

## RECUBRIMIENTOS FORMULADOS CON QUITOSANO Y EXTRACTOS DE MEZQUITE PARA EL CONTROL DE *Fusarium verticilloides*

A.N. López-Anchondo<sup>a,b\*</sup>, M.S. Linaje-Treviño<sup>a</sup>, C.M. Valencia-C., N.M. De la Fuente-Salcido<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Bioprospección y Bioprocesos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Campus-Torreón. Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5, CP 27104 Torreón, Coahuila, México. <sup>b</sup> Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 206, Carr. Torreón-Mieleras km 3, CP 27084 Torreón, Coahuila, México. \*normapbr322@hotmail.com

### RESUMEN:

En la actualidad la intoxicación por alimentos se ha vuelto un problema recurrente, motivo por el cual los consumidores desean adquirir productos que mantengan su buen estado el mayor tiempo posible. El propósito de esta investigación es comprobar la eficacia de los recubrimientos alimentarios a base de quitosano, adicionándolos con extractos de mezquite (*Prosopis leavigata*) autóctono de Irapuato, Guanajuato, contra el hongo *Fusarium verticilloides*, realizando estudios en frutas y verduras (fresa, manzana, tomate cherry y zanahoria baby). Se evaluó su efecto antifúngico *in vitro* al mezclar agar PDA y los recubrimientos de mezquite a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, y 5 %) y se plaqueó por triplicado, posteriormente se inocularon con 3µl de esporas del hongo, se incubaron por 7 días a 30°C y se midió su crecimiento miceliar diariamente con el fin de establecer la inhibición de cada extracto. Con el propósito de comprobar su efectividad en los productos hortofrutícolas se realizaron estudios *in vivo*, en los cuales fresas, manzanas, tomates cherry y zanahorias baby fueron inmersos en los recubrimientos (30 s), se colocaron en cámaras húmedas y se incubaron en refrigeración por 13 días, adicionalmente se repitió el proceso colocando 3µl de esporas a las frutas y hortalizas.

### ABSTRACT:

Currently food poisoning has become a recurring problem, why consumers want to buy products that maintain their good conditions as long as possible. The purpose of this research is to test the effectiveness of chitosan coatings, adding them with extracts of mesquite (*Prosopis leavigata*) against *Fusarium verticilloides*, studding in fruits and vegetables (strawberry, apple, cherry tomatoes and baby carrots). The antifungal effect *in vitro* was evaluated by mixing agar PDA and mesquite coatings at different concentrations (0, 1, 2, 4, 5 %) and plated in triplicate subsequently inoculated with 3µl of spore, incubated for 7 days at 30°C and mycelia growth was measured daily in order to establish inhibition of each extract. In order to check the effectiveness in the fruit and vegetable products *in vivo* studies were performance, in which strawberry, apples, cherry tomatoes and baby carrots were immersed in coatings (30 s), they were placed in humid chambers for 13 days, placing further the process 3µl spore was added in fruits and vegetables.

**Palabras clave:** Cubierta, *Fusarium verticilloides*, Quitosano

**Keywords:** Chitosan, coating, *Fusarium verticilloides*

**Área:** Frutas y Hortalizas}

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las pérdidas post-cosecha de productos hortofrutícolas son por bajo peso, infecciones fúngicas y cambios fisiológicos que se han evitado con almacenamiento en frío y tratamientos con fungicidas químicos (SIAP, 2008). Sin embargo, la aplicación indiscriminada de productos químicos ha conducido a problemas de salud en los consumidores y daño al medio ambiente. Lo anterior sugiere la necesidad de alternativas benéficas para la salud de consumidores y la preservación de los productos frescos. Los recubrimientos comestibles con compuestos naturales proporcionan una capa delgada sobre los alimentos que mejoran su apariencia, evitando la pérdida de oxígeno, humedad, aroma y dióxido de carbono, logrando así extender la vida útil de frutas y verduras durante su almacenamiento (Aide, et al., 2015).

El uso del quitosano como recubrimiento antimicrobiano se ha estudiado extensivamente porque es considerado como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drugs Administration) (Wang y Luo, 2013) además de retrasar la aparición de hongos (Benhabiles, Drouiche, Lounici, Paus, & Mameri, 2013). La combinación de quitosano con antioxidantes naturales de extractos de plantas pueden modificar su estructura, mejorar su funcionalidad y aplicación en frutas y verduras enteras o troceadas (Li, et al., 2014; EÇA et al., 2014).

En este trabajo se desarrolló un nuevo recubrimiento comestible con propiedades antifúngicas combinando quitosano y extractos de mezquite (*Prosopis laevigata*), contribuyendo en la investigación en tecnología de los alimentos. Se determinó el efecto antifúngico de las cubiertas *in vitro* e *in vivo* contra el hongo *Fusarium verticilloides* en productos hortofrutícolas (fresa, manzana, tomate cherry y zanahoria baby) y además se evaluó algunas de las propiedades antioxidantes y físico-químicas de las cubiertas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de los extractos de mezquite.

Se obtuvieron extractos (500 mg/mL) por decocción (95°C/3 min) de hoja, flor, rama, vaina, carozo y semilla de mezquite (*P. laevigata*), se deshidrataron (70°C/4 días), se molieron y tamizaron.

### Formulación de recubrimientos

Se prepararon soluciones quitosano (SIGMA) (2%) de bajo peso molecular con ácido acético al 1 % (v/v), extracto de mezquite (5%) y glicerol (1%) como plastificante y se homogenizó por 24 horas.

### Actividad antioxidante y pH

La capacidad antioxidante se determinó con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) (Prieto et al, 2012). La medición de pH de los diferentes recubrimientos se realizó con sensor de pH Neulog (Fisher Scientific).

### **Actividad antifúngica *in vitro* de mezquite**

El efecto inhibitorio de los extractos se realizó combinando agar papa dextrosa (PDA) con los recubrimientos a concentraciones finales de 0,1, 2 y 4 %, se plaquearon por duplicado, se inocularon con 3 $\mu$ L de esporas de *F. verticilloides* y se incubaron a 30°C/7 días. Se registró el crecimiento micelial (mm) en PDA (control) y adicionado con los recubrimientos para calcular el índice antifúngico (% inhibición) descrito por Wang *et al.* (2005).

### **Evaluación de color**

La medición de color se realizó en fresas, tomate cherry y zanahoria baby sin cubierta (control) y con cubierta a base de quitosano y plastificante y cubiertas con los diferentes extractos y plastificante. Se utilizó un colorímetro CR-400 (Japón) determinando los parámetros de color CIEBLAB L\*a\*b\*.

### **Actividad antifúngica *in vivo***

Se realizaron pruebas de fitopatogenicidad utilizando como modelos los productos hortofrutícolas fresa, manzana, tomate cherry y zanahoria baby sanitizadas con peróxido de hidrogeno 3 % y etanol al 70 %. El quitosano adicionado con los diferentes extractos se aplicó por inmersión a la fresa, manzana, tomate cherry y zanahoria baby, posteriormente se colocaron en cámaras húmedas por 13 días en refrigeración a 4°C por triplicado. Adicionalmente se repitió el procedimiento inoculando los modelos con 3 $\mu$ L de esporas de *F. verticilloides* y se mantuvieron en las mismas condiciones. Se registró el tiempo (h) transcurrido para el desarrollo de síntomas de fitopatogenicidad fúngica y el desarrollo de crecimiento micelial (CM), necrosis (NC), pudrición blanda (PB) y deshidratación (DH) de cada fruto.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistic Inc., Rockville, MD, USA). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se determinaron por análisis de varianzas (ANOVA).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Actividad antioxidante y pH**

La actividad antioxidante es expresada por el porcentaje de inhibición, correspondiente a la cantidad de radical DPPH neutralizado por los diferentes recubrimientos tabla I). El tratamiento que tuvo una mayor capacidad antioxidante fue Flor Etanol (30.73%). Los pH de los recubrimientos Rama Acetona (RA), Hoja Acuoso (HA), Carozo Acuoso (CA), Flor Etanol (FE), Flor Acetona (FA) y Quitosano BPM (QBPM) fueron 4.28, 4.42, 4.35, 3.99, 4.49 y 4.51 respectivamente.

Tabla I Capacidad antioxidante de recubrimientos							
% de inhibición							
Concentración	HE	FE	HA	RA	FA	QBPM	AC
1	12.71	30.73	17.42	18.15	10.72	-0.97	0.46
1/2	2.50	-1.20	7.48	0.00	0.00	-7.98	-5.96
1/4	-6.42	-4.05	5.79	-4.10	0.30	-2.66	-6.60
1/16	7.27	1.35	5.65	2.97	-3.13	-0.70	1.43
1/32	7.72	0.71	5.78	9.15	2.89	4.27	4.33
1/64	11.76	2.29	3.04	4.55	1.94	6.30	-4.33
1/128	8.39	0.78	0.78	7.28	2.01	4.05	1.69
1/256	5.00	0.00	-1.20	3.56	-0.81	6.92	-1.24

### Actividad antifúngica *in vitro*

El recubrimiento de quitosano BPM con una concentración de 5% de extracto presenta una de las mayores inhibiciones del crecimiento del hongo *F. verticilloides* a partir de las 24 hora., Los extractos con mayor eficacia fueron los de Rama con Acetona, Hoja con Etanol y Flor con Etanol con un índice antifúngico máximo de 76.29, 85.57 y 95.88 %, respectivamente a la máxima concentración. El extracto de Flor Acetona presentó la menor inhibición 51.55 % de índice antifúngico en la concentración al 4 %.

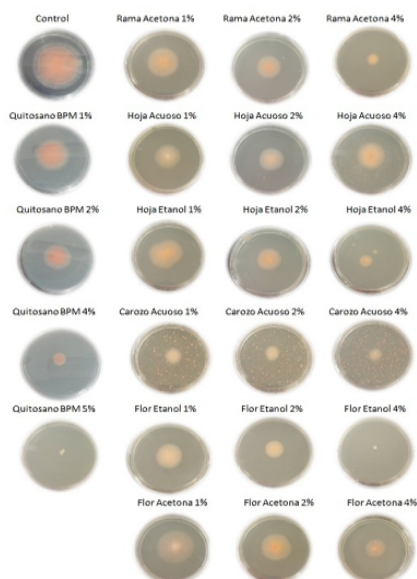


Figura 1 Crecimiento miceliar de *F. verticilloides* en PDA con recubrimientos de quitosano con diferentes extractos de mezquite.

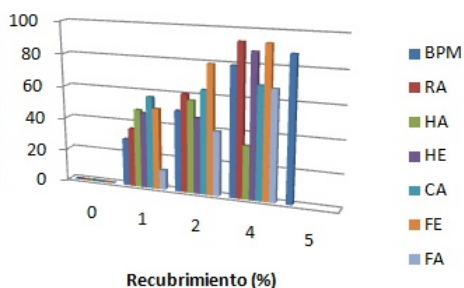


Figura 2 Índice antifúngico de *F. verticilloides*

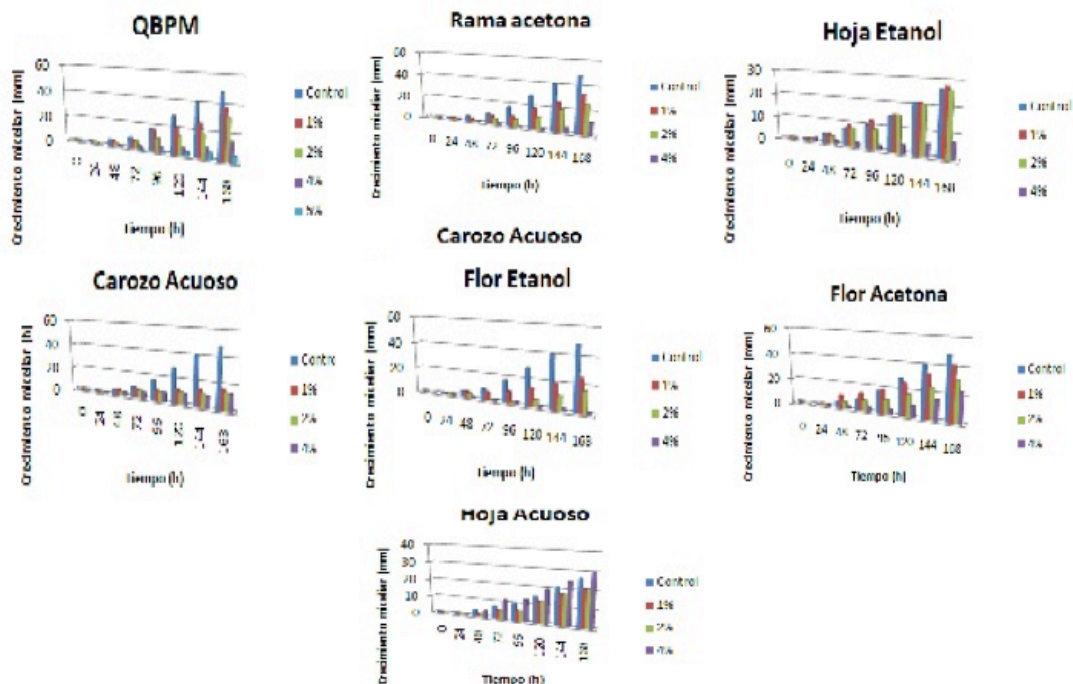


Figura 3 Actividad antifúngica *in vitro* de los recubrimientos contra *F. Verticilloides*

### Evaluación del color

Al analizarse el color externo de fresa, tomate cherry y zanahoria baby al aplicársele 8 diferentes tratamientos mostraron una mayor diferencia en la coloración las zanahorias baby con respecto al control, el cual mostró una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos. Con respecto a las fresas, se detectó una coloración similar entre ellas con todos los tratamientos aplicados, incluso con el control sin quitosano, lo cuál indica que en esta frutilla los extractos no modifican el color y por lo tanto la apariencia. En la tabla II se observan los valores numéricos determinados por colorimetría triestímulo y la diferencia estadística con vocales.

Tabla II: Color externo de productos hortofrutícolas									
Tratamiento	Parámetros de colorimetría triestímulo								
	Fresa			Zanahoria baby			Tomate cherry		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
1 Control Sin cubierta	34.187 <sup>a</sup>	26.503 <sup>a</sup>	14.573 <sup>a</sup>	55.633 <sup>f</sup>	30.253 <sup>f</sup>	47.087 <sup>f</sup>	37.73 <sup>g</sup>	18.593 <sup>g</sup>	18.54 <sup>g</sup>
2 Q BPM 2%	36.903 <sup>b</sup>	33.577 <sup>b</sup>	24.97 <sup>b</sup>	50.94 <sup>e</sup>	24.78 <sup>e</sup>	36.83 <sup>e</sup>	38.663 <sup>gh</sup>	23.96 <sup>gh</sup>	20.563 <sup>gh</sup>
3 Hoja Acuoso	30.407 <sup>ab</sup>	34.047 <sup>ab</sup>	19.463 <sup>ab</sup>	48.547 <sup>de</sup>	21.32 <sup>de</sup>	34.903 <sup>de</sup>	39.317 <sup>h</sup>	24.98 <sup>h</sup>	23.913 <sup>h</sup>
4 Carozo Acuoso	31.247 <sup>a</sup>	31.283 <sup>a</sup>	14.767 <sup>a</sup>	49.047 <sup>cd</sup>	17.37 <sup>cd</sup>	32.827 <sup>cd</sup>	38.667 <sup>gh</sup>	20.343 <sup>gh</sup>	19.49 <sup>gh</sup>
5 Rama Acetona	33.85 <sup>ab</sup>	33.15 <sup>ab</sup>	18.227 <sup>ab</sup>	52.04 <sup>e</sup>	20.753 <sup>e</sup>	36.683 <sup>e</sup>	39.317 <sup>g</sup>	16.88 <sup>g</sup>	21.533 <sup>g</sup>
6 Flor Acetona	29.467 <sup>a</sup>	33.213 <sup>a</sup>	16.97 <sup>a</sup>	49.03 <sup>e</sup>	22.6 <sup>e</sup>	36.11 <sup>e</sup>	40.05 <sup>h</sup>	25.203 <sup>h</sup>	22.393 <sup>h</sup>
7 Hoja Etanol	34.333 <sup>a</sup>	26.86 <sup>a</sup>	15.84 <sup>a</sup>	50.167 <sup>cde</sup>	20.42 <sup>cde</sup>	33.98 <sup>cde</sup>	38.143 <sup>gh</sup>	24.143 <sup>gh</sup>	18.12 <sup>gh</sup>
8 Flor Etanol	29.447 <sup>a</sup>	31.323 <sup>a</sup>	14.977 <sup>a</sup>	46.527 <sup>c</sup>	17.477 <sup>c</sup>	32.4467 <sup>c</sup>	38.647 <sup>gh</sup>	23.187 <sup>gh</sup>	20.51 <sup>gh</sup>

### **Actividad antifúngica *in vivo***

La aplicación de los recubrimientos en productos hortofrutícolas presenta una amplia variación en los diferentes síntomas de patogenicidad especialmente en aquellos no fueron inoculados con esporas de *F. verticilloides*, sin embargo mostraron una disminución en la susceptibilidad para desarrollar los síntomas. Las fresas al ser más susceptibles al ataque de los hongos fue la primera en presentar pudrición blanda y crecimiento micelial, las zanahorias solo presentaron deshidratación en aquellas que fueron inoculadas con esporas del hongo.

Las manzanas presentaron una considerable disminución del oscurecimiento enzimático después de 13 días de almacenamiento en refrigeración. El tratamiento con menor efectividad tanto en las pruebas con y sin esporas fue Flor Acetona al igual que las pruebas *in vitro*.

### **CONCLUSIONES**

Impacto de este estudio: Indudablemente se evidencia el control biológico del crecimiento del importante fitopatógeno *F. verticillioides*, en todos los productos hortofrutícolas tratados con los recubrimientos de quitosano, y además el efecto antimicrobiano principal del polímero se potencia al agregar un extracto de mezquite con actividad antifúngica y alta capacidad antioxidante que permitió una mayor vida de anaquel.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- A., D. L. Z. M., Aide, S. G., Romeo, R. M., Raúl, R. H., Diana, J. C., & N., A. C. (2015). Edible candelilla wax coating with fermented extract of tarbush improves the shelf life and quality of apples. *Food Packing and Shelf life*, 3, 70-75.
- Carneiro L. P. K. K. N., Vasconcelos C. A. C., Pires do Santos J. C., Assis D. J., Oliveira S. C., Druzian J. I. (2014). Properties and Antioxidant Action of Active Cassava , Starch Films Incorporated with Green Tea and Palm Oil Extracts, 9 (9).
- Benhabiles, M. S., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., & Mameri, N. (2013). Effect of Shrimp chitosan coating as affected by chitosan extraction processes on postharvest quality of strawberry. *Food Measure*, 7, 215-221.
- Sitonio E. K., Menegalli F. C., Sartori T. (2014). Films and edible coating containing antioxidants - a review. *Campinas*, 17 (2), 98-112
- SIAP. 2008. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Avances de siembras y cosechas (en línea). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>.
- Wang, Q., & Luo, Y. (2013). Recent Advances of chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science. *Food Processing and Beverages*, 1(1).