

Síntesis y eficiencia antimicrobiana de nanopelículas comestibles para *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* asistido con un sistema de registro autónomo

García Avila, S.A.^{a*}, López-Anchondo, A.N.^b, Valencia Castro, C.M.^a, De la Fuente-Salcido, N.M.^a

a Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento Bioprospección y Bioprocesos. Blvd. Torreón-Matamoros, Km. 7.5, Ciudad Universitaria, Torreon, Coahuila, Mexico 27104.

b Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 206, Carretera Torreón-Mieleras km 3, Torreon, Coahuila, Mexico 27084

* alejandro.ga2015@hotmail.com

RESUMEN:

Los nanopelículas comestibles sintetizados con polímeros y agentes bioactivos vegetales han confirmado su eficacia para preservar frutas y verduras de diversos orígenes. Se sintetizaron cuatro nanopelículas comestibles diferentes con extracto de chitosan-mezquite (*Prosopis glandulosa*) y se caracterizaron parcialmente con respecto al color (CIEBLAB $L^* a^* b^*$), transparencia fraccionaria, espesor (mm) y pérdida de humedad (g). Además, la actividad antibacteriana se estableció *in vitro* mediante el método de difusión de pozos.

La eficacia para prolongar la vida propia *in vivo* se confirmó en tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) recubierto por separado con cada película utilizando un sistema de registro autónomo continuo con sensores de °C, pH, O₂ durante 5 días y también se realizaron pruebas de fitopatogenicidad con *Colletotrichum gloesporioides* y *Fusarium oxysporum lycopersici* raza 1. Las nanopelículas que presentan mejor eficiencia antimicrobiana fué T3, así como las que mostraron menor pérdida de humedad (g) y las de mayor transparencia (T3) y luminosidad (T2). El sistema de registro autónomo detectó que el tratamiento T3 presenta una mayor conservación del tomate cereza (menor liberación de oxígeno), Todos los tratamientos a los 7 días en refrigeración no presentaron síntomas de fitopatogenicidad en los tomates cubiertos con las cuatro nPQEM..

ABSTRACT:

Edible biofilms synthesized with polymer nanoparticles plus plant bioactive agents have confirmed their efficiency to preserve fruits and vegetables of diverse origins. Four different edible nanofilms with chitosan-mesquite extract (*Prosopis glandulosa*) were synthesized and partially characterized with respect to pH, viscosity (cp), color (CIEBLAB $L^* a^* b^*$), fractional transparency, thickness (mm) and moisture loss (g). In addition, the antibacterial activity of nanofilms was established by *in vitro* by the well diffusion method.

The efficiency to prolong the self-life *in vivo* was confirmed in cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) coated separately with each nanofilm using a continuous autonomous record system with sensors of °C, pH, O₂ for 5 days and also, phytopathogenicity tests were performed against *Colletotrichum gloesporioides* and *Fusarium oxysporum lycopersici* race 1. The nanofilms that show better antimicrobial efficiency was T3, as well as those that showed less moisture loss (weight) and with greater transparency (T3) and luminosity (T2). The autonomous recording system detected that the T3 treatment presents a greater conservation of the cherry tomato (lower release of oxygen). All treatments after 7 days in refrigeration did not present symptoms of phytopathogenicity in the tomatoes covered with the four nanofilms (nPChME)..

Palabras clave:

Biopelículas, Nanopartículas, Mezquite, *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, Antimicrobiano.

Área: Microbiología y biotecnología,

INTRODUCCIÓN

La preservación de los alimentos perecederos mundialmente es un reto en la tecnología de empaques por dos razones, la primera incluye la conservación de alimentos antes y durante el transporte y además el recubrimiento idóneo para cada tipo de producto. La segunda involucra a los consumidores que exigen empaques sustentables, materiales inocuos, novedosas formulaciones y/o diseños. Ambas razones involucran el retardar el deterioro natural de perecederos, principalmente en frutas y hortalizas destinadas a exportación (Kore et al., 2017).

México es el principal exportador mundial de tomate, la producción acumulada de tomate en febrero de 2018 fue de 3, 186 000 toneladas, un incremento de 8% respecto al 2017 (SAGARPA, 2018; www.gob.mx). La cantidad de tomate exportados requiere de novedosos y efectivos para incrementar su vida útil post-cosecha reduciendo o eliminando los factores físicos, químicos y microbiológicos que deterioran al tomate y limitan su exportación. Las biopelículas comestibles de nanopartículas de polímeros y agentes bioactivos vegetales han confirmado su eficiencia para preservar frutas y hortalizas de diversos orígenes (Goycoolea et al., 2009; Kaur et al., 2017; Kore et al., 2017).

Los objetivos de esta investigación fueron sintetizar y caracterizar parcialmente nanopelículas comestibles con quitosano-extracto de mezquite (*Prosopis glandulosa*) y determinar la eficiencia antimicrobiana para prolongar la vida de anaquel *in vitro* e *in vivo* del tomate cereza (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). Además se planteó implementar un sistema continuo de registro autónomo con sensores para recopilar y registrar datos físicos (°C, pH, O₂) durante los bioensayos de vida de anaquel *in vivo* de las nanopelículas aplicadas en tomate cereza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis. Se obtuvieron cuatro formulaciones o tratamientos de nPQEM y control (T1, T2, T3, T4, QBPM) por gelación iónica combinando quitosano (2%), extracto mezquite (EM, 1 mg/mL) en agua o etanol (10%) adicionando con ácido oleico (0.08%), tripolifosfato de sodio (TPPS, 0.08%), Tween (4%). La mezcla se sonicó a 60 hz, en intervalos de 5 min por 60 min, se centrifugó (10,000 rpm/ 15 min) (Calvo et al., Sugita et al., 2017; Rampinoa et al., 2013).

Caracterización parcial. En todas las nanopelículas se determinó pH, viscosidad (cp), el color por colorimetría triestímulo (CIEBLAB L*a*b*) con colorímetro minolta CR-300. La transparencia se determinó espectrofotométricamente aplicando la fórmula $Tr = -\log T_{600}/G$, donde T_{600} es la transmitancia fraccional a 600nm y G el grosor de la película (mm) medido con un micrómetro (López-Mata et al., 2015).

Vida de anaquel. Se realizaron bioensayos *in vitro* de las formulaciones y el control (100 µL) para determinar la actividad antibacteriana por difusión en pozos contra cepas grampositivas y gramnegativas crecidas en condiciones óptimas toda la noche (1×10^8 cel/mL), y se registró el área del halo de inhibición del crecimiento (De la Fuente-Salcido et al., 2017).

En los bioensayos *in vivo* se utilizaron como modelos experimentales tomates cereza o “cherry” (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) cubiertos por inmersión con cada nanopelícula, se colocaron en una cámara hermética acondicionada con un conjunto de sensores de pH, O₂ y temperatura con módulos independientes interconectados en una sola unidad inteligente. Posteriormente los sensores se conectan a un módulo USB que permite la conexión rápida de los datos obtenidos por cada sensor para que se registren y grafiquen en la computadora (PC, Mac, XO, Linux). La PC se conecta utilizando un cable de conexión USB a Mini USB estándar.

La misma disposición de modelos experimentales se utilizó en cámaras húmedas para realizar las pruebas de fitopatogenicidad, inoculando los modelos cubiertos con nanopelículas con 3 µL de esporas (1×10^6 espora/mL) de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y se incubaron a temperatura ambiente y en refrigeración por 7 días. Todos los bioensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Actividad Antimicrobiana (UA)* de nanopelículas de quitosano-extracto mezquite

Microorganismo	Formulaciones				Controles	
	T1	T2	T3	T4	EM	QBPM
Grampositivas						
<i>S. capitis</i>	151	264	441	151	151	296
<i>S. equi</i>	ND	ND	ND	ND	264	402
<i>M. luteus</i>	ND	ND	ND	296	296	441
<i>Micrococcus sp</i>	126	330	264	402	296	264
<i>S. aureus</i>	402	402	402	402	365	176
<i>E. faecium</i>	296	330	365	330	204	204
<i>S. lentus</i>	104	ND	ND	ND	330	296
<i>S. uberis</i>	104	ND	151	151	330	330
<i>L. innocua</i>	402	481	565	402	151	151
<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	151	151	233
<i>S. xylosus</i>	171	151	151	151	233	233
<i>E. malodoratus</i>	126	ND	ND	ND	126	151
<i>B. subtilis</i>	ND	264	ND	ND	82	63
<i>L. monocytogenes scott A</i>	402	151	204	296	264	264
<i>S. agalactiae</i>	ND	ND	ND	ND	151	204
<i>S. pyogenes</i>	104	104	104	104	177	233
Gramnegativas						
<i>Sh. flexneri</i>	ND	365	ND	402	264	264
<i>S. marcescens</i>	610	565	565	657	151	365
<i>S. typhimurium</i>	44	126	151	441	233	104
<i>P. vulgaris</i>	ND	ND	ND	ND	264	151
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	151	151
<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	177	104	204	233
<i>Sh. sonnei</i>	481	523	705	754	522	402
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND	ND	ND	151	151
Levaduras						
<i>C. albicans</i>	402	481	565	522	45	63

En la tabla 1 se observa la capacidad antimicrobiana de las nPQEM siendo el T3 las de mayor actividad antibacteriana con un valor de 441 UA contra grampositivas (*S. capitis*) y contra gramnegativas 705 UA (*Sh. sonnei*).

Tabla 2. Color de nanopelículas de quitosano-extracto de mezquite

T1			T2			T3			T4		
L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
65.9	-1.66	9.11	67.12	-3.14	13.9	63.48	-1.58	13.3	62.64	-2.24	14.88
64.11	-1.38	8.16	66.33	-2.65	11.43	63.79	-0.71	9.47	64.55	-1.46	12.38
66.85	-1.39	8.65	66.33	-2.87	12.67	65.53	-0.71	9.69	64.33	-2.11	14.78
65.62	-1.47	8.64	66.59	-2.88	12.66	64.266	-1	10.82	63.84	-1.936	14.01

En la determinación del color (tabla 2), se observa la menor coloración amarillo-verde en la nanopelícula T3 (-0.71) e indica que el color del extracto no incide en el color total del producto, que puede contrarrestarse por al color del tomate.

Tabla 3. Tarnsparencia de nanopelículas de quitosano-extracto de mezquite

Transparencia de nanopelículas				
T1	T2	T3	T4	Promedio
0.8750	0.5471	-0.3467	-0.0969	0.45

La transparencia es una propiedad deseable en cubiertas alimenticias muy apreciada por consumidores (Jutaporn et al., 2011), y en esta cubiertas el T3 fue el tratamiento que proporciona el mejor valor al aplicar la película en los tomates cereza, sin embargo al realizar un ANOVA no existió diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).

Con respecto a la determinación de la pérdida de peso de los modelos experimentales con las nanopelículas es menor en refrigeración y a temperatura ambiente si se comparara con el control sin películas, y la cubierta T3 (figura 1, línea morada). En ambas condiciones se muestra el mejor resultado en la nanopelícula T3, es decir, retiene mayor humedad. Se ha reportado que cubiertas de polisacáridos como el quitosano tienen una alta capacidad de retención de humedad, además de capacidad antioxidante (Li et al., 2014).

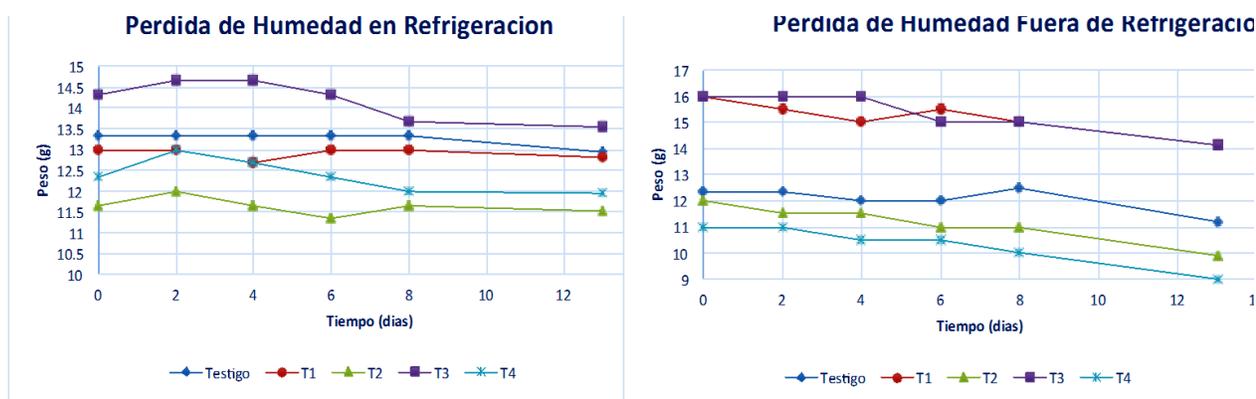


Figura 1. Pérdida de humedad (pérdida de peso g) de los modelos experimentales tomate cereza recubiertos con nanopelículas de quitosano y extracto de mezquite (Se utilizó un control o testigo sin cubierta).

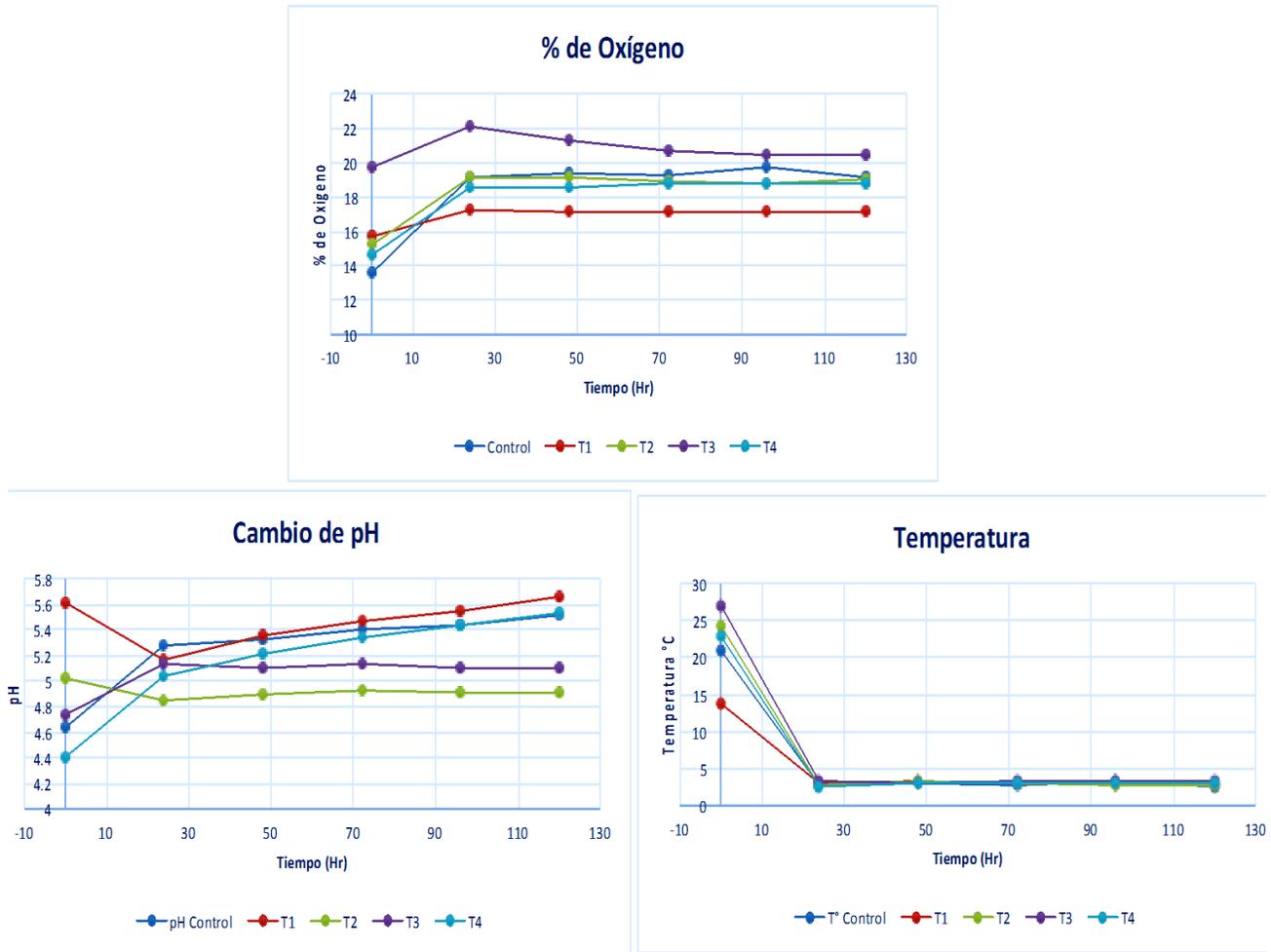


Figura 2. Resultados obtenidos del monitoreo continuo de O₂, pH y temperatura con sensores NeuLog del sistema de registro autónomo aplicado en sistemas modelo (tomate cereza) recubiertos con las nanopelículas de quitosano y extracto de mezquite.

Con respecto al sistema autónomo de registro, en la figura 2 se observan los datos obtenidos del registro continuo para los parámetros de O₂, pH y temperatura y en la figura.

En la figura 3 se presenta la comparación entre medias obtenidas de cada tratamiento o nanopelícula aplicada a los tomates cereza, con respecto a los valores registrados por cinco días.

El análisis estadístico aplicado demuestra que el T3 es el que proporciona un mejor valor de oxígeno y por lo tanto, mantiene más fresco el tomate cereza.

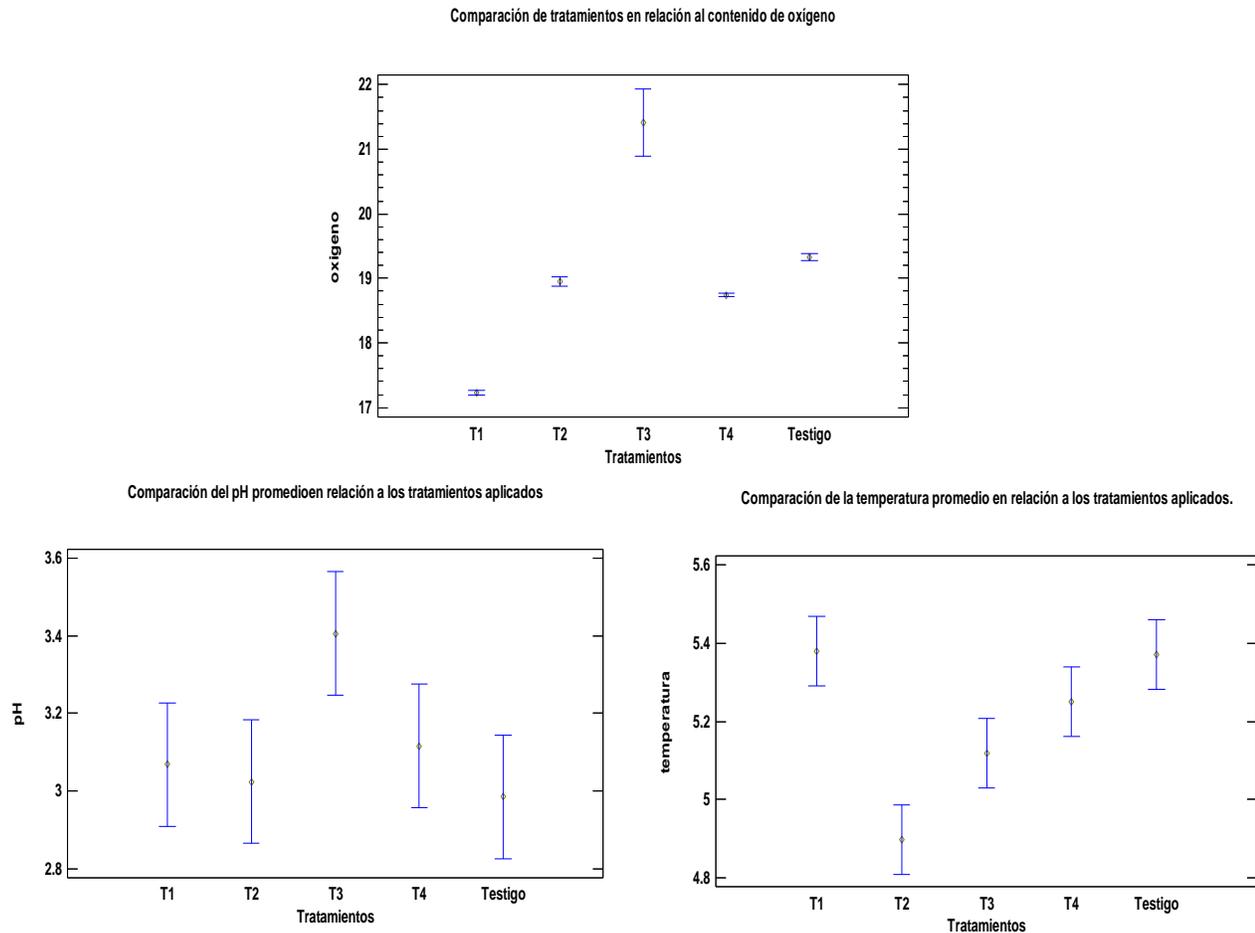


Figura 3. Comparación de los tratamientos (nanopelículas) aplicados en modelos de tomate cereza con sistema de registro autónomo durante 5 días para medir oxígeno (O₂) pH, y temperatura.

Las pruebas de fitopatogenicidad realizadas en los productos recubiertos con los 4 tratamientos no mostraron ninguno de los síntomas característicos (crecimiento micelial, necrosis, pudrición blanda, deshidratación) debido a los hongos ensayados (*C. gloesporioides* y *F. oxysporum lycopersici* raza 1) inclusive fuera de refrigeración, durante los días que se utilizó el sistema de registro autónomo.

Lo anterior es un excelente resultado que confirma la excelente capacidad antifúngica de las nanopelículas. Además se dejó los modelos de tomate cereza recubiertos en refrigeración, y aún a los 17 y 20 días y las nanopelículas son efectivas contra los fitopatógenos más contaminantes de diversas variedades de tomate.

CONCLUSIÓN

La síntesis y aplicación de las nanopelículas de quitosano y extracto de mezquite pueden ser una alternativa viable para extender la vida útil de almacenamiento de perecederos destinados a exportación como es el caso tomate cereza (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

BIBLIOGRAFÍA

De la Fuente-Salcido NM, Pimentel, A, Valenzuela, A, Gutiérrez, E, Valencia C. C.M., Villarreal Prieto, J.M., Salcedo Hernández, R., Barboza-Corona, J.E., & Castañeda Ramírez, J.C. (2016). Cubierta bioactiva con mezquite y quitosano: ensayos in vitro e in vivo contra *C. gloesporioides*, *F. oxysporum*, *Rhizopus oryzae* y *R. stolonifer*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1 (2), 353-359.

- Goycoolea, F.M., Remuñán-López, C., & Alonso, M.J. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica, Editado por la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid pp.103-131.
- Jutaporn, C.T., Suphitchaya, C., & Tawien, W. (2011). Antimicrobial activity and characteristics of edible films incorporated with Phayom wood (*Shorea toluera*) extract, *International Food Research Journal*, 18 (1), 39-54.
- Kaur, M., Kalia, A., & Thakur, A. (2017). Effect of biodegradable chitosan–rice-starch nanocomposite films on post-harvest quality of stored peach fruit. *Starch-Stärke*. 69-81. doi: 10.1002/star.201600208.
- Kore, V.T., Tawade, S.S., & Kabir, J. (2017). Application of Edible Coatings on Fruits and Vegetables. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*. 3 (1): 591-603.
- Li, J.H., Miao, J., Wu, J.L., & Zhang, O.Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166-173.
- López-Mata, M.A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N.P., et al., (2015). Physicochemical and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Cinnamon Oil. *International Journal of Polymer Science*, vol. 2015, Article ID 974506, 8 pages, doi:10.1155/2015/974506.
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellicha, B., Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of of Pharmaceutics*, 455 (1–2), 219-228.
- Rodríguez Hamamura, N., Valderrama Negrón, A., Alarcón Cavero, H López Milla, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 76 (4), 336-354.
- Sugita, P., Wijaya, D.E., Syahbirin, G., & Dewi, R.M. (2017). Antimalarial Drugs Based on Chitosan Nanoparticles of *Cassia fistula* L. and *Duranta repens* L. Fruits Methanol Extract. *Der Pharma Chemica*, 9 (18), 58-63.