

## Evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante de una nanoemulsión W/O de *Opuntia oligacantha* y aceite esencial de *Citrus X sinensis*

R. Solís-Silva<sup>1</sup>, A. Reyes-Munguía<sup>2</sup>, A. Madariaga-Navarrete<sup>1</sup>, G. Medina-Pérez<sup>1,3</sup>, R.G. Campos-Montiel<sup>1</sup>, A.J. Cenobio-Galindo<sup>1</sup>.

**1** Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario s/n Km.1 C.P. 43760, Tulancingo, Hgo., México. **2** Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí C.P. 79060, San Luis Potosí, México. **3** Programa de doctorado transdisciplinar, DCTS. Cinvestav Unidad Zacatenco, Ciudad de México.

[ruloshifu@gmail.com](mailto:ruloshifu@gmail.com)

### RESUMEN:

Se ha demostrado que el xoconostle (*Opuntia oligacantha*) es una excelente fuente de compuestos con posible actividad biológica, entre sus compuestos se encuentran ácidos fenólicos y flavonoides; los cuales tienen efecto antimicrobiano y antioxidante, efecto similar al mostrado por aceites esenciales como el de naranja, rico en terpenos y flavonoides. Desgraciadamente este tipo de metabolitos son lábiles, es decir que se degradan fácilmente al estar expuestos al ambiente, por lo que es necesario protegerlos en un sistema estable, como una nanoemulsión, permitiendo su disponibilidad por un tiempo prolongado. Se compararon muestras de filtrado de xoconostle, aceite esencial de naranja y nanoemulsión, se determinó la concentración de fenoles totales, actividad antioxidante mediante DPPH, además del crecimiento de *Colletotrichum gloesporoides*, encontrando que la nanoemulsión incrementa los compuestos fenólicos totales (409.37±22.14 mg EAG/ml) incrementando así la actividad antioxidante (357.85±29.26 mg EAG/ml). El crecimiento del hongo se ve afectado significativamente por los compuestos contenidos en la nanoemulsión respecto al testigo (17.1 y 21.25 mm respectivamente). Con lo cual, es posible elaborar una nanoemulsión que contiene una concentración importante de fenoles totales, capacidad antioxidante elevada y un efecto contra el crecimiento de *C. gloesporoides*, para su posterior aplicación en alimentos.

**Palabras clave:** Antioxidantes, *Colletotrichum*, Nanoemulsión

### ABSTRACT:

Several studies had reported that xoconostle (*Opuntia oligacantha*) is an excellent source of compounds with possible biological activity, among its compounds are phenolic acids and flavonoids; those compounds have antimicrobial and antioxidant effect, like that seen by essential oils such as orange, rich in terpenes and flavonoids. Unfortunately, these metabolites are degraded easily when are exposed to the environment, so it is necessary to protect them in a stable system, such as a nanoemulsion, allowing their availability for an extended time. Samples of xoconostle, orange essential oil and nanoemulsion were compared. Concentration of total phenols, antioxidant activity by DPPH, and the growth of *Colletotrichum gloesporoides* were determined, finding that nanoemulsion increases total phenolic compounds (409.37±22.14 mg EAG/ml) thus increasing antioxidant activity (357.85±29.26 mg EAG/ml). The growth of the fungus is significantly affected by the compounds contained in the nanoemulsion compared against a control (17.1 and 21.25 mm respectively). Thus, it is possible to produce a nanoemulsion containing a significant concentration of total phenols, high antioxidant capacity and an against growth effect of *C. gloesporoides*, for their subsequent application in a food matrix.

**Keywords:** Antioxidants, *Colletotrichum*, Nanoemulsion

## INTRODUCCIÓN

Más del 50% de las pérdidas de frutas y hortalizas frescas son causadas por especies de *Colletotrichum* (Awang *et al.*, 2011; Siddiqui y Ali, 2014). Este fitopatógeno está distribuido por todo el mundo y causa antracnosis a plantas frutales tropicales (André *et al.*, 2017). La severidad de esta enfermedad, conlleva el excesivo uso de fungicidas resultando una práctica costosa, poco eficaz y nociva para el ambiente (Pérez *et al.*, 2003). Recientemente, varios compuestos antifúngicos, incluyendo extractos de plantas han demostrado resultados prometedores para el control de enfermedades postcosecha causadas por *C. gloeosporioides* en algunos frutos como papaya, mango y aguacate (Xu *et al.*, 2017).

El xoconostle es un fruto que se utiliza como condimento en la cocina tradicional mexicana. La cáscara, pulpa y el endocarpio del xoconostle son un objetivo atractivo para la industria alimentaria, respecto a su composición nutricional, así como sus propiedades antioxidantes. Estudios anteriores concluyen este fruto es una buena fuente de compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos y flavonoides, que proporcionan una elevada capacidad antioxidante (Osorio-Esquivel *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2012). Sin embargo, estos metabolitos secundarios dependen de su preservación para asegurar su estabilidad, bioactividad y biodisponibilidad con lo cual existen bastantes limitaciones para su posible aplicación. Además, se ha demostrado que estos compuestos presentan una importante actividad contra algunos microorganismos como *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus Aureus* (Espinosa-Muñoz *et al.*, 2016). La utilización de polifenoles encapsulados, es una forma eficiente para el aprovechamiento de compuestos con actividad biológica (Pérez-Alonso *et al.*, 2015).

Existen reportes que muestran las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y bio-reguladoras de los aceites esenciales y por lo tanto pueden ideales para el uso como fungicidas. Su estatus aprobado por la Food and drug administration (FDA) y su amplia disponibilidad han facilitado la rápida comercialización de plaguicidas basados en estos aceites (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014). El aceite esencial de naranja tiene una marcada estabilidad antioxidante y antimicrobiana que se atribuye a la presencia de  $\alpha$ -tocoferol y D-limoneno; pero esta actividad antioxidante no sólo puede atribuirse exclusivamente a un componente específico, sino a una actividad sinérgica de los compuestos que tiene este aceite (Vargas-Arispuro *et al.*, 1998).

En los últimos años, la nanotecnología ha sido introducida con éxito en el campo de los alimentos debido a sus diversas ventajas, incluyendo tamaño pequeño, alta relación superficie-volumen, elevada solubilidad, aumento de la estabilidad, entre otras (Hak *et al.*, 2012). Esta tecnología ha sido ampliamente estudiada en diferentes formas, una de ellas son las nanoemulsiones. Una nanoemulsión es una dispersión coloidal termodinámicamente metaestable con gran potencial para resolver los problemas de solubilidad y estabilidad de sustancias activas naturales. Se conforma de una fase acuosa y una oleosa. En comparación con la emulsión tradicional, la nanoemulsión es translúcida y posee múltiples beneficios significativos y competitivos, tales como tamaño de partícula más pequeño, aumento de solubilización de ingredientes hidrófilos o hidrófobos y alta estabilidad cinética y termodinámica frente a la agregación y coalescencia (Erramreddy *et al.* 2014, Kim *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017) Además, se cree que el mismo componente encapsulado presenta una actividad antimicrobiana más alta en comparación con los compuestos sin encapsular (Zahi *et al.*, 2017).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante de la nanoemulsión W/O de xoconostle y aceite esencial de naranja y evaluar el efecto contra el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

En el presente trabajo se encontró que la nanoemulsión es un método estable y eficaz para mantener compuestos con actividad biológica, permitiendo la disponibilidad de estos para posibles aplicaciones en matrices alimentarias, por ejemplo, extendiendo la vida de anaquel retardando el crecimiento de un fitopatógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó xoconostle variedad *Opuntia oligacantha* var. Ulapa obtenido en el municipio de Tezontepec de Aldama, estado de Hidalgo. Se utilizaron frutos en estado de madurez fisiológica. La

extracción y filtrado de los compuestos bioactivos fue realizada de acuerdo al trabajo realizado por Pérez-Alonso *et al.*, 2015. La nanoemulsión fue del tipo agua en aceite W/O; para su elaboración los porcentajes que se utilizaron fueron: 70% de aceite de naranja (REASOL), 10% del filtrado de xoconostle y 20% de lecitina de soya en estado líquido como tensoactivo (REASOL). Esta mezcla se sometió a ultrasonido (Ultrasonido Sonics Vibra-cell) con sonda de 6 mm de diámetro durante 20 intervalos de 50 segundos de sonicación con periodos de descanso de 10 segundos usando 80% de amplitud con una frecuencia de 20 kHz, una vez obtenida la nanoemulsión se conservó en refrigeración protegida de la luz hasta su análisis y utilización. Se realizó la comparación entre el filtrado de xoconostle, el aceite esencial de naranja y la nanoemulsión.

Determinación de fenoles totales.

Se utilizó el método espectrofotométrico desarrollado por Singleton *et al.*, (1999), para la determinación de fenoles totales, las muestras se leyeron a 760 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por ml de nanoemulsión.

Determinación de actividad antioxidante por DPPH.

Este método se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH por antioxidantes (Brand-Williams *et al.*, 1995). Se tomó lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. El resultado fue expresado en mg de ácido ascórbico por ml de nanoemulsión.

Determinación del crecimiento del *Colletotrichum gloeosporioides*

Según la metodología desarrollada por Rondón *et al.*, (2006) con algunas modificaciones. El hongo fue obtenido del laboratorio de anatomía vegetal del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. El efecto de inhibición se determinó por método difusión en pozo en medio Papa-Dextrosa-Agar (P.D.A.) inoculadas con *C. gloeosporioides*. Cada pozo se inoculó con 100  $\mu$ l de muestra (filtrado de xoconostle, aceite esencial de naranja y nanoemulsión): Las cajas se incubaron a 28°C, se registró el crecimiento durante 7 días y el resultado se expresó en mm.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados fueron analizados por un ANOVA, cuando existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) se utilizó la prueba de comparación de medias Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el resultado de fenoles totales, donde se observa que la menor concentración se observó en el filtrado ( $37.74 \pm 0.17$  mg EAG/ml de nanoemulsión), del cual se adicionó solo en 10% para la elaboración de la nanoemulsión. Se ha reportado que el xoconostle es una fuente importante de fenoles totales, donde destacan algunos ácidos fenólicos como el protocatecuico, 4-hidroxibenzoico, cafeico, vanílico, y sirínico, además de algunos flavonoides como rutina y quercetina (Osorio-Esquivel *et al.*, 2011). El aceite esencial de naranja también presentó una concentración importante de fenoles totales ( $101.53 \pm 4.82$ ), esto debido a que presenta flavonoides como naringina, luteolina, rutina, kaempferol, y quercetina entre otros (Tenorio-Dominguez, 2016). La concentración mayor se encuentra en la nanoemulsión ( $409.37 \pm 22.14$  mg EAG/ml), y esto se debe a la combinación del filtrado de xoconostle y el aceite esencial de naranja, además del proceso utilizado para la elaboración de la nanoemulsión, pues el ultrasonido es un proceso bastante utilizado debido a su eficiencia para la extracción de compuestos bioactivos (Espinosa-Muñoz *et al.*, 2016). Se ha reportado que la actividad antioxidante en extractos naturales es derivada por ciertos compuestos, como los polifenólicos, los cuales son altamente efectivos como captadores de radicales libres y antioxidantes, es por eso que existe una elevada correlación entre los fenoles totales y la actividad antioxidante o algún efecto contra microorganismos (Pan *et al.*, 2008).

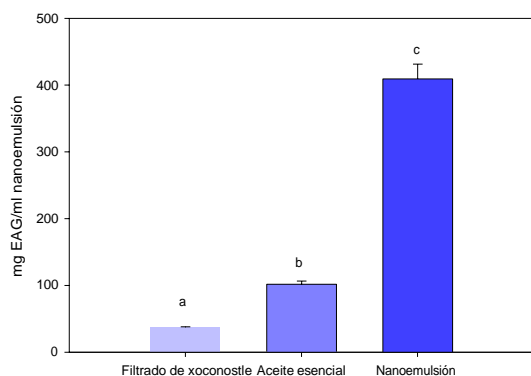


Figura 1. Resultado para fenoles totales. Los resultados se presentan en medias  $\pm$  desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

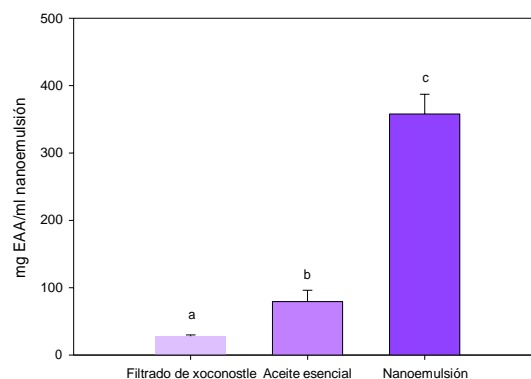
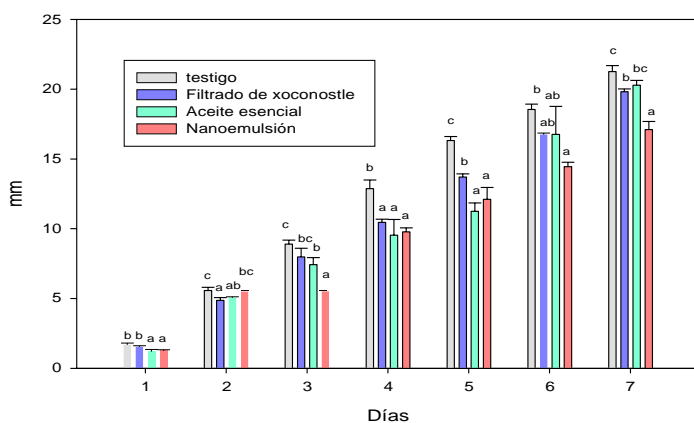


Figura 2. Resultado para DPPH. Los resultados se presentan en medias  $\pm$  desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

La figura 2 muestra el resultado para la actividad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH. Donde se observa que los compuestos bioactivos presentes en la nanoemulsión se incrementaron respecto a la adición del filtrado de xoconostle y el aceite esencial de naranja ( $357.85 \pm 29.26$ ,  $27.84 \pm 2.16$ ,  $79.34 \pm 16.94$  mg EAA/ml respectivamente), lo cual demuestra que los terpenos y flavonoides presentes en el aceite, como los compuestos bioactivos de filtrado no solo se mantienen, sino que se incrementan, resultado similar al encontrado para fenoles totales. Existen diversos reportes de la capacidad antioxidante del xoconostle (Hernández-Fuentes *et al.*, 2015; Espinoza-Muñoz *et al.*, 2016) y el aceite esencial de naranja (Tenorio-Dominguez, 2016) demostrando que son excelentes alternativas para ser utilizados en procesos alimentarios. Lou *et al.*, (2017) demostraron que los compuestos presentes en una nanoemulsión (aceite esencial de *Citrus medica L.*) son más estables respecto al tiempo que cuando se encuentran libres. Estas gotitas de tamaño nano pueden ser estructuralmente favorables para una mayor transparencia, estabilidad acuosa y liberación controlada, preservando con ello la bioactividad de los compuestos encapsulados (Ha *et al.*, 2015).

La figura 3 muestra el resultado obtenido en el crecimiento de *C. gloesporoides*, donde se observan diferencias entre los tratamientos respecto a tiempo, el testigo (sin adición) fue quien presentó el mayor crecimiento desde el día uno. En el día 7 se observa que entre el xoconostle y el aceite esencial no existen diferencias. La nanoemulsión inhibió el desarrollo del hongo 4.15 mm respecto al testigo (17.1 y 21.25 mm respectivamente). A pesar que las nanoemulsiones han sido diseñadas y han demostrado ser eficaces contra bacterias, existen pocos reportes acerca del uso de nanoemulsiones con acción antifúngica, Chang *et al.*, (2012) determinaron que existe un efecto contra *Zygosaccharomyces bailii* que depende de la concentración utilizada. Una mejor comprensión de cómo los componentes de aceite esencial incorporados dentro de las gotitas de nanoemulsión interactúan con las células microbianas puede conducir al diseño de sistemas de administración de antimicrobianos eficaces.



**Figura 3.** Resultado para el crecimiento de *C. gloeosporoides*. Los resultados se presentan en medias  $\pm$  desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos por día.

## CONCLUSIONES

La encapsulación de los compuestos fenólicos contenidos en la nanoemulsión no solo logró protegerlos, sino que los incrementó considerablemente, al igual que la capacidad antioxidante; fenómeno atribuido al método utilizado para la elaboración. Además, la nanoemulsión logró retardar el crecimiento del hongo a comparación del testigo y los compuestos en forma libre del xoconostle y el aceite esencial de naranja, por tanto, los resultados de este estudio tienen implicaciones importantes para la utilización de nanoemulsiones como sistemas de incorporación de compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana en la industria alimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- André, A., Wojtowicz, N., Touré, K., Stien, D., Eparvier, V. 2017. New acorane sesquiterpenes isolated from the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* SNB-GSS07. *Tetrahedron Letters*, 58(13), 1269-1272.
- Awang, Y., Ghani, M.A.A., Sijam, K., Mohamad, R.B. 2011. Effect of calcium chloride on anthracnose disease and postharvest quality of red-flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Afri. J. Microbiol. Res.* 5, 5250-5259.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. 2012. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(48), 12056-12063.
- Erramreddy, V.V., Ghosh, S. 2014. Influence of emulsifier concentration on nanoemulsion gelation. *Langmuir*, 30, 11062-11074.
- Espinosa-Muñoz, V., Roldán-cruz, C.A., Hernández-Fuentes, A.D., Quintero-Lira, A., Almaraz-Buendía, I., Campos-Montiel, R.G. 2016. Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenols, Flavonoids, and Biocompounds with Inhibitory Effect Against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus Aureus* from Cactus Pear. *Journal of Food Process Engineering*.
- Ha, T. V. A., Kim, S., Choi, Y., Kwak, H. S., Lee, S. J., Wen, J., Oey, I., Ko, S. 2015. Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. *Food chem.*, 178, 115-121.
- Hak, S., Helgesen, E., Hektoen, H.H., Huuse, E.M., Jarzyna, P.A., Mulder, W.J.M., Haraldseth, O., Davis, C.L. 2012. The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging. *ACS nano*, 6, 5648-5658.



- Hernández-Fuentes, A.D., Trapala-Islas, A., Gallegos-Vásquez, C., Campos-Montiel, R.G., Pinedo-Espinoza, J.M., Guzmán-Maldonado, S.H. 2015. Physicochemical variability and nutritional and functional characteristics of xocostles (*Opuntia* spp.) accessions from Mexico. *Fruits*, 70(2), 109-116.
- Li, X., Wang, L., & Wang, B. (2017). Optimization of encapsulation efficiency and average particle size of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 229, 479-486.
- Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., Zhu, S. 2017. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 371-377.
- Kim, J.H., Ko, J.A., Kim, J.T., Cha, D.S., Cho, J.H., Park, H.J., Shin, G.H. 2014. Preparation of a capsaicin-loaded nanoemulsion for improving skin penetration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 725-732.
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., de Cortes Sanchez-Mata, M., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xocostle cultivars (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguét and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Res. Int.*, 46(1), 279-285.
- Osorio-Esquivel, O., Álvarez, V.B., Dorantes-Álvarez, L., & Giusti, M.M. 2011. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Res. Int.*, 44(7), 2160-2168.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C. 2008. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chem.*, 106(3), 1264-1270.
- Pérez, L.M., Baquero, M.J., Beltran, J.D. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Rev Col Biotecnol.* V:24-35.
- Pérez-Alonso, C., Campos-Montiel, R.G., Morales-Luna, E., Reyes-Munguía, A., Aguirre-Álvarez, G., & Pimentel-González, D.J. 2015. Estabilización de compuestos fenólicos de *Opuntia oligacantha* Först por microencapsulación con agave SAP (aguamiel). *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(3), 579-588.
- Rondón, O., Sanabrá de Albarracín, N., Rondón, A. 2006. Respuesta in vitro a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía tropical*, 56(2), 219-235.
- Siddiqui, Y., Ali, A. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). En: Postharvest Decay: Control Strategies. *Elsevier*. pp. 338.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37.
- Tenorio Domínguez, M. (2016). Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria*, 7(4), 419-431.
- Vargas-Arispuro, I., Sanz, B.I., Martínez-Téllez, M.A., & Primo-Yúfera, E. 1998. Actividad antioxidante de compuestos aislados del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja. *Grasas y aceites*, 49, 159-164.
- Xu, X., Lei, H., Ma, X., Lai, T., Song, H., Shi, X., Li, J. 2017. Antifungal activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP) against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest mango fruit and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 1-6.
- Zahi, M.R., El Hattab, M., Liang, H., Yuan, Q. 2017. Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of  $\epsilon$ -polylysine. *Food Chem.*, 221, 18-23.