

ENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES COMO AGENTE DE BIOCONTROL
ENCAPSULATION OF POLYPHENOLS AS A BIOCONTROL AGENT

Carrillo D *.; Villareal D¹; Galarza, W.² Cañarte J.¹

¹Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Manta, Ecuador

²Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

RESUMEN

La podredumbre gris, causado por *Botrytis cinerea*, es una epidemia de filoxera (insectos succionadores de savia), que limita la producción y exportación de uva causando pérdidas económicas en la industria vinícola. El objetivo del presente trabajo es evaluar el principio del resveratrol encapsulado en diferentes matrices como lecitina de soja y β -glucano de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y avena respectivamente que conllevan a favorecer la penetración de este compuesto a través de la pared celular para impedir el crecimiento del hongo patógeno. El crecimiento en placa de *Botrytis cinerea* nos indica que la emulsión con acetato de etilo $C_2H_5(CH_3COO)$ y resveratrol $C_{14}H_{12}O_3$ encapsulado en betaglucano $C_{18}H_{30}O_{14}X_2$ procedente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a concentración de 15 g/l. y la emulsión con lecitina y acetato de etilo a concentración de 20 g/L. existe una reducción significativa con relación al control. Las emulsiones (con acetato) son eficaces porque existen diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas, al eliminar el acetato en rotavapor a 60°C y una presión a vacío de 0.7-0.8 bar a 75 rpm por 1 hora si se observan diferencias y la más eficiente es β -glucano de cebada de 20g/L con una inhibición del crecimiento de 70%. La distribución de tamaño de gotas de las emulsiones con acetato y las suspensiones sin acetato se midió por difracción láser (Mastersizer 2000 de Malvern). Para medir la distribución de tamaño de gota, el valor de $d(0,5)$ de las emulsiones a diferentes concentraciones de los compuestos encapsulantes (lecitina y β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* y β -glucano de cebada) así se obtiene que el menor valor para la emulsión y para la emulsión lecitina con acetato de etilo es 0.143 μm . después de estabilizar en el agitador de alta velocidad a 70Hz por 4 minutos con un rango de tamaño de partícula entre 0.1 y 1000 μm

Palabras clave:

Emulsión, β -glucano, resveratrol, lecitina, *Botrytis cinérea*

ABSTRACT

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, is a phylloxera epidemic (sap-sucking insects), which limits the production and export of grapes causing economic losses to the wine industry. The aim of this study is to evaluate the principle of encapsulated resveratrol in different matrices such as soy lecithin and β -glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and oats respectively leading to favor the penetration of the compound through the cell wall to prevent the growth of fungal pathogen. The growth plate *Botrytis cinerea* indicates that the emulsion C_2H_5 with ethyl acetate (CH_3COO) and resveratrol $C_{14}H_{12}O_3$ encapsulated beta glucan $C_{18}H_{30}O_{14}X_2$ from the *Saccharomyces cerevisiae* yeast concentration to 15g / l. and emulsion with lecithin and ethyl acetate at a concentration of 20 g / L. there is a significant reduction relative to control. Emulsions (acetate) are effective because there are significant differences between the concentrations tested, eliminating acetate in rotavapor at 60 ° C and a pressure of 0.7-0.8 bar vacuum at 75 rpm for 1 hour if differences are observed and more β -glucan it is efficient barley 20g / L with growth inhibition of 70%. The droplet size distribution of the emulsions with ethyl acetate and suspensions without measured by laser diffraction (Malvern Mastersizer 2000 of Malvern). To measure droplet size distribution, the value of $d(0.5)$ of emulsions at different concentrations of encapsulants compounds (β -glucan lecithin and *Saccharomyces cerevisiae* and barley β -glucan) is obtained so that the lower value for emulsification and lecithin emulsion with ethyl acetate is 0.143 μm after stabilize in high speed stirrer to 70Hz for 4 minutes with a range of particle size between 0.1 and 1000 μm

Keywords:

Emulsión, β -glucan, resveratrol, lecithin, *Botrytis cinérea*

1. ANTECEDENTES

Como antecedentes al desarrollo de estos nuevos fungicidas citamos la actividad antifúngica de los aceites esenciales de productos naturales y extractos de plantas. Por ejemplo citamos el *Origanum vulgare* L., L.(orégano), *Monarda didyma* (bergamota silvestre) y de una formulación comercial de aceite de tomillo contra *B. cinérea* inhibiendo el crecimiento del patógeno a 200 mg / ml de aceite de tomillo. Otro ejemplo citamos que el crecimiento del micelio del patógeno se redujo significativamente en la mayor concentración de los aceites esenciales de *O. vulgare* y *M. didyma*. (Taborda L. 2014)

Otros estudios nos indican que los extractos naturales cuyo principio activo es el ácido pinolénico proveniente del aceite de piñón de cedro blanco (*Hiba arborvitae*) inhiben la germinación de *B. cinerea* (Hernández y Bautista 2007), este componente se lo extrae mediante lipasas y agua destilada (Patente española, Número de publicación: 2 265 865)

Los extractos de las especies arbóreas de origen indio *Azadirachta indica* (Neem), que se da en las costas de Ecuador, de igual forma *Melia azederach* (*Melia* o Paraíso) con 4 sus principios activos como los terpenoides, fenoles, aminoácidos no esenciales y alcaloides tienen un efecto inhibitorio en el hongo *Botrytis cinérea*. (Donoso, E. 1998).

Otra planta de interés fue la menta (*Mentha pulegium* L.), que causó inhibición moderada en el crecimiento del fitopatógeno (Bouchra et al., 2003).

El resveratrol, cuya estructura química se muestra en la Figura 1, es una fitoalexina, que se encuentra en altas cantidades en la piel de la uva (Casas et al, 2010;. Zheng et al., 2011) que actúa como agente protector. Es un polifenol que ha sido estudiado como remedio natural por sus propiedades antioxidantes contra la obesidad y enfermedades cardiovasculares (Chun Fu et al., 2013). Posee efectos protectores debido a sus propiedades antioxidantes, por ello se busca técnicas que mejoren su absorción.

Se ha investigado el efecto que causa el resveratrol para la inhibición del crecimiento que al estar en contacto con el patógeno penetra la pared celular de la planta (Adrian y Jeandet, 2012).

Debido a estos hallazgos, el resveratrol ha sido seleccionado como prometedor antifúngico de origen natural. Sin embargo cuando se aplica externamente en la planta para luchar contra *B. cinérea*, el principio activo debe ser encapsulado en matrices poliméricas que actúa como un portador para que el compuesto activo inhiba el crecimiento, así como la protección contra la degradación térmica y oxidativa. (Salgado M, Soraya et.al (2015).

2. OBJETIVOS

Desarrollar un agente bioactivo en estado líquido, con la utilización de lecitina y β -glucanos como agentes encapsulantes.

Evaluar los polifenoles: resveratrol y lecitina de soya

Medir el efecto del agente en *Botrytis cinerea*

3. MATERIALES Y METODOS

Se utilizó β -glucanos de levadura *Sacharomyces cerevisiae* insoluble donado por Naturae, β -glucanos de cebada con una pureza del 75% (Glucagel TM, Alkem Laboratories LTD, India), resveratrol con una pureza del 98% (Pure Bulk, EE.UU), lecitina de soja (Glama-sot, SOTYA, S.A.), acetato de etilo con una pureza del 99% (Panreac) y agar extracto de malta (Panreac).

3.1. Pretratamiento de los β -glucanos (1,3)-(1,6)

La razón por la cual el β -glucano se somete a este tratamiento es que tenga la capacidad de disolverse en agua.

Los β -glucanos de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* se pesó 10 gramos.

Los reactivos que se añadieron está en una relación de $1,4 \times 10^{-3}$ g acetato/g sólido y $1,2 \times 10^{-2}$ ml. ácido acético/g sólido. La relación sólido/agua es de 1/10 para obtener una concentración de 100 g/L.

Para el pre-tratamiento de los β -glucanos es aumentar la presión del dispositivo de acero inoxidable 304 AISI, cuyo volumen es 170ml, es equipado con un tubo lateral para el muestreo en el tiempo, la temperatura de operación es a 135°C durante 4,5 horas y una presión de 2 bares en el interior del reactor (ver fig1.)

Durante la reacción, se tomaron varias muestras cada 30 minutos y se los enfría a temperatura ambiente, con la finalidad que sean capaces de solubilizarlos en agua.

3.2. Preparación de las emulsiones

Los encapsulantes empleados fueron lecitina, β -glucanos procedente de la levadura solubilizadas en el reactor de acero inoxidable y β -glucanos procedente de la cebada. Inicialmente fueron preparadas las disoluciones acuosas saturadas con acetato de etilo a diferentes concentraciones: 10g/l, 15 g/l y 20 g/l de surfactante. En todas las emulsiones se añade resveratrol (7.5g/l) disuelto en acetato de etilo.

La emulsión tiene la proporción aceite/agua: 1/9

La macro emulsión formada es inestable y se somete a dilución entre el acetato de etilo y el β -glucano a 70°C y la lecitina a 55°C, luego llevamos al agitador de alta velocidad (IKA Pilot Labor plant) durante 4 minutos a 70Hz para la formación de la micro emulsión (de Paz, et al., 2012) para que la emulsión sea estable.

3.3. Método de eliminación del disolvente

Para extraer el acetato de etilo se introduce la emulsión en el rotavapor (Heidolph), a 60°C y una presión a vacío de 0.7-0.8 bar a 75 rpm por 1 hora.

3.4 Efecto anti fúngico con técnicas de cultivo

El cultivo in vitro de *Botrytis cinerea*, se realizó en placas con agar de extracto de malta, previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos. En la preparación de las placas se añade al agar de extracto de malta una cantidad de emulsión o suspensión tal que la concentración de resveratrol fuera de 100ppm. Una vez preparadas las placas se realiza la siembra del hongo a partir de una placa madre de *B. cinérea* el cual se coloca en la superficie del agar una vez solidificado. Se cultivaron 5 réplicas para cada emulsión de las 3 concentraciones con acetato y sin acetato a 22°C por 7 días. Igualmente, se cultivaron una placa control y una placa 11 control de acetato de etilo, con una concentración de acetato de etilo equivalente a la utilizada en las emulsiones.

Pasado ese tiempo, se midió el diámetro de crecimiento del hongo y se comparan los efectos del uso de resveratrol encapsulándolo en las matrices de lecitina, β -glucanos de cebada y β -glucanos de *Sacharomyces cerevisiae* solubilizados en el reactor y la mezcla de estos con acetato y sin acetato de etilo respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. TAMAÑO DE LA PARTICULA

El tamaño de la partícula se ve influenciado en la concentración de la suspensión y se deduce que disminuye en el caso de la mezcla de lecitina+ β -glucano de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* así para 15g/L. presenta el mayor aumento de tamaño, y la distribución del tamaño de partícula es mejor en toda la suspensión.

Para la concentración de 10 g/L disminuye y para 20g/L se aprecia que la partícula es menor por razón de que a mayor concentración de la suspensión existe mayor influencia de la lecitina como matriz encapsulante. Estos valores se correlacionan con el valor de $d(0.5)$ que es igual a 1,434 con acetato y 3,868 sin acetato y nos indica que la partícula de la suspensión de β -glucano (1-3)(1-6) + lecitina con acetato es más estable la mezcla de sus componentes.

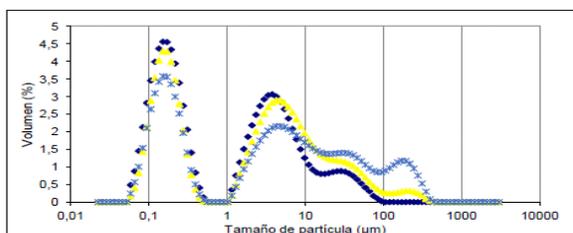


Fig. 7: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando lecitina como surfactante en β -glucano con acetato a distintas concentraciones 15g/L (♦), 10 g/L (▲) y 20 g/L (✱)

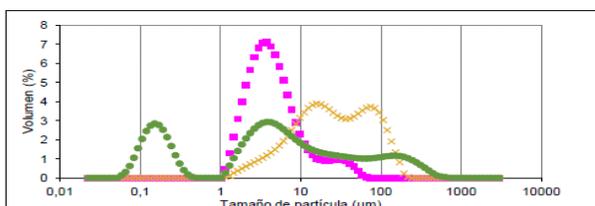
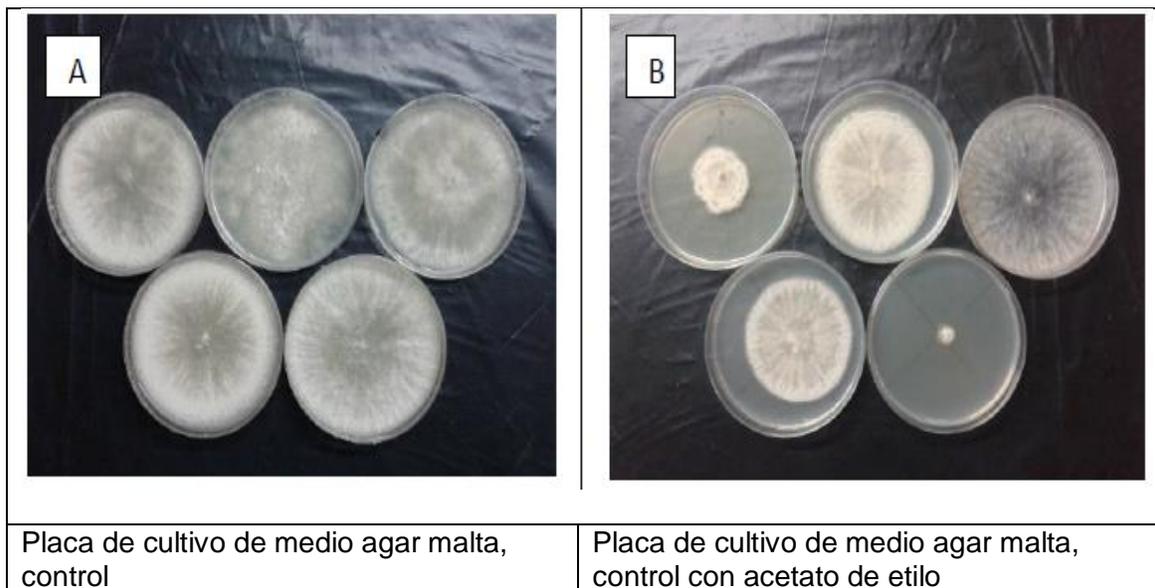


Fig. 8: Distribución de tamaño de gota de la suspensión de resveratrol usando lecitina como surfactante en β -glucano sin acetato a distintas concentraciones 15g/L (•), 10 g/L (◊) y 20 g/L (◐)

FORMULACION	$d(0.5)$
B-glucano de levadura+lecitina con acetato 20g/L	3,818
B-glucano de levadura+lecitina con acetato 10g/L	2,787
B-glucano de levadura+lecitina con acetato 15g/L	1,434
B-glucano de levadura+lecitina sin acetato 10g/L	22,947
B-glucano de levadura+lecitina sin acetato 20g/L	4,455
Naturae+lecitina 15g/L	3,868

4.2. EFECTO BIOACTIVO

En las figuras se observa el crecimiento del hongo *Botrytis cinérea* y representan diferencias significativas del control con acetato y sin acetato de etilo Figura A. control y Figura B. Placa de cultivo de medio agar malta, control



5. CONCLUSIONES

Al optimizar la formulación de encapsulación de resveratrol en matrices de β -glucanos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y β -glucanos de cebada se concluye que el mayor poder de penetración se evaluó en el crecimiento en placa de *Botrytis cinerea*. De igual forma se detecta que la emulsión de glucagel+lecitina de 20g/L la inhibición es significativa en comparación a la suspensión glucagel de 20g/L que es de 70% eficaz a la penetración y ataque al hongo.

La emulsión con acetato de etilo a 20 g/L de concentración inhibe el 100% del crecimiento.

La formación de las partículas no se ve influenciada en el efecto antifúngico en función de los valores d (0.5).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Benito-Román, O. Alonso, E (2011). Optimization of the β -Glucan Extraction Conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science* 53(3), 271-276.

Bouchra C, M Achouri, L M I Asan, M Hmamouchi (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *J. Ethnopharmacol.* 89:165-169.

Bulit, J. & Dubos, B. (1988). *Botrytis* bunch rot and blight. In: R.C. Pearson and A.C. Goheen (Edts.). *Compendium of Grapes Diseases*. P.13-15. The American Phytopathological Society. St. Paul, Mn.

Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Ossa, E.J.M.d.I., Roldan, A., Ory, I.D., Caro, I., Blandino, A., (2010). Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 96 (2), 304–308.

De Paz., Martin, Cocero, M. J., (2012). Formulation of β -carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) - drying. *Journal of Supercritical Fluids* 72, 125-133

Ellis, M. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Wallingford, UK: CAB

International. Ellis MB, Waller JM, (1974). *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). CMI Description of pathogenic fungi and bacteria, No. 341.

Guorong, S., Liqun R., Huazhong, Y., Hua, X., Runa, J. (2008). Stabilization and Encapsulation of Photosensitive Resveratrol within Yeast Cell. *International Journal of Pharmaceutics* 349 (1-2), 83-93

Hendler, SS., Rorvick, D. (2001) Alpha-lipoic acid. Eds, PDR for Nutritional Supplements. Medical Economics Company. Montvale, NJ. 20

Hernández. A, Bautista. S, Velásquez, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícola. *Revista Fitotécnica Mexicana*, Abril-Junio, 2007. Vol. 30, numero 002.

Latorre, B. & Vásquez, G. Situación de *Botrytis cinerea* latente en uva de mesa de la zona Central. *Aconex (Chile)*, 1996. 52:16-21.

Latorre, B., Lillo, C., Rioja M. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Cien. Inv. Agr. (Chile)* 2001. 28: 61-66.

Memenza M. (2009). Control biológico in vitro de *Botrytis cinerea* (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (*Vitis vinifera*). Universidad Nacional Mayor. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis para optar el título profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología, Lima – Perú 75pp.

XXXI Congreso Argentino de Química

25 al 28 de Octubre de 2016 Asociación Química Argentina

Sánchez de Bustamante 1749 – Ciudad de Buenos Aires – Argentina

The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January – December 2016 ISSN: 1852 -1207

Anales de la Asociación Química Argentina AAQAE 095 - 196

Patent Application Publication (10) United States (12) Pub. No.: US 2008/0108114 A1 Cox et al. (43) Pub. Date: May 8, 2008

Pearson, R. Compendium of Grape Disease. American Phytopathological Society Press. 1998. 13pp.

Ronda F., Rodriguez de la Calle y Pando V. Enriquecimiento de pan sin gluten con β -glucanos extraídos del hongo pleurotus ostreatus. Trabajo Fin de Master, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera, Universidad de Valladolid.

Ronda F., Rivero M. (2012). Extracción y reología de β -glucanos de cebada y elaboración de masas de pan sin gluten enriquecidas con los extractos. Trabajo Fin de Master, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera, Universidad de Valladolid.

Salgado M., Soraya Rodríguez-Rojo, Fernando Manuel Alves-Santos, María Jose Cocero. Encapsulation of resveratrol on lecithin and b-glucans to enhance its action against Botrytis cinérea. Journal of Food Engineering 165 (2015) 13–21.

Taborda, L. Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de Lippia organoides HBK y Thymus vulgaris L. como alternativas de manejo de Botrytis cinerea en fresa, Universidad de La Salle-Colombia, 2014

Sanchez N., Hydrothermal conversión of sucrose and its monosaccharides, D-glucose and D-fructose, into lactic acid. Trabajo de Fin de Master. Universidad de Valladolid, Junio 2014.