

## **Extractos acuosos de fruto de Nance, caracterización y aplicación in vitro sobre el control de *Colletotrichum asianum***

González-Estrada, R. R.<sup>1</sup>, Méndez-Valdivia, G. K.<sup>1</sup>, Montaña-Leyva, B.<sup>2</sup>, Gutierrez-Martinez, P.<sup>1</sup>, Blancas-Benitez, F. J.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico 2595, Col. Lagos del Country C.P. 63175 Tepic, Nayarit, Mexico. <sup>2</sup>Department of Food Research and Graduate Program, University of Sonora, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico. \*Correo: fblancas@ittec.edu.mx

**Palabras clave:** compuestos bioactivos; inhibición; patógeno de la fruta; desarrollo de hongos

### **Introducción**

El nance (*Byrsonima crassifolia*) es una especie nativa de mesoamérica que se distribuye naturalmente desde México hasta Panamá. Es muy valorado por sus frutas comestibles, agrídulces y ligeramente ácidas, que se pueden consumir frescas o transformadas en gelatinas, refrescos, helados y otros productos. Esta especie también tiene una variedad de usos tradicionales, medicinales y silvícolas, entre otros [1]. Por las características del hábitat donde prospera, que debe ser un clima cálido, semicálido y templado, el resultado es que México es un lugar en el que puede desarrollarse. Solo en 2016, según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), se produjeron 7.1 mil toneladas [2]. La alta producción de esta fruta abre la oportunidad para el uso de nance en diferentes productos. Actualmente existen pocos estudios sobre el uso de nance como agente antifúngico aun sabiendo que tiene una gran cantidad de compuestos fenólicos que pueden usarse como antimicrobianos. Se ha determinado que la composición química de la fruta contiene un alto contenido de carotenos y polifenoles. Se ha informado que la fruta contiene 0.8 mg de polifenoles totales y 0.12 mg de flavonoides totales [3]. Este tipo de aditivo alimentario permite la conservación y prolongación de la vida útil de los alimentos, al inhibir o inactivar el crecimiento de patógenos y microorganismos de deterioro [4]. El objetivo de esta investigación fue evaluar el fruto de nance como fuente viable para la obtención de compuestos de interés biológico con potencial antifúngico contra *Colletotrichum asianum* aislado de frutos de mango.

### **Metodología**

#### **Extracción acuosa de compuestos bioactivos de Nance (*Byrsonima Crassifolia*).**

El fruto de nance fue seleccionado entre distribuidores locales ubicados en el mercado de la ciudad de Tepic, Nayarit, México. Las muestras fueron lavadas con detergente comercial (Salvo™) (1,5% p / v). fueron homogeneizadas (ultraturax. T25, IKAworks, Wilmintong, NC) y se liofilizaron (Labconco modelo 77522020. Kansas, EE. UU.). Posteriormente se molieron, se tamizaron y se almacenaron herméticamente para su uso posterior. Una vez obtenida la muestra se realizó una extracción acuosa, para lo cual se pesó 1 g de muestra seca y se le adicionó 100 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó durante una hora. Pasado este tiempo, se realizó una centrifugación a 6000 rpm durante 10 min y se extrajo el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. Posteriormente, se realizó una filtración de los sobrenadantes utilizando una membrana de 0.45 µm y finalmente los extractos acuosos filtrados se almacenaron en la oscuridad a temperatura de refrigeración.

#### **Identificación por HPLC-DAD de compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de Nance (*Byrsonima Crassifolia*).**

Los ácidos fenólicos se identificaron en un equipo HPLC-DAD (Agilent 1200, Santa Clara, CA), utilizando una columna de fase inversa Zorbax Eclipse Plus C18, 4,6 mm x 100 mm (3.5 µm), según la metodología descrita por Ayala-Soto et al. [5], con algunas modificaciones. Las condiciones operativas fueron: volumen de inyección, 5.0 µL, temperatura de la columna 30 °C. El gradiente de elución se realizó con agua acidificada con ácido trifluoroacético a pH 2 (A) y acetonitrilo (B) como sigue: a 0 min 15% B; después de 10 min 35% de B; a los 11 min

55% de B, a un caudal de 0.6 mL/min; a los 12 min 75% de B con un caudal de 0.8 ml/min; a 13 min 100% B con un caudal de 1.0 mL / min, a 25 °C. La identificación de los picos de ácidos fenólicos se basó en el tiempo de retención de los estándares.

### **Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos acuosos contra *Colletotrichum asianum***

Para la evaluación de la actividad antifúngica, el hongo patógeno se cultivó previamente en agar papa dextrosa (PDA) a 27 °C durante 6 días hasta su crecimiento. Los extractos obtenidos de la extracción se filtraron mediante acrodiscos estériles (unidad de filtración Millex-HN; 0.45 µm, nylon, 33 mm) para posteriormente ser incorporados al medio Agar Papa Dextrosa (PDA) en concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1% (v / v). La evaluación del desarrollo del crecimiento micelial, se realizó en placas de PDA que contenían inóculo del hongo en el centro de las placas de Petri tratadas. Luego, las placas de agar se incubaron a 27 °C durante cuatro días. El control consistió en placas PDA sin extracto. Los resultados se informaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en comparación con el control.

### **Esporulación**

Para la evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre la esporulación, se utilizó la metodología descrita por Ramos et al. [6]. Sobre las placas de Petri utilizadas en la evaluación del crecimiento micelial, se agregaron 8 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie fúngica con una varilla de vidrio estéril con el fin de romper la estructura micelial y liberar las esporas formadas, la suspensión se filtró con gasa estéril en un embudo de vidrio estéril y la suspensión se colocó en matraces de vidrio estériles de 50 mL. La concentración de esporas por mL se determinó contando en la cámara de Neubauer, depositando 10 µL de cada tratamiento y visualizando a través del microscopio óptico (Motic BA300, EE. UU.).

### **Germinación**

La prueba de germinación de esporas se determinó mediante la metodología descrita por Ramos et al. [6] con algunas modificaciones, se realizó una suspensión stock de esporas utilizando un cultivo del hongo, con 4 días de edad y ajustado a  $1 \times 10^5$  esporas/mL. Se preparó PDA con soluciones de extracto agregadas al 0.1%, 0.5% y 1%, luego se tomaron pequeños discos y se colocaron en un portaobjetos dentro de una placa de Petri estéril, posteriormente se inoculó una alícuota de 10 µL de las esporas del hongo en el disco de agar que contiene los tratamientos. Finalmente, se incubaron los discos de PDA. El recuento de esporas germinadas se realizó después de 8 h utilizando un microscopio óptico (Motic BA300, EE. UU.) Con un objetivo de 40X contando el número de esporas germinadas. Una espора se considera germinada cuando el tubo germinativo tiene el doble de su tamaño original.

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis de identificación se realizaron por triplicado, calculando la media y la desviación estándar para cada determinación. Todos los análisis de inhibición en desarrollo micelial, esporulación y germinación *in vitro* se realizaron por triplicado con dos repeticiones, calculando la media y la desviación estándar para cada determinación. Para determinar diferencias significativas entre concentraciones (0.1%, 0.5%, 1.0% (v / v)), se utilizó el software Statistica 10.0 para Windows (STATISTICA®, STATSOFT Inc., EE. UU.) Con un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño multifactorial. y con una prueba de LSD con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## **Resultados y discusión**

### **Identificación de los principales compuestos bioactivos presentes en extractos acuosos de nance mediante HPLC-DAD.**

Los extractos acuosos de nance analizados por HPLC-DAD, mostraron como compuestos principales a la catequina, que es un flavonoide que ha mostrado efectos inhibidores contra diversos microorganismos [7], seguido de la galocatequina, compuesto que ha mostrado

importantes efectos antimicrobianos específicamente en bacterias [7] y ácido gálico, que es un ácido fenólico que ha demostrado tener efectos antimicrobianos en algunos hongos [8]. La presencia de los compuestos identificados en los extractos acuosos puede indicar un potencial antifúngico que estos extractos podrían tener a nivel *in vitro*.

### **Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos acuosos contra *Colletotrichum asianum***

El efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento micelial de *C. asianum* fue bastante cercano en los tres tratamientos, observándose 34.77% de inhibición a una concentración de 0.1%, 34.43% de inhibición a una concentración de 0.5% y 32.9% de inhibición a una concentración del 1%. La eficacia de la inhibición en el desarrollo del micelio se puede atribuir a la presencia de ácido gálico y catequina obtenida de la fracción soluble del nance. El ácido gálico tiene acción sobre la polifenoloxidasas de hongos saprofitos y fitopatógenos, lo que produce la acumulación de productos de oxidación, provocando que estos productos afecten la síntesis de proteínas [9]. Al mismo tiempo, la catequina podría provocar la inducción de una rápida fuga de pequeñas moléculas atrapadas en el espacio intraliposomal y la agregación de liposomas, lo que podría afectar la membrana celular y provocar una lisis de conidios e hifas. Estos datos coinciden con lo reportado con Toyoshima et al. [10] al observar el efecto de la catequina sobre *T. mentagrophytes*. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción del ácido gálico y la catequina, la función de la pared celular podría verse comprometida, dañando su estructura y provocando una reducción de la longitud de las hifas. Al final de la prueba, se observó un comportamiento similar en el ciclo de crecimiento de *C. asianum* sobre los diferentes tratamientos, siendo la concentración de los extractos el factor limitante en el diámetro de crecimiento del hongo. Para la esporulación, los diferentes tratamientos con una eficacia inhibidora de *C. asianum* ya que redujeron el proceso de esporulación hasta en un 98%. Los resultados de la esporulación pueden estar relacionados con el daño al micelio por la presencia de compuestos fenólicos, ya que estos podrían afectar las hifas, fundamentales en la formación de esporas. Este resultado coincide con lo reportado por Cortés-Rivera et al. [11] al observar una disminución en la producción de esporas de *Penicillium italicum* expuestas a extractos acuosos de mesocarpio y exocarpio de coco.

En la determinación de la inhibición de la germinación en esporas de *C. asianum* se puede observar que la concentración del 1% del extracto fue la que mantuvo la mayor inhibición del proceso de germinación. La inhibición en la germinación puede ser provocada por el ácido gálico debido al daño de los esteroides, que son componentes vitales de la membrana celular de los hongos y son esenciales para su crecimiento y viabilidad celular, por lo que el ácido gálico podría alterar el proceso de germinación del hongo. Estos resultados son similares a los reportados por Li et al. [9] donde se utilizó ácido gálico para estudiar sus efectos contra *Candida albicans* y se demostró una reducción del hongo comparable con el fármaco fluconazol.

### **Conclusiones**

La evaluación del potencial antifúngico de los compuestos bioactivos extraídos del nance (*Byrsonima crassifolia*) demostró una alta efectividad antifúngica *in vitro* contra el hongo *C. asianum*, patógeno emergente en el cultivo del mango y agente causante de la antracnosis, una de las enfermedades más agresivas presentes en el mango, por lo que los extractos acuosos de nance podrían ser una alternativa ecológica para el tratamiento de la antracnosis en el mango.

### **Agradecimientos**

Esta investigación fue apoyada por el Tecnológico Nacional de México (Número de proyecto 10326.21-P).

### **Referencias**

- [1] Avilés-Peraza, G. C. (2015). Rico y popular: Importancia y usos tradicionales del nance

- (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)., *Herb. CYCY*, **vol. 7**.
- [2] SIAP, (2018), Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.” Gobierno de Mexico, Ciudad de Mexico, **p. 1**,
- [3] Moreno-León, G. R. (2015). Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante del extracto del fruto de nanche (*Byrsonima crassifolia*).
- [4] Poveda-Castillo, G. del C. (2017). Efecto Antimicrobiano del Compuesto Bioactivo Fucoidan frente a *Listeria monocytogenes*.
- [5] Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldívar, S. O., García-Lara, S., y Pérez-Carrillo, E. (2014). Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocoll.*, **vol. 35**, pp. 471–475.
- [6] Ramos-Guerrero, A., Gutierrez-Martinez, P., y Berumen-Varela, G. (2017). In vitro response of *Colletotrichum* to chitosan . Effect on incidence and quality on tropical fruit . Enzymatic expression in mango.
- [7] Al-Salt, J. (2012). Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Res J Microbiol*, **7**, 59–67.
- [8] Filip, S., Đurović, S., Blagojević, S., Tomić, A., Ranitović, A., Gašić, U., Tešić, Ž., & Zeković, Z. (2021). Chemical composition and antimicrobial activity of Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf extracts. *Archiv Der Pharmazie*, **354(2)**, 2000195.
- [9] Li, Z., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H., & Aibai, S. (2017). Antifungal activity of gallic acid in vitro and in vivo. *Phytotherapy Research*, **31(7)**, 1039–1045.
- [10] Toyoshima, Y., Okubo, S., Toda, M., Hara, Y., & Shimamura, T. (1994). Effect of catechin on the ultrastructure of *Trichophyton mentagrophytes*. *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, **68(3)**, 295–303.
- [11] Cortés-Rivera, H. J., Blancas-Benitez, F. J., & Romero-islas, L. C. (2019). *In vitro* evaluation of residues of coconut ( *Cocos nucifera* L .) aqueous extracts , against the fungus *Penicillium italicum*. **31(8)**, 613–617.