

## Efecto de compuestos bioactivos nanoencapsulados contra hongos de interés agroalimentario

N. Santos-Ordoñez<sup>a</sup>, A. Reyes-Munguía<sup>b</sup>, A. D. Hernández-Fuentes<sup>a</sup>, I. Almaraz-Buendía<sup>a</sup>, R. G. Campos-Montiel<sup>a</sup>, A. J. Cenobio-Galindo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario s/n Km.1 C.P. 43760, Tulancingo, Hgo., México. \* [anjec\\_hs@hotmail.com](mailto:anjec_hs@hotmail.com)

<sup>b</sup> Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Ciudad Valles, San Luis Potosí

### RESUMEN:

Las enfermedades de plantas causadas por hongos son uno de los factores más importantes que afectan la producción de cultivos a nivel mundial, estos son la principal causa de pérdidas económicas reportadas. Actualmente, se diseñan diversos métodos para el manejo y control de estas enfermedades. En el presente trabajo se elaboró una nanoemulsión a base de compuestos bioactivos de xoconostle y aceite esencial de naranja, y se probó su efecto *In Vitro* en diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 200 µL) contra el crecimiento micelial de dos cepas de hongos fitopatógenos: *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Se observó que a partir de 150 µL se presentó una inhibición del 100% durante ciertos días para ambos hongos, logrando este efecto hasta por 4 días contra *Fusarium* utilizando 200 µL. Al día 7 se obtuvo un 68.88±13.64% de inhibición máxima para *R. solani*, mientras que un 68.69±6.94% para *F. oxysporum*, con lo cual esta nanoemulsión contribuye al desarrollo de un sistema eficaz y una alternativa promisorio para el control de ciertas especies de interés como algunos hongos fitopatógenos..

### ABSTRACT:

Plant diseases caused by fungi are one of the most important factors affecting the production of crops worldwide, these are the main cause of reported economic losses. Currently, several methods are designed for the management and control of these diseases. In the present work a nanoemulsion based on bioactive compounds of xoconostle and orange essential oil was elaborated, and its *In Vitro* effect was tested in different concentrations (50, 100, 150 and 200 µL) against the mycelial growth of two strains of fungi phytopathogens: *Rhizoctonia solani* and *Fusarium Oxysporum*. It was observed that from 150 µL there was a 100% inhibition during certain days for both fungi, achieving this effect for up to 4 days against *Fusarium* using 200 µL. At day 7 a 68.88 ± 13.64% maximum inhibition was obtained for *R. solani*, while 68.69 ± 6.94% for *F. oxysporum*, whereby this nanoemulsion contributes to the development of an effective system and a promising alternative for the control of certain species of interest such as some phytopathogenic fungi..

### Palabras clave:

Nanoemulsión, fitopatógenos, xoconostle, aceite esencial de naranja, efecto antifúngico

### Keywords:

Nanoemulsion, phytopathogens, xoconostle, essential oil, antifungal effect

**Área:** Microbiología y biotecnología.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos fitopatógenos son uno de los factores más importantes que limitan la producción de cultivos a nivel mundial y son una de las causas principales de pérdidas económicas (Agríos, 1996). El principal método de manejo de plagas y enfermedades de los cultivos ha sido el control químico, desgraciadamente, se han ocasionado problemas de contaminación ambiental que han impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, así como en la seguridad y salud pública, inherentes a la fabricación y uso inadecuado de los agroquímicos, motivo por el cual se ha conducido a la búsqueda y desarrollo de alternativas ecológicas (Zavaleta-Mejía, 1999).

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades constituye una alternativa promisoría debido a su elevada efectividad, bajo costo y al ser amigables con el ambiente. Estos productos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural, los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas. Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antivirales, antimicrobianos o repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Rodríguez *et al.*, 2000).

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. Se ha demostrado que estos compuestos presentan una importante actividad contra algunos microorganismos como *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus Aureus* (Espinosa-Muñoz *et al.*, 2016).

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 reducidos tamaños de partícula, alta relación superficie-volumen, elevada solubilidad, aumento de la estabilidad, entre otras (Hak *et al.*, 2012). 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 (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 antifúngica de la nanoemulsión W/O de xoconostle y aceite esencial de naranja evaluando el efecto *in vitro* contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron frutos de 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. extracción y filtrado de los compuestos bioactivos fue realizada de acuerdo al trabajo realizado por Pérez-Alonso *et al.*, 2015. La nanoemulsión 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 utilización.

Determinación del crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*

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 discos miceliales de *R. solani* y *F. oxysporum*. Los pozos se inocularon con 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{L}$  de nanoemulsión y para el testigo se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 28°C, se registró el crecimiento micelial durante 7 días y el resultado se expresó en mm de crecimiento y en porcentaje de inhibición.

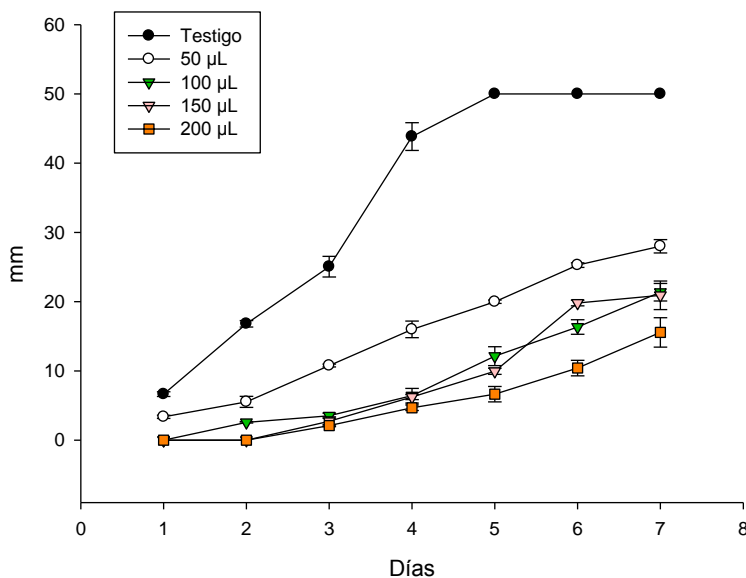
#### Análisis estadístico

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 obtenido en el crecimiento de *R. Solani*, donde se observa que el testigo tuvo el mayor crecimiento desde el día uno. La nanoemulsión presentó un efecto directamente proporcional a la cantidad utilizada, logrando inhibición total del crecimiento del hongo los dos primeros días con 150 y 200  $\mu\text{L}$ .

Los porcentajes de inhibición logrados gracias al efecto de la nanoemulsión son mostrados en la tabla 1, teniendo al día 7 un máximo del  $68.88 \pm 13.64\%$  de inhibición, utilizando 200  $\mu\text{L}$ . Melgar *et al.*, (2017) observaron que ciertas variedades de *Opuntia* presentan efecto antifúngico, principalmente de extractos provenientes de la piel, pues se ha reportado que ahí existe una elevada concentración de compuestos con posible actividad biológica, como los flavonoides. Ahmad *et al.*, (2015) mencionan que los flavonoides presentan su actividad antimicrobiana de tres posibles maneras: 1) Daño de la membrana citoplásmica por mecanismo de perforación y disminución de la fluidez de la membrana. 2) Efecto inhibitorio sobre el metabolismo energético. 3) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

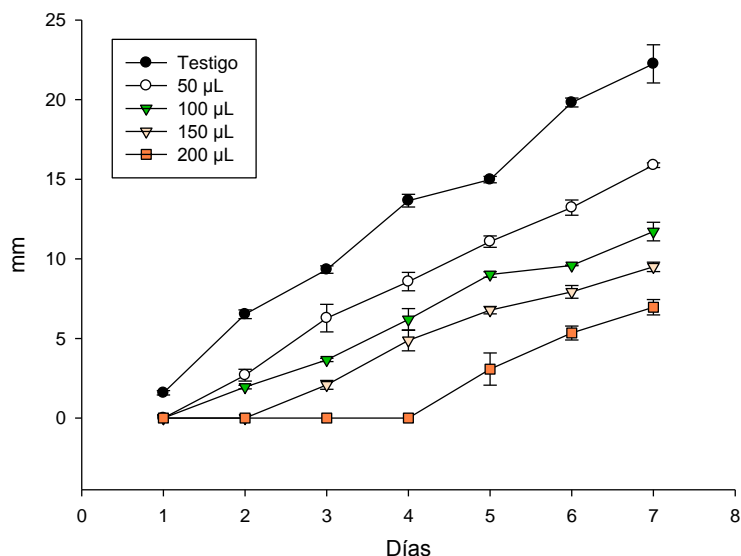


**Figura 1.** Efecto de la nanoemulsión en el crecimiento de *R. solani*. Los resultados se expresan en medias  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición de la nanoemulsión contra *R. solani*

Días	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L	200 $\mu$ L
1	49.32 $\pm$ 9.94 <sup>b</sup>	100 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
2	67.06 $\pm$ 14.33 <sup>b</sup>	84.61 $\pm$ 4.44 <sup>b</sup>	100 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
3	56.96 $\pm$ 1.88 <sup>b</sup>	85.87 $\pm$ 10.29 <sup>a</sup>	89.10 $\pm$ 14.02 <sup>a</sup>	91.57 $\pm$ 7.80 <sup>a</sup>
4	63.50 $\pm$ 7.50 <sup>b</sup>	85.33 $\pm$ 13.48 <sup>ab</sup>	85.77 $\pm$ 5.79 <sup>a</sup>	89.30 $\pm$ 8.56 <sup>a</sup>
5	60.00 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	75.71 $\pm$ 11.29 <sup>ab</sup>	80.08 $\pm$ 4.53 <sup>a</sup>	86.70 $\pm$ 13.65 <sup>a</sup>
6	49.42 $\pm$ 1.33 <sup>c</sup>	67.30 $\pm$ 6.41 <sup>ab</sup>	60.36 $\pm$ 2.08 <sup>b</sup>	79.16 $\pm$ 10.71 <sup>a</sup>
7	43.9866667 <sup>b</sup>	57.24 $\pm$ 5.91 <sup>ab</sup>	58.14 $\pm$ 9.86 <sup>ab</sup>	68.88 $\pm$ 13.64 <sup>a</sup>

La figura 2 muestra el resultado del crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la nanoemulsión, siendo el testigo el que presentó un mayor crecimiento desde el día 1, logrando un crecimiento máximo al día 7 de 22.25 $\pm$ 1.2 mm. Para 150  $\mu$ L se obtuvo una inhibición total durante los primeros dos días y para 200  $\mu$ L la inhibición total fue durante los 4 primeros días. Encontrando al día 7 un mayor porcentaje de inhibición al utilizar 200  $\mu$ L con 68.69 $\pm$ 6.94% (tabla 2). Las propiedades antifúngicas exhibidas por los aceites pueden atribuirse a la presencia de los múltiples componentes bioactivos, como terpenos bioactivos, fenoles, alcoholes o aldehídos, dependiendo de los componentes utilizados (Burt 2004).



**Figura 2.** Efecto de la nanoemulsión en el crecimiento de *F. oxysporum*. Los resultados se expresan en medias  $\pm$  desviación estándar.

Salas *et al.* (2011) mencionan que algunos flavonoides aislados de especies de cítricos, como naringina, hesperidina y neohesperidina, presentan una elevada capacidad antifúngica, pero la intensidad de esta actividad depende del tipo de hongo y compuesto utilizado. Abd-Elsalam y Khokhlov (2015) probaron el efecto de una nanoemulsión a base de eugenol contra *F. oxysporum* encontrando el mayor efecto cuando se aplicó a una concentración del 2%, además que su nanoemulsión inhibió no solo el crecimiento radial, sino también la esporulación y la pigmentación del patógeno, atribuyendo a que la nanoemulsión puede atravesar la membrana

celular y la membrana citoplásmica (Bakkali et al., 2008), con lo cual se podría inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la funcionalidad del material genético (Woo et al. 2009).

**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de la nanoemulsión contra *F. oxysporum*

Días	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL
1	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>
2	58.69±13.63 <sup>b</sup>	70.14±5.68 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>
3	32.70±13.81 <sup>d</sup>	60.82±2.87 <sup>c</sup>	77.66±12.45 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>
4	37.24±6.77 <sup>d</sup>	54.64±1.01 <sup>c</sup>	64.26±12.52 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>
5	25.99±3.21 <sup>d</sup>	39.79±1.91 <sup>c</sup>	54.72±3.43 <sup>b</sup>	79.45±12.99 <sup>a</sup>
6	33.29±3.61 <sup>d</sup>	51.63±0.21 <sup>c</sup>	60.00±5.03 <sup>b</sup>	73.04±8.13 <sup>a</sup>
7	28.58±0.91 <sup>d</sup>	47.33±4.99 <sup>c</sup>	57.31±3.08 <sup>b</sup>	68.69±6.94 <sup>a</sup>

## CONCLUSIÓN

La utilización de compuestos bioactivos como alternativa para el control de ciertos microorganismos es una tendencia que cada vez es más recurrida, por tanto, el desarrollo de sistemas de incorporación para este tipo de compuestos cobra bastante relevancia. La nanoemulsión resultó ser eficaz en el control del crecimiento de los fitopatógenos, logrando inhibirlos en su totalidad hasta dos días en el caso de *R. solani* y hasta cuatro días para *F. oxysporum*, manteniendo un porcentaje de inhibición considerable hasta el fin del análisis, siendo proporcional a la cantidad de nanoemulsión utilizada. Estos resultados confirman que los compuestos nanoencapsulados provenientes de *Opuntia* y *Citrus* pueden ser considerados como de especial interés para ser utilizados en sistemas antifúngicos enfocados al área agroalimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abd-El Salam, K. A., & Khokhlov, A. R. (2015). Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds. *Applied Nanoscience*, 5(2), 255-265.
- Agrios, G. N. (1996). *Fitopatología* (2da. edición). México: LIMUSA S.A. pp. 4-6
- Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., & Shafiq, H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Research International*, 77, 221-235.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Espinosa- Muñoz, V., Roldán- cruz, C. A., Hernández- Fuentes, A. D., Quintero- Lira, A., Almaraz- Buendía, I., & Campos- Montiel, R. G. (2017). 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*, 40(2).
- 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.
- 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.
- 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.
- Melgar, B., Pereira, E., Oliveira, M. B. P., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Sokovic, M., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2017). Extensive profiling of three varieties of *Opuntia* spp. fruit for innovative food ingredients. *Food Research International*, 101, 259-265.
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., de Cortes Sánchez-Mata, M., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguet and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International*, 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 Research International*, 44(7), 2160-2168.

- 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.
- Rodríguez, A. T., Morales, D., & Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos tropicales*, 21(2).
- Rondón, O., Sanabria de Albaracín, 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.
- Salas, M. P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., & Resnik, S. L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124(4), 1411-1415.
- 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.
- 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.
- Woo, K. S., Kim, K. S., Lamsal, K., Kim, Y. J., Kim, S. B., Jung, M., Sim, S. J., Kim, H. S., Chang, S. J., Kim, J. K., & Lee, Y. S. (2009). An *In Vitro* study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), 760-764.
- 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 Chemistry*, 221, 18-23.
- Zavaleta Mejia, E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra latinoamericana*, 17(3).