



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

INSTITUTO DE BIOCIENCIAS

CAMPUS IV

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Lacticaseibacillus paracasei* TEP8 INMOVILIZADA EN PELÍCULAS FORMULADAS CON DIFERENTES BIOMOLÉCULAS Y TRATADAS CON ULTRASONIDO

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

Carlos de Jesús Cadena De Aquino U080003

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ OVANDO



Tapachula, Chiapas; abril de 2025

TAPACHULA DE CÓRDOVA Y ORDOÑEZ, CHIAPAS;
02 DE ABRIL DE 2025

C. CARLOS DE JESÚS CADENA DE AQUINO
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

De acuerdo con la respuesta emitida por los profesores que revisaron el manuscrito de su tesis titulada:

“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Lacticaseibacillus paracasei* TEP8 INMOVILIZADA EN PELÍCULAS FORMULADAS CON DIFERENTES BIOMOLÉCULAS Y TRATADAS CON ULTRASONIDO”

Me es grato informarle que tiene Usted autorización para la impresión de la misma. Así mismo le informo que el jurado asignado para su examen de grado, quedó integrado de la siguiente manera:

DR. RAYMUNDO ROSAS QUIJANO	PRESIDENTE
DRA. DIDIANA GÁLVEZ LÓPEZ	SECRETARIA
DR. JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ OVANDO	VOCAL
DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA	SUPLENTE
M.C. JOSÉ DAVID MEJÍA REYES	SUPLENTE

“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”



Dr. Miguel Salvador Figueroa
Encargado de Dirección



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE CHIAPAS**
**INSTITUTO DE BIOCIENCIAS
DIRECCION
TAPACHULA, CHIAPAS
CAMPUS IV**



Código: FO-113-05-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

La alumna (s) o él alumno (s) Carlos de Jesús Cadena de Aquino, autora (s) o autor (es) de la tesis bajo el título de ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE Lactisaseibacillus paracasei TEP8 INMOVILIZADA EN PELÍCULAS FORMULADAS CON DIFERENTES BIOMOLÉCULAS Y TRATADAS CON ULTRASONIDO presentada y aprobada en el año 2025 como requisito para obtener el título o grado de Maestro en Biotecnología, autorizo licencia a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), para que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para su consulta, reproducción parcial y/o total, citando la fuente, que contribuya a la divulgación del conocimiento humanístico, científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 21 días del mes de abril del año 2025.

Carlos de Jesús Cadena de Aquino

Nombre y firma de la alumna (s) o él alumno (s)

Dedicatoria

A Dios Nuestro Señor por darme el don de la vida y dejarme realizar este gran logro con vida y salud y por siempre ponerme personas que me apoyaron para lograr esta gran meta en mi vida.

A mis padres, CP. Sergio Cadena Hernández, y Sra. María Isabel De Aquino Rizo, por siempre apoyarme en mis metas profesionales y también a mis hermanos Marisa, Susana y Sergio, por su apoyo incondicional en cada momento, y a mi sobrino Checolin a quien quiero darle un ejemplo de que siempre se debe de superar.

Agradecimientos

Al Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas por proporcionarme el conocimiento para seguirme formando en el ámbito profesional, a mis maestros por sus enseñanzas y dedicación para que continuara con mi formación.

Al Dr. Alfredo Vázquez Ovando, por creer en mi y apoyarme con su dirección y asesoría durante la elaboración y conclusión de la presente tesis.

A la Dra. Didiana Gálvez López por su apoyo su ánimo que siempre nos motivo para seguir adelante y terminar.

Al MC. David Mejía Reyes por su importante apoyo en el trámite de mi examen de grado.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Materiales y métodos	5
Reactivos	5
Material biológico	5
Tratamientos	5
Elaboración de las películas <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> TEP8	7
Inhibición de crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7
Análisis de datos	7
Resultados y Discusión	8
Conclusión	14
Referencias	15

Actividad antifúngica de *Lacticaseibacillus paracasei* TEP8 inmovilizada en películas formuladas con diferentes biomoléculas y tratadas con ultrasonido

Carlos de Jesús Cadena De Aquino

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino sin número, CP 30798, Colonia Solidaridad 2000. Tapachula, Chiapas México.

Correo-electrónico:cadena_deaquino@outlook.es

Resumen

Colletotrichum gloeosporioides es un hongo fitopatógeno que afecta la calidad postcosecha de muchas frutas tropicales, incluida la papaya (*Carica papaya* L.). El uso de películas comestibles (PC) conteniendo bacterias ácido lácticas (BAL) ha demostrado reducir la presencia de este fitopatógeno, sin embargo, su actividad es aún baja. El tratamiento físico de las soluciones formadoras de PC puede incrementar la actividad antifúngica de las BAL atrapadas en las PC. Este estudio evaluó la actividad antifúngica de *Lacticaseibacillus paracasei* TEP8 inmovilizada en PC elaboradas con quitosán, almidón, goma guar y carboximetilcelulosa (CMC), sometidas a ultrasonido (US) en tiempos variables. Se prepararon soluciones con cada biopolímero, gel de *Aloe vera* y glicerol como plastificante, a las cuales se incorporó la BAL antes de su sonicación y posterior formación de películas. Se evaluó la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* mediante cultivos *in vitro*. Las PC basadas en quitosán y almidón con tiempos de US superiores a 5 min lograron inhibiciones mayores al 90%, lo que sugiere que el US favorece la funcionalidad de la BAL al mejorar la disponibilidad de nutrientes o modificar la estructura del biopolímero. En comparación, las películas sin US o sin BAL presentaron inhibiciones menores al 40%, destacando la relevancia del tratamiento combinado.

Palabras clave:

Almidón, cavitación, *Colletotrichum gloeosporioides*, quitosán, ultrasonido.

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides is a phytopathogenic fungus that affects the postharvest quality of many tropical fruits, including papaya (*Carica papaya* L.). The use of edible films (EF) containing lactic acid bacteria (LAB) has been shown to reduce the presence of this phytopathogen, however its activity is still low. Physical treatment of EF-forming solutions can increase the antifungal activity of LAB trapped in EF. This study evaluated the antifungal activity of *Lacticaseibacillus paracasei* TEJ8 immobilized on EF made with chitosan, starch, guar gum and carboxymethylcellulose (CMC), subjected to ultrasound (US) at variable times. Solutions were prepared with each biopolymer, *Aloe vera* gel and glycerol as plasticizer, to which LAB was incorporated before sonication and subsequent film formation. Growth inhibition of *C. gloeosporioides* was recorded by *in vitro* cultures. Chitosan- and starch-based PCs with US times longer than 5 min achieved inhibitions greater than 90%, suggesting that US favors LAB functionality by improving nutrient availability or modifying the biopolymer structure. In comparison, films without US or without LAB presented inhibitions less than 40%, highlighting the relevance of the combined treatment.

Keywords:

Starch, cavitation, *Colletotrichum gloeosporioides*, chitosan, ultrasound

1. Introducción

Los hongos fitopatógenos afectan a los productos vegetales en la postcosecha y aceleran su deterioro. Esta situación es universal, pero se agrava más en las regiones tropicales, pues las condiciones de temperatura y humedad son más propicias para el desarrollo de una gran variedad de fitopatógenos (Godana et al., 2023). Dentro de los hongos que más daño causan a los productos vegetales se encuentra *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis. Esta enfermedad es frecuente en frutos tropicales como *Carica papaya* L. (Pacheco-Esteva et al., 2023), uno de los cultivos más importantes del sur de México y cuya producción nacional alcanzó 1 139 121 ton en 2022 (FAO, 2024).

Las dos principales estrategias usadas para reducir la contaminación y desarrollo de los hongos en la postcosecha son, la refrigeración y la aplicación de fungicidas sintéticos. Dado que estas estrategias son costosas, tanto económica como ambientalmente, otras más amigables con el ambiente se encuentran en evaluación con distintos frutos, reportándose distinto grado de eficacia (Jarman et al., 2023). El uso de películas comestibles elaboradas con biopolímeros para la conservación de frutas en la postcosecha ha demostrado minimizar la pérdida de peso, la producción de CO₂ y de etileno en frutos climatéricos, así como mantener la firmeza y el color en diversos frutos (Wibowo et al., 2024). Además, muchas películas son usadas de manera eficiente para contrarrestar el crecimiento de hongos en el fruto, bien sea porque los polímeros empleados poseen actividad antimicrobiana o; porque se adicionan diversas moléculas para proveer de esta capacidad el segundo caso, las películas hacen una doble función, como barrera y como vehículo (de Oliveira et al., 2023).

El uso de películas o recubrimientos como vehículos para diversas sustancias o moléculas es una estrategia que se está difundiendo ampliamente en la ciencia de los alimentos. Se incorporan aceites esenciales, enzimas, compuestos antioxidantes, indicadores, antimicrobianos entre otros compuestos (de Oliveira et al., 2023). En otros casos, las películas también han servido como soporte para incorporar microorganismos (inmovilización) como levaduras (He et al., 2024) o bacterias ácido-lácticas (BAL) principalmente, bien sea como probióticos o como coadyuvantes en la actividad antimicrobiana (Massoud et al., 2023; Silva et al., 2023).

La inmovilización de células en películas comestibles (PC) supone varios retos; los principales, mantener la viabilidad, pero sobre todo la funcionalidad de las células. Ya que el método de incorporación en los alimentos es determinante para lograr mantener la viabilidad y funcionalidad de estos microorganismos, en muchos de los casos se prefiere realizar inmovilización de las células en matrices poliméricas (Silva et al., 2023). Las principales biomoléculas empleadas con este fin incluyen proteínas, polisacáridos y lípidos ya sean solas o combinadas (Chang et al., 2023). También se usan otros polímeros como almidón, goma guar, y celulosa (Shivani et al., 2023).

Aunque la gran mayoría de los estudios se enfocan en el uso de las BAL contenidas en PC como controladoras de bacterias que causan deterioro de los alimentos y/o que producen intoxicaciones

en los consumidores (Muñoz-Tebar et al., 2023); existen varios reportes del uso de PC conteniendo BAL's para el control del desarrollo de hongos fitopatógenos *in vitro*. Recientemente se ha evaluado la factibilidad de usar PC de quitosán como matrices para inmovilizar BAL, aunque solo se ha logrado la disminución de hasta 40% del desarrollo del hongo *C. gloeosporioides* (Barragán-Menéndez et al., 2020).

Los componentes de las PC también deben fungir como fuente de nutrientes para el mantenimiento y desarrollo de las BAL (Ceylan et al., 2023). Se ha reportado que el gel de *Aloe vera* está compuesto de polisacáridos, glicoproteínas, vitaminas, enzimas y compuestos fenólicos y fructanos con alto grado de polimerización, los cuales se ha demostrado pueden promover el crecimiento de diversas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Dysin et al., 2023).

Otro factor que resulta determinante en la viabilidad y funcionalidad de las BAL es el tamaño de las moléculas que componen la matriz de la PC. Se ha reportado que los procesos que involucran menor tamaño de partícula tienden a aumentar la viabilidad de las BAL (Misra et al., 2022). A su vez, se ha reportado que algunos biopolímeros incluidos quitosán, almidón y carboximetilcelulosa (CMC) pueden modificar su comportamiento en solución debido a tratamientos con ultrasonido (US), los cuales provocan entre otros, cambios en el alineamiento de las cadenas, en la masa molecular, tamaño de las partículas (Du et al., 2022). Hou et al. (2018) reportan que se puede incrementar el grado de degradación de la CMC hasta en 18% con tratamientos de US de 30 min. Otros cambios derivados del proceso de cavitación (US) incluyen, ruptura de los enlaces de hidrógeno originales y los enlaces hidrofóbicos en el medio, y así promueven la formación y exposición de más centros de reacción; se aceleran las reacciones químicas lo que permite que las macromoléculas se recombinen y formen una variedad de enlaces no polares. Además, el US aumenta la solubilidad del material y hace que las películas adopten estructuras de red más compactas (Ji et al., 2020). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antifúngica de *Lactocaseibacillus paracasei* TEJ8 inmovilizada en películas elaboradas con diferentes biomoléculas pretratadas con distintos tiempos de aplicación de ultrasonido.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Se emplearon quitosán con 85% de desacetilación y $PM=340.33 \text{ g mol}^{-1}$ marca Sigma®, ácido láctico al 85% (Meyer®), glicerol (Meyer®), agar dextrosa papa (ADP) marca Sigma-Aldrich®, agar MRS marca BD Difco™, caldo MRS marca Condalab, carboximetilcelulosa (CMC) marca Sigma®, almidón de papa soluble (ACS) marca Meyer, gomar guar salubre marca Meyer. Todas las sustancias químicas empleadas fueron de grado reactivo.

2.2. Material biológico

A partir de plantaciones en los alrededores de la ciudad de Tapachula, Chiapas, México se obtuvieron 500 g de hojas maduras de sábila (*Aloe vera*), libre de daños visibles y de signos de enfermedad. Las hojas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio y procesadas para extraer el mucílago el día del corte.

El hongo *C. gloeosporioides* Penz fue obtenido del cepario del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas (IBC-UNACH). Este hongo fitopatógeno fue previamente aislado de frutas enfermas de papaya Maradol y caracterizado mediante claves dicotómicas (Vázquez-Ovando et al., 2018). La cepa fue sub cultivada en ADP a pH 7.0 por períodos de 7 días.

La BAL *L. paracasei* TEJ8 caracterizada por su capacidad antifúngica (Barrios-Roblero et al., 2019) fue obtenida del cepario del IBC-UNACH y sub-cultivada en caldo y agar MRS a pH 6.5 por períodos de 48 h. Para obtener la biomasa necesaria para ser incorporada en las PC se preparó el pre-inóculo con una asada de BAL en tubos de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 3 mL de caldo MRS durante 48 h, luego el contenido se inoculó en matraces de Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo MRS fresco y se dejó en agitación durante 48 h para alcanzar una DO de 1.8 ± 0.1 equivalente a $4 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ (datos no mostrados).

2.3. Tratamientos

Para investigar el efecto del tipo de molécula sobre la capacidad antifúngica de *L. paracasei* TEJ15 incorporadas en PC se emplearon cuatro polímeros (quitosán, almidón, goma guar y carboximetilcelulosa) como molécula base de la PC. Adicionalmente a todas las formulaciones se les adicionó glicerol como plastificante y gel de *Aloe vera* como prebiótico (Barragán-Menéndez et al., 2020). Para investigar el efecto del tiempo de aplicación de ultrasonido, las soluciones fueron tratadas a 12 tiempos con frecuencia de 40 KHz y 500 W de potencia (Sonicador Ultrasonic Processor© VCX 500). Se evaluaron 48 tratamientos resultantes de la combinación de cuatro polímeros y 12 tiempos (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 min) más ocho testigos (dos para cada tipo de polímero), uno conteniendo la BAL sin ultrasonido y otro sin la BAL y sin ultrasonido, dando un total de 56 condiciones o tratamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos resultantes de la combinación de cuatro polímeros base con la adición o no de las BAL y a distintos tiempos de ultrasonido.

No.	Composición base	No.	Composición base	No.	Composición base	No.	Composición base	BAL TEJ8	Tiempo de US (min)
1		15		29		43		No	0
2		16		30		44		Si	1
3		17		31		45		Si	5
4		18		32		46		Si	10
5		19		33		47		Si	15
6		20		34		48	Carboximetil-	Si	20
7	Qitosán +	21	Almidón +	35	Goma guar +	49	celulosa +	Si	25
8	glicerol +	22	glicerol +	36	glicerol +	50	glicerol +	Si	30
9	<i>Aloe vera</i>	23	<i>Aloe vera</i>	37	<i>Aloe vera</i>	51	<i>Aloe vera</i>	Si	35
10		24		38		52		Si	40
11		25		39		53		Si	45
12		26		40		54		Si	50
13		27		41		55		Si	0
14		28		42		56		No	20

2.4. Elaboración de las películas conteniendo *L. paracasei* TEJ8

Primeramente, se elaboraron las soluciones de cada uno de los polímeros evaluados. Para la solución de quitosán se disolvió 1% (v/v) de ácido láctico en agua destilada y se dejó en agitación por 10 min, enseguida se agregó 1.5% (p/v) de quitosán y se agitó durante al menos 30 min. Posteriormente se agregó 30% (v/v) de gel de *Aloe vera* y 1.5% (v/v) de glicerol y se agitó hasta disolución completa (Monzón-Ortega et al., 2018). Para la solución de almidón se disolvió 1.5% (v/v) de almidón en agua destilada y se dejó en agitación por 5 min, enseguida se calentó a 95 °C y se mantuvo a esa temperatura con agitación durante 30 min. Posteriormente se agregó 30% (v/v) de gel de *Aloe vera* y 1.5% (v/v) de glicerol y se agitó hasta disolución completa (Arrubla-Vélez et al., 2021). La solución formadora de película de goma guar se preparó disolviendo 1% (p/v) en agua destilada, se mantuvo en agitación por 60 min a 40 °C. Posteriormente se agregó 30% (v/v) de gel de *Aloe vera* y 1.5% (v/v) de glicerol y se agitó hasta disolución completa (Zhao et al., 2023). La solución de CMC se preparó disolviendo 1.5% (p/v) en agua destilada, posteriormente se mantuvo en agitación durante 30 min a 80 °C (Ali et al., 2024). Posteriormente se agregó 30% (v/v) de gel de *Aloe vera* y 1.5% (v/v) de glicerol y se agitó hasta disolución completa. Una vez elaboradas las soluciones, se tomaron de cada una alícuotas de 15 mL y se sonicaron (Sonicador Ultrasonic Processor© VCX 500) según correspondió a cada tratamiento. Para incorporar las BAL, se centrifugó a 5880 g durante 20 min el volumen de caldo MRS con células necesario para alcanzar una concentración de 1×10^{10} UFC·g⁻¹ de película y se lavó el pellet celular dos veces con 1 mL de PBS y se resuspendió en la solución de PC. Luego de la homogeneización, se vertieron 3 mL de solución en placas Petri estériles (60 mm de diámetro) y se dejó reposar al ambiente durante 24 h para la formación de la PC (Barragán Menéndez et al., 2020).

2.5. Inhibición de crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides*

Primeramente, se resembró micelio del hongo en ADP a pH 7. Se esperó crecimiento completo del hongo y se cortaron con sacabocados discos de micelio del hongo (5 mm de diámetro) para ser colocados al centro de placas de Petri conteniendo ADP. Posteriormente, sobre el micelio se colocaron discos de las PC de 10 mm de diámetro. Las placas se incubaron a 30 °C y después de 9 días se midió el área total del micelio. Se utilizó como Testigo una placa donde se puso un disco de 5 mm del hongo sin PC. A partir de estos datos, se calculó el porcentaje de inhibición (I) del crecimiento de *C. gloeosporoides* con la ecuación, $I = [(Ac - At) / Ac] (100)$, donde At es el área de crecimiento del micelio y Ac es el área de crecimiento del Testigo (Li et al., 2014).

2.6. Análisis de datos

Los datos del área de inhibición fueron considerados como variables continuas, sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y posterior comparación por la prueba Tukey ($\alpha=0.05$) empleando el software InfoStat versión 2015.

3. Resultados y Discusión

De las PC elaboradas a base de quitosán (T1-T14), aquellas en donde no se aplicó ultrasonido (US) (Tratamientos 1 y 13) así como en la que no se adicionó *L. paracasei* TEP8 (Tratamiento 14); exhibieron los valores más bajos de inhibición del hongo fitopatógeno (Figura 1). Del resto de los tratamientos (T2-T12), solo el de menor tiempo de US (Tratamiento 2) fue ligeramente inferior al resto y diferente significativamente ($P < 0.05$). Los demás tratamientos presentaron valores de inhibición por arriba del 90%, lo cual en muchos casos se tradujo en inhibición completa del desarrollo del micelio de *C. gloeosporioides* (Figura 2C). Aún con lo anterior, todos los tratamientos donde se realizó US y se agregó la BAL tuvieron valores de inhibición de arriba del 80%, lo cual es el doble de lo reportado por Barragán Menéndez et al. (2020) contra el mismo hongo con una PC de composición similar, pero sin el tratamiento de US. Aunque no se evaluaron parámetros texturales de las PC, éstas presentaron de manera general una consistencia firme, tal como reporta Monzón-Ortega et al. (2018), muy fácil de manipular (Figura 2A-B). Es notorio que los tratamientos que no contenía la BAL (1 y 14) también presentaron actividad antifúngica cercana a 40% lo que estaría revelando la actividad antifúngica del quitosano nativo o tratado con 20 min de US, contrario con los reportado por Barrios-Salgado et al. (2022). Este resultado demuestra que el solo tratamiento con US provoca cambios bien en la masa molecular, tamaño de partícula y alineamiento, pero, que estos cambios por si solos no incrementan la capacidad antifúngica del quitosano.

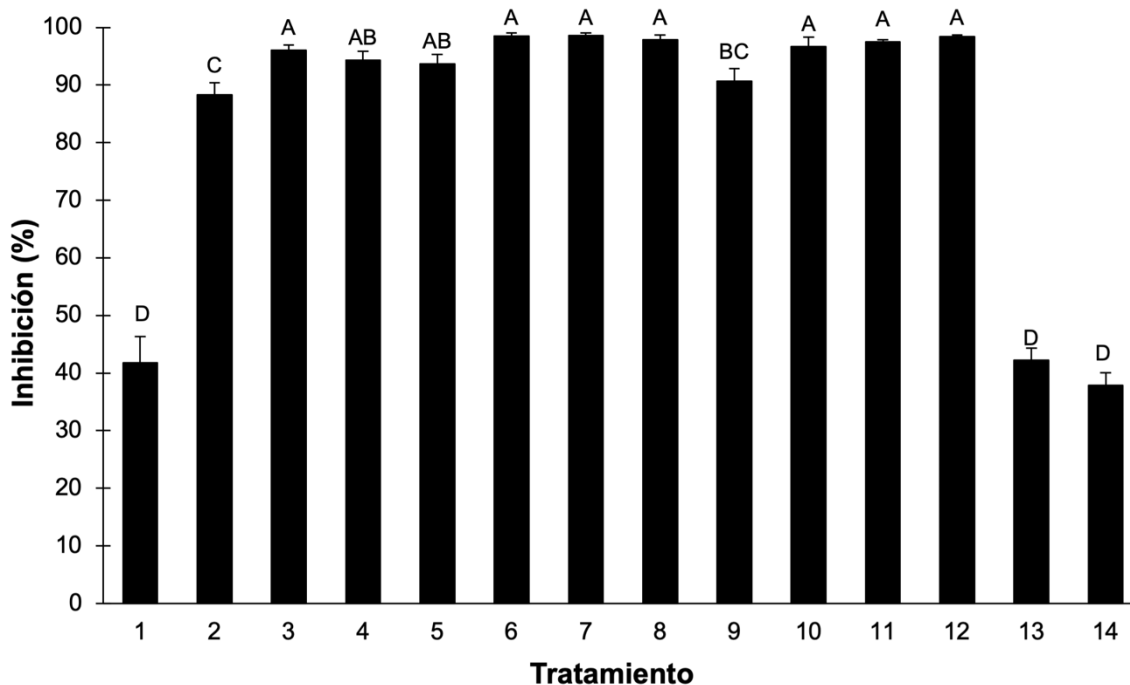


Figura 1. Valores de inhibición (%) del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* ejercido por las películas formuladas con quitosán, *Aloe vera* y glicerol como base, con o sin ultrasonido y con o sin la BAL *Lactiplantibacillus pentosus* TEP8. Los tratamientos 2-13 contienen la BAL. Los tratamientos 1 y 13 no fueron tratados con ultrasonido. Tratamientos con ultrasonido, 2 = 1 min; 3 = 5 min; 4 = 10 min; 5 = 15 min; 6 = 20 min; 7 = 25 min; 8 = 30 min; 9 = 35 min; 10 = 40 min; 11 = 45 min; 12 = 50 min; 14 = 20 min.

Se ha reportado que el uso de US con un tiempo de acción y una amplitud apropiada puede mejorar las propiedades de la película, además que promueve la disponibilidad de los nutrientes (Robles y Ochoa, 2012). Una de las hipótesis originales de este estudio planteó que la actividad antifúngica sería una respuesta de la disponibilidad o cambios en los polímeros promovidos por el US y que ésta será una función directa del tiempo de US. Los resultados con las PC de quitosán-*Aloe vera* parecen no cumplir con este supuesto, toda vez que a partir de 5 min de US (T2) se incrementó la actividad antifúngica sustancialmente. En el reporte de Barragán-Menéndez et al. (2020) se logró incrementar la viabilidad y observar incluso multiplicación celular de la BAL en la PC, pero la débil actividad antifúngica (<30%) hace pensar que los nutrientes eran limitados y que con el tratamiento de US aplicado en el presente estudio se logró poner disponibles los nutrientes para que las BAL ejerzan el efecto antifúngico que han demostrado cuando son enfrentadas de manera directa contra *C. gloeosporioides* (Barrios-Roblero et al., 2019). Otra posible explicación está relacionada con cambios en la estructura de la PC (Du et al., 2022) que permitieron liberar mayor cantidad de compuestos antifúngicos y ponerlos en contacto directo con el fitopatógeno.

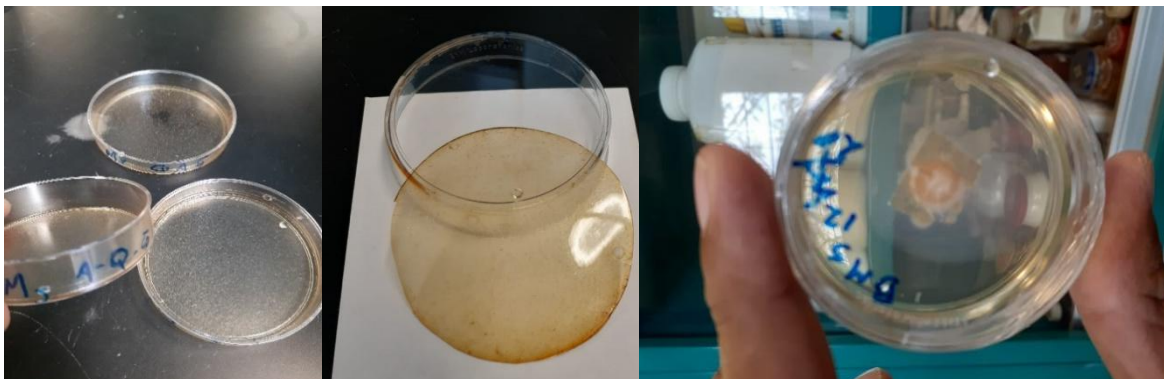


Figura 2. Películas comestibles elaboradas con quitosán como polímero base. Contenidas en placas de Petri (izquierda), después de ser extraídas de las placas de Petri (centro), después de ser 10 días de ser colocada sobre el micelio inhibiendo completamente el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (derecha).

Las PC a base de almidón presentaron un comportamiento en la inhibición del hongo (Figura 3) similar a las PC de quitosán. Todas las explicaciones planteadas para las PC de quitosán serían entonces aplicables a las PC de almidón; sin embargo, esto es un comportamiento inusual debido a que los gránulos de almidón contienen moléculas ramificadas en contraste con las moléculas de quitosán que son lineales (Zabot et al., 2016) y en las que se espera mayor impacto del US. Los reportes que muestran impacto del US sobre los gránulos de almidón y/o sobre las moléculas de amilosa y amilopectina hacen referencia a tiempos prolongados (>30 min, incluso horas) de US. La potencia y frecuencia aquí empleadas (40 kHz y 500 W) en el US pueden ser en parte la explicación del porque se incrementó la actividad antifúngica a valores cercanos o mayores a 90% desde 1 min de tratamiento con US, ya que otros tratamientos reportan modificaciones estructurales-funcionales

en el almidón de maíz y yuca con condiciones similares solo después de 10 min (Rahaman et al., 2021). Marín et al. (2019) reportan altos valores (90%) en la reducción de la incidencia de síntomas de *Botrytis cinerea* al recubrir uvas con películas de almidón de papa conteniendo *L. plantarum*, lo cual es contrastante con los resultados del tratamiento 27 (con BAL, pero sin US) cuyo valor de inhibición *in vitro* fue <30%. Texturalmente las PC de almidón fueron frágiles y, aunque no se evaluó su resistencia, dada la fragilidad pudieran tener valores bajos de resistencia.

Resulta también notorio que las películas sin BAL (T15 y T28) exhibieron actividad antifúngica, lo cual es poco usual para películas de almidón y que por tanto puede ser explicado por la acción del *A. vera* adicionado en la formulación. El gel de *A. vera* es usado ampliamente por sus propiedades antimicrobianas incluida su acción contra *C. gloeosporioides* (Mendy et al., 2019). Además, se observa que la acción de US (20 min) promovió incremento en la actividad antifúngica en las películas sin BAL, pues el valor aumentó de 16.96% (T15) a 27.15% (T28). Lo anterior puede deberse a la acción del US sobre los componentes del gel de *A. vera*. Se ha reportado que el US no afecta en gran medida la composición molecular de los acemananos y pectinas del gel (Alvarado-Morales et al., 2019), pero en cambio promueve alta migración de compuestos como aloína y aloe-emodina responsables de actividad antimicrobiana (Gansukh et al., 2018).

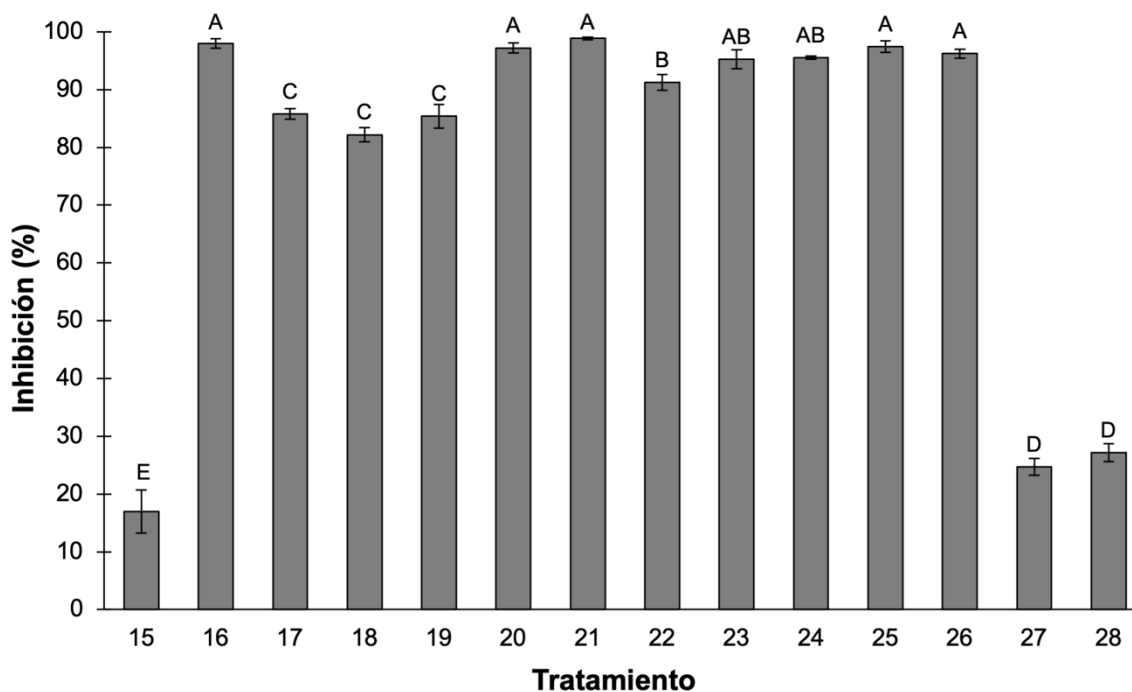


Figura 3. Valores de inhibición (%) del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* ejercido por las películas formuladas con almidón, *Aloe vera* y glicerol como base, con o sin ultrasonido y con o sin la BAL *Lactiplantibacillus pentosus* TEP8. Los tratamientos 16-27 contienen la BAL. Los tratamientos 15 y 27 no fueron tratados con ultrasonido. Tratamientos con ultrasonido, 16 = 1 min; 17 = 5 min; 18 = 10 min; 19 = 15 min; 20 = 20 min; 21 = 25 min; 22 = 30 min; 23 = 35 min; 24 = 40 min; 25 = 45 min; 26 = 50 min; 28 = 20 min.

Un comportamiento más variable en la inhibición del crecimiento del hongo se observó en las PC elaboradas con goma guar (Figura 4) como molécula base. A diferencia de lo observado con las PC de quitosán y almidón, los valores de inhibición fueron menores, pues aún en los tratamientos con mayor actividad (T30 y T31), los valores alcanzaron 80% de inhibición. No existen reportes del uso de goma guar como vehículo para bacterias ácido lácticas o del efecto antifúngico de este polímero. Los resultados de la actividad antifúngica de las películas de goma guar (T29) y de goma guar con las BAL (T41), ambas sin ultrasonido son resultados pioneros. Otros reportes muestran nula actividad antifúngica de películas de goma guar-hidroxiopropilmetilcelulosa contra *Alternaria* sp y *Penicillium* sp. (Maurizzi et al., 2023).

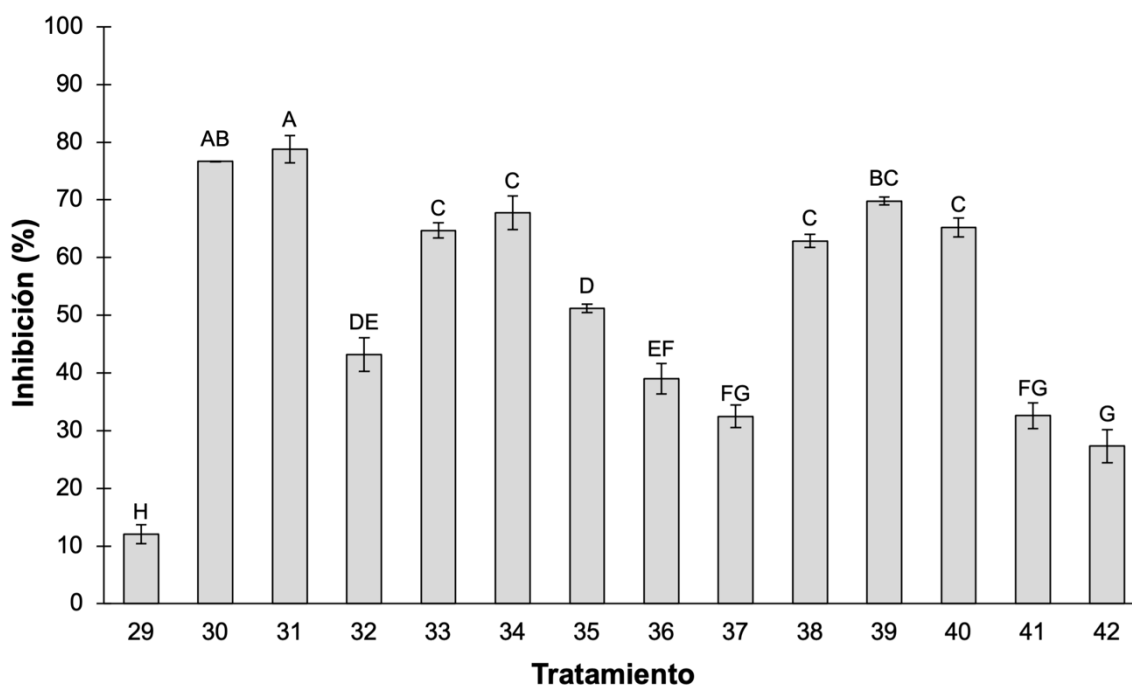


Figura 4. Valores de inhibición (%) del crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* ejercido por las películas formuladas con goma guar, *Aloe vera* y glicerol como base, con o sin ultrasonido y con o sin la BAL *Lactiplantibacillus pentosus* TEP8. Los tratamientos 30-41 contienen la BAL. Los tratamientos 29 y 41 no fueron tratados con ultrasonido. Tratamientos con ultrasonido, 30 = 1 min; 31 = 5 min; 32 = 10 min; 33 = 15 min; 34 = 20 min; 35 = 25 min; 36 = 30 min; 37 = 35 min; 38 = 40 min; 39 = 45 min; 40 = 50 min; 42 = 20 min.

Además, para este polímero no se observó el mismo fenómeno que ocurrió con las películas de almidón y quitosán, donde para casi todos los tiempos de aplicación de US se mantuvieron valores muy similares de actividad antifúngica. Con la goma guar, las películas que fueron tratadas por 10, 30 y 35 min de US los valores de inhibición fueron similares a aquellos donde no se aplicó US y a los que fueron tratados con US pero no contenían BALs. Se reporta que el US puede reducir el peso molecular de la goma guar pero que no afecta las características estructurales de la cadena polimérica, y que bastan 3 min para reducir a la mitad el peso molecular del polímero (Ansari et al.,

2013). Si esto es así, todas las películas estarían conformadas por moléculas de menor tamaño, lo cual parece no beneficiar a la actividad antifúngica que exhibieron las BAL en las películas.

Algo similar a lo anterior ocurrió con las películas preparadas a base de CMC, un comportamiento variable en función del tiempo de US pero con valores de inhibición del hongo menor a las películas de goma guar. Significativamente diferente del resto de los tratamientos, el mayor valor de inhibición se presentó con la película conteniendo la BAL y sonicada por 1 min (T45). Resulta notorio de los resultados que las películas de CMC nativa presentaron mayor inhibición que las películas con la BAL y tratadas con 45 y 50 min de US. Se ha reportado que tiempos de aplicación de US de hasta 45 min pueden mejorar las propiedades de contacto (ángulo de contacto) de la CMC, sobre todo la hidrofobicidad superficial pero que tiempos por arriba de 50 min tienden a disminuirla (Cheng et al., 2024), lo cual puede explicar de modo parcial la baja actividad antifúngica de los tratamientos 53-54 que resultó menor incluso a los tratamientos no sonicados. Salehi et al. (2023) demostraron que el tratamiento de la CMC con US disminuye la viscosidad aparente de soluciones al 0.2% de manera inversa al tiempo de aplicación de US y también como una función de la potencia del US.

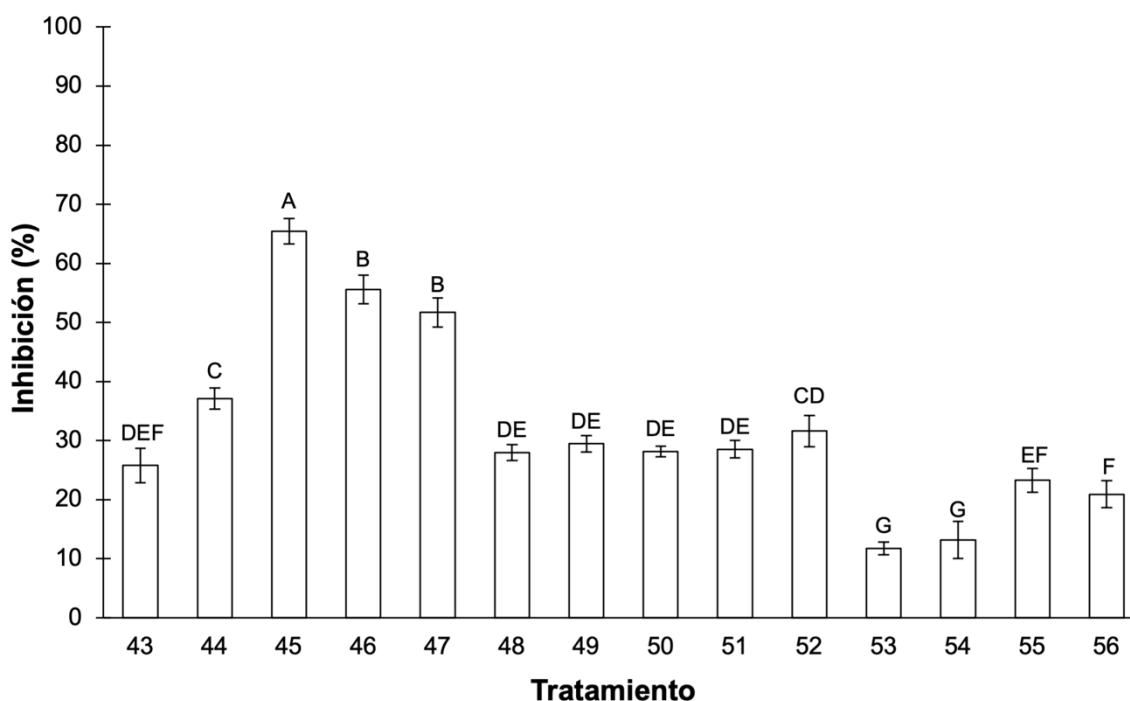


Figura 5. Valores de inhibición (%) del crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* ejercido por las películas formuladas con carboximetilcelulosa, *Aloe vera* y glicerol como base, con o sin ultrasonido y con o sin la BAL *Lactiplantibacillus pentosus* TEP8. Los tratamientos 44-55 contienen la BAL. Los tratamientos 43 y 55 no fueron tratados con ultrasonido. Tratamientos con ultrasonido, 44 = 1 min; 45 = 5 min; 46 = 10 min; 47 = 15 min; 48 = 20 min; 49 = 25 min; 50 = 30 min; 51 = 35 min; 52 = 40 min; 53= 45 min; 54 = 50 min; 56 = 20 min.

Cuando se analizó la contribución de los factores a la inhibición del hongo, bien a través de la comparación de medias (Figuras 6A-C) o analizando los residuos del análisis de varianza factorial (Figura 6D) se verificó lo que revelaron los tratamientos de forma individual; baja inhibición cuando

se emplearon CMC y goma guar como polímeros base de las películas (Figuras 6A y 6D) y valores por arriba de 80% usando películas de quitosán. De manera similar se evidenció la influencia del US pero como antes se ha discutido y se comprobó, sin efecto significativo entre los diferentes tiempos de US (Figuras 6C y 6D). Aunque los residuos reflejan una diferencia altamente significativa entre los tratamientos que contenían la BAL y los que no la contenían (Figura 6D), los valores de la inhibición del hongo en promedio para las películas con la BAL apenas sobrepasaron el 60% (Figura 6B).

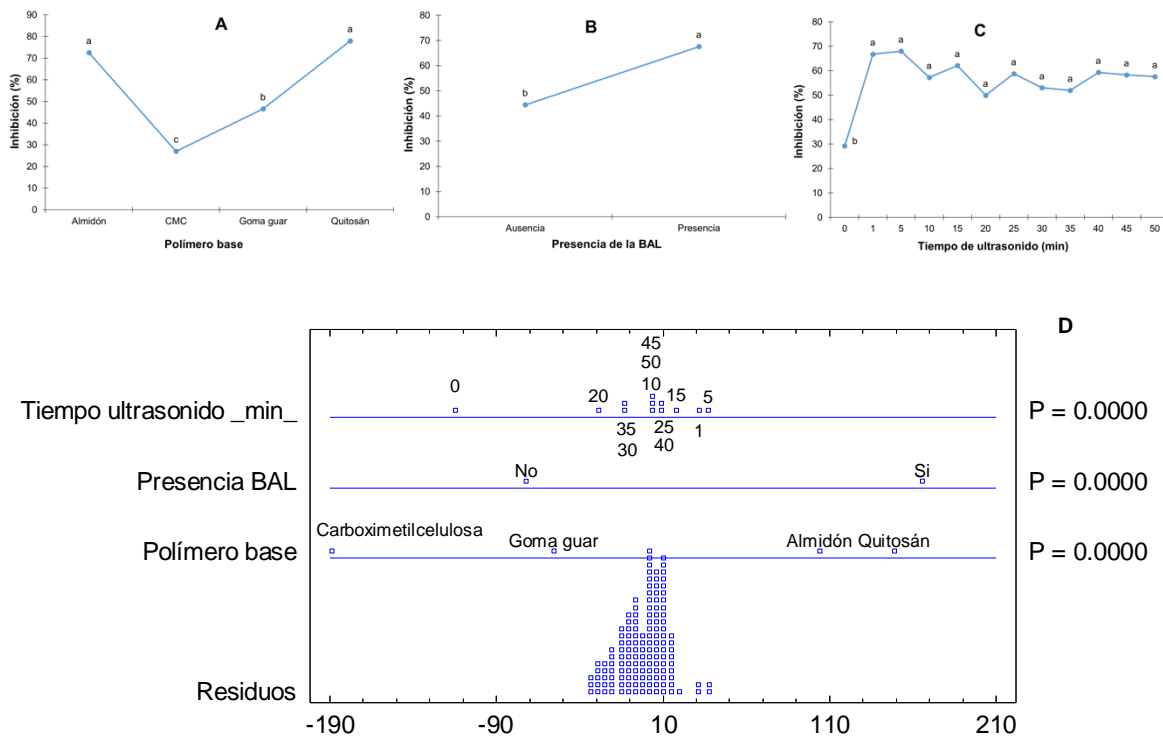


Figura 6. Valores promedio de la contribución de los factores (A-C) y representación del análisis de varianza factorial (D) para la inhibición del desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

4. Conclusión

Este estudio demostró que la aplicación de ultrasonido en soluciones formadoras de películas de quitosán o almidón potencia la actividad antifúngica de *L. paracasei* TEP8 contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Se encontró que los tratamientos donde se trató la solución formadora de películas con al menos 5 min de US se obtuvo incremento significativo en la actividad antifúngica (hasta 90%) de las películas conteniendo las BAL. La goma guar y la carboximetilcelulosa, empleadas como polímeros base de las PC no alcanzaron los valores de inhibición del hongo *C. gloeosporioides* que exhibieron las PC de almidón y quitosán.

Referencias

- Ali, S., Ullah, M. A., Nawaz, A., Naz, S., Shah, A. A., Gohari, G., Razavi, F., Khaliq, G., & Razzaq, K. (2024). Carboxymethyl cellulose coating regulates cell wall polysaccharides disassembly and delays ripening of harvested banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *191*, 111978.
- Alvarado-Morales, G., Minjares-Fuentes, R., Contreras-Esquivel, J. C., Montañez, J., Meza-Velázquez, J. A., & Femenia, A. (2019). Application of thermosonication for *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) juice processing: Impact on the functional properties and the main bioactive polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, *56*, 125-133.
- Ansari, S. A., Matricardi, P., Cencetti, C., Di Meo, C., Carafa, M., Mazzuca, C., Palleschi, A., Capitani, D., Alhaique, F., & Coviello, T. (2013). Sonication-based improvement of the physicochemical properties of guar gum as a potential substrate for modified drug delivery systems. *Biomed Research International*, *2013*, 985259.
- Arrubla-Vélez, J. P., Guerrero-Álvarez, G. E., Vargas-Soto, M. C., Cardona-Hurtado, N., Pinzón, M. I., & Villa, C. C. (2021). *Aloe vera* gel edible coating for shelf life and antioxidant properties preservation of Andean blackberry. *Processes*, *9*(6), 999.
- Barragán-Menéndez, C., Gálvez-López, D., Rosas-Quijano, R., Salvador-Figueroa, M., Ovando-Medina, I., & Vázquez-Ovando, A. (2020). Films of chitosan and *Aloe vera* for maintaining the viability and antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* TEP6. *Coatings*, *10*(3), 259.
- Barrios-Roblero, C., Rosas-Quijano, R., Salvador-Figueroa, M., Gálvez-López, D., & Vázquez-Ovando, A. (2019). Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Bioscience*, *29*, 47-54.
- Barrios-Salgado, G., Vázquez-Ovando, A., Rosas-Quijano, R., Gálvez-López, D., & Salvador-Figueroa, M. (2022). Inhibitory capacity of chitosan films containing lactic acid bacteria cell-free supernatants against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food and Bioprocess Technology*, *15*(5), 1182-1187.
- Ceylan, H. G., & Atasoy, A. F. (2023). New bioactive edible packing systems: synbiotic edible films/coatings as carries of probiotics and prebiotics. *Food and Bioprocess Technology*, *16*(7), 1413-1428.
- Chang, S., Guo, Q., Du, G., Tang, J., Liu, B., Shao, K., & Zhao, X. (2023). Probiotic-loaded edible films made from proteins, polysaccharides, and prebiotics as a quality factor for minimally processed fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *253*(5), 127226.
- Cheng, Y., Cheng, X., Fang, C., Chen, J., Zhang, X., Cao, C., & Wang, J. (2024). Antimicrobial properties of carboxymethyl cellulose/starch/n'n methylenebisacrylamide membranes endowed by ultrasound and their potential application in antimicrobial packaging. *Polymers*, *16*(9), 1282.
- de Oliveira, T. S., Costa, A. M. M., Cabral, L. M. C., Freitas-Silva, O., Rosenthal, A., & Tonon, R. V. (2023). Anthracnose controlled by essential oils: are nanoemulsion-based films and coatings a viable and efficient technology for tropical fruit preservation? *Foods*, *12*(2), 279.
- Du, B., Jeepipalli, S. P., & Xu, B. (2022). Critical review on alterations in physiochemical properties and molecular structure of natural polysaccharides upon ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *90*, 106170.
- Dysin, A. P., Egorov, A. R., Godzishvskaya, A. A., Kirichuk, A. A., Tskhovrebov, A. G., & Kritchenkov, A. S. (2023). Biologically active supplements affecting producer microorganisms in food biotechnology: A review. *Molecules*, *28*(3), 1413.
- FAO. (2024). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Consulta 15 nov. de 2014.

- Gansukh, E., Gopal, J., Paul, D., Muthu, M., Kim, D. H., Oh, J. W., & Chun, S. (2018). Ultrasound mediated accelerated Anti-influenza activity of *Aloe vera*. *Scientific Reports*, *8*(1), 17782.
- Godana, E. A., Yang, Q., Zhang, X., Zhao, L., Wang, K., Dhanasekaran, S., Mehari, T. G., & Zhang, H. (2023). Biotechnological and biocontrol approaches for mitigating postharvest diseases caused by fungal pathogens and their mycotoxins in fruits: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(46), 17584-17596.
- He, Y., Degraeve, P., & Oulahal, N. (2024). Bioprotective yeasts: Potential to limit postharvest spoilage and to extend shelf life or improve microbial safety of processed foods. *Heliyon*, *10*(3), e24929.
- Hou, F., Fan, L., Ma, X., Wang, D., Wang, W., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2018). Degradation of carboxymethylcellulose using ultrasound and β -glucanase: Pathways, kinetics and hydrolysates' properties. *Carbohydrate Polymers*, *201*, 514-521.
- Jarman, A., Thompson, J., McGuire, E., Reid, M., Rubsam, S., Becker, K., & Mitcham, E. (2023). Postharvest technologies for small-scale farmers in low-and middle-income countries: A call to action. *Postharvest Biology and Technology*, *206*, 112491.
- Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X., Sun, Y., Xue, H., Zhao, L., Kong, F., & Lv, J. (2014). Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control*, *43*, 57-64.
- Marín, A., Plotto, A., Atarés, L., & Chiralt, A. (2019). Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience*, *54*(2), 337-343.
- Massoud, R., Khodaeii, D., Hamidi-Esfahani, Z., & Khosravi-Darani, K. (2023). The effect of edible probiotic coating on quality of fresh fruits and vegetables: Fresh strawberries as a case study. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(4), 2517-2526.
- Maurizzi, E., Bigi, F., Volpelli, L. A., & Pulvirenti, A. (2023). Improving the post-harvest quality of fruits during storage through edible packaging based on guar gum and hydroxypropyl methylcellulose. *Food Packaging and Shelf Life*, *40*, 101178.
- Mendy, T. K., Misran, A., Mahmud, T. M. M., & Ismail, S. I. (2019). Antifungal properties of *Aloe vera* through *in vitro* and *in vivo* screening against postharvest pathogens of papaya fruit. *Scientia Horticulturae*, *257*, 108767.
- Misra, S., Pandey, P., Dalbhagat, C. G., & Mishra, H. N. (2022). Emerging technologies and coating materials for improved probiotication in food products: A review. *Food and Bioprocess Technology*, *15*(5), 998-1039.
- Monzón-Ortega, K., Salvador-Figueroa, M., Gálvez-López, D., Rosas-Quijano, R., Ovando-Medina, I., & Vázquez-Ovando, A. (2018). Characterization of Aloe vera-chitosan composite films and their use for reducing the disease caused by fungi in papaya Maradol. *Journal of Food Science and Technology*, *55*, 4747-4757.
- Muñoz-Tebar, N., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2023). Chitosan edible films and coatings with added bioactive compounds: antibacterial and antioxidant properties and their application to food products: A review. *Polymers*, *15*(2), 396.
- Pacheco-Esteve, M. C., Soto-Castro, D., Vásquez-López, A., & Tovar-Pedraza, J. M. (2023). *Colletotrichum brevisporum* causing anthracnose of papaya (*Carica papaya* L.) in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *45*(4), 360-366.

- Rahaman, A., Kumari, A., Zeng, X. A., Farooq, M. A., Siddique, R., Khalifa, I., Siddeeg, A., Ali, M., & Manzoor, M. F. (2021). Ultrasound based modification and structural-functional analysis of corn and cassava starch. *Ultrasonics Sonochemistry*, *80*, 105795.
- Robles-Ozuna, L. E., & Ochoa-Martínez, L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, *13*(2), 109-122.
- Salehi, F., Inanloodoghouz, M., & Karami, M. (2023). Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC) solution: Impact of high intensity ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, *101*, 106655.
- Shivani, T. M., & Sathiavelu, M. (2023). A comprehensive review on functionality of probiotics in edible packaging. *Packaging Technology and Science*, *36*(1), 15-30.
- Silva, S. P., Teixeira, J. A., & Silva, C. C. (2023). Recent advances in the use of edible films and coatings with probiotic and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, *56*, 103196.
- Vázquez-Ovando, A., López-Hilerio, H., Salvador-Figueroa, M., Adriano-Anaya, L., Rosas-Quijano, R., & Gálvez-López, D. (2018). Uso combinado de radiación UV-C y biorecubrimiento de quitosán con aceites esenciales para el control de hongos en papaya Maradol. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *40*, e-688.
- Wibowo, C., Salsabila, S., Muna, A., Rusliman, D., & Wasisto, H. S. (2024). Advanced biopolymer-based edible coating technologies for food preservation and packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *23*(1), e13275.
- Zhao, Y., Li, H., Chen, J., & Wang, Y. (2023). A novel high water-soluble antibacterial films-based guar gum incorporated with *Aloe vera* gel and ϵ -polylysine. *Food Chemistry*, *427*, 136686.
- Ji, T., Zhang, R., Dong, X., Sameen, D. E., Ahmed, S., Li, S., & Liu, Y. (2020). Effects of ultrasonication time on the properties of polyvinyl alcohol/sodium carboxymethyl cellulose/nano-ZnO/multilayer graphene nanoplatelet composite films. *Nanomaterials*, *10*(9), 1797.
- Zabot, G. L., Silva, E. K., Azevedo, V. M., & Meireles, M. A. A. (2016). Replacing modified starch by inulin as prebiotic encapsulant matrix of lipophilic bioactive compounds. *Food Research International*, *85*, 26-35.