

Efecto de los extractos de brócoli sobre *Alternaria alternata* y *Salmonella sp*, y la elaboración de un recubrimiento comestible a base de quitosana/extractos de brócoli

Navarro-Vela, J.^{a,*}, Pacheco-Cano R.D^b, Barboza-Corona J.E^{a,b}

^a División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de Alimentos,

^b Posgrado en Biociencias, Ex Hacienda El Copal, Irapuato, Gto, C.P. 36 500, carretera Irapuato-Salamanca, Irapuato, Gto. México, j.navarrovela@ugto.mx; rd.pachecocano@ugto.mx, josebar@ugto.mx

Resumen:

El brócoli presenta efecto inhibitorio contra bacterias y hongos. El objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto inhibitorio de los extractos brócoli sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* y sobre *Salmonella sp*; asimismo, elaborar recubrimientos comestibles a base de quitosana con extractos de brócoli y evaluar el efecto protector sobre tomate cherry. Los resultados indican que los tomates cherry inoculados con *A. alternata* presentan un 22.5% de daño en un periodo de 6 días. Los extractos brócoli afectan la esporulación e integridad de membrana de los conidios y un efecto inhibitorio sobre *A. alternata* y *Salmonella sp*, respectivamente. Finalmente, los recubrimientos comestibles a base de quitosana y extractos de brócoli fueron útiles para proteger a los tomates cherry, donde muestras tratadas con los extractos solamente presentaron un 9% de pérdida de humedad. Estamos en proceso de evaluar el efecto protector de recubrimientos comestibles a base de quitosana/ extractos de brócoli sobre tomates infectados con *A. alternata*.

Palabras clave: brócoli, quitosana, recubrimientos comestibles

Abstract: Broccoli has an inhibitory effect against bacteria and fungi. The objective of this work was to demonstrated the inhibitory effect of the broccoli extracts to phytopathogen fungi *Alternaria alternata* and *Salmonella sp*, also to elaborate edible films based on chitosan and broccoli extracts in order to evaluate the protector effect on cherry tomatoes. Data indicate that cherry tomatoes innoculated with *A. alternata* showed 22.% of physical damage after 6 days of treatment. Broccoli extracts have a negative effect on sporulation, affecting the membrane integrity and an inhibitory effect on *A. alternata* and *Salmonella sp*, respectively. Finally, edible films based on chitosan and broccoli extracts were useful to protect cherry tomatoes, as samples treated with those films lost only 9% humidity. We are in process to evaluate the protector effect of edible films/broccoli extracts on tomatoes infected with *A. alternata*.

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Los recubrimientos comestibles (RC) son una tecnología que se aplica en muchos productos para el controlar la transferencia de humedad, el intercambio de gases o procesos de oxidación. Los RC pueden proporcionar el mismo efecto que el almacenamiento en atmosferas modificadas ya que modifican la composición interna del gas. Una de las ventajas más importantes de los RC es que se les puede adicionar ingredientes activos consumibles, mejorando de esta forma la seguridad y/o los atributos nutricionales y sensoriales (Dhall 2013). Otros atributos de los RC incluyen la protección en los alimentos debido a sus propiedades funcionales (antioxidantes, agentes antimicrobianos) y a que actúan como barrera de oxígeno que puede limitar la oxidación del aceite (Atarés et al. 2011) y también pueden funcionar como agentes antifungicos. La quitina y el quitosano son biomateriales considerablemente versátiles y prometedores. El derivado de quitina desacetilado, quitosano, es un polímero bioactivo más útil e interesante (Dutta et al. 2015). El quitosano es seguro, natural, y es un polímero libre de alérgenos y biocompatible con beneficios para la salud (Bornet y Teissedre, 2011). Se han realizado varios estudios del quitosano contra hongos fitopatógenos como *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium spp*. lo cual inhibió el crecimiento micelial y la esporulación. Asimismo, se han hecho combinaciones de extractos de plantas/quitosano obteniendo sinergismo en el efecto antioxidante, antibacteriano o antifúngico.

Por otro lado, se ha reportado que los extractos de brócoli tienen propiedades antiobesidad, anticancerígeno, antidiabético, antimicrobiano, hepatoprotector, cardioprotector, gastroprotector, antiinflamatorio, antiamnésico y propiedades inmunomoduladoras (Yang y Zhang 2011; Mahn y Reyes 2012; Owis 2015; Vinha et al. 2015; Park et al. 2016). Estas actividades son por compuestos bioactivos como vitamina C, carotenoides, polifenoles, glucosinolatos, sulforafano y por enzimas (Fahey et al. 2002; Mahn y Reyes, 2012; Owis, 2015).

Asimismo se ha demostrado que el brócoli cuenta con actividad antibacteriana y antifúngica contra varios microorganismos de importancia en salud humana y también en el deterioro de alimentos como por ejemplo *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella Sonnei* y *Proteus vulgaris* y contra hongos fitopatógenos (*C. gloeosporioides*, *Aspergillus niger*) y levaduras (*Candida albicans* y *Rhodotorula* sp.) (Pacheco-Cano et al. 2018).

En este trabajo elaboramos recubrimientos comestibles a base de quitosana y extractos de brócoli y se analizó el efecto proyectado sobre tomate cherry infectado con el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata*. (Rotem, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción de florete y tallo de brócoli se utilizaron (aprox. 300 g), y se cortaron en pequeños trozos y se les adiciono agua destilada y plata ionizada al 0.35% v/v (Microdyn). La muestra se colocó en un extractor de jugos y se centrifugó para retirar precipitados. Posteriormente el extracto se calentó a 65°C durante 5 minutos, posteriormente se centrifugo a 15000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se almaceno a -5° C hasta su posterior uso.

Se realizo un ensayo de infección con *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme utilizando como modelo de infección *Alternaria alternata*, colocando una suspensión de conidios en la superficie y utilizando como control el tomate sin conidios de *Alternaria alternata*, verificando sus pesos y su daño causado por este hongo fitopatógeno.

De acuerdo a Maghsoudlou et al. (2012) para la preparación de quitosano se utilizó una concentración de 5g/L en solución acuosa de ácido acético glacial (1mL en 100mL), el cual se le colocó en condiciones de agitación, a temperatura de 60°C y se adicionó glicerol como plastificante, en proporción de 1:4 de polvo de quitosano, continuando la agitación durante 15 minutos. Una vez que se enfrió se realizaron tres mezclas, a la primera se le adiciono 1.5 mL de florete, en tallo y una combinación de florete y tallo en 300 mL de la mezcla original. Posteriormente, en dichas mezclas se sumergieron los tomates durante un periodo de 5 min. Como controles se usaron tomates sin recubrimiento o cubiertos quitosano sin extratos de brócoli. Las muestras de tomate con el RC se colocaron en campana de flujo laminar con UV (20 min) y se secaron durante 30 min en condiciones de esterilidad. Finalmente se colocaron en platos envueltos con film de polipropileno (PP), para evaluar la vida de anaquel y realizar un analisis microbiológico de los tomates. Se tomaron 25 g de tomate, se homogenizaron en 225 mL de agua peptonada (1 g/L) y se hicieron diluciones seriadas. Estas se sembraron en placas de agar nutritivo a 37°C por 24-48 h para determinar el total de bacterias aeróbicas y en papa-dextros-agar a 28°C, 4 días para hongos y levaduras. Asimismo, se sembraron en agar MacConkey para detectar coliformes totales y *E. coli*. Los exerimentos fueron realizados por triplicado y analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de Tukey's (P<0.05).

Se realizo una prueba de actividad inhibitoria por la técnica de difusión de pozos contra *Salmonella sp.* Para esto se preparó agar de pozos y se realizó una mezcla con la bacteria, se dejó solidificar 20 min y se realizaron pozos de 8mm de diámetro interior y se colocan 100 µL de extracto de florete y tallo. Este ensayo se realizó por triplicado. Se dejaron las cajas Petri en incubación a 37°C durante 12 h y se observó el halo de inhibición.

Se realizaron ensayos de actividad antifúngica contra *A. alternata*, el hongo se dejó crecer en Agar papa dextrosa a temperatura de 28°C durante 4 días. Se le agregó 2 mL de agua destilada estéril sobre el hongo, y se realizó un raspado. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, quedándose con el sobrenadante y se realizaron 4 lavados con agua destilada centrifugando a 4000 rpm durante 5 minutos en cada lavado. La pastilla se resuspendio en 2 mL de caldo YPD. Tambien se realizaron microensayos adicionando en un eppendorf 10µL de conidios y 10µL de los extractos de florete y tallo de brócoli con 1µL de Yoduro de propidio (es una molécula fluorescente y un agente que se une al DNA por intercalación entre las bases) y teniendo como un máximo de excitación de fluorescencia de 535 nm y un máximo de emisión de 617 nm.

Se realizó una prueba de actividad en pozos contra *Alternaria alternata*, dejando crecer el hongo durante 4 días, sobre el hongo se realizaron pozos de 8 mm de diámetro y se adiciono en los pozos los extractos de florete y tallo, se dejaron incubando durante un periodo de 1 día y se observo la actividad inhibitoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de infección de tomate con *Alternaria alternata*

El hongo fitopatogéno *A. alternata* es causante de infecciones en hoja de tomate y en la superficie de este, causando la pudrición. Para comprobar que se estaba trabajando con el mismo hongo fitopatogéno se realizó una infección en la superficie y evaluó en un periodo de 6 días el porcentaje de humedad que perdió lo cual como se muestra en la (Fig. 1).

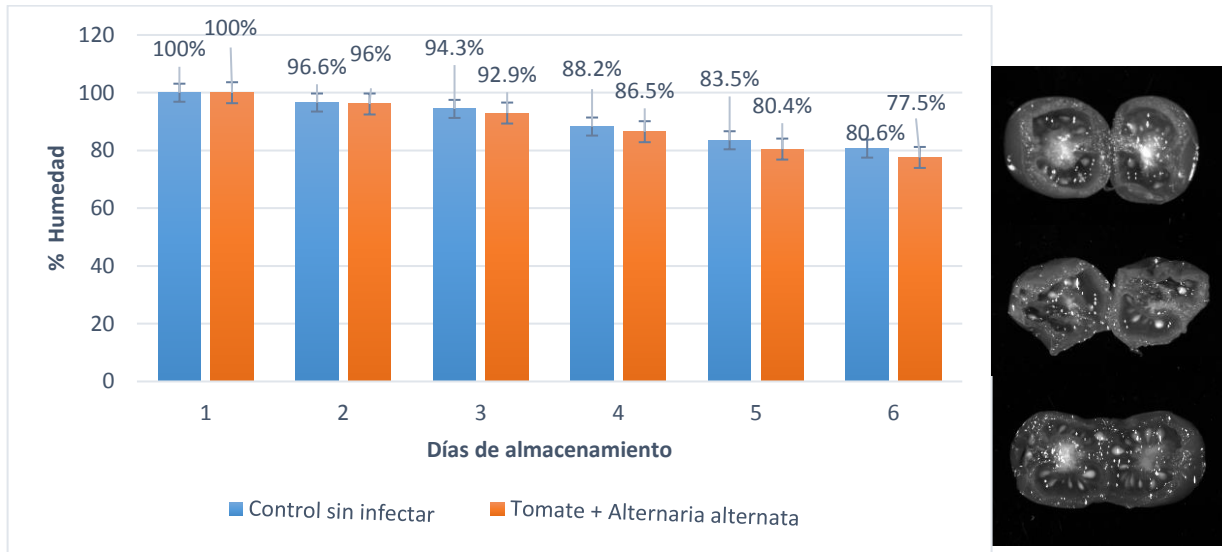


Figura 1. Evaluación de perdida de humedad por infección del hongo fitopatogéno *Alternaria alternata*

Con el tratamiento de infección el tomate pierde un 22.5% de humedad en comparación con el control que solamente obtuvo una perdida de humedad de 19.4%. Estos datos importantes nos muestra que el deterioro del tomate si se ve comprometido con la infección del *A. alternata*.

Actividad antifúngica de extractos de florete y tallo de brócoli contra *Alternaria alternata*

La actividad antifúngica de los extractos de florete y tallo se evaluó mediante la técnica de pozos. En la Fig. 2a se puede ver claramente el control positivo con agua y no se observó cambio en la morfología del hongo. En la Fig. 2b se observa el efecto del extracto de florete con un halo de inhibición afectando la esporulación, mientras que en la Fig. 2c se aprecia con el extracto de tallo un efecto en la morfología causando un estrés en el hongo, indicando un efecto inhibitorio en la esporulación. Esto nos indico que los extractos de brócoli tienen un fuerte impacto inhibitorio contra este hongo y pueden ser usados para formulaciones de recubrimientos comestibles ya que este hongo fitopatogéno es uno de los principales causantes de daño en tomate.

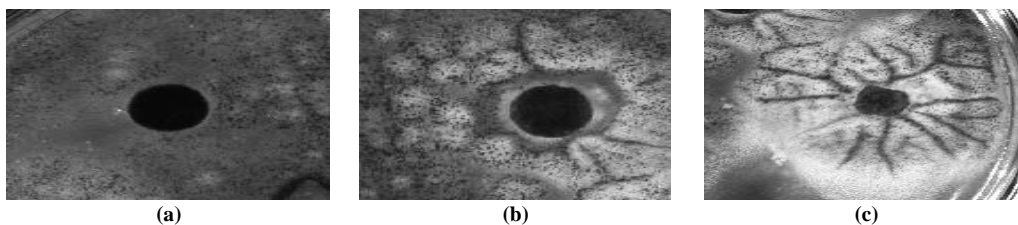


Figura 2. Efecto de extractos de florete y tallo de brocoli contra *Alternaria alternata*. a) Control con agua; b) Efecto con extracto de florete; c) Efecto con extracto de tallo.

Efecto de extractos de brócoli contra conidios de *Alternaria alternata*

En la (Fig.3) se puede apreciar los tratamientos que se sometieron los conidios contra extractos crudos de brócoli causando un efecto importante sobre ellos. En la figura 3a se muestra un conidio sin tratamiento en perfecto estado, también se usó yoduro de propidio para determinar la integridad de membrana ya que cuando los extractos pueden tener un efecto sobre la membrana la lisan o forman poros y es cuando el yoduro de propidio penetra intercalando con DNA y es detectado con microscopía de fluorescencia. En este caso en la figura 3b no se observó ningún efecto sobre la integridad del conidio. En la figura 3c,e se observa el efecto que tiene el extracto de florete y tallo sobre la integridad de membrana de los conidios, el efecto con el tallo es muy diferente ya que presenta una característica de hinchazón y con extracto de florete existe una deformación en la superficie de los conidios. En las figuras 3d,f se observan las partes donde los extractos de brócoli pudieron penetrar y causar el daño a la integridad de la membrana causando que los conidios no sean viables.

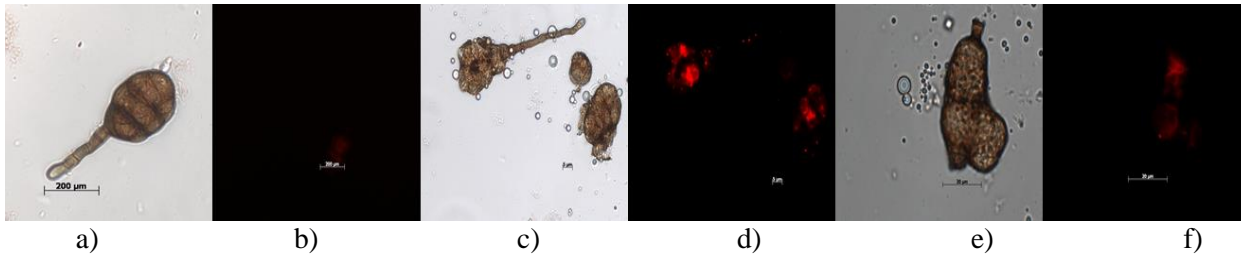


Figura 3. Efecto de extractos de brócoli contra conidios de *A. alternata* utilizando microscopía de fluorescencia utilizando objetivo 100x, en campo claro. a) Conidio sin tratamiento; b) Conidio con yoduro de propidio sin tratamiento; c) Conidios con tratamiento de florete; d) Conidio con tratamiento de florete y yoduro de propidio; e) Conidio con tratamiento de tallo; f) Conidio con tratamiento de tallo y yoduro de propidio.

Efecto antimicrobiano de extractos de brócoli contra *Salmonella sp.*

Salmonella sp es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas. Generalmente se caracteriza por la aparición brusca de fiebre, dolor abdominal. Las personas contraen *salmonella* por alimentos que se han vinculado a la transmisión en hortalizas contaminadas por estiércol. Los brotes de *salmonella sp* cada día se han incrementado en Estados Unidos. Este brote en hortaliza es uno de los de mayor causa en enfermedades y esto es preocupante ya que se ve afectada la salud de las personas y por otro lado la exportación de este producto, lo que generaría pérdidas económicas considerables. Por eso es muy importante realizar estudios del efecto de antimicrobiano de los extractos de brócoli para poder tener aún más ese plus y realizar formulaciones de recubrimientos comestibles más potentes contra una gran gama de patógenos y proteger sobre todo la integridad de las personas. En la figura 4 se realizó mediante la técnica de difusión de pozos la actividad inhibitoria de extracto de florete y tallo de brócoli en ambos casos se obtuvo una inhibición de *Salmonella sp* a esto se agrega la actividad antimicrobiana del brócoli contra esta bacteria lo cual es una excelente estrategia para los RCs.

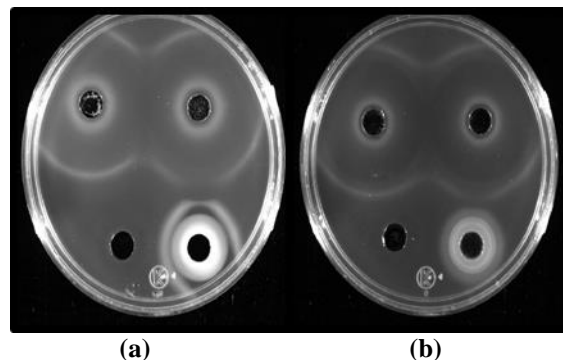


Figura 4. Actividad antimicrobiana de extractos de florete y tallo de brócoli contra *Salmonella sp.* (a) Actividad antimicrobiana de florete; (b) Actividad antimicrobiana de tallo.

Formulación de recubrimientos comestibles a base de extractos de brócoli y quitosana

Se formularon varios recubrimientos comestibles para verificar la viabilidad de alguno de ellos, y como modelo se utilizó el tomate cherry. Se utilizó un control sin recubrimiento (SR); recubrimiento de quitosana (RQ); recubrimiento de quitosana y

extracto de florete (RQF); recubrimiento de quitosana y extracto de tallo (RQT) y recubrimiento de quitosana y extracto de florete y tallo (RQFT). Todos estos tratamientos se evaluaron en un periodo de 5 días y así se apreció el efecto que obtuvieron los tomates en SR se puede observar un hinchamiento y un color amarillo opaco mientras que con RQ se observó un color rojo con una consistencia semiuniforme con los extractos de RQF y RQT tienen un color rojo, sin embargo la consistencia es blanda, y la que mejor conservó el color fue con la mezcla de los extractos y la quitosana, obteniendo una textura semifirme.

Cuando se evaluó la pérdida de humedad en los tomates tratadas con las diferentes biopelículas a diferentes tiempos, se observó que la menor pérdida de humedad a los 5 días la presentó la biopelículas de quitosano/extracto de florete y tallo, seguido de los de quitosana (Fig 5) con ~ 9% y 15%, respectivamente. Sin embargo, con el control sin biopelícula los tomates perdieron un 10%. Lo anterior sugiere modificar las condiciones de preparación de las biopelículas con extracto de brócoli para disminuir la pérdida de humedad y que presente diferencia estadística con respecto al control.

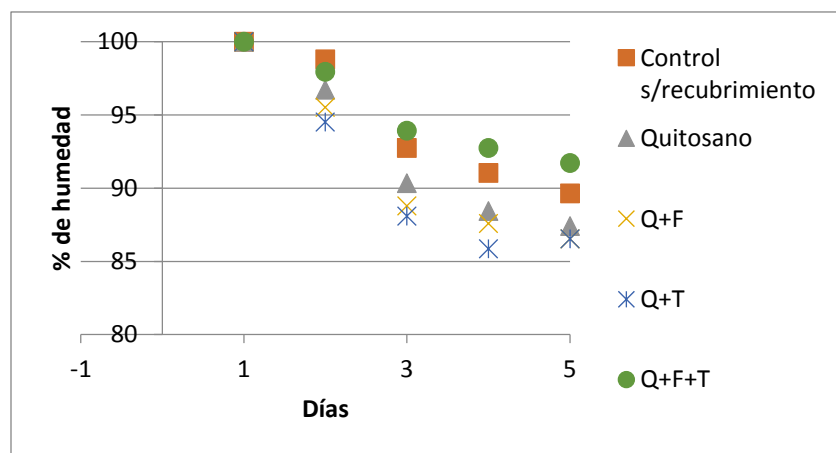


Figura 5. Formulaciones de extractos de brócoli y quitosana y su retención de humedad evaluada en 5 días.

CONCLUSIONES

Alternaria alternata afecta los tomates cherry, y los extractos de brócoli tienen un efecto deletéreo sobre dicho hongo. Demostramos que las películas comestibles a base de quitosana y extractos de brócoli tienen un efecto protector, evitando la pérdida de humedad en los tomates, por lo que dichas películas podrían aumentar la vida de anaquel de tomates infectados con *A. alternata*. Asimismo, demostramos que los extractos de brócoli inhiben a *Salmonella sp.*, una bacteria de importancia en la salud pública, por lo que los biopelículas sugeridas en este trabajo también podrían ayudar a proteger a los tomates contra dicha bacteria y evitar una infección en los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

- AK. Dutta (2015). Facile preparation of surface N-halamine chitin nanofiber to endow antibacterial and antifungal activities. *Journal of Carbohydrate Polymers*. 115 pp 342-347.
- Atarés, L.; Perez-Masia, R.; Chiralt, A. (2011). The Role of Some Antioxidants in the HPMC Film Properties and Lipid Protection in Coated Toasted Almonds. *Journal of Food Engineering, Essex*, v. 104, n. 4, p. 649-656.
- Mahn, A. and Reyes, A. (2012) An overview of health-promoting compounds of broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) and the effect of processing. *Food Sci Technol Int* 18, 503–514.
- Owis, A.I. (2015) Broccoli; the green beauty: a review. *J Pharm Sci Res* 7, 696–703 Pacheco-Cano, R.D.; Salcedo-Hernandez, R.; Lopez-Meza, J.E.; Bideshi, D.K.; Barboza –Corona, J.E. (2018). Antimicrobial activity of broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) cultivar Avenger against pathogenic bacteria, phytopathogenic filamentous fungi and yeast. *Journal of Applied Microbiology* 124(1):126-135.

R.K. Dhall (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (5), pp. 435-450, 2013

Rotem J. (1994). *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press

Yang, Y. and Zhang, X. (2011) *In vitro* antitumor activity of broccolini seeds extracts. *Scanning* 33, 402–404.