

## ACCIÓN FUNGITOXICA DEL EXTRACTO DE MEZQUITE (*P. laevigata*) CONTRA *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae* y *R. stolonifer*

De la Fuente-Salcido NM<sup>a</sup>, Pimentel A<sup>a</sup>, Valenzuela A<sup>a</sup>, Gutiérrez E<sup>a</sup>, Ontiveros D<sup>a</sup>, Sandoval A<sup>a</sup>, Linaje T MS<sup>a</sup>, Rodríguez V<sup>a</sup>, Salcedo Hernández R<sup>c</sup>, Barboza-Corona JE<sup>c</sup>, Castañeda Ramírez JC<sup>c</sup>

**a** Universidad Autónoma de Coahuila-Campus Torreón, Ciencias Biológicas, Bioprospección y Bioprocesos. Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5, Cd. Universitaria. CP 27104, Torreón Coah., México.

**b** Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Alimentos. Ex Hacienda El Copal, Km. 9. Carr. Irapuato-Silao 311 CP 36500 Irapuato, Guanajuato, México.

**c** Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Procesos Alimentarios. Carr. Valle-Huanímaro Km. 1.2, CP 38400 Valle de Santiago, Guanajuato, México.

\* normapbr322@hotmail.com.

### RESUMEN:

El propósito de este estudio fue determinar *in vitro* e *in vivo* la actividad antifúngica del extracto de mezquite EM *P. glandulosa* y evaluar el potencial fungitóxico para enriquecer la formulación de películas y/o cubiertas comestibles para prolongar la vida de anaquel de frutas y vegetales al protegerlas de daño biológico.

El EM se obtuvo por decocción (500 mg/mL), se evaluó *in vitro* mezclándolo con agar PDA para obtener diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 5%) y se plaquearon por triplicado. Las cajas se inocularon con 3 µL de suspensión de esporas ( $1 \times 10^5$  esporas/mL) de *C. gloeosporoides*, *F. oxysporum*, *R. oryzae* y *R. stolonifer* se incubaron 7 días (30°C), se registró y comparó diariamente el crecimiento micelial para establecer el efecto inhibitorio de cada concentración de EM. Además, la actividad del EM al 5% se evaluó *in vivo*, adicionándolo por inmersión (30 s) en fresas, tomates y zanahorias, se depositó en cámara húmeda, se incubó 7 días a temperatura ambiente y en refrigeración (4°C).

El EM (4 y 5%) es un potencial ingrediente activo para añadirse en formulaciones de películas o cubiertas comestibles para inhibir el crecimiento hongos fitopatógenos, con aplicación en la bioconservación postcosecha de frutas y vegetales perecederos.

### ABSTRACT:

The purpose of this study was to assess the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of extract from mesquite (EM) *Prosopis glandulosa* to evaluate the fungitoxic potential to enrich the formulation of coatings and/or films to prolong the quality and shelf life of fruits and vegetables and protecting them from biological damage.

The EM was obtained by decoction (500 mg / mL) and *in vitro* evaluated by mixing different volumes (0, 1, 2, 4, 5%) with PDA agar and plated on petri dishes. They were inoculated in triplicate with 3 µL spore suspension ( $1 \times 10^5$  spors/mL) of *C. gloeosporoides*, *F. oxysporum*, *R. oryzae* and *R. stolonifer* and incubated for 7 days (30 °C). The radial mycelial growth was compared to establish the effect of each EM final concentration. Also the 5% of EM was evaluated *in vivo* in strawberries, tomatoes and carrots adding by immersion, deposited in humid chamber for 7 days and incubated at room temperature and under refrigeration (4°C). The EM (4 y 5%) is a potential active ingredient to be added in the formulation of edible films or coatings to inhibit the growth of important phytopathogenic fungi with application in bioconservation of postharvest of perishable fruits and vegetables.

### Palabras clave:

Mezquite, Bioconservación, Fitopatógenos

### Keyword:

Mesquite, Biopreservation, phytopathogenic.

**Área:** Frutas y Hortalizas

## INTRODUCCIÓN

El mezquite (*Prosopis* spp) de la familia Fabáceas o leguminosas, es considerado flora nativa valiosa en las zonas áridas y semiáridas, ecológicamente por fijar nitrógeno y económicamente por su uso como forraje, leña y fuente de néctar para abejas (García-Andrade *et al.*, 2013). El árbol de 13 m de alto, posee espinas axilares, hojas glabras, inflorescencias espigadas con pétalos florales, y vainas lineares con un exocarpio duro sobre un mesocarpio pulposo y dulce. Las vainas tienen de 5 a 18 semillas ovaladas y pardas (FAO, 2010). Esta planta ha sido estudiada extensivamente revelando propiedades medicinales atribuidas a los alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos distribuidos en las partes leñosas de la planta, en hojas y polen (Dhananjaya *et al.*, 2014).

En los extractos del mezquite se han confirmado propiedades hipoglucemiantes y anti-hiperlipidémicas (Sharma and Singla, 2013), actividad antidiabética (Deutschländer 2009), actividad cardioprotectora y anti-hipertensiva (Huisamen *et al.*, 2013) y además, actividad antibacteriana *in vitro* (Dos Santos *et al.*, 2013; de Souza Cândido *et al.*, 2011), sin embargo, es escasa la información sobre la actividad fungitóxica.

Por la extensiva distribución de esta fabácea en México y las numerosas propiedades biológicas reportadas, el objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* e *in vivo* la actividad antifúngica del extracto de hojas de mezquite (EM) *P. glandulosa* para evaluar su potencial fungitóxico con el propósito de utilizarla para enriquecer la formulación de cubiertas y/o películas comestibles en la bioconservación de frutas y hortalizas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Crecimiento de hongos fitopatógenos

Se inocularon 3  $\mu\text{L}$  de suspensión de esporas ( $1 \times 10^5$  esporas/mL) de *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 42374, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus orizae* y *R. stolonifer* (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2015) en agar PDA (APDA BIOXON) acidificado con ácido tarárico (10% v/v) y se incubaron 7 días a 30° C.

### Obtención del extracto de mezquite (EM)

#### Colecta:

En la comunidad del Copal en Irapuato, Guanajuato, se recolectaron hoja, flor y rama de mezquite (*P. glandulosa*), se deshidrataron (70°C/5 días), se molieron y tamizaron para obtener una harina de partículas de 0.5 mm. Se realizó el análisis proximal de las harinas determinando proteína cruda, carbohidratos, ceniza, fibra cruda, lípidos crudos (AOAC 1990).

Por el método de decocción (95 °C/3 min) (Davis 1956) y posterior filtrado (Whatman, UK) se obtuvieron 400 mL de cada extracto de mezquite (500 mg/mL) y se determinó el pH.

### Determinación de la capacidad fungitóxica del extracto de mezquite

#### Actividad antifúngica *in vitro* del EM

El efecto inhibitorio del EM sobre el desarrollo de cada hongo se realizó mezclando APDA (20 mL) con diferentes volúmenes del extracto para obtener concentraciones finales de 0, 1, 2, 4 y 5% de EM. Se plaqueó en cajas Petri por triplicado, se inocularon con 3  $\mu\text{L}$  de suspensión de esporas de cada hongo y se incubaron a 30°C por 7 días. Se registró diariamente el crecimiento miceliar en milímetros (mm) del control (0% EM) y se comparó con el crecimiento en APDA adicionado con diferentes concentraciones de EM, para calcular el índice antifúngico

de acuerdo al método descrito por Wang *et al.*, (2005). El índice antifúngico expresa el porcentaje de inhibición del EM y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice antifúngico (\%)} = \frac{D_{\text{control}} - D_{\text{extracto}}}{D_{\text{control}}} \times 100$$

### Actividad antifúngica *in vivo* del EM

Se realizaron pruebas de fitopatogenicidad utilizando como modelos productos hortofrutícolas, fresa, zanahoria baby y tomate cherry sanitizadas con etanol al 70% (1 minuto), con hipoclorito de sodio al 0.5 % (v/v) (3 minutos) y tres lavados con agua destilada estéril.

A las fresas, tomates y zanahorias se les aplicó por inmersión el EM al 5% (v/v) de concentración y se les inoculó superficialmente y 3 µL de suspensión de esporas de cada hongo por triplicado.

Los productos inoculados se colocaron en cámara húmeda individual por 7 días en refrigeración a 4°C y a temperatura ambiente (25-30°C) por triplicado. Se realizaron dos controles sin sanitizar y sin EM y se mantuvieron en las mismas condiciones.

Se registró el tiempo (h) transcurrido para el desarrollo de los síntomas de fitopatogenicidad causado por los cuatro hongos, registrando el crecimiento miceliar (CM), necrosis (NC) pudrición blanda (PB) y deshidratación (DH) del fruto para determinar la efectividad del EM para inhibir el crecimiento de los hongos contra los controles sin EM.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis proximal de las harinas de hoja, flor y rama de mezquite que se utilizaron para obtener los extractos se muestran en la Tabla I. Además a los extractos de hoja, flor y rama se les determinó en pH, obteniéndose valores de 4.77, 5.62 y 6.32 respectivamente.

Tabla I. Análisis químico proximal de harinas de mezquite

Determinación	Harina Mezquite		
	Hoja	Flor	Rama
*Proteína cruda	9.6	9.4	8.2
**Carbohidratos	55.9	56.7	53.7
Cenizas	5.9	6.2	6.1
Fibra	25.2	24.8	28.5
Grasas	3.4	2.9	3.5

Porcentaje de base seca. \*Nitrógeno total (Factor de conversión x 6.25)

\*\*Carbohidratos determinados por diferencia

### Actividad antifúngica *in vitro* del EM

El efecto del EM sobre el crecimiento de los hongos ensayados fue más evidente al aplicar EM al 5% en APDA, pues redujo el crecimiento radial a la mitad en todos los hongos. Para *C. gloeosporoides* desde las 48 horas de incubación se observa la inhibición o retraso del crecimiento hasta en un 50%, si lo comparamos con el crecimiento del hongo control (sin EM) (Figura 1 a 48-72 h).

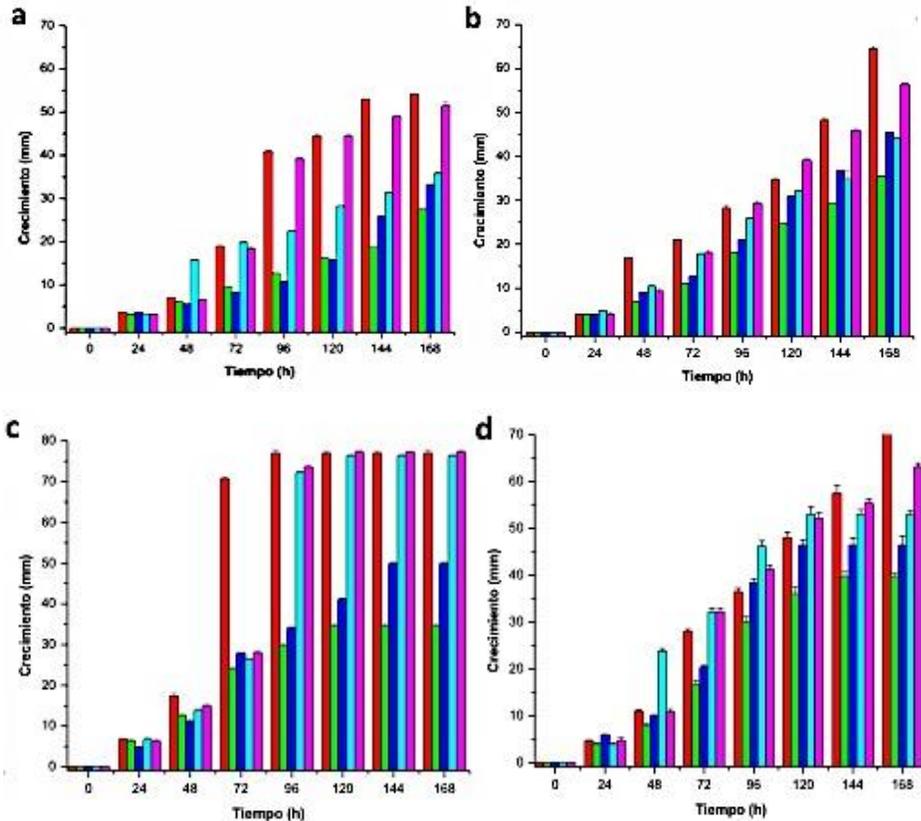


Figura 1. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de mezquite contra el crecimiento de *C. gloeosporoides* (a), *F. oxysporum* (b), *R. oryzae* (c) y *R. stolonifer* (d) a diferentes concentraciones (0% rojo, 5% verde, 4% azul fuerte, 2% azul claro, 1% rosa).

En *F. oxysporum* desde las 48 horas se observó la inhibición del crecimiento radial de un 50% con EM al 5% y hasta 75% a las 96 horas (Figura 1 b, 48-96 h), siendo el hongo menos sensible al efecto del EM. En el caso de *Rhizopus* en ambas especies el efecto del EM en concentraciones elevadas no se evidencia hasta después de las 72 horas de incubación, sin embargo se presenta una menor inhibición del crecimiento en *R. oryzae* aun en las concentraciones de 4 y 5% (figura 1 c, 96.168 h) y una mayor inhibición contra *R. stolonifer* (Figura 1 c, 72 h). Ambos *Rhizopus* fueron más susceptibles al efecto inhibitorio del EM al 5%.

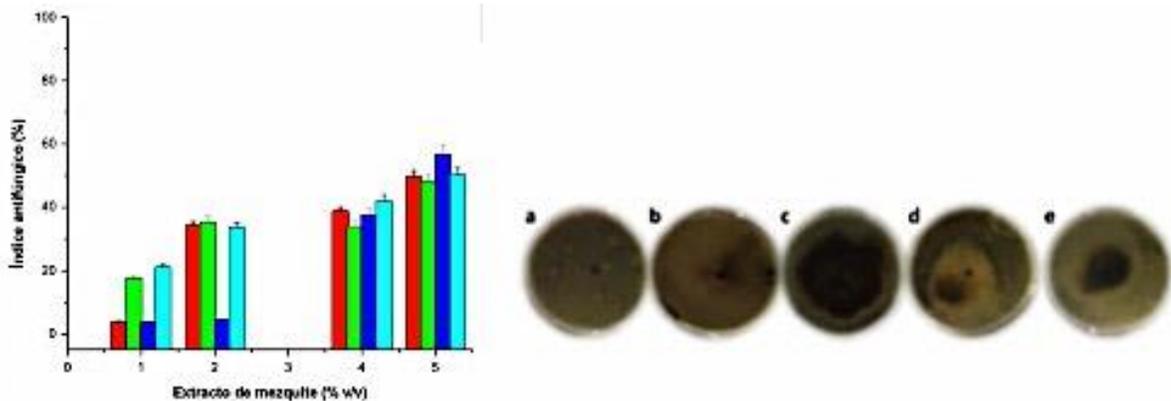


Figura 2.) A) Índice antifúngico para *C. gloeosporoides* (rojo) *F. oxysporum* (verde), *R. oryzae* (azul fuerte) y *R. stolonifer* (azul claro). B) Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de mezquite contra *C. gloeosporoides* a) Control 0%, b) 1%, c) 2%, d) 4% y e) 5%.

Con respecto al índice antifúngico registrado para las 4 concentraciones de EM (1, 2, 4, 5% v/v se considera aceptable, sin embargo, para futuras aplicaciones del EM habría que incrementarse la concentración inicial del extracto, pues se obtuvieron índices antifúngicos de 49.78, 48.33, 56.72 y 50.31 % para de para *C. gloeosporoides* ATCC 42374, *F. oxysporum*, *Rhizopus oryzae* y *R. stolonifer* respectivamente (Figura 2).

**Actividad antifúngica *in vivo* del EM**

Los ensayos *in vivo* en fresa, tomate y zanahoria muestran un daño evidente desde las 48 horas por el desarrollo de los hongos a temperatura ambiente. La muestras en refrigeración tratadas con EM 5% fueron menos susceptibles para desarrollar los síntomas, especialmente NC en todos los modelos, la NC y PB en fresa y zanahoria, CM en tomate y zanahoria (Tabla II). El efecto más evidente se observó en muestras inoculadas con *R. oryzae* y *R. stolonifer* cuyo control sin mezquite invade los modelos por CM en 48 h a temperatura ambiente.

Tabla II. Actividad antifúngica *in vivo* del extracto de mezquite por pruebas de fitopatogenicidad en fresa, tomate y zanahoria.

Desarrollo de síntomas de fitopatogenicidad (h)									
Hongo	<sup>a</sup> Temperatura ambiente				<sup>b</sup> Refrigeración				
	CM	NC	PB	DH	CM	NC	PB	DH	
<b>Fresa</b>									
<i>C. gloeosporoides</i>	*0/68	72/0	72/144	72/120	96/144	0/0	0/0	72/144	
<i>F. oxysporum</i>	0/68	72/0	72/144	120/0	96/0	0/0	0/0	72/0	
<i>R. oryzae</i>	24/68	96/0	72/0	72/144	96/0	0/0	0/240	72/0	
<i>R. stolonifer</i>	24/68	72/0	48/24	72/120	72/168	0/0	0/0	72/168	
<b>Tomate</b>									
<i>C. gloeosporoides</i>	48/68	0/0	72/144	72/120	72/0	0/0	0/0	72/0	
<i>F. oxysporum</i>	24/68	72/0	72/144	120/0	96/0	0/0	0/0	72/0	
<i>R. oryzae</i>	48/68	96/0	72/0	72/144	96/0	0/0	72/0	96/0	
<i>R. stolonifer</i>	48/68	72/0	48/24	72/120	96/0	0/0	96/0	96/264	
<b>Zanahoria</b>									
<i>C. gloeosporoides</i>	68/68	72/0	72/120	72/96	120/0	0/0	0/0	72/144	
<i>F. oxysporum</i>	24/68	96/0	72/144	120/0	0/0	0/0	0/0	72/0	
<i>R. oryzae</i>	48/68	72/0	72/0	72/120	0/0	0/0	0/192	72/0	
<i>R. stolonifer</i>	48/68	0/0	24/72	72/120	0/0	0/0	0/0	72/0	

CM: Crecimiento miceliar; NC: Necrosis; Pudrición blanda; DD: Deshidratación. a= 28-30°C; b= 4°C. En letra normal el tiempo de aparición (horas) del síntoma en muestras control sin mezquite. En letra cursiva tiempo de aparición del síntoma en muestras con tratamiento con mezquite.

**CONCLUSIONES**

La actividad antifúngica del extracto de hojas de mezquite (*P. glandulosa*) confirmada *in vitro* e *in vivo* evidencia su potencial fungitóxico y es un valioso prospecto para enriquecer con antioxidantes la formulación de cubiertas y/o películas para la bioconservación de frutas y hortalizas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dhananjaya SP, Dahms HU, Malliga P. 2014. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp -a Review. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(11): 918-924.
- Deuschländer MS, de Venter V, Roux M, Louw S, Lall, N. 2009. Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 124 (3): 619-624
- de Souza Cândido E, Soares Pinto MF, Barbosa Pelegrini P, Bergamin Lima T, Nascimento Silva O, Pogue R, Grossi-de-Sá MF, Franco OL. 2011. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal* 25: 1-16.
- dos Santos EJ, de Albuquerque Pereira ML, Presídio Almeida PJ, Vitória Moreira J, Santos de Souza AC, Ramos Pereira CA. 2015. Mesquite pod meal in sheep diet: intake, apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 37(1): 55-59.
- FAO, 2010. Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales (FRA-2010)  
Disponible en: <http://www.fao.org/forestry/static/data/fra2010/KeyFindings-es.pdf>.
- García-Andrade M, González-Laredo RF, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Rosales-Castro M, Medina-Torres L. 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*, 44: 336–342.
- Huisamen B, George C, Genade S, Dietrich D. 2013. Cardioprotective and anti-hypertensive effects of *Prosopis glandulosa* in rat models of pre-diabetes. *Cardiovascular Journal of Africa* 24(2):10-16.
- Johnson BD, Shringi BN, Patidara DK, Suresh Chalichem NS, Kumar Javvadi A. 2011. Screening of Antimicrobial Activity of Alcoholic & Aqueous extract of Some Indigenous Plants. *Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences* 1 (2): 186-193.
- Sharma D, Singla YP. 2013. Evaluation of antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of *Prosopis cineraria* (Linn.) in wistar rats. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2 (4): 751-758.
- Wang SY, Chen PF, Chang TS. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96: 813-818.