

Nanotecnología aplicada al desarrollo de películas inteligentes para la conservación de productos hortofrutícolas.

E. N. Estrada-Velázquez¹, R. Castro Ríos², J.A. Rodríguez Arzave¹, González Horta¹, E.R. Robledo Leal³, A. Chávez Montes¹,

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
² Depto. de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

³ Depto. de Fitopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. emiily.enev@gmail.com

RESUMEN:

La calidad de productos hortofrutícolas se ve afectada por el crecimiento de microorganismos, entre los principales se encuentran hongos fitopatógenos del género *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Geotrichum* y *Rhizopus*. Datos emitidos tras el programa federal “Cruzada nacional contra el hambre” muestran que es uno de los productos con mayor porcentaje de merma, hasta del 30 % de la producción. Para mantener la calidad de estos productos se evalúa el uso de activos naturales de piel de *Punica granatum* incorporados en micropartículas poliméricas sensibles a pH ácido, por lo que se aprovecha la acidez provocada por la infección. La extracción se realizó mediante la técnica de maceración con agitación en sistema metanol – agua 7:3 y etanol – agua en la misma proporción, se eliminó el solvente orgánico utilizando un rotavapor. Para la formulación de las micropartículas de 1 µm de tamaño promedio, se implementó la técnica de doble emulsión (w/o/w)- evaporación, usando el polímero Eudragit E-100. Se evaluó la actividad antifúngica contra *Geotrichum candidum* causante de la pudrición ácida en jitomate *in vitro* mediante la técnica de microdiluciones en microplaca (extracto libre y encapsulado). La formulación de micropartículas incorporadas con extracto permitirá lograr una liberación prolongada, además de ser fácilmente lavable e inocua.

Palabras claves: Conservación, Micropartículas poliméricas, *Punicagranatum*.

ABSTRACT:

The quality of horticultural products is affected by the microorganism's growth, among the main ones are the phytopathogenes fungi from the genus *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Geotrichum* and *Rhizopus*. According to data obtained from the federal program “Cruzadanacional contra el hambre” (national organization against hunger), these are some of the products with up to 30% of waste in the production process. To keep the quality of these products, an evaluation of natural active compounds from *Punicagranatum*'s skin was made, these compounds were added in polymeric microparticles that are sensitive to acid pH to take advantage of the acidity caused by the infection. The extraction will be achieved by the maceration technique with constant stir in a system consisting of methanol – water 7:3 and ethanol – water, in the same proportion, eliminating the organic solvent in the rotary evaporator. For the 1 µm microparticles formulation the double emulsion (w/o/w) evaporation technique was used, using the Eudragith E-100 polymer. The antifungal activity will be evaluated against *Geotrichuncandidum*, which causes the acidic rot in tomato *in vitro* using the microdilution technique in a microplate (free and encapsulated extract) The microparticles formulation incorporated with the extract will allow its continuous release and innocuity.

Keywords: Preservation, Polymeric microparticles, *Punicagranatum*.

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es después de la papa, la hortaliza más consumida en el mundo, tanto fresco como después de transformación. Se cultiva en condiciones muy variadas, tanto climas como modos de producción. Sin embargo, es una hortaliza de alto riesgo fitosanitario ya que es sumamente susceptible a infecciones durante poscosecha. Las enfermedades que lo afectan son diversas, entre las principales que atacan al fruto se encuentran las ocasionadas por hongos, las cuales pueden ocasionar graves pérdidas debido a que provocan alteraciones y podredumbres al no aplicar las medidas adecuadas de tratamiento. Una de las enfermedades comunes que presenta esta hortaliza es la pudrición ácida causada por el hongo fitopatógeno *Geotrichum candidum* que infecta el fruto por medio de heridas en el epicarpio ocasionadas por daños mecánicos en la etapa de poscosecha. El sistema de prevención más empleado es el uso de productos químicos de síntesis, pero en la actualidad cada vez existen más objeciones de carácter higiénico sanitario ante su uso, así como desventajas en cuanto a eficiencia y costos. Es por ello que es necesario el desarrollo de nuevos y más efectivos métodos para el control de enfermedades de productos hortofrutícolas que no supongan riesgo al medio ambiente y a la salud humana.

Los activos naturales, principalmente extractos vegetales se han utilizado como medio de prevención de alteraciones en productos hortofrutícolas. Sin embargo, han sido empleados en muy pequeña escala por su baja residualidad al aplicarse de forma libre, y por su bajo porcentaje de incorporación en las películas existentes. El objetivo de la presente investigación fue el desarrollo de una formulación de micropartículas poliméricas con propiedades antifúngicas a partir de extractos de piel de *Punicagranatum* que permita prolongar la vida de anaquel de vegetales susceptibles al hongo *Geotrichum candidum*, principalmente el jitomate. Esta nueva película polimérica inteligente, solo actúa en presencia de infección fúngica ya que se aprovecha la acidez provocada. La película contiene extracto hidroalcohólico de epicarpio de *Punica granatum* incorporado en micropartículas constituidas por polímeros derivados de ácido metacrílico grado farmacéutico sensibles a pH ácido. Para la formación de las micropartículas se implementó la técnica de doble emulsión (w/o/w) – evaporación, las micropartículas producidas se caracterizaron en función de tamaño y morfología. La evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* se realizó con el extracto libre y con el extracto incorporado en la formulación, evidenciando así la eficiencia en cuanto a liberación controlada y prolongada que representa el tratamiento aplicado con la película inteligente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las granadas empleadas para la obtención del extracto fueron adquiridas en establecimientos comerciales de la zona metropolitana de Monterrey, N. L. A los frutos seleccionados les fue retirado el epicarpio, el cual se sometió a liofilización y se pulverizó empleando un molino manual. Se procedió a realizar la extracción, para la cual se utilizaron 10 g de polvo seco en un sistema metanol – agua 7:3 y etanol – agua en la proporción antes descrita, la extracción se llevó a cabo mediante la técnica de maceración con agitación constante a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 h. El extracto líquido se separó de los sólidos empleando papel filtro Whatman y se eliminó el solvente orgánico mediante presión reducida utilizando un rotavapor (Heildoph Laborota 4003 control). La fracción acuosa restante fue congelada para su liofilización. Se realizaron cromatografías en capa fina de sílica gel para los extractos obtenidos, empleando como fase móvil cloroformo – acetona – metanol (6:3:1). La placa cromatográfica fue revelada con bromuro de cobalto y calor.

Para la evaluación de la actividad antifúngica del extracto libre, el inóculo se preparó a partir de un cultivo de *Geotrichum candidum*, el cual fue cultivado en agar dextrosa y papa por 72h a 28°C. Se tomó una muestra de la biomasa y se depositó en un tubo de ensaye con solución salina estéril; a partir del concentrado se prepararon una serie de diluciones consecutivas de la misma para ser cuantificadas en un hematocitómetro.

En una primera etapa se realizó el método de pocillos en agar inoculado con *G. candidum*, se hicieron perforaciones con un sacabocados estéril y se adicionaron 100 µL de extracto etanólico y metanólico a 2030 y 1560 ppm, se usó agua estéril como control. Las placas fueron incubadas a 28°C por 72 h horas. Posteriormente, se determinó la concentración mínima inhibitoria mediante la prueba de microdiluciones. Cada micropocillo contenía 100 µL de medio Mueller Hinton, 20 µL de inóculo (6.6×10^3 cel/mL) y 100 µL de cada extracto en concentraciones de 126, 253, 506, 1012 y 2025 ppm, esto fue incubado por 48 h a 28°C. Como controles se utilizaron medio e inóculo, medio únicamente, y extracto. El crecimiento del microorganismo se determinó en un lector de microplacas (MultiskanGo) a 600 nm.

La formulación de micropartículas poliméricas se realizó con la técnica de doble emulsión (w/o/w) – evaporación, la cual consiste en realizar la fase orgánica pesando 0.2 g de Eudragit E-100 en 4 mL de cloroformo, fase que se utiliza para preparar una emulsión simple en reactor, ésta consiste en agregar la fase orgánica y 1000 µL de solución acuosa de extracto, uno metanólico y otro etanólico a 5000ppm manteniendo en agitación a 1100 rpm por 5 minutos. Posteriormente, se realiza una emulsión doble en otro reactor al agregar 13 mL de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) con una concentración de 0.5% p/p a la que se adiciona la emulsión simple formada previamente y se continua con la agitación a 700 rpm por 20 minutos. Los reactores se mantienen a 5°C durante todo el proceso. Por último, se realiza una destilación rotatoria asociada a baño maría por 30 minutos a 40 rpm en vacío para eliminar el disolvente orgánico. La suspensión de micropartículas obtenidas se llevó a 10 mL con agua destilada (500 ppm) y se conservará en frío a 4°C hasta su utilización. El tamaño de la partícula se determinó con el analizador de tamaño de partículas por difracción láser Mastersizer 3000. Finalmente, se determinó la morfología de las partículas por microscopía óptica.

Para evaluar la liberación prolongada de metabolitos secundarios y su actividad antimicrobiana contra *Geotrichum candidum*, se realizaron pruebas en placa con agar Mueller Hinton. Por extensión se adicionaron 500 µL de cada uno de los lotes de micropartículas arriba mencionados (500 ppm), 400 µL de agua estéril y 100 µL de inóculo (4.9×10^6 cel/mL). Como controles se utilizaron nitrato de miconazol y agua estéril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de extracto.

Los dos extractos obtenidos, etanólico y metanólico a partir de polvo de *P. granatum* mostraron rendimientos de 32.548 % y 31.688% respectivamente. En cuanto a solubilidad, el extracto etanólico fue muy soluble en metanol y soluble en agua, mientras que el metanólico fue muy soluble en agua y soluble en metanol. Se ha considerado el efecto de distintos solventes en la extracción de compuestos polifenólicos a partir de epicarpio de *P. granatum*, mostrando mayor rendimiento el extracto obtenido con metanol, seguido del agua y etanol (Wang & Atungulu, 2011).

Se caracterizaron los extractos mediante cromatografía en capa fina y se evaluaron distintas fases móviles, la mezcla que presentó mayor número de fracciones separadas fue el sistema cloroformo –

acetona – metanol en una relación 6:3:1 (figura 1). Los extractos presentaron 5 fracciones principales con frentes de recorrido de valores 9.83, 6.55, 2.95, 1.68 y 1.13.

El epicarpio de *P. granatum* es considerado residuo agroalimentario, aunque los fitoquímicos fenólicos



Figura 1. Placa cromatográfica obtenida con extracto de piel de *Punica granatum* empleando como fase móvil cloroformo – acetona – metanol (6:3:1).

se encuentran presentes en mayores concentraciones que en otras partes de la planta o fruto (López et al., 2010) donde se ha demostrado que los principales fitoquímicos recuperados a partir de extractos crudos de epicarpio son punicalaginas y ácido elágico (Amyrgialaki et al., 2014).

Actividad antifúngica extracto libre.

La evaluación preliminar mediante la técnica de pocillos en agar permitió observar que ambos extractos presentaron actividad antifúngica. La mayor actividad antifúngica se observó con el extracto etanólico a 2030 ppm con un halo de inhibición de 1.28 cm, mientras para el metanólico a 1560 ppm fue de 1.12 cm (Figura 2). Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria de ambos. Las absorbancias obtenidas a 600 nm se muestran en la tabla I. Se aprecia que el extracto inhibió el crecimiento del hongo desde la mínima concentración probada. Los aumentos en las absorbancias obtenidas en los micropozos de control con extracto son debido a la absorción de luz por los componentes presentes en el extracto.



Figura 2. Halos de inhibición mostrados por extractos etanólico (E) y metanólico (M) a 2030 y 1560 ppm. Pozo de control con agua estéril (C).

Tabla I. Absorbancias obtenidas a 600 nm en microplaca con extractos a distintas concentraciones.

Extracto	Concentración (ppm)						Medio+inóculo	Medio
	2025	1012	506	253	126			
Etanólico	1.3392	0.5502	0.3722	0.3032	0.2906	1.1820	0.0679	
Etanólico control	1.2860	0.3148	0.2350	0.2884	0.3696	1.1387	0.0672	
Metanólico	0.7198	0.6657	0.3867	0.2997	0.2352	1.2321	0.0713	
Metanólico control	0.6239	0.5772	0.3073	0.2825	0.3228	1.2668	0.0669	

Se ha demostrado que los principales compuestos con actividad antifúngica presentes en extractos de epicarpio de *P. granatum* son polifenoles, particularmente punicalaginas, el mayor elagitanino presente en la piel de granada (Glazer et al., 2012). Las tasas de crecimiento de hongos se han mostrado negativamente correlacionadas con los niveles totales de compuestos polifenólicos y contenido de punicalaginas presentes en extractos. Particularmente, el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos es inhibido a bajas concentraciones de extracto (Osorio et al., 2010).

Caracterización de las micropartículas poliméricas.

Se determinó el tamaño de la partícula con el analizador de tamaño de partículas por difracción láser Mastersizer 3000. La medición de la luz dispersada se realizó a los distintos lotes de micropartículas preparados. Los tamaños promedio de los lotes fueron de 1.75 μm con alta uniformidad. La morfología de los lotes de micropartículas generados se muestra en la figura 3.

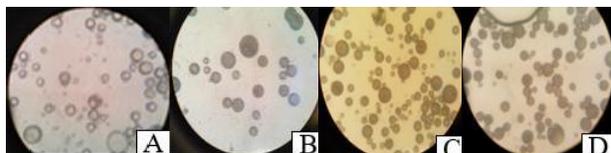


Figura 3. Morfología de micropartículas poliméricas obtenidas con la técnica de doble emulsión (w/o/w) - evaporación. Lotes independientes. Tamaño promedio de 1.85 μm y uniformidad de 6.710. Aumento 40 X

Actividad antifúngica de extracto incorporado en micropartículas.

El extracto metanólico a 500 ppm incorporado en micropartículas mostró mayor actividad antifúngica, seguido del extracto etanólico, ambos extendidos en placa (Figura 4). Se empleó como control nitrato de miconazol a 200 ppm y agua estéril. La película de micropartículas constituidas por polímeros de metacrilato catiónico únicamente permite la liberación del activo natural en pH ácido. Por lo tanto, al presentarse la infección fúngica en fruto se aprovechará la acidez provocada.

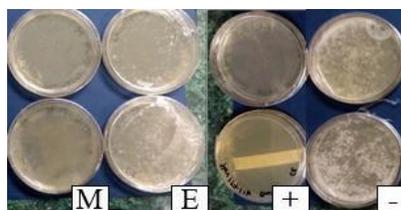


Figura 4. Evaluación de actividad antifúngica. Lotes con micropartículas incorporadas con extracto metanólico (M) y etanólico (E). Control positivo (+), control negativo (-). Medio Mueller Hinton.

Es de destacar que el presente estudio se ha realizado con extracto crudo, que ha sido obtenido de una parte vegetal considerada desecho y que presenta su actividad antifúngica en concentraciones del orden de partes por millón. Esto abre la puerta a la microencapsulación polimérica de extractos como un potencial método efectivo para el control de enfermedades de productos hortofrutícolas ya que este tipo de formulaciones no supone riesgo a la salud humana y al medio ambiente. Así mismo, abre un campo para el empleo de otros extractos que pudieran alcanzar funciones similares ya que aumentan potencialmente la residualidad del activo en el fruto, así como una liberación prolongada e inteligente.

BIBLIOGRAFÍA

- Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., &Kefalas, P. 2014. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punicagranatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216-222.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., del Valle, M. V., Bosquez-Molina, E., & Sánchez- Domínguez, D. 2005. Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha*, 7(1), 1-6.
- Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., &Khan, M. 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punicagranatum L.*). *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci*, 9(3), 273-281.
- Flores, R. A., &Yahia, E. M. (2001). Tratamientos físicos en poscosecha de fruta y hortaliza. *Horticultura internacional*, (1), 80-89.
- Garay, A. V. A., & Chávez, B. C. 2014. La horticultura en México: una primera aproximación al estudio de su competitividad. *INCEPTUM Revista de Investigación en Ciencias de la Administración*, 7(12), 271-294.
- Glazer, I., Masaphy, S., Marciano, P., Bar-Ilan, I., Holland, D., Kerem, Z., & Amir, R. 2012. Partial identification of antifungal compounds from *Punicagranatum* peel extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(19), 4841-4848.
- Lauzardo, A. N. H., Baños, S. B., &del Valle, M. G. V. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119-123.
- López, O. A., López-Malo, A. & Palou, E. 2010. Granada (*punicagranatum L.*): una fuente de antioxidantes de interés actual. *Temas selectos de ingeniería en Alimentos* 4(1), 64-73.
- Macías Macías, A. 2003. Enclaves agrícolas modernos: el caso del jitomate mexicano en los mercados internacionales. *Región y sociedad*, 15(26), 104-151.
- Martínez, J. R., Vicente, A. A., Saenz, J. C. M., Herrera, R. R., & González, C. N. A. 2012. Un tesoro percedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (54), 57-63.
- Osorio, E., Flores, M., Hernández, D., Ventura, J., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Caryaillinoensis*), pomegranate husk (*Punicagranatum*) and creosote bush leaves (*LarreatridentataCov.*) against plant pathogenic fungi. *Industrial crops and products*, 31(1), 153-157.
- Sauceda, E. N. R. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Thornton, C. R., Slaughter, D. C., & Davis, R. M. 2010. Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody- based ELISA. *International journal of food microbiology*, 143(3), 166-172.
- Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., &Atungulu, G. G. 2011. Extract of phenolics from pomegranate peels. *The open food science journal*, 5, 17-25.
- Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., &Warid, K. 2012. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *Int J PharmPharmSci*, 4(3), 675-682.