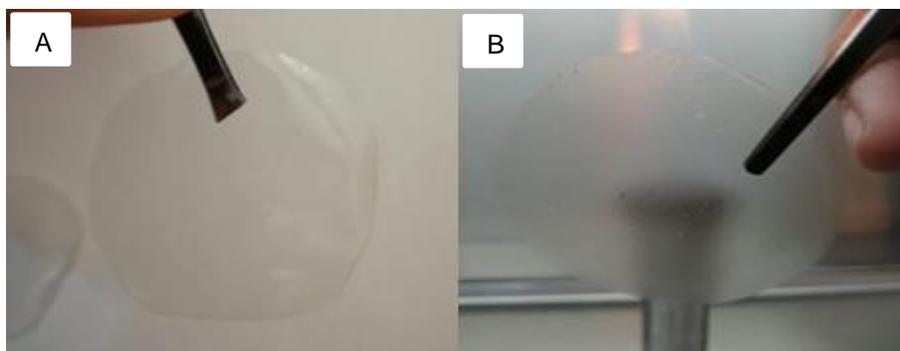


Figura 8. Película de pectina de bajo metoxilo sin (A) y con péptidos de hoja de jaca (B).

6.7. Evaluación de actividad antifúngica del recubrimiento

6.7.1. Inhibición de crecimiento micelial.

El recubrimiento de pectina de bajo metoxilo, adicionado con péptidos de hoja de jaca con una concentración de 680 μg de péptidos/mL, produjo $82 \pm 0.08\%$ de inhibición de crecimiento micelial del fitopatógeno *C. gloeosporioides* en condiciones de almacenamiento a 27°C (Fig. 9). Así mismo, se puede observar que el recubrimiento sin tratamiento no presentó actividad antifúngica. Esto

podría deberse a que el hongo genera enzimas pectinasas que son capaces de hidrolizar la pectina Patiño-Torres (2010) . La actividad antifúngica se genera debido a que los péptidos son ricos en cisteínas que forman enlaces disulfuro que confieren estabilidad estructural y termodinámica, generan despolarización de la membrana del patógeno, al tener carga eléctrica positiva, interaccionan con los fosfolípidos (cargados negativamente) de las membranas de los patógenos, formando poros en la membrana de los hongos, de esta forma los péptidos se insertan en la membrana celular del patógeno y forman estructuras parecidas a canales iónicos, que permiten la salida de los iones celulares (Flores y cols., 2005).

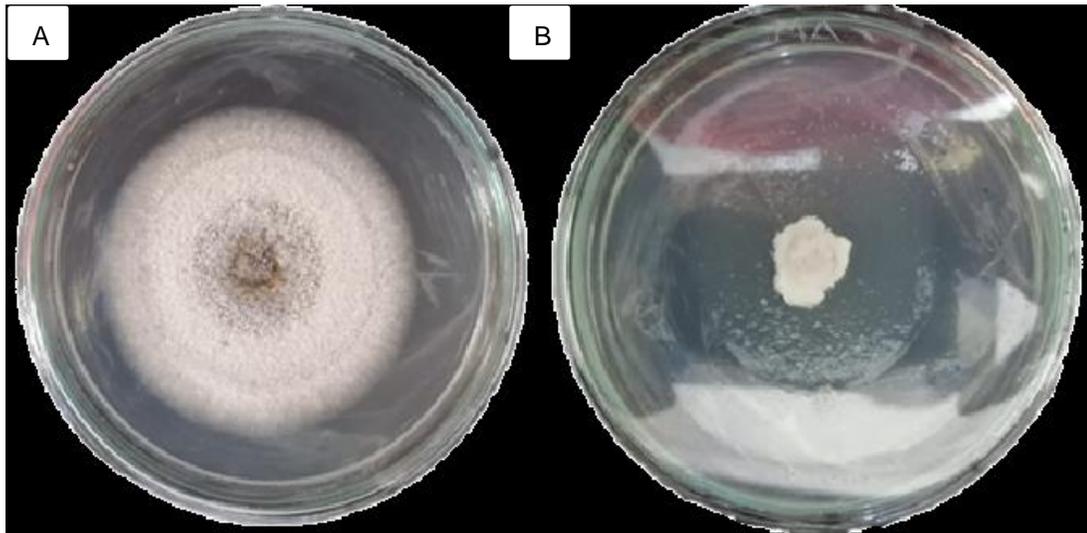


Figura 9. Actividad antifúngica de películas sin péptidos (A) y con péptidos (B).

6.7.2. Inhibición de germinación de esporas.

En la prueba de inhibición de la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*, se observó que el blanco con tiempo de 8 h 30 produjo un 100% de germinación con 200 esporas germinadas (Fig. 10A), mientras que los tratamientos adicionados con películas con y sin péptidos no presentaba germinación en las primeras 12 h, actuando como fungistático y prolongando su desarrollo (Fig. 10). La función principal de las películas es evitar pérdidas

de humedad, mientras que permiten el intercambio controlado de gases importantes, como oxígeno, dióxido de carbono y etileno, que están involucrados en los procesos de respiración (González-Estrada y cols., 2018). En las siguientes 18 h, los discos con el recubrimiento sin péptidos presentaron 100% de germinación de esporas (Fig. 10B), mientras que las películas con péptidos presentaron hasta $91\pm 1.2\%$ de inhibición (Fig. 10C). Los grupos hidroxilos (OH) de los polisacáridos de las esporas al ser negativos, interactúan con los grupos aminos de los péptidos con polaridad positiva, generando la lisis celular (Jones y cols., 2002). Los resultados son prometedores debido a que las esporas podrían verse afectas en el desarrollo del tubo germinativo y por lo tanto inhibir el crecimiento del micelio.



Figura 10. Inhibición de germinación de esporas en discos de PDA por aplicación de biopelículas de pectina adicionadas de péptidos (680 μg de péptidos/ml) de hoja de jaca.

6.8. Características físicas y mecánicas.

6.8.1. pH del recubrimiento en fase líquida.

El gel para realizar las películas de pectina de bajo metoxilo, presentaron valores pH ácidos, los geles con péptidos de 3.23 y sin péptidos 3.81. Esta ligera variación se debe a que los hidrolizados con pepsina se suspenden en buffer pH 2.0 y al homogenizarlos con el material del recubrimiento (pectina de bajo metoxilo, CaCl_2 y glicerol) le genera una mayor acidez. Favorablemente los recubrimientos de pectina de bajo metoxilo son más tolerantes a variaciones de pH, las pectinas pueden formar geles estables en condiciones ácidas por medio de enlaces entrecruzados con iones de calcio en condiciones

controladas, por lo tanto se generara películas mayormente estables y con mayor elasticidad, lo cual es favorable para la aplicación en frutos (Rascón-Chu y cols., 2016).

6.8.2. Color

Se determinó la diferencia de color entre la película con péptidos y sin péptidos, se observa que la película sin péptidos (P s/p) presenta una mayor luminosidad en comparación con la película con péptidos (P c/p), así mismo se puede comparar que las P c/p es más verdoso y amarillenta (Cuadro 12). Este comportamiento se debe a que la solución de péptidos de hoja de jaca tiene una tonalidad amarillenta y al homogenizarlos con el material del recubrimiento modifica el color final de la película. La diferencia media de color (ΔE^*) evidenció que la variación de color se encuentra en el rango de 2.5 a 4.5, es importante señalar que dependiendo de las condiciones de iluminación, podría apreciarse o no esta diferencia (Vervoort y cols., 2012).

Cuadro 12. Valores de color L*, a* y b* en la biopelícula con péptidos (680 μg de péptidos/mL) y sin péptidos.

Parámetro	P s/p	P c/p	$\Delta ()^*$	ΔE^*
L*	94.38	93.69	0.70	
a*	-1.59	-1.93	0.35	3.42
b*	5.17	8.51	-3.34	

En la (Cuadro 13) se muestra una simulación de la aplicación por sobre posición de la película en fruto. El valor de ΔE^* permite apreciar que la variación de color supera el mínimo perceptible de tonos establecido por CIELab con una escala (<5), por lo tanto, la aplicación de películas de pectina de bajo metoxilo con péptidos de hoja de jaca, producirá un cambio de color perceptible al ojo humano sin embargo, aún se requiere evaluar el efecto de aplicación de esta película en frutos para evaluar si esta causa una diferencia

de color o no, lo cual es importante para saber si el fruto podrá o no ser aceptado en el mercado, así mismo, se propone realizar una prueba sensorial.

Cuadro 13. Valores medios $L^*a^*b^*$ y diferencial ΔE^* promedio entre fruto y la película.

Amarillo				
Parámetro	Fruto	P c/p	$\Delta()^*$	ΔE^*
L*	62.97	63.94	-0.97	
a*	8.53	7.12	1.41	14.54
b*	50.93	36.49	14.44	
Verde				
Parámetro	Fruto	P c/p	$\Delta()^*$	ΔE^*
L*	49.60	56.90	-7.30	
a*	-4.48	-4.43	-0.06	9.88
b*	32.55	25.88	6.66	
Naranja				
Parámetro	Fruto	P c/p	$\Delta()^*$	ΔE^*
L*	53.63	55.88	-2.25	
a*	22.47	18.05	4.42	17.67
b*	44.40	27.44	16.96	

6.8.3. Espesor

Las películas de pectina de bajo metoxilo y sin péptidos presentaron un espesor promedio de 0.0491 mm en su sección transversal, mientras que aquellas que contienen péptidos con actividad antifúngica el espesor promedio fue de 0.0686 mm, con una diferencia significativa $p > 0.05$. La presencia de los péptidos al interactuar con la matriz del recubrimiento genera una interacción reforzando las zonas de entrecruzamiento con iones de calcio entre las cadenas de ácidos galacturónicos, modificando la estructura de la película, así como la cantidad y ubicación de los puntos de unión (Rascón-Chu y cols., 2016), lo que incrementa el espesor de la películas.

6.8.4. Contenido de humedad.

El contenido de humedad del recubrimiento sin péptidos en promedio es 26.75%, en cambio el recubrimiento con péptidos con actividad antifúngica presentó un promedio de 28.80%. Este incremento en contenido de humedad se debe a que cuando se adicionan los péptidos están suspendidos en un medio líquido y al homogenizarlos con los materiales del recubrimiento la cantidad de agua en la formulación es mayor. Sin embargo, esto no es favorable, si el objetivo de utilizar el recubrimiento es como barrera de humedad (Yang y cols, 2020).

6.8.5. Solubilidad.

La solubilidad de los recubrimientos de pectina de bajo metoxilo sin y con tratamiento de péptidos presentaron valores de solubilidad promedio de 90.84 y 86.63%, respectivamente. La disminución de la solubilidad se debe a la adición de los péptidos presentan un pH ácido, lo cual interacciona con los compuestos de recubrimiento, reforzando las zonas de entrecruzamiento con iones de calcio entre las cadenas de ácidos galacturónicos, modificando la estructura de la película, así como la cantidad y ubicación de los puntos de unión. Las películas aplicadas a frutos de alta humedad deben ser insolubles, debido a que la solubilidad involucra la penetración de las moléculas de agua en la matriz polimérica esto es seguido por la disrupción de las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas poliméricas, afectando al fruto debido a la generación de alta humedad relativa propiciando el desarrollo de microorganismos y podredumbre (Sothornvit y cols., 2000).

6.9. Propiedades mecánicas del recubrimiento

6.9.1. Permeabilidad al vapor de agua

Para calcular el valor de permeabilidad al vapor de agua se graficó el peso perdido vs tiempo, utilizando la pendiente de la recta de la película sin péptidos y con péptidos (Fig. 11).

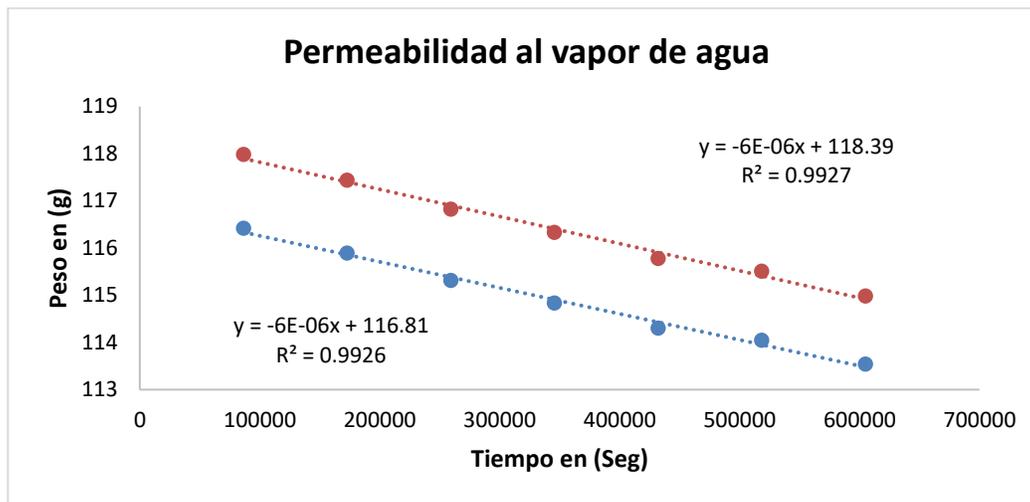


Figura 11. Permeabilidad al vapor de agua de la película antifúngica, • Película sin péptidos, • Película con péptidos.

La permeabilidad al vapor de agua del recubrimiento de pectina de bajo metoxilo sin péptidos fue de 1.31×10^{-13} kg/m.s.Pa, esto se debe a los compuestos que conforman la película por ejemplo la pectina se encuentra entrecruzada con el CaCl_2 que genera un entramado de forma de caja de huevo que al ser poroso genera permeabilidad a moléculas de agua. El glicerol, al ser un plastificante hidrofílico, aumenta la permeabilidad de la película al vapor de agua, pero disminuye la habilidad de ésta para funcionar como una barrera al transporte de humedad, gases y compuestos aromáticos (Barrón., 2018). Por otra parte el recubrimiento con péptidos de hoja de jaca se vieron ligeramente afectadas al homogenizarlos con la matriz. La permeabilidad resultó mayor (1.83×10^{-13} con kg/m.s.Pa), esto se debe al

carácter hidrofílico que se encuentran presentes en el coctel de algunos péptidos con peso molecular <10 kDa que fueron adicionados a la matriz del recubrimiento; sumando a esto, la adición de glicerol que ya fue explicada. La adición de compuestos hidrófobos a las películas basadas en péptidos hidrofílicos generalmente mejora las propiedades de barrera de vapor de agua (Atarés y cols., 2016)

6.10. Análisis termogravimétrico (TGA)

El propósito de este análisis fue evaluar la resistencia térmica a la degradación del péptido antifungico encapsulado en la película de pectina de bajo metoxilo, con respecto a la perdida de variación de peso con el incremento de la temperatura controlada (Cuadro 14 y 15).

Cuadro 14. Comportamiento térmico de los compuestos de la película antifúngica.

Compuestos de la película	Onset (°C)	Midpoin (°C)	Endset (°C)	% Perdida	Pérdida de peso (mg)
Glicerol	161.950	172.520	188.420	98.398	19.476
CaCl ₂	92.950	115.640	138.330	24.524	3.147
Pectina	182.670	203.440	227.100	44.037	2.230
Péptidos	161.470	168.900	177.170	37.236	2.641

Cuadro 15. Comportamiento térmico de películas con y sin péptidos antifungicos

Película sin péptidos	Onset (°C)	Midpoin (°C)	Endset (°C)	% Perdida	Pérdida de peso (mg)
Fase I Glicerol-CaCl ₂	121.120	142.450	163.830	31.389	1.462
Fase II Pectina	210.560	222.990	235.420	16.803	0.783
Película con péptidos	Onset (°C)	Midpoin (°C)	Endset (°C)	% Perdida	Pérdida de peso (mg)
Fase I Glicerol-CaCl ₂	123.780	142.080	160.730	18.617	1.087
Fase II Péptidos	178.380	180.100	181.760	3.236	0.189

Fase III Pectina	211.17	224.64	238.21	21.795	1.272
----------------------------	--------	--------	--------	--------	-------

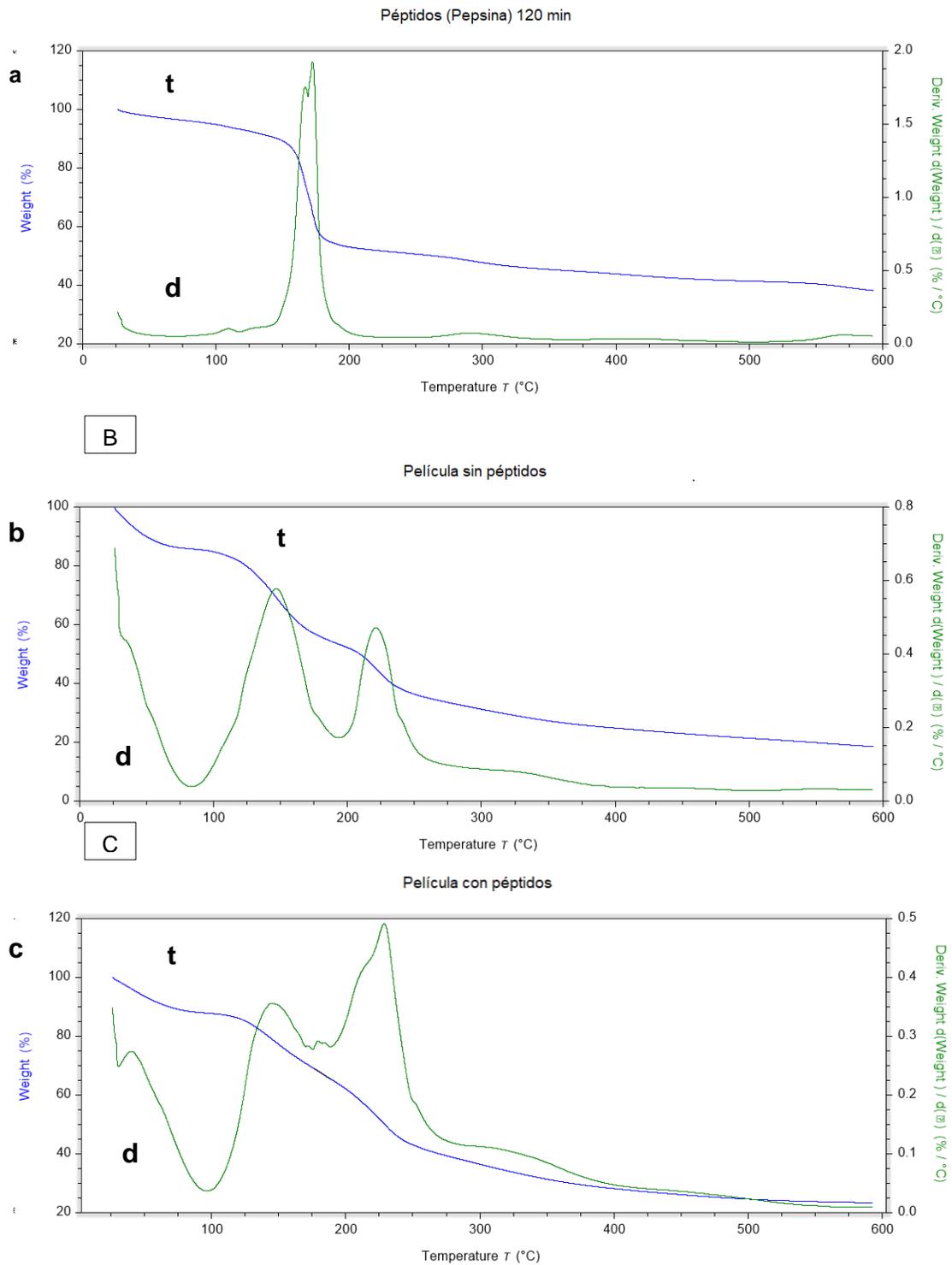


Figura 12. Perfil termogravimétrico. Péptidos (a), Película sin péptidos (b), Película con péptidos. La curva (d) representa la derivada y la curva (t) representa el termograma.

En el termograma (Fig.12a) con la muestra de péptidos, se puede observar un rango de descomposición térmica de 161.47 °C a 177.17°C. El recubrimiento sin péptidos (Fig. 12b) se degrada en 2 fases, en la prime desde 121.12 °C a 163.83 ° y la segunda de 210.56 °C hasta 235.42°C. Estas diferencias en la estabilidad, pueden estar asociada a la evaporación del glicerol y al entrecruzamiento que se forma entre CaCl₂ y la pectina de bajo metoxilo López y cols. (2019).

La película con péptidos (Fig. 12c) se descompuso, entre 123.78°C y 238.21 °C, lo cual se puede observar que en la fase II el péptido presenta un efecto de termoprotección de 178.38 °C - 161.47 °C = 16.92 °C. Además este rango se reduce considerablemente, lo que evidencia que los péptidos se encuentran encapsulados, ya que cuando se analizan sin encapsular, el rango es muy amplio, debido a la diversidad de tamaño. En la cápsula se protegen 16.92 °C y cuando algunos componentes de la película han sido descompuestos, los péptidos quedan expuestos y sin importar el aumento de tamaño, son degradados más rápidamente por la alta temperatura.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN

CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN

Los hidrolizados con pepsina, a partir de proteína de hoja de jaca, presentaron actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*, con un 90% de inhibición de crecimiento micelial e inhibición total de la germinación de esporas.

La adición de péptidos antifúngicos en las películas de pectina de bajo metoxilo, modificó ligeramente las propiedades fisicoquímicas de las películas, sin afectar su aplicabilidad.

Las películas adicionadas con péptidos obtuvieron un 82% de inhibición de crecimiento micelial y un 91% de inhibición en germinación de esporas contra el hongo de *C. gloeosporioides* de *papaya*.

La película adicionada de péptidos de hoja de jaca es susceptible de ser aplicada con éxito en el control de este fitopatógeno en postcosecha.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alejandra B. CARDILLO, María C. MARTÍNEZ CERON, Stella M. ROMERO^{3,4}, Osvaldo CASCONE^{1,2}, S. A., & CAMPERI y Silvana L. GIUDICESSI. (2018). Péptidos Antimicrobianos De Plantas. *Revista Farmaceutica*, 160(ISSN 0034-9496), 19. Retrieved from <http://www.anfyb.com.ar/info/revistas/2018/3-GIUDICESSI.pdf>
- AOAC. (2000a). Determinación de humedad. Retrieved July 5, 2020, from <https://www.coursehero.com/file/p31s7rk/A-Determinación-de-humedad-Método-de-la-AOAC-92510-basada-en-la-pérdida-de-peso/>
- AOAC. (2000b). pH de alimentos acidificado. Retrieved July 5, 2020, from <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=18372>
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–236.
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 3–28. <https://doi.org/10.15174/au.2002.276>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cabello-Ruiz, E. D., Núñez-González, M. A., & Torres de la Cruz, V. M. (2016). Actividad biológica de proteínas y péptidos. In *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 313–350). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.325>
- Castañeda-Andrade A. (2019). *Caracterización del crecimiento fúngico y de la*

inhibición de hongos fitopatógenos por agentes de biocontrol mediante microcalorimetría isotérmica (IMC). INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC.

Cheftel, J. C. (1991). Application des hautes pressions en technologie alimentaire. *Actualités des Industries Alimentaires et Agro-Alimentaire, Applicatio*, 141–153.

Coscueta, E. R., Campos, D. A., Osório, H., Nerli, B. B., & Pintado, M. (2019). Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. *Food Chemistry: X*, 1(January), 100006. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100006>

Crane, J. H., & Balerdi, C. F. (2006). *La Jaca en Florida 1. EDIS* (Vol. 2006).

Dai, L., Reichert, C. L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Acid hydrolysis behavior of insoluble protein-rich fraction extracted from *Chlorella protothecoides*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.02.064>

Daoudi, L. (2006). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/5662>

De Lucca, A. J., & Walsh, T. J. (1999). Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.1.1>

Flores, I. R. I., Minero, Y., & James, A. C. (2005). Proteínas contra las infecciones de las plantas, 64–74.

García-Muro D., Calderon-Santoyo M., Carvajal-Millán E., R.-S. J. A. (2016). *FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN HIDROGEL DE PECTINA PARA LA FORMACIÓN DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES ADICIONADOS CON CANDIDA FAMATA PARA EL CONTROL FÚNGICO POSTCOSECHA DE PAPAYA MARADOL*. Instituto Tecnológico de Tepic.

Gómez, A. (2007). Alimentos y micotoxinas. *Farmacia Profesional*, 21, 49–53.

Gonzalez-Estrada, R., Ascencio-Valle, F., Ragazzo-Sanchez, J., & Calderon-

- Santoyo, M. (2017). Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen *Penicillium citrinum* on Persian lime. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(2), 114. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-09-1273>
- González-Estrada, R. R., Calderón-Santoyo, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Peyron, S., & Chalier, P. (2018). Antimicrobial soy protein isolate-based films: physical characterisation, active agent retention and antifungal properties against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 921–929. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13664>
- Guadix, A. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., & López-Meza, J. E. (2015). Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. *BioMed Research International*, 2015(1), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/735087>
- Heda, R., & Tombazzi, C. R. (2018). *Physiology, Pepsin*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30725690>
- Huang, X., Xie, W. J., & Gong, Z. Z. (2000). Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Letters*, 478(1–2), 123–126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01834-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01834-2)
- Huerta-cantillo, J., & Navarro-garcía, F. (2016). Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells, 20.
- Jones, R. W., & Prusky, D. (2002). Expression of an Antifungal Peptide in *Saccharomyces*: A New Approach for Biological Control of the Postharvest Disease Caused by *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology*®, 92(1), 33–37. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.33>
- Khani, S., Seyedjavadi, S. S., Zare-Zardini, H., Hosseini, H. M., Goudarzi, M.,

- Khatami, S., ... Razzaghi-Abyaneh, M. (2019). Isolation and functional characterization of an antifungal hydrophilic peptide, Skh-AMP1, derived from *Satureja khuzistanica* leaves. *Phytochemistry*, 164(May), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.05.011>
- Konica Minolta. (2006). Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B* | Konica Minolta Sensing. Retrieved July 5, 2020, from <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Korotych, O., Mondal, J., Gattás-Asfura, K. M., Hendricks, J., & Bruce, B. D. (2019). Evaluation of commercially available styrene-co-maleic acid polymers for the extraction of membrane proteins from spinach chloroplast thylakoids. *European Polymer Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.10.035>
- Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Boettcher, M. E. (2003). SEPARATION OF PROTEIN FRACTIONS IN ALFALFA JUICE: EFFECTS OF SOME PRE-TREATMENT METHODS, 46(1980), 715–720.
- López, D. F., Osorio, O., & Checa, O. E. (2019). Propiedades Mecánicas de un Material de Pectina para Revestimiento de Fibras Naturales Utilizadas en Aplicaciones Agrícolas. *Información Tecnológica*. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000300189>
- Luna-Esquivel, G., Alejo-Santiago, G., Ramírez-Guerrero, L. G., & Arévalo-Galarza, M. de L. (2015). La Yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Un fruto de exportación. *Revista Agroproductividad*, 65–70.
- Marambe, P. W. M. L. H. K., Shand, P. J., & Wanasundara, J. P. D. (2008). An in-vitro investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Proteins. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1293-z>
- Martínez-Bolaños L., Téliz-Ortiz D., Rodríguez-Maciel J., Mora-Aguilera A., Nieto-Ángel D., Cortés-Flores J., Mejía-Sánchez D., Nava-Díaz C., S.-A. G. (2012). RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN POBLACIONES DE *Mycosphaerella fijiensis* DEL SURESTE MEXICANO. *Universidad*

Autónoma Chapingo, 12–13.

- Morais, H. A., Pinto, M., Silvestre, C., & Silveira, J. N. (2013). Action of a Pancreatin and an *Aspergillus oryzae* Protease on Whey Proteins: Correlation among the Methods of Analysis of the Enzymatic Hydrolysates, *56*(December), 985–995.
- Morales, R. (2017). *Las Condiciones De Secado De Una Harina a Base De Las Semillas De La Jaca (Artocarpus Licenciado En Gastronomía*. UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS.
- Moreno-Nájera L. (2020). *Extracción de proteínas de hojas de jaca (Artocarpus heterophyllus Lam) empleando tecnología de métodos emergentes. Psychological Bulletin*.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*(5), 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Noman, A., Xu, Y., Al-bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, *67*(September 2017), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>
- Patiño-Torres C. (2010). Producción in vitro de pectinasas por *Colletotrichum acutatum*. *Acta Agronómica*, *59*(1), 80–90.
- Pina-Dumoulin, G., Quiroz, J., Ochoa, A., & Magana-Lemus, S. (2010). Physical-chemistry characterization of fresh fruits of no traditional cultivations in Venezuela I the yaca. *Caracterizacion Fisico-Quimica de Frutas Frescas de Cultivos No Tradicionales En Venezuela I La Yaca*.
- Pradas Baena, I., & Moreno Rojas, J. M. (2016). Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas en la Industria Alimentaria. *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera*, 1–18.
- Quintero, C. J., Falguera, V., & Muñoz, H. A. (2010). Films and edible coatings :

- importance , and recent trends in fruit and vegetable value chain. *Revista TUMBAGA*, 5(1), 93–118. <https://doi.org/Doi 10.1021/Je900853f>
- Rascón-Chu, A., Martínez-López, A. L., Carvajal-Millán, E., Martínez-Robinson, K. G., & Campa-Mada, A. C. (2016). Gelificación iónica de pectina de bajo grado de esterificación extraída de manzanas inmaduras de raleo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(1), 17–24.
- Regente, M. C., Oliva, C. R., Feldman, M. L., Castagnaro, A. P., & Canal, L. (1997). A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03470.x>
- Rivas-Santiago, B., Sada-Díaz, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases. *Salud Pública de México, Vol 48, Iss 1, Pp 62-71 (2006)*, 48(1), 62.
- Rodr, P., Molina, A., Alamillo, J. M., Garc, F., Berrocal-lobo, M., & Lo, E. (2001). Antibiotic activities of peptides , hydrogen peroxide and peroxytrite in plant defence, 498, 219–222.
- Rogozhin, E. A., Slezina, M. P., Slavokhotova, A. A., Istomina, E. A., Korostyleva, T. V, Smirnov, A. N., ... Odintsova, T. I. (2015). A novel antifungal peptide from leaves of the weed *Stellaria media* L. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.014>
- Safi, C., Charton, M., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Research*, 3(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.017>
- Sánchez Aldana, D., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CYTA - Journal of Food*. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.904929>
- Shi, W., Li, H., Zeng, X., Zhang, H., & Qin, X. (2019). The extraction of tobacco

- protein from discarded tobacco leaf by hollow fiber membrane integrated process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58, 102245. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102245>
- SIAP. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Retrieved July 4, 2020, from https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/?fbclid=IwAR09RhBTR2neDyPV8ypEublo_ljzzuubBNF9Nqdn0LQHhYIk-fxJ8rwu4
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6298–6302. <https://doi.org/10.1021/jf000836l>
- Su, R., Liang, M., Qi, W., Liu, R., Yuan, S., & He, Z. (2012). Pancreatic hydrolysis of bovine casein : Peptide release and time-dependent reaction behavior. *Food Chemistry*, 133(3), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.103>
- Taylor, P., Broekaert, W. F., Cammue, B. P. a, Bolle, M. F. C. De, Thevissen, K., Samblanx, G. W. De, ... Nielson, K. (1997). Critical Reviews in Plant Sciences Antimicrobial Peptides from Plants Antimicrobial Peptides from Plants. *Critical Review in Plant Sciences*, 16(March 2013), 297–323. <https://doi.org/10.1080/07352689709701952>
- Taylor, P., Street, M., Wt, L., Signaling, P., Stotz, H. U., Thomson, J., ... Wang, Y. (2015). Plant defensins Defense , development and application. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9755>
- Trigos, Á., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*.
- Vázquez, M., & Guerrero, J. (2017). Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in the physicochemical properties of chitosan films. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 401–409. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.04.11>
- Vervoort, L., Van Der Plancken, I., Grauwet, T., Verlinde, P., Matser, A., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2012). Thermal versus high pressure

- processing of carrots: A comparative pilot-scale study on equivalent basis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.02.009>
- Vioque, J; Clemente, A; Pedroche, J; Del, M; Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52, 132–136. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i2.385>
- Yang, Q., Yuan, F., Xu, L., Zhong, W., Yang, Y., Shi, K., ... Zhu, J. (2020). Moisture barrier films for herbal medicines fabricated by electrostatic dry coating with ultrafine powders. *Powder Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.03.023>
- Yang, Y., Marczak, E. D., Usui, H., Kawamura, Y., & Yoshikawa, M. (2004). Antihypertensive Properties of Spinach Leaf Protein Digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2223–2225. <https://doi.org/10.1021/jf034551v>
- Zhang, C., Sanders, J. P. M., Xiao, T. T., & Bruins, M. E. (2015). How does alkali aid protein extraction in green tea leaf residue: A basis for integrated biorefinery of leaves. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133046>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1875-1881.1990>