CUBIERTA BIOACTIVA CON MEZQUITE Y QUITOSANO: ENSAYOS *in vitro* E *in vivo* CONTRA *C. gloeosporioides, F. oxysporum, Rhizopus oryzae y R. stolonifer*

De la Fuente-Salcido NM[a,*], Pimentel A[a], Valenzuela A[a], Gutiérrez E[a], Valencia C. CM[a], Villarreal P. JM[a], Salcedo Hernández R[b], Barboza-Corona JE[b], Castañeda Ramírez JC[c]

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:

Se investigó la eficacia *in vitro* e *in vivo* de una cubierta bioactiva con extracto de mesquite (EM) y quitosano para el biocontrol postcosecha de hongos de plantas (*C. gloeosporoides, F. oxysporum, R. oryzae* y *R. stolonifer*) en frutas y hortalizas (fresas, tomates cherry y zanahorias baby). Separadamente se investigó la eficiencia del EM y quitosano (0, 1, 2, 4 y 5%) para retrasar el crecimiento de hongos y los mejores resultados fueron con 2 y 4% de quitosano BPM y 5 ME %. Se formuló la cubierta o recubrimiento con EM 5%, glicerol 1% como plastificante y 2 o 4% de quitosano (pH: 4,0, 4,8 y 5,2 y viscosidad; 63, 164 y 1180 cp) y se determinó su eficacia *in vitro* e *in vivo*. La fórmula con 5% EM, glicerol I% y 4% quitosano *in vitro*, retrasó el crecimiento de todos los hongos utilizados.
Los principales efectos microscópicos fueron ramificación hifal en *C. gloeosporoides*, hinchazón hifal en *F. oxysporum* y aumento de densidad hifal en *R. oryzae y R. stolonifer*. *In viivo* la cubierta fue menos eficaz contra *C. gloeosporoides* (fresa) y *Rhizopus* (zanahoria) que mostraron síntomas de deshidratación y la pudrición blanda a los 8 y 12 días respectivamente.

ABSTRACT:

The efficiency *in vitro* and *in vivo* of a bioactive coating formulated with chitosan and mesquite extract was investigated for postharvest biocontrol of plant pathogenic fungi (*C. gloeosporoides, F. oxysporum*, *R. oryzae* and *R. stolonifer*) in fruit and vegetables (strawberry, cherry tomatoes and baby carrots). Separately chitosan and mesquite extract (ME) efficiency (0, 1, 2, 4 and 5%) was tested to delay fungal growth and the best results obtained with 2 and 4% chitosan ME BPM and 5%. A bioactive coating formulated with 5% EM, 1% glycerol as plasticizer and 2 or 4% chitosan (pH: 4.0, 4.8 and 5.2 and viscosity of 63, 164 and 1180 cp) and its efficiency *in vitro* and *in vivo* was tested. The coating with 5% EM, I% glicerol, 4% chitosan was the most effective in the *in vitro* bioassays, fungal growth delay in all the tested fungi.
The mains microscopic effects observed were hyphal branching in *C. gloeosporoides*, hyphal swelling in *F. oxysporum* and hyphal density increased in *R. oryzae* and *R. stolonifer*. *In viivo* the coating was less effective against *C. gloeosporoides* (strawberry) and *Rhizopus* (carrot) showing signs of pathogenicity as dehydration and soft rot at 8 and 12 days respectively.

Palabras clave:

Prosopis glandulosa, Quitosano, Cubierta

Keyword:

Prosopis glandulosa, Chitosan, Coatings

Área: Frutas y Hortalizas

INTRODUCCIÓN

Las películas y cubiertas (recubrimientos) comestibles son útiles para incrementar la vida útil postcosecha de productos hortofrutícolas. Las cubiertas a base de quitosano durante años han sido las más utilizadas porque no son tóxicas y son biodegradable. Para mejorar las propiedades de los revestimientos a base de quitosano e incrementar los efectos como conservador, actualmente se combina con compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, agentes de control biológico, o bien se tratan térmicamente (Jianglian and Shaoying 2013). Lo anterior genera a una extensa investigación para obtener nuevas fórmulas de películas y recubrimientos adicionados con agentes antimicrobianos para la bioconservación de frutas y hortalizas, y lo más novedoso incluye la incorporación de antioxidantes naturales (Eca *et al*., 2014).

La incorporación de antioxidantes naturales puede modificar la estructura y mejorar la funcionalidad y aplicación de cubiertas en los alimentos, también mejorar las propiedades sensoriales y agregar valor a los productos alimenticios, aumentando su vida útil (Bonilla *et al.*, 2013). Además, la adición de antioxidantes a la formulación de películas y cubiertas mejora la función conservante, inhibe el pardeamiento y reduce los efectos indeseables de los productos de la oxidación (Pastor *et al.*, 2011;. Bonilla *et al.*, 2010).

En este trabajo se investigó la eficiencia de una cubierta o recubrimiento formulado con quitosano adicionado con un antioxidante (extracto de mezquite) y se determino su efectividad para el biocontrol postcosecha de hongos fitopatógenos (*C. gloeosporoides, F. oxysporum, R. oryzae y R. stolonifer*) en frutas y hortalizas (fresa, tomate cherry y zanahoria baby).

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento de hongos fitopatógenos

Los hongos *Fusarium oxysporum, Rhizopus oryzae y R. stolonifer* aislados de productos hortofrutícolas de Guanajuato e identificados molecularmente (Castañeda *et al*., 2015) y *Colletotrichum gloeosporoides* ATCC 42374 se crecieron en agar papa dextrosa (APDA) (BIOXON) acidificado ($C_4H_6O_6$ 10% v/v) inoculando 3 µL de esporas ($1x10^5$ esporas/mL) de cada hongo, se incubaron 7 días a 30º C y se registró el crecimiento miceliar.

Bioensayos con quitosano

Se prepararon soluciones de quitosano (SIGMA) de bajo y medio peso molecular (BPM y MPM) con grados de desacetilación **≥** 75.0 % y 75-85 % respectivamente, diluyendo con ácido acético al 1%. Estas soluciones se mezclaron con APDA para obtener concentraciones finales de 0 (control), 1, 2, 4%, 5% para verificar el efecto del quitosano *in vitro.* El agar se plaqueó y se inoculó con 3 µL de esporas de cada hongo ($1x10^6$), se incubaron por 7 días a 30ºC y se determinó el crecimiento radial.

Bioensayos con extracto de mezquite (EM)

Hoja, flor y rama de mezquite (*P. glandulosa*), se deshidrataron (70ºC/4 días), se molieron y tamizaron. Por el método de decocción (95 °C/3 min) y por filtrado con papel filtro (Whatman, UK) se obtuvieron 3 extractos (500 mg/mL). Se determinó la capacidad fitotóxica de cada

extracto de mezquite mezclándolo con APDA a concentraciones finales de 0, 1, 2, 4 y 5% de EM, se plaqueo en cajas Petri, se inocularon por triplicado con 3 µL de suspensión de esporas de cada hongo y se incubaron a 30ºC por 7 días. Para establecer *in vitro* el efecto inhibitorio del EM sobre el desarrollo de cada hongo se registró diariamente el crecimiento miceliar.

Bioensayos con la cubierta bioactiva

- Diseño y características de la cubierta

La cubierta bioactiva se formuló con quitosano BPM (2 o 4%,) y extracto de mezquite (500 mg/mL) esterilizado por filtración, se adicionó glicerol (1%) grado alimenticio como plastificante y se homogenizaron por 12 hr a 200 rpm. Por triplicado se determinó en la cubierta el pH y la viscosidad a 31ºC y 50 rpm con una aguja del No. 2 en un viscosímetro DV-II+Pro (BROOKFIELD).

- Estudios *in vitro*

Los componentes de la cubierta biocativa (quitosana, EM, glicerol) se mezclaron con APDA para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 5 % de quitosana, 5% (v/v) de EM y 1% de glicerol, se plaquearon por triplicado y se inocularon con 3 µL de suspensión de esporas de cada hongo y se incubaron a 30ºC por 7 días.. Se realizó un control de cada hongo en APDA por triplicado incubado en las mismas condiciones. La efectividad *in vitro* de la cubierta se determinó al comparar el crecimiento radial de cada hongo en las diferentes formulaciones.

- Estudios *in vivo*

Se utilizaron como sistemas modelos fresa, zanahoria baby y tomate cherry sanitizadas y se les aplicó por inmersión dos formulaciones de la cubierta al 2 y 4% de quitosano, ambas con 5% de EM y 1% de glicerol. Se dejaron secar en la campana de flujo laminar y se inocularon con 3 µL de suspensión de esporas de cada hongo. Los modelos se colocaron en cámara húmeda por 14 días a temperatura ambiente (25-30 ºC) y en refrigeración a 4 ºC por triplicado. Se realizaron dos controles de los modelos sin sanitizar y sin la cubierta bioactiva y se mantuvieron en las mismas condiciones que los modelos con cubierta. Se registró diariamente el desarrollo del crecimiento miceliar (CM), necrosis (NC), pudrición blanda (PB) y deshidratación (DH) en los modelos para determinar la efectividad de la cubierta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos con quitosano

El quitosano de BPM mostró en general un mayor retraso del crecimiento de los hongos que el de MPM, y de acuerdo a los resultados observados en las graficas de la Figura 1, se seleccionaron las concentraciones de 1%, 2 y 4% para formular la cubierta bioactiva.

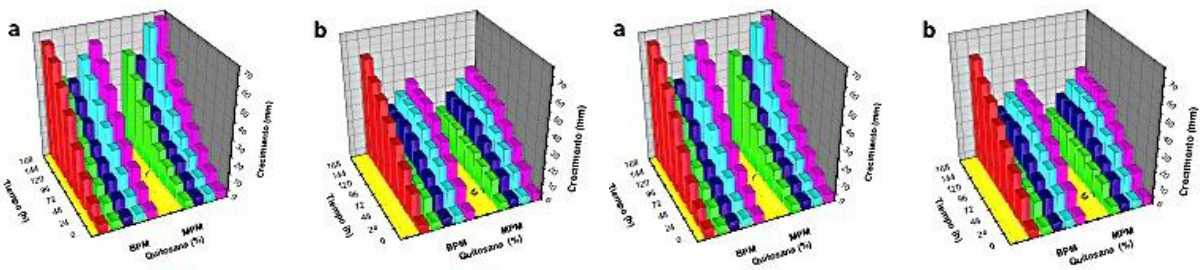

Figura 1. Crecimiento de hongos en presencia de Quitosano (BPM y MPM). a) *C. gloeosporoides, b) F. oxysporum, c) R. oryzae, d) R. stolonifer* en quitosano (rojo: 0%, verde:5%, azul fuerte: 4%, azul claro 2%, rosa: 1%).

Bioensayos con extracto de mezquite (EM)

El efecto del EM contra el crecimiento de todos los hongos ensayados fue inhibitorio, encontrándose mayor retraso del crecimiento en *C. gloeosporoides* y *F. oxysporum* a 2, 4 y 5% de EM. Sin embargo ambos *Rhizopus* solo se ven afectados con un 5% del EM en el medio de cultivo (Figura 2), y por tanto se utilizó esta concentración para formular la cubierta.

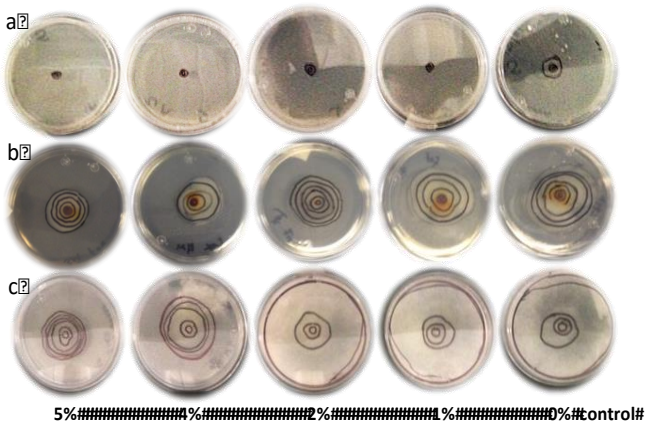

Figura 2. Bioensayos de diferentes concentraciones de extracto de mezquite y registro del crecimiento a los 5 días de incubación de a) *C. gloeosporoides, b) F. oxysporum, c) R. oryzae.*

Bioensayos con la cubierta bioactiva

Las 3 formulaciones de la cubierta con concentraciones fijas de EM (5% v/v) y plastificante (glicerol 1%), y con diferentes concentraciones de quitosano BPM (1, 2, 4%) tuvieron valores de pH de 4.0, 4.8 y 5.2 y una viscosidad de 63, 164 y 1180 cp respectivamente.

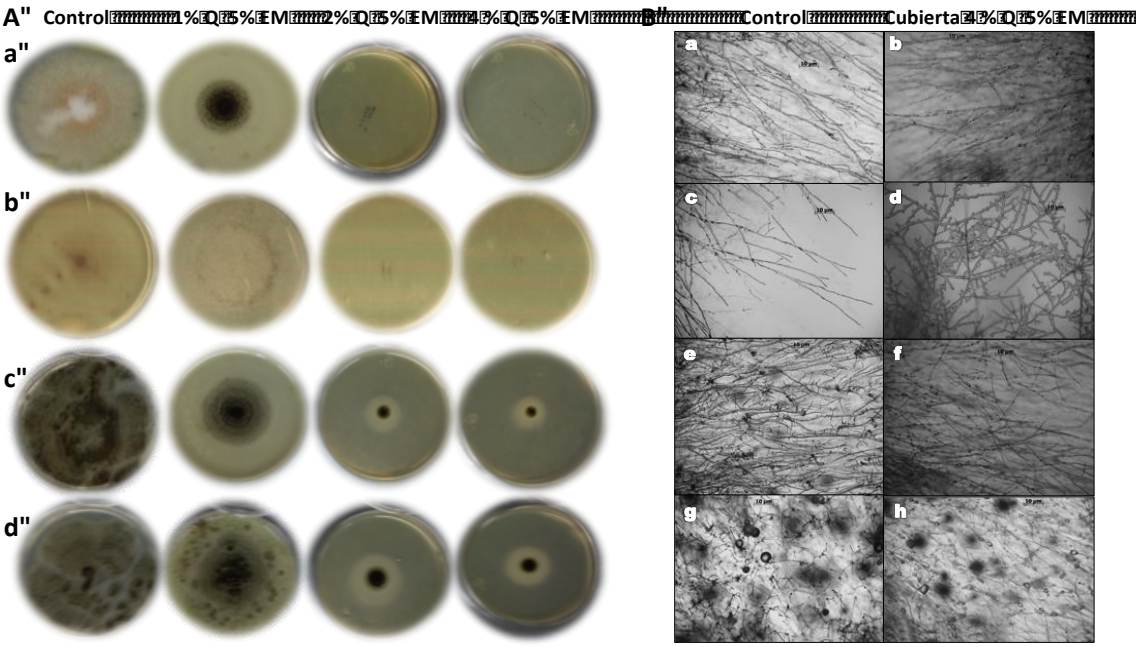

Figura 3. Bioensayos *in vitro* de la cubierta bioactiva. A) Crecimiento de *C. gloeosporoides* a); *F. oxysporum* b); *Rhizopus oryzae* y *R. stolonifer* d). de la cubierta. B) Vista microscópica del efecto del la cubierta sobre morfología de los hongos a, c, e y f controles sin cubierta y b, d, f y h cubierta a la derecha de cada hongo visualizado.

Estudios *in vitro.*

La cubierta *in vitro* retrasó el crecimiento fúngico, principalmente contra la alta velocidad de crecimiento los *Rhizopus,* causantes de pudrición blanda. Estos hongos mostraron la menor susceptibilidad al ensayarlos independientemente en EM y quitosano (Figura 3A).

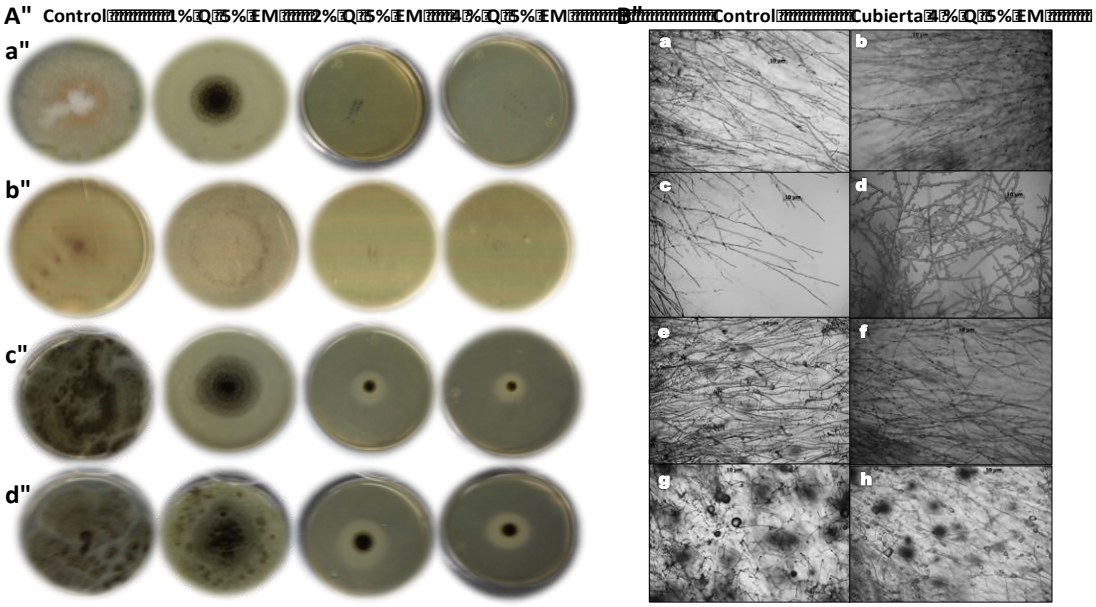

Figura 3. Bioensayos *in vitro* de la cubierta bioactiva. A) Crecimiento de *C. gloeosporoides* a); *F. oxysporum* b); *Rhizopus oryzae* y *R. stolonifer* d). de la cubierta. B) Vista microscópica del

efecto del la cubierta sobre morfología de los hongos a, c, e y f controles sin cubierta y b, d, f y h cubierta a la derecha de cada hongo visualizado.

Microscópicamente la fórmula de la cubierta provocó ramificación hifas en *C. gloeosporoides* (Figura 3 B, b), "hinchazón" en *F. oxysporum* (Figura 3 B, d) y un aumento en la densidad de hifas en los *Rhizopus* (Figura 3 B f, h), pero mucho más cortas que las observadas en el control sin aplicar la cubierta (Figura 3 e, g). Esto se explica porque las hifas del margen de la colonia determinan el diámetro, tienen prioridad para utilizar los nutrientes disponibles sobre todas las demás hifas, es decir, las ramificaciones. Solo los nutrientes en exceso requeridos por las puntas de hifas marginales están disponibles para apoyar la ramificación y los nutrientes producen una mayor densidad hifal (Shovan *et al*, 2008; www.fungionline.org.uk).

Estudios *in vivo*.

La cubierta o recubrimiento ensayado mostró efectividad cuando se aplicó a fresa, tomate cherry y zanahoria baby pero solamente al almacenarse en refrigeración por 14 días, pués en fresa inoculada con *C. gloeosporoides* y *R. oryzae* se presenta crecimiento miceliar a los 8 y 12 días de almacenamiento respectivamente (Figura 4 a y c indicado con flecha). Los modelos que se inocularon en las mismas condiciones pero se incubaron a temperatura ambiente (30ºC) aún con la cubierta fueron susceptibles a crecimiento miceliar, necrosis, pudrición blanda y deshidratación, principalmente en fresa (Figura 4 a´, b´, c´y d´).

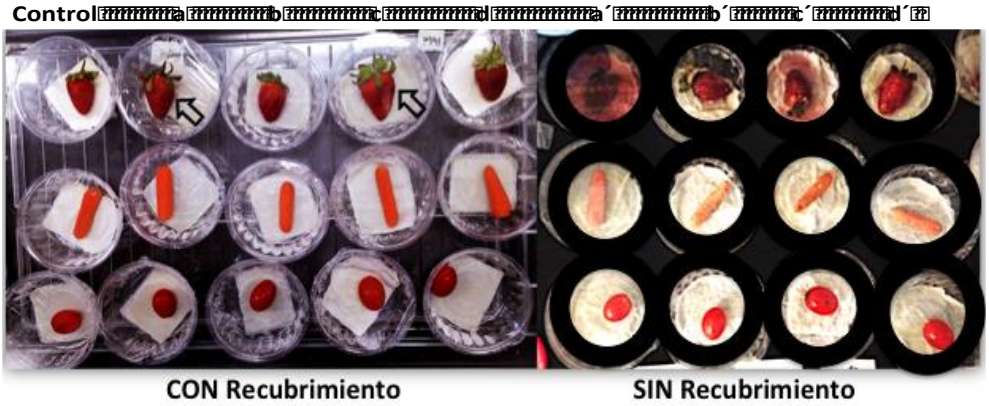

Figura 4. Bioensayos *in vivo* de la cubierta bioactiva. a) *C. gloeosporoides, b) F. oxysporum, c) R. oryzae*, d) *R. stolonifer*, control (sin inocular) incubados en refrigeración. En a´, b´, c´ y d´ se indican los mismos hongos incubados a temperatura ambiente (30ºC).

CONCLUSIONES

La cubierta bioactiva formulada con extracto de mezquite y quitosano preliminarmente se considera una excelente alternativa como tratamiento biodegradable para bioconservar postcosecha frutas y hortalizas altamente perecederas y económicamente importantes.

BIBLIOGRAFÍA

Bonilla J, Talón E, Atarés l, Vargas M, Chiralt A. 2013. Effect of the Incorporation of Antioxidants on Physicochemical and Antioxidant Properties of Wheat Starch-Chitosan Films. Journal of Food Engineering 118(3): 271-278.

Bonilla J, Chiralt A. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. Journal of Food Engineering 100 (4): 678-687.
Eca KS, Sartori T, Menegalli FC. 2014. Films and edible coatings containing antioxidants - a review. Brazilian Journal of Food Technology 17(2): 98-112.
Fungi Online. Disponible en: http://www.fungionline.org.uk/5kinetics/4solid_media.html.
Jianglian D, Shaoying Z (2013) Application of Chitosan Based Coating in Fruit and Vegetable Preservation: A Review. Journal of Food Process Technology 4: 227- 238.
Pastor C, Sánchez-González L, Chiralt A, Cháfer M, González-Martínez C. 2013. Physical and Antioxidant Properties of Chitosan and Methylcellulose Based Films Containing Resveratrol. Food Hydrocolloids 30 (1): 272-280.
Shovan LR, Bhuiyan MKA, Begum JA, Pervez Z. 2008. *In vitro* control of *Colletotrichum dematium* causing anthracnose of soybean by fungicides, plant extracts and *Trichoderma harzianum.* International Journal of Sustain Crop Production 3(3):10-17.