

Compósitos de quitosano-ácidos grasos reducen la infección de *Botrytis cinerea* en fresa en poscosecha
Chitosan-fatty acids composite reduce *Botrytis cinerea* infection on post-harvest strawberry

Ma. Guadalupe Sandoval Flores¹

Rafael Jiménez Mejía¹

Gustavo Santoyo²

Patricia Nayeli Alva Murillo³

Joel Edmundo López Meza⁴

Pedro Damián Loeza Lara¹

¹ Licenciatura en Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo

² Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

³ Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

⁴ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Autor para correspondencia: Pedro Damián Loeza Lara, E-mail: pdloeza@ucienegam.edu.mx

Resumen

Introducción: El moho gris es una de las principales causas de pudrición en poscosecha del fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), la cual es ocasionada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers.:fr. El tratamiento con fungicidas químicos es el método principal de su control; no obstante, su uso ocasiona problemas de salud y contaminación. Lo anterior promueve la investigación hacia

alternativas de control. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de compósitos de quitosano-ácidos grasos sobre la infección de *B. cinerea* en frutos de fresa en poscosecha.

Método: Se realizaron bioensayos *in vitro* para evaluar el efecto del quitosano, octanoato de sodio y ácido decanoico sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. Asimismo, en bioensayos *in vivo* se evaluó la protección de los compuestos solos y en mezcla sobre la severidad de la infección del moho gris en frutos de fresa en poscosecha. Los tratamientos se evaluaron bajo un diseño completamente al azar, y los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$) y comparación de medias por el método de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados: El quitosano inhibió el crecimiento en 100 % cuando se aplicó en concentraciones de 10, 12.5 y 15 mg/mL, mientras que el octanoato de sodio alcanzó el mismo porcentaje de inhibición en las concentraciones de 0.33 y 0.49 mg/mL. Finalmente, el ácido decanoico inhibió en 100 % a *B. cinerea* en las concentraciones de 0.17, 0.34 y 0.51 mg/mL. En los bioensayos *in vivo*, los mejores resultados de protección de los frutos de fresa de la infección por *B. cinerea* fueron aquellos en los que se utilizó el compósito quitosano/octanoato de sodio (12.5/0.49 y 15/0.49 mg/mL) con ausencia de severidad. También destacaron los tratamientos de quitosano (15 mg/mL), ácido decanoico (0.51 mg/mL) y del compósito quitosano/ácido decanoico (12.5/0.51 y 15/0.51 mg/mL), donde el grado de severidad fue entre 1 y 2.

Discusión o Conclusión: El quitosano, octanoato de sodio y ácido decanoico inhibieron significativamente el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*. El compósito quitosano/octanoato de sodio posee un efecto protector mayor de los frutos de fresa, en relación a los compuestos aplicados solos. El quitosano y el ácido decanoico presentaron un efecto protector significativo de los frutos, aplicados solos o como compósito. Lo anterior sugiere que estos compuestos podrían ser utilizados potencialmente en el control de *B. cinerea* en poscosecha.

Palabras clave: Quitosano; ácidos grasos; compósito; *Botrytis cinerea*; *Fragaria x ananassa*

Abstract

Introduction: Grey mold is one of the main causes of post-harvest strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) rot fruit, which is caused by *Botrytis cinerea* Pers.:fr fungus. The treatment with chemical fungicides is the main method for its control; however, its use cause health concerns and pollution. The above promote the research toward alternatives of control. The aim of the present

research was to evaluate the chitosan-fatty acids composites effects on the *B. cinerea* infection in post-harvest strawberry fruits.

Method: *In vitro* bioassays were conducted to evaluate the chitosan, sodium octanoate and decanoic acid effect on the mycelial growth of *B. cinerea*. Likewise, *in vivo* bioassays were conducted to evaluate the compounds alone and in mixture effect on infection severity of grey mold in post-harvest strawberry fruits. The treatments were evaluated in a completely randomized design and the data were analyzed by means of analysis of variance (ANOVA) ($p \leq 0.05$) and average comparison by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Results: The chitosan inhibited 100 % of the growth when it was applied in 10, 12.5 and 15 mg/mL concentrations, while the sodium octanoate reached the same inhibition percentage in 0.33 and 0.49 mg/mL concentrations. Finally, decanoic acid inhibited in 100 % to *B. cinerea* in 0.17, 0.34 and 0.51 mg/mL concentrations. In *in vivo* bioassays, the best results of strawberry fruits protection from *B. cinerea* infection were those in which the chitosan/sodium octanoate (12.5/0.49 y 15/0.49 mg/mL) were utilized, with absence of severity. Also highlight the chitosan (15 mg/mL), decanoic acid (0.51 mg/mL) and chitosan/decanoic acid composites (12.5/0.51 and 15/0.51 mg/mL) treatments, with severity degrees between 1 and 2.

Discussion or Conclusion: The chitosan, sodium octanoate and decanoic acid significantly inhibited the *in vitro* mycelial growth of *B. cinerea*. The chitosan/sodium octanoate composite have a greater protective effect of strawberry fruits, in relation to the compounds applied alone. The chitosan and decanoic acid presented a significantly protective effect of the fruits, applied alone as well as in composite. The above suggest that these compounds could be potentially used in the post-harvest control of *B. cinerea*.

Keywords: Chitosan; fatty acids; composite; *Botrytis cinérea*; *Fragaria x ananassa*

Recibido en 31/07/2018

Aceptado en 24/09/2018

Introducción

México es uno de los principales países productores de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), ya que ocupa el tercer lugar a nivel mundial con una producción estimada de 338,764 t durante 2016. El estado de Michoacán es la principal entidad productora y exportadora con un 76.8 % del volumen total (SIAP-SAGARPA, 2016).

La elevada producción del fruto de fresa se debe a sus propiedades organolépticas, lo que provee de notables beneficios a la salud debido a que contiene compuestos nutritivos que incluyen minerales (manganeso, magnesio, cobre, hierro y fósforo), vitaminas (A, E, K y C, entre otras), fibra dietética y un amplio rango de compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y taninos), que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antihipertensivas y anticancerígenas (Giampieri *et al.*, 2015; Forbes-Hernández *et al.*, 2017). Lo anterior ha colocado a la fresa como un alimento popular incluido en diversos productos alimenticios como el yogurt, además de mermeladas, gelatinas, alimentos funcionales y suplementos dietéticos, entre otros (Giampieri *et al.*, 2015).

Lamentablemente, el fruto de fresa es un alimento altamente perecedero, particularmente durante su transporte y almacenamiento en poscosecha, ya que es susceptible de sufrir deshidratación, daño mecánico, pudrición o infección por microorganismos patógenos, especialmente hongos. El moho gris es una de las principales causas de pudrición en poscosecha del fruto de fresa, la cual es ocasionada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers.:fr. La infección del fruto comienza desde la etapa de floración en el campo, en donde el hongo permanece latente hasta su maduración, tiempo en el cual el microorganismo cambia de saprófito a patógeno (Romanazzi *et al.*, 2013).

El tratamiento con fungicidas químicos sintéticos (por ejemplo Trioxil®, i.a. sulfato de cobre tribásico), es el principal método de control de este tipo de fitopatógenos; no obstante, el uso de estos compuestos, además de incrementar los costos de producción y evitar la exportación de la fresa, pueden ocasionar aislados resistentes al ingrediente activo (Weber, 2011), además del riesgo en la salud humana que conlleva la persistencia de residuos químicos en los frutos (Botelho *et al.*, 2010). Asimismo, y debido al interés que han mostrado los consumidores, quienes exigen alimentos libres de plaguicidas químicos en los alimentos, es necesario realizar la búsqueda de nuevas alternativas para el control de este tipo de patógenos (Darolt *et al.*, 2016).

Los ácidos grasos son moléculas ubicuas en la naturaleza, ya que pertenecen a una clase de compuestos fisiológicamente importantes, involucradas en el almacenamiento de energía, estructura de la membrana y en varias vías de señalización (Pohl *et al.*, 2011). Estas moléculas varían en longitud y nivel de saturación, existiendo ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas de 4 hasta 28 carbonos, las cuales pueden ser saturadas o insaturadas (Sylvain *et al.*, 2009). Además de realizar funciones estructurales en las células y de participar en mecanismos de control de enfermedades, entre otras funciones básicas, los ácidos grasos poseen actividad antifúngica sobre diversos hongos, además de que son biodegradables y utilizados como aditivos alimentarios (Liu *et al.*, 2008).

Por otro lado, el quitosano (poli β -[1-4]-*N*-acetil-D-glucosamina) es un biopolímero catiónico reconocido como seguro (GRAS, Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés), ya que es biodegradable, no tóxico y compatible con el ambiente (Mahae *et al.*, 2011). Este polisacárido es producido por la desacetilación química de la quitina (2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa), cuya fuente principal se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y hongos; el cual, además, puede formar biopelículas con actividad antimicrobiana, entre ésta la antifúngica (López-Mata *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014).

En este sentido, la actividad biológica del quitosano sobre hongos patógenos de plantas está ampliamente documentada (Romanazzi *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2009). Sin embargo, la actividad antifúngica del quitosano solo, no siempre alcanza los niveles de protección deseados en los frutos en poscosecha, por lo que la incorporación de moléculas antimicrobianas, como los ácidos grasos, para la formación de compósitos podría incrementar su eficacia y expandir su aplicación en la conservación de alimentos. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto protector de compósitos de quitosano-ácidos grasos sobre la infección de *B. cinerea* en frutos de fresa en poscosecha.

Método

Obtención de frutos de fresa y del hongo fitopatógeno

Los frutos de fresa var. Camino Real que se utilizaron en el presente estudio fueron obtenidos en una producción comercial de Zamora, Michoacán. Dichos frutos se seleccionaron con base en la uniformidad del tamaño, ausencia de daño físico e infección por hongos, así como por el nivel de maduración (más del 75 % de la superficie del fruto era roja) (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). Por otro lado, el hongo *B. cinerea* se obtuvo del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El hongo se mantuvo bajo resiembra continua en agar papa dextrosa (PDA, Bioxón, México) a 25 ± 2.0 °C.

Preparación de quitosano, octanoato de sodio, ácido decanoico y de los compósitos quitosano/octanoato de sodio, quitosano/ácido decanoico

El quitosano de mediano peso molecular (190 a 300 kDa) (Verlee *et al.*, 2017) se obtuvo de Sigma-Aldrich, México (75-85 % de desacetilación) y se preparó de acuerdo a las metodologías de Bautista-Baños *et al.* (2003) y Liu *et al.* (2007): Se preparó una solución de 200 mL a una concentración de 20 mg/mL, para lo cual 4 g de quitosano se disolvieron en 100 mL de agua destilada y 2 mL de ácido acético (J.T. Baker, México), los cuales se mantuvieron en agitación constante por 24 h. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a 5.6 con NaOH 1 N (J.T. Baker, México). Luego, se adicionó agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 200 mL y se procedió a esterilizar la solución a 120 °C, 20 psi, por 15 min. La solución de quitosano se utilizó para preparar cajas Petri con PDA a concentraciones finales de 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg/mL, mismas que se utilizaron en los bioensayos correspondientes.

Los ácidos grasos (octanoato de sodio y ácido decanoico) se obtuvieron de Sigma-Aldrich, México y se prepararon con base en las instrucciones del fabricante. De esta manera, se preparó una solución de octanoato de sodio a una concentración de 49.8 mg/mL en agua destilada. Con respecto al ácido decanoico, se preparó una solución en etanol absoluto (J.T. Baker, México) a una

concentración de 51.6 mg/mL. Dichas soluciones se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 0.22 μm de poro (Merck Millipore, USA). A partir de la solución de octanoato de sodio se prepararon cajas Petri con PDA a concentraciones finales de 0.016, 0.16, 0.33 y 0.49 mg/mL, mientras que para el ácido decanoico se prepararon concentraciones de 0.017, 0.17, 0.34 y 0.51 mg/mL, las cuales se utilizaron en los bioensayos correspondientes (Liu *et al.*, 2008).

Los compósitos quitosano/octanoato de sodio y quitosano/ácido decanoico se prepararon de la siguiente manera: una vez preparadas y esterilizadas las tres soluciones, las concentraciones correspondientes (aquellas que mostraron un 100 % de inhibición *in vitro* del hongo) de octanoato de sodio se disolvieron en la solución de quitosano a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), lo mismo que las de ácido decanoico. Dichos compósitos se agitaron vigorosamente por 5 min y se utilizaron en los ensayos de protección correspondientes.

Bioensayos *in vitro*: inhibición del crecimiento micelial de *B. cinérea*

El efecto del quitosano sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* se realizó de acuerdo a las metodologías de Liu *et al.* (2007) y Muñoz *et al.* (2009). Se preparó medio PDA con diferentes concentraciones de quitosano (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg/mL). Dichas soluciones se vaciaron en cajas Petri de 60 mm (SyM, México) y una vez que el medio solidificó, un fragmento de 5 mm de PDA-micelio del hongo se colocó de manera inversa en el centro de cada caja Petri. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 ± 2.0 °C durante 4-8 días hasta que el control negativo (ácido acético al 1 %) alcanzó el borde de la caja Petri. Se incluyó un control positivo con tiabendazol (Tecto 60®, polvo, 600 g i. a. kg, MSD AGVET), así como un control absoluto (*B. cinerea* + PDA). Al final del periodo de incubación, se determinó el crecimiento del diámetro de la colonia con un vernier digital (Fisher Scientific, México). Con la información obtenida se calculó el Índice Antifúngico (IA) de acuerdo a la siguiente fórmula: $IA (\%) = 1 - (DC_{\text{tratamiento}}/DC_{\text{control}}) \times 100$. Donde $DC_{\text{tratamiento}}$ = diámetro de la colonia de la caja con quitosano. DC_{control} = diámetro de la colonia de la caja control (Guo *et al.*, 2006). Se realizaron seis repeticiones de cada concentración de quitosano en ensayos independientes.

Por otra parte, el efecto del octanoato de sodio y del ácido decanoico sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* se realizó de acuerdo a Liu *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Se preparó medio PDA con diferentes concentraciones de los ácidos grasos (0.016, 0.16, 0.33 y 0.49 mg/mL para el octanoato de sodio y 0.017, 0.17, 0.34 y 0.51 mg/mL para el ácido decanoico), las cuales se vaciaron en cajas Petri de 60 mm. Para el caso del ácido decanoico disuelto en etanol, las cajas se mantuvieron abiertas por 1 h en campana de flujo laminar (CHCbiolus, México) para permitir la evaporación del etanol. Posteriormente, un fragmento de 5 mm de PDA-micelio del hongo se colocó de manera inversa en el centro de cada caja Petri. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 ± 2.0 °C durante 7 días hasta que el control negativo (agua destilada estéril para el octanoato de sodio y etanol absoluto para el ácido decanoico) y el control absoluto (*B. cinerea* + PDA) alcanzó el borde de la caja Petri. Se incluyó un control positivo con tiabendazol. Al final del periodo de incubación, se determinó el crecimiento del diámetro de la colonia con un vernier digital y se calculó el IA de acuerdo a la fórmula mostrada en el párrafo anterior. Se establecieron seis repeticiones de cada concentración de ácido graso en ensayos independientes.

Bioensayos *in vivo*: ensayos de protección de frutos de fresa de la infección por *B. cinerea* en poscosecha

Previo a la evaluación del quitosano, octanoato de sodio, ácido decanoico y los compósitos quitosano/octanoato de sodio y quitosano/ácido decanoico en la protección de frutos de fresa, se evaluó la patogenicidad del aislado de *B. cinerea* sobre frutos de fresa var. Camino Real. Para realizar lo anterior, los frutos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 min y posteriormente éstos se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril en campana de flujo laminar (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). En los frutos desinfectados se realizaron dos heridas superficiales en la zona ecuatorial (5 mm de profundidad) y un fragmento de PDA-micelio de 3 mm se colocó en cada herida del fruto. Los frutos inoculados se colocaron en contenedores de plástico estériles con algodón humedecido y se

incubaron a 25 ± 2.0 °C, durante 5-8 días (Fraire *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2009). Transcurrido este tiempo se evaluó la presencia de micelio de *B. cinerea* (Moussa *et al.*, 2013).

Después de realizar el ensayo de patogenicidad, se evaluó el efecto protector de los compuestos anteriormente señalados sobre la severidad del moho gris. Para realizar lo anterior, el cáliz de cada fruto se removió y las fresas se desinfestaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en la campana de flujo laminar, utilizando papel absorbente estéril (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). Después, se realizaron heridas superficiales (dos heridas de 5 mm de profundidad) en la zona ecuatorial de cada fruto, para así sumergirlos durante 2 min en diferentes concentraciones de quitosano, octanoato de sodio, ácido decanoico y los compósitos quitosano/octanoato de sodio y quitosano/ácido decanoico. Los frutos se dejaron secar por 1.5 h. Transcurrido este tiempo, un fragmento de PDA-micelio de cada hongo se colocó de manera invertida en las heridas del fruto para, finalmente, agregar 20 μ L de la concentración correspondiente de compuesto sobre el micelio inoculado. Los frutos se colocaron en cajas de plástico estériles con algodón estéril húmedo y se incubaron a 2 ± 2.0 °C por 7 días. Transcurrido este tiempo, los frutos se almacenaron a temperatura ambiente (25 ± 2.0 °C) durante 3 días para simular las condiciones de almacenamiento de la fresa para exportación (Romanazzi *et al.*, 2013; Darolt *et al.*, 2016). Se realizó el mismo procedimiento para los controles negativos: ácido acético al 1 % para el quitosano y el compósito quitosano/octanoato de sodio; etanol absoluto para el ácido decanoico y ácido acético al 1 % y etanol absoluto para el compósito quitosano/ácido decanoico. Se incluyó un control absoluto (frutos inoculados con *B. cinerea*). Cada tratamiento se realizó por triplicado con 10 frutos por réplica y el experimento se repitió dos veces de manera independiente.

Después del tiempo de incubación se registró la infección de los frutos por *B. cinerea*, así como el crecimiento superficial de micelio. La severidad de la enfermedad se obtuvo de acuerdo con la escala de Romanazzi *et al.* (2013), la cual tiene seis niveles: 0) fruto sano; 1) 1-20 % de la superficie del fruto infectada; 2) 21-40 % de la superficie del fruto infectada; 3) 41-60 % de la superficie del fruto infectada; 4) 61-80 % de la superficie del fruto infectada; 5) más del 80 % de la superficie del fruto infectada.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los tratamientos se aplicaron bajo un diseño experimental completamente al azar. Los datos del IA y severidad de la enfermedad se transformaron con la función $\sqrt{x + 0.5}$ (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA $p \leq 0.05$) y se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico SPSS-IBM Statistics versión 22.

Resultados

Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*

El crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* fue inhibido por Tecto 60® (6 mg/mL) y por quitosano en concentraciones de 10, 12.5 y 15 mg/mL durante un periodo de 7 días de incubación, mientras que en las concentraciones de 2.5, 5 y 7.5 mg/mL el hongo comenzó a crecer a partir del segundo día de incubación alcanzándose un IA de 71, 83 y 86 %, respectivamente. No obstante, estos valores fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) en comparación con los controles negativo y absoluto, los cuales no mostraron inhibición (Cuadro 1, Figura 1).

Cuadro 1. Efecto de quitosano sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Quitosano (mg/mL)	Crecimiento micelial (mm)	IA (%)
2.5	15.6±1.03	71 ^d
5	9.1±0.98	83 ^c
7.5	7.6±0.51	86 ^b
10	0	100 ^a
12.5	0	100 ^a
15	0	100 ^a
Control positivo [†]	0	100 ^a
Control absoluto*	53	0 ^e
Control negativo [¶]	53	0 ^e

Valores con la misma letra en la misma columna no son diferentes de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$).

Los datos representan el promedio de seis réplicas \pm la desviación estándar.

[†]Fungicida Tecto 60® (Tiabendazol 6 mg/mL).

*PDA.

[¶]Ácido acético al 1 %, pH = 5.6.

Respecto al ensayo con octanoato de sodio, éste inhibió completamente el crecimiento micelial de *B. cinerea* en dos de las concentraciones ensayadas (0.33 y 0.49 mg/mL), después de 7 días de incubación, al igual que el fungicida Tecto 60®, mientras que a la concentración de 0.16 mg/mL mostró un IA de 95 %, mostrando diferencias ($p \leq 0.05$) con los controles negativo y absoluto (0 % de IA). Finalmente, en la concentración de 0.016 mg/mL se observó crecimiento similar a los controles negativo y absoluto durante los 7 días de incubación, con un IA de 2 % (Cuadro 2, Figura 1).

Cuadro 2. Efecto del octanoato de sodio sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Octanoato de sodio (mg/mL)	Crecimiento micelial (mm)	IA (%)
0.016	52	2 ^c
0.16	3.6±2.87	95 ^b
0.33	0	100 ^a
0.49	0	100 ^a
Control positivo [†]	0	100 ^a
Control absoluto*	53	0 ^c
Control negativo [‡]	53	0 ^c

Valores con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$).

Los datos representan el promedio de seis réplicas \pm la desviación estándar.

[†]Fungicida Tecto 60® (Tiabendazol 6 mg/mL).

*PDA.

[‡]Agua destilada estéril.

Con relación al ácido decanoico, el crecimiento micelial de *B. cinerea* fue inhibido completamente, tanto por el fungicida Tecto 60® como por tres de las concentraciones del ácido ensayadas (0.17, 0.34 y 0.51 mg/mL), luego de 7 días de incubación, mientras que la concentración utilizada más baja (0.017 mg/mL) mostró un crecimiento similar ($p \leq 0.05$) a los controles negativo y absoluto durante los 7 días de incubación, con un IA de 1 % (Cuadro 3, Figura 1).

Cuadro 3. Efecto del ácido decanoico sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Ácido decanoico (mg/mL)	Crecimiento micelial (mm)	IA (%)
0.017	52.6±0.51	1 ^b
0.17	0	100 ^a
0.34	0	100 ^a
0.51	0	100 ^a
Control positivo [†]	0	100 ^a
Control absoluto*	53	0 ^b
Control negativo [‡]	53	0 ^b

Valores con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$).

Los datos representan el promedio de seis réplicas \pm la desviación estándar.

[†]Fungicida Tecto 60® (Tiabendazol 6 mg/mL).

*PDA.

[‡]Etanol absoluto.

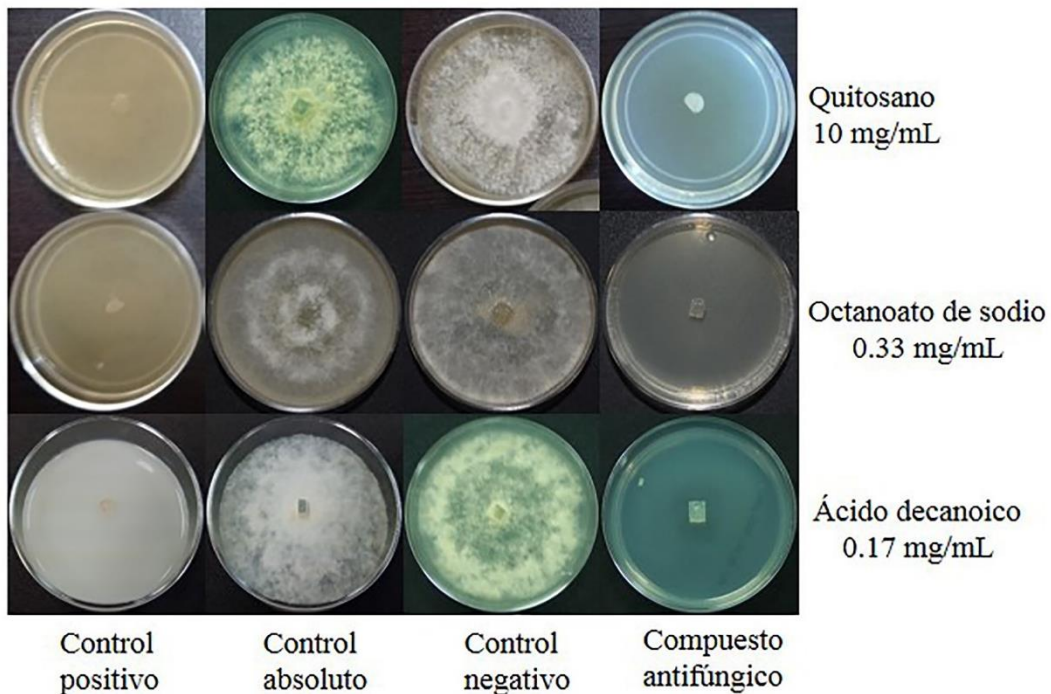


Figura 1. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* por quitosano, octanoato de sodio y ácido decanoico. Se muestra el control positivo: Tecto 60®. Control absoluto: PDA. Control negativo: ácido acético al 1 %, pH 5.6; agua destilada estéril y etanol absoluto, para el quitosano, octanoato de sodio y ácido decanoico, respectivamente. De los compuestos antifúngicos sólo se muestra una de las concentraciones que inhibió el crecimiento del hongo en un 100 %.

Protección de frutos de fresa de la infección por *B. cinerea* en poscosecha

Previo a la realización de los ensayos de protección *in vivo*, se realizó un experimento de patogenicidad y los resultados muestran que el hongo evaluado en esta investigación es patógeno para frutos de fresa var. Camino Real después de 5 días de la inoculación (resultados no mostrados). Por otra parte, los frutos de fresa tratados con quitosano y los compósitos quitosano/octanoato de sodio y quitosano/ácido decanoico e inoculados con micelio de *B. cinerea* mostraron una reducción significativa ($p \leq 0.05$) en la infección, en comparación con los controles negativo y absoluto, como se observa en los Cuadros 4 y 5, así como en las Figuras 2 y 3. Asimismo, sólo se observó una reducción significativa ($p \leq 0.05$) en la infección de los frutos cuando éstos se trataron con ácido decanoico solo, no así con el octanoato de sodio.

La mayor protección de los frutos de fresa de la infección por *B. cinerea* se observó en aquellos tratados con el compósito quitosano/octanoato de sodio en las concentraciones de 12.5/0.49 y 15/0.49 mg/mL, respectivamente, con un grado de severidad de 0 (Cuadro 4, Figuras 2G y H). Este resultado indica una infección superficial de los frutos de 0 %, en comparación con los controles negativo y absoluto cuyos grados de severidad fueron de 3.9 (infección de los frutos del 41 al 60 %) y 4 (infección de los frutos del 61-80 %), respectivamente (Cuadro 4, Figuras 2A y B).

Cuadro 4. Reducción de la severidad del moho gris en frutos de fresa tratados con quitosano, octanoato de sodio y el compósito quitosano/octanoato de sodio después de 10 días de la inoculación con *B. cinerea*.

Tratamientos (mg/mL)	Grado de severidad (escala de daño) 0-5
Quitosano	
10	2.7 ^{c-e}
12.5	1.9 ^{bc}
15	1.3 ^{bc}
Control absoluto*	4 ^e
Control negativo [¶]	3.9 ^{de}
Octanoato de sodio	
0.33	2.7 ^{c-e}
0.49	2.2 ^{b-e}
Control absoluto*	4 ^e
Control negativo [†]	4 ^e
Compósito quitosano/octanoato de sodio	
10/0.33	2.4 ^{c-e}
12.5/0.33	1.2 ^{bc}
15/0.33	1 ^{ab}
10/0.49	2 ^{b-d}
12.5/0.49	0 ^a
15/0.49	0 ^a
Control absoluto*	4 ^e
Control negativo [¶]	3.9 ^{de}

Valores con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$).

*Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea*.

[¶]Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea* y tratados con ácido acético al 1 %, pH = 5.6.

[†]Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea* y tratados con agua destilada estéril.

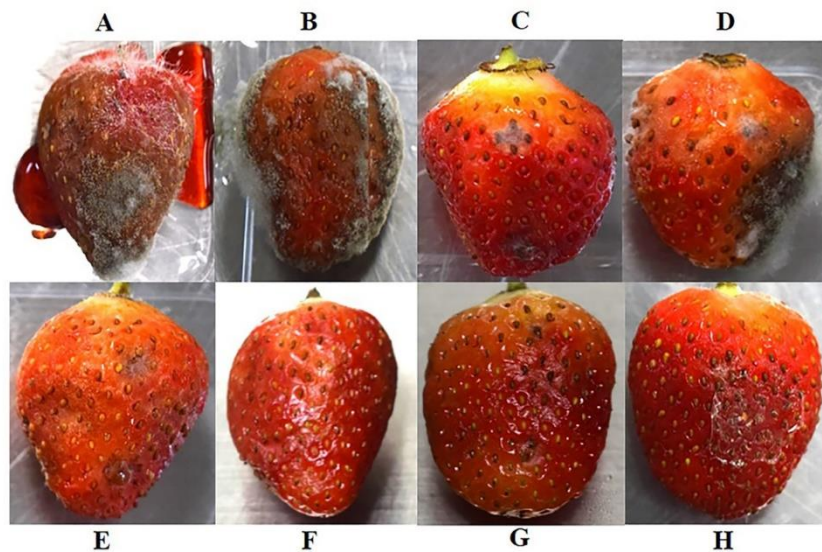


Figura 2. Efecto protector del quitosano, octanoato de sodio y del compuesto quitosano/octanoato de sodio. A) Control absoluto: *B. cinerea*. B) Control negativo: *B. cinerea* + ácido acético al 1 %, pH 5.6. C) Quitosano 15 mg/mL. D) Octanoato de sodio 0.49 mg/mL. E) Compósito quitosano/octanoato de sodio 12.5/0.33 mg/mL. F) Compósito quitosano/octanoato de sodio 15/0.33 mg/mL. G) Compósito quitosano/octanoato de sodio 12.5/0.49 mg/mL. H) Compósito quitosano/octanoato de sodio 15/0.49 mg/mL.

Asimismo, las concentraciones de 12.5/0.33 y 15/0.33 mg/mL (Cuadro 4, Figuras 2E y F) revelaron grados de severidad de 1.2 y 1, respectivamente, lo que equivale a un porcentaje de infección del 1 al 20 %, mostrando diferencias ($p \leq 0.05$) con los controles negativo y absoluto. Por otra parte, los frutos tratados con quitosano solo, también mostraron una reducción significativa ($p \leq 0.05$) de la infección, en comparación con los controles negativo y absoluto, ya que se observaron grados de severidad de 1.9 en la concentración de 12.5 (Cuadro 4) y 1.3 en la de 15 mg/mL (Cuadro 4, Figura 2C), correspondientes a una infección del 1 al 20 %. Finalmente, cuando los frutos fueron tratados sólo con octanoato de sodio, se observaron grados de severidad de 2.7 en la concentración de 0.33 (Cuadro 4) y 2.2 en la de 0.49 mg/mL (Cuadro 4, Figura 2D), correspondientes a una infección de 21 a 40 %, sin mostrar diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con los controles negativo y absoluto.

Con respecto a los frutos tratados con quitosano y ácido decanoico, la mayor protección se observó en los que se trataron con el compuesto quitosano/ácido decanoico en todas las concentraciones ensayadas (10/0.17; 10/0.34; 10/0.51; 12.5/0.17; 12.5/0.34; 12.5/0.51; 15/0.17; 15/0.34; 15/0.51 mg/mL) con grados de severidad que van desde 1 hasta 3, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los controles negativo y absoluto (grado de severidad de 5, infección de los frutos mayor al 80 %) (Cuadro 5). Sin embargo, los tratamientos que destacan son los de 12.5/0.51, 15/0.34 y 15/0.51 mg/mL, con grados de severidad de 1, 1.6 y 1, respectivamente, los cuales revelan infecciones superficiales de los frutos de 1 a 20 % (Cuadro 5, Figura 3E, F y G). Asimismo, cuando los frutos se trataron sólo con ácido decanoico, se observaron grados de severidad de 2.4 en la concentración de 0.17 mg/mL, 2.4 en la de 0.34 mg/mL (Cuadro 5) y 2 en la de 0.51 mg/mL (Cuadro 5, Figura 3D), equivalente a una infección de 21 a 40 %, mostrando diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) con los controles negativo (grado de severidad de 4.8, equivalente a una infección de 61 a 80 %) y absoluto (grado de severidad de 5, equivalente a una infección superior al 80 %) (Cuadro 5, figuras 3A y B).

Discusión o Conclusiones

El hongo *B. cinerea* es causante del moho gris, una de las enfermedades más importantes de la fresa, la cual afecta la calidad del fruto, por lo que ocasiona cuantiosas pérdidas en el rendimiento del cultivo. El patógeno infecta las hojas y las flores de las plantas de fresa y subsecuentemente éste permanece latente hasta que comienza a pudrir al fruto cuando comienza a madurar (Kim *et al.*, 2007).

Existen numerosos fungicidas químicos registrados para el control de la pudrición del fruto de fresa. Sin embargo, con los eminentes riesgos que su aplicación conlleva, se están evaluando alternativas para el control del moho gris en poscosecha. En la actualidad, los estudios sobre el quitosano y su uso en el control de enfermedades en poscosecha y la conservación de alimentos son atractivos por su capacidad para formar biopelículas biodegradables y antifúngicas, las cuales,

además, pueden incorporar agentes antimicrobianos diversos para mejorar su actividad biológica y expandir sus aplicaciones (Berger *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Reducción de la severidad del moho gris en frutos de fresa tratados con quitosano, ácido decanoico y el compuesto quitosano/ácido decanoico después de 10 días de la inoculación con *B. cinerea*.

Tratamientos (mg/mL)	Grado de severidad (escala de daño) 0-5
Quitosano	
10	2.7 ^{cd}
12.5	1.9 ^{a-c}
15	1.3 ^{ab}
Control absoluto*	4 ^{d-f}
Control negativo [¶]	3.9 ^{d-f}
Ácido decanoico	
0.17	2.4 ^{b-d}
0.34	2.4 ^{b-d}
0.51	2 ^{a-c}
Control absoluto*	5 ^f
Control negativo [†]	4.8 ^{ef}
Compósito quitosano/ácido decanoico	
10/0.17	3 ^{c-e}
10/0.34	2.8 ^{cd}
10/0.51	1.8 ^{a-c}
12.5/0.17	2.6 ^{cd}
12.5/0.34	2.5 ^{b-d}
12.5/0.51	1 ^a
15/0.17	1.8 ^{a-c}
15/0.34	1.6 ^{a-c}
15/0.51	1 ^a
Control absoluto*	5 ^f
Control negativo [°]	5 ^f

Valores con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$).

*Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea*.

¶Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea* y tratados con ácido acético al 1 %, pH = 5.6.

[†]Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea* y tratados con etanol absoluto.

[°]Frutos de fresa inoculados con *B. cinerea* y tratados con etanol absoluto y ácido acético al 1 %, pH = 5.6.

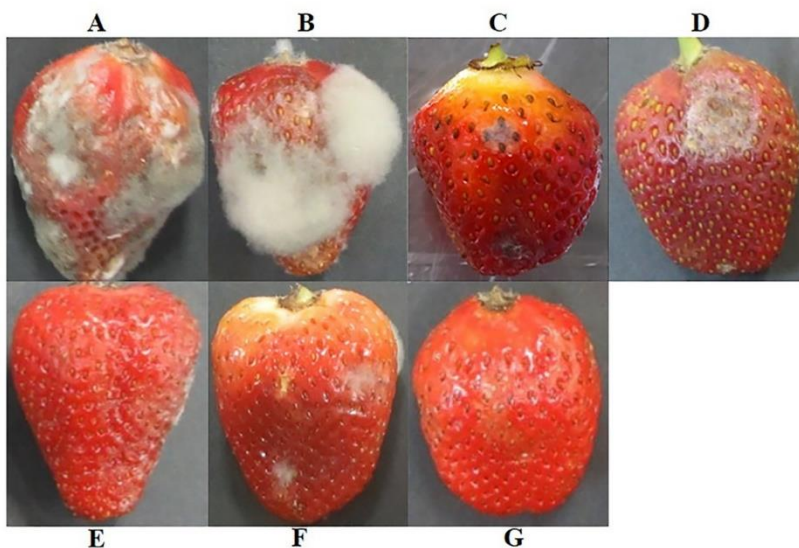


Figura 3. Efecto protector del quitosano, ácido decanoico y del compuesto quitosano/ácido decanoico y ácido decanoico. A) Control absoluto: *B. cinerea*. B) Control negativo: *B. cinerea* + etanol absoluto + ácido acético al 1 %, pH 5.6. C) Quitosano 15 mg/mL. D) Ácido decanoico 0.51 mg/mL. E) Compósito quitosano/ácido decanoico 12.5/0.51 mg/mL. F) Compósito quitosano/ácido decanoico 15/0.34 mg/mL. G) Compósito quitosano/ácido decanoico 15/0.51 mg/mL.

En el presente estudio, el quitosano redujo el crecimiento del hongo en 100 % con las concentraciones de 10, 12.5 y 15 mg/mL. Estudios previos han mostrado que el quitosano inhibe el crecimiento de una gran variedad de hongos, incluido *B. cinerea* (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008), lo que es consistente con otros estudios que indican que este biopolímero de naturaleza policatiónica, afecta a la membrana celular de los hongos mediante atracciones electrostáticas con fosfolípidos cargados negativamente, lo que provoca la salida del contenido citoplasmático o bien la inhibición de la síntesis de ADN/ARN y proteínas (Guo *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2010; Verlee *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha reportado que los ácidos grasos poseen actividad antifúngica *in vitro* sobre el crecimiento micelial de patógenos de plantas como *Penicillium pinophilum* y *P. digitatum* (Era *et al.*, 2015), *Alternaria solani* y *Colletotrichum lagenarium* (Liu *et al.*, 2008), entre otros. Se ha hipotetizado que estas moléculas afectan procesos fundamentales en los microorganismos que inhiben, como las funciones de la membrana, la producción de energía, integridad de la pared y actividad proteínica (Xi-Hui y Joon-Hee, 2017). Interesantemente, en este trabajo el octanoato de sodio y el ácido decanoico inhibieron el crecimiento micelial de *B. cinerea* en 100 % en las concentraciones de 0.33 y 0.49 mg/mL y 0.17, 0.34 y 0.51 mg/mL, respectivamente. Estos resultados son importantes debido a que ambos ácidos grasos muestran una prometedora actividad antifúngica *in vitro* sobre *B. cinerea*, un patógeno por excelencia de la fresa, lo cual hasta el momento no se ha reportado.

Considerando los resultados obtenidos *in vitro*, se evaluó el efecto protector de estas moléculas aplicadas solas y en mezcla, sobre la infección de frutos de fresa por *B. cinerea*. Los resultados muestran que aunque al aplicar el quitosano solo, se redujo significativamente la severidad del moho gris en los frutos de fresa, el compósito quitosano/octanoato de sodio reveló los mejores resultados de protección de los frutos en las mayores concentraciones en las que fue aplicado: 12.5/0.49 y 15/0.49 mg/mL, con porcentajes de infección superficial de los frutos de 0. Por lo anterior, destaca el uso de este compósito sobre la utilización de los compuestos solos, ya que en este trabajo se observó un efecto protector aditivo cuando los frutos de fresa se trataron con la mezcla en todas las concentraciones ensayadas.

Estudios previos han aprovechado las excelentes características del quitosano de formar una biopelícula comestible y ser un acarreador de diversos compuestos como nutraceuticos (Han *et al.*, 2004; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008) y extractos de plantas (Bautista-Baños *et al.*, 2003), con el objetivo de mejorar el valor nutricional del fruto de fresa y la calidad de la papaya, respectivamente. En este trabajo se adicionó un ácido graso para mejorar la protección de los frutos de fresa de la infección provocada por *B. cinerea*, obteniendo resultados positivos en el compósito quitosano/octanoato de sodio. Adicionalmente, estas moléculas poseen bajo riesgo ambiental, al ser biodegradables; y son aceptadas como aditivos alimentarios, lo que resalta aún más el resultado. Para el caso del quitosano y el ácido decanoico, tanto la aplicación de los compuestos por separado como el compósito, redujeron significativamente la severidad del moho gris en los frutos de fresa, destacando las mayores concentraciones utilizadas: quitosano 15 mg/mL, ácido decanoico 0.51

mg/mL y el compósito quitosano/ácido decanoico 12.5/0.51 y 15/0.51 mg/mL, con porcentajes de infección superficial de los frutos del 1 al 40 %. Sin embargo, es preciso mencionar que en este caso no existieron diferencias significativas entre el uso de los compuestos por separado y el uso del compósito.

En conclusión, este es el primer reporte que muestra que el octanoato de sodio y el ácido decanoico inhiben el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*. Asimismo, este trabajo también revela que el compósito quitosano/octanoato de sodio posee un mayor efecto protector de los frutos de fresa en todas las concentraciones ensayadas, sobre la infección provocada por *B. cinerea* en poscosecha. También se destaca el efecto protector del ácido decanoico, aplicado solo o en combinación con quitosano. Lo anterior sugiere que éstos podrían ser potencialmente utilizados en el control de la enfermedad en poscosecha. Sin embargo, resta por analizar la calidad nutricional de los frutos tratados, tanto con los compuestos por separado, como con el compósito, así como la aceptación del fruto por parte de los consumidores.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo otorgado por la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCEMICH), para la realización de la presente investigación, así como el excelente apoyo técnico proporcionado por el Ing. Roberto Zepeda Anaya y el estudiante Xavier Iván Ochoa Alvarado.

Referencias

- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087-1092.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre- and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop protection*, 25, 108-118.
- Berger, L.R.R, Stamford, T.C.M., Stamford, N.P. 2011. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12, 195-215.

- Botelho, R.V., Maia, A.J., Rickli, E.H., Leite, C.D., Faria, C.D.M.R. 2010. Quitosana no controle de *Penicillium* sp. na pós-colheita de maçãs. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 5, 200-206.
- Darolt, F.C., Neto, A.C.R., Di Piero, R.M. (2016). Effects of the protective, curative, and eradivative applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 1014-1019.
- Era, M., Sakai, S., Tanaka, A., Kawahara, T., Kanyama, T., Morita, H. 2015. Antifungal activity of fatty acid salts against *Penicillium pinophilum*. *Japan Journal of Food Engineering*, 16, 99-108.
- Forbes-Hernández, T.Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Cianciosi, D., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Battino, M., Giampieri, F., Bompadre, S. (2017). Strawberry (cv. Romina) methanolic extract and anthocyanin-enriched fraction improve lipid profile and antioxidant status in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-17.
- Fraire, C.M. de L., Yáñez, M.M. de J., Nieto, A.D., Vázquez, G.G. (2003). Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 285-291.
- Giampieri, F., Forbes-Hernández, T.Y., Gasparrini, M., Alvarez-Suarez, J.M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based Review. *Food & Function*, 6, 1386-1398.
- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, P. 2006. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrates Research*, 341, 351-354.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., Li, P. 2008. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71, 694-697.
- Han, C., Zhao, Y., Leonard, S.W., Traber, M.G. 2004. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 67-78.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., Gavara, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110, 428-435.

- Kim, H.J., Soo, H.L., Choul, S.K., Eun, K.L., Ki, H.C., Hyung, G.K., Dae, W.K., Seon-Woo, L., Byung, J.M. 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*, 438-444.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, *44*, 51-63.
- Liu, J., Tiang, S., Meng, X., Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *44*, 300-306.
- Liu, S., Weibin, R., Jing, L., Hua, X., Jingan, W., Yubao, G., Jingguo, W. 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathology*, *166*, 93-102.
- López-Mata, M.A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N.P., Ornelas-Paz, J.J., Zamudio-Flores, P.B., Burruel-Ibarra, S.E. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules*, *18*, 13735-13753.
- Mahae, N., Chalal, C., Muhamud, P. (2011). Antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-sugar complex. *International Food Research Journal*, *18*, 1543-1551.
- Moussa, S.H., Tayel, A.A., Alsohim, A.S., Abdallah, R.R. 2013. Botryticidal activity of nanosized silver-chitosan composite and its application for the control of gray mold in strawberry. *Journal of Food Science*, *78*, 1589-1594.
- Muñoz, Z., Moret, A., Garcés, S. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection*, *28*, 36-40.
- Pohl, C.H., Kock, L.F.J., Thibane, V.S. 2011. Antifungal free fatty acids: a review. In: Science against microbial pathogens: Communicating current research and technology advances. Méndez V.A., editor. p. 61-71.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Satini, M., Landi, L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and others resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, *75*, 24-27.
- Salgado-Garciglia, R., Molina-Torres, J., López-Meza, J.E., Loeza-Lara, P.D. 2008. Effect of crude extract and bioactive compounds of *Heliopsis longipes* on anthracnose incidence, mycorrhization, and nodulation of bean. *Agrociencia*, *42*, 679-688.

SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación), 2016. Disponible de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do (consultado 31/01/2018).

Sylvain, L.S., Lucia, V.M., Elisabetta, G. 2009. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 288-294.

Sun, X., Wang, Z., Kadou, H., Zhou, K. (2014). The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT-Food Science and Technology*, 57, 83-89.

Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268-283.

Weber, R.W.S. (2011). Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in northern German small-fruit production. *Plant Disease*, 95, 1263-1269.

Xi-Hui, L. y Joon-Hee, L. (2017). Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. *Journal of Microbiology*, 55, 753-766.