

# Evaluación de métodos naturales de desinfección sobre el control de aflatoxinas en frutos de jitomate saladette

Serrano Molina L.<sup>1\*</sup> • Ramos García M. de L.<sup>1</sup> • Bautista Baños S.<sup>2</sup>

*Palabras clave:* *Aspergillus flavus*, inmunoensayo, extracto cítrico, aceite esencial, cubierta de quitosano  
*Key words:* *Aspergillus flavus*, immunoassay, citrus extract, essential oil, chitosan coating

## Introducción

El jitomate es considerado como uno de los productos más consumidos en México por su valor nutricional y su versatilidad para cocinarlo en diferentes platillos. Su consumo anual asciende a 21.06 kg/persona. En el año 2019 el INEGI reportó una producción de 2.86 millones de toneladas en 42 mil hectáreas de cultivo en México, lo que lo convierte en uno de los países con mayor producción para exportar. Es un fruto perecedero, por lo tanto, es susceptible a sufrir daños como magulladuras y perforaciones, causados por la inadecuada manipulación durante la postcosecha, esto aumenta el riesgo de contaminación por microorganismos y pérdida del producto.

En México se estima que las pérdidas de jito-

mate en postcosecha durante el año 2013 fueron del 23.33% considerando toda la cadena de suministro. Estas pérdidas se deben principalmente a los hongos que prevalecen con alta incidencia, cuando el manejo postcosecha no es adecuado. *Aspergillus flavus* es un hongo que se desarrolla con mucha facilidad en productos secos, tales como, maíz, arroz, trigo y cacahuete. Anteriormente solo se reportaba la presencia de aflatoxinas en granos y cereales, sin embargo, en la actualidad existen reportes que indican su detección en productos frescos como jitomates, fresas y pimientos, etc. *A. flavus* produce una de las toxinas de mayor interés en la inocuidad alimentaria, denominada como aflatoxina. La presencia de aflatoxinas en

1 Facultad de Nutrición – Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Calle Ixtaccihuatl 100, Vista Hermosa, 62350 Cuernavaca, Morelos.

2 Centro de Desarrollo de Productos Bióticos – Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec - Jojutla s/n-km. 85, San Isidro, 62739 San Isidro, Morelos.

\* lizette.serrano@uaem.edu.mx



frutos de jitomate representa un problema, debido a que tienen efecto teratogénico, genotóxico y nocivo a la salud humana, además se han asociado a diferentes tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas e inmunológicas [1,2]

Los desinfectantes químicos son utilizados con mayor frecuencia en el control de microorganismos por su amplia capacidad para reducir e inhibir crecimiento de hongos y bacterias. Entre los desinfectantes de mayor uso encontramos el cloro, plata coloidal y soluciones a base de yodo, estos productos químicos han tenido buena capacidad inhibitoria, sin embargo, su uso prolongado aumenta el riesgo de intoxicación por los residuos que puedan quedar adheridos al fruto, además del impacto ambiental que generan [3].

Existen alternativas naturales efectivas para el control de *A. flavus*, las cuales han sido evaluadas en frutos de jitomate. El quitosano es un producto natural, no tóxico, que se obtiene por medio de la desacetilación de la quitina, presente en los exoesqueletos de los crustáceos y en hongos. Ha sido evaluado de forma individual o en solución (cubiertas simples o combinadas otros compuestos antimicrobianos) y se ha reportado una efectividad entre el 65 y 75% en el control de *A. flavus* presente en jitomate Cherry [4].

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas obtenidas por arrastre de vapor del pericarpio de los cítricos; la fracción destilada se compone principalmente de terpenos y derivados del fenilpropano, sustancias reconocidas por su acción antimicótica. Su efecto se puede potenciar cuando se usan en combinación con quitosano para formar cubiertas. Los extractos cítricos son otra alternativa natural para control de hongos, se obtienen a partir de los residuos de cáscaras y semillas de cítricos, por ello no impactan el medio ambiente y ni la salud de los individuos que los utiliza, debido a que sus componentes son considerados GRAS (generalmente reconocidas como seguras). Se han reportado un número importante de polifenoles y ácidos presentes en los extractos de semillas y cáscaras de cítricos con actividad antifúngica probada, como hesperidina, naranjina, limoneno, naringrutina, etc. Las concentraciones de los compuestos fenólicos dependen del tipo de extracto, sea acuoso o alcohólico, así como la variedad y genética de los

cítricos de origen. Estos productos ya se comercializan y se han popularizado, se han evaluado la capacidad antimicótica de algunos, entre los que resaltan Ecolife, de Culta Agrobiológicos y Citrocover®, que reportan de 80 a 95 % de eficiencia [5].

Después de la desinfección lo más común es aplicar un método de conservación que mantenga libre de microorganismos el jitomate. El deshidratado es un método para reducir la actividad de agua, aquella disponible para procesos biológicos, como actividad enzimática o microbiológica. La forma más común de deshidratar es aplicando flujo de aire caliente; la temperatura y el tiempo se asignan en función de los componentes del alimento. El jitomate tiene buenos resultados cuando se trata a 60°C por 24 horas, se logra peso constante y se conserva la mayoría de los carotenoides presentes en fresco [6].

De tal manera que el presente trabajo tiene como fin evaluar la capacidad inhibitoria de aflatoxinas de métodos naturales de desinfección tales como extractos cítricos comerciales y cubiertas de quitosano con aceite esencial de limón y naranja, en un modelo in vitro y en jitomate tratado y deshidratado.

## Metodología

### Obtención de los materiales

La cepa de *A. flavus* fue donada por el Laboratorio de Tecnología de Postcosecha de Productos Agrícolas de CEPROBI-IPN.

Se utilizó quitosano de bajo peso molecular de la marca Sigma-Aldrich, CAS: 9012-76-4; con grado de desacetilación de 75-85%, ácido acético glacial de Ferromont Chemicals Inc y glicerol de J.T. Baker. Para la evaluación in vitro se emplearon placas de Agar Czapek-Dox® de la marca BD Bioxon.

Se empleó extracto de semilla de cítricos comercial Citrocover® y Citro-80®, así como aceite esencial de limón y naranja de la empresa MS Agros S.A. de C.V. Como control negativo se empleó plata coloidal comercial.

Los frutos de jitomate fueron obtenidos de huertas localizadas en el municipio de Tlaltizapán en el estado de Morelos (18°24'36"N 99°04'13"O). Se utilizaron frutos de jitomate variedad saladette sanos, rojo maduro.

### Preparación solución de esporas y tratamientos

La cepa de *A. flavus* fue activada en placas de medio Czapek-Dox® durante 7 días a 27±2°C, al término se preparó la solución de esporas adicionando 20 ml de agua destilada estéril sobre la superficie, se realizó barrido con una aguja de disección y se recuperó el líquido en un matraz Erlen Meyer. Para cuantificar esporas en solución se empleó la cámara de Neubauer y microscopio binocular, se contabilizaron las esporas y a través de diluciones se ajustó el conteo final a 105 esporas mL<sup>-1</sup>. Los tratamientos evaluados se prepararon de acuerdo con la especificación de la Tabla 1.

### Evaluación in vitro

Se llevo a cabo la técnica de envenenamiento del medio para la evaluación *in vitro* de los extractos y cubiertas de quitosano. A cajas Petri con medio Czapek-Dox® se les adicionó 0.5 ml de tratamiento, se secó en campana de flujo laminar y posteriormente se adicionó en el centró 10 µL de la solución de esporas 105 mL<sup>-1</sup>. Se incubó por 7 días a 27±2°C. Las cajas se reservaron para cuantificar aflatoxinas.

### Evaluación in situ

Se seleccionaron frutos de jitomate que presentaban color rojo maduro. Se sumergieron en una solución de hipoclorito al 1% durante 2 minutos, se dejaron escurrir y secar al ambiente. Se realizó una punción con ayuda de una aguja de disección esterilizada a una profundidad aproximada de 3 milímetros. Posteriormente se adicionaron 20µL de solución de 105 esporas mL<sup>-1</sup> directamente a la herida del fruto. Se almacenaron a temperatura ambiente entre 28±2°C por 72 horas. Posteriormente, los frutos se sumergieron en las soluciones tratamiento por 15 minutos y al escu-

rrirlos se dejaron secar a temperatura ambiente. Los jitomates tratados se cortaron en rebanadas de 0.5 cm y se sometieron a deshidratación a 60°C por 24 horas. El producto se pulverizó y reservó para cuantificar aflatoxinas.

### Cuantificación de aflatoxinas por ELISA

Se empleó el kit Veratox Aflatoxin HS®, de alta sensibilidad para aflatoxinas de la marca Neogen. Se licuaron 10g de medio de cultivo Czapek-Dox® con crecimiento de *Aspergillus flavus*, empleado en la técnica de envenenamiento del medio, con 50 mL de metanol al 70%. Se filtraron los extractos a través de un filtro Whatman #1 y se reservaron en tubos de borosilicato. En los pocillos de mezclado se adicionó 100µL de solución conjugada, posterior se añadieron 100 µL de los controles para el ajuste de la curva de calibración de 0, 1, 2, 4 y 8 partes por billón (ppb) así como 100µL del filtrado muestra. Cada pocillo se mezcló con ayuda de la pipeta multicanal y se transfirieron 100µL de la mezcla a los pocillos de anticuerpos e incubaron por 10 minutos. Al término se desechó la muestra, se enjuagaron 5 veces los pocillos con agua desionizada, se secaron perfectamente con ayuda de papel absorbente.

A los pocillos enjuagados se les adiciono 100µL de solución sustrato, se incubó por 10 minutos y se agitó suavemente sobre una superficie. Al terminó del tiempo se adiciono 100µL de solución Red stop. Los pocillos se leyeron en el Stat Fax® a 650 nm y el resultado se obtuvo en absorbancia y ppb.

Se utilizó n=10 y los datos se trataron a través de un análisis de varianza con un método de comparación de medias de Tukey en el programa Infostat® versión 2017.

Tabla 1. Tratamientos y concentraciones evaluadas en *Aspergillus flavus*

No.	Tratamiento	Concentración
T1	Extracto de semilla de cítricos Citro-80	1%
T2	Extracto de semilla de cítricos Citrocover	1%
T3	Cubierta de quitosano con aceite esencial de naranja	0.1%
T4	Cubierta de quitosano con aceite esencial de limón	0.1%
T5	Agua (Control positivo).	No Aplica
T6	Plata coloidal (Control negativo)	0.0021%

## Resultados y discusión

En la evaluación *in vitro*, los tratamientos Citro-80® y Citrocover®, mostraron una menor producción de aflatoxinas en las cajas de medio de cultivo (0.1 y 0.1 ppb, respectivamente), sin embargo, fueron estadísticamente similares a la plata coloidal (0.2 ppb). En el resto de los tratamientos si se observaron diferencias estadísticas significativas (Figura 1).

Respecto a la evaluación en jitomates deshidratados, los tratados con Citro-80® mostraron la menor cantidad de aflatoxinas producidas (1.3 ppb), este resultado fue estadísticamente similar a los jitomates tratados plata coloidal (1.7 ppb) y al resto de los tratamientos (Figura 2).

En nuestros estudios *in vitro* e *in situ*, los extractos de cítricos (Citrocover® y Citro-80®) mostró menor producción de aflatoxinas; estos datos concuerdan con lo reportado por Segura et al. (2021), donde men-

cionaron una producción de 1.7 ppb de aflatoxinas en frutos de jitomate saladette tratado con Citrocover® al 1%. Del mismo modo, Restuccia et al. (2019), evaluaron la capacidad de *A. flavus* para producir aflatoxinas frente a la acción de diferentes extractos cítricos; en tal estudio el extracto de limón mostró la mayor eficiencia de inhibición de aflatoxina B1 en 97.88%. La acción de los extractos de cítricos es debido los terpenos y flavonoides presentes en su composición, los cuales tienen función antifúngica ya que debilitan la membrana celular y reducen las especies reactivas de oxígeno producidas el hongo [7,8].

## Conclusión

Los extractos de semillas de cítricos Citro-80® y Citrocover® controlaron eficazmente la producción de aflatoxinas, tanto *in vitro* como en jitomates saladette deshidratado.

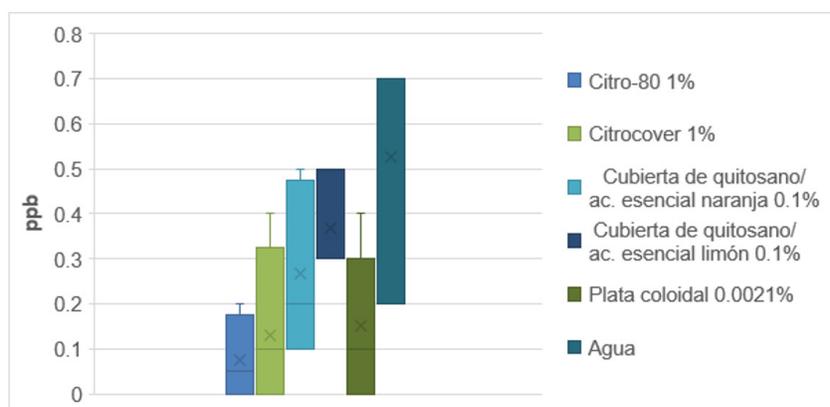


Figura 1. Efecto de los productos naturales sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus* desarrolladas *in vitro*

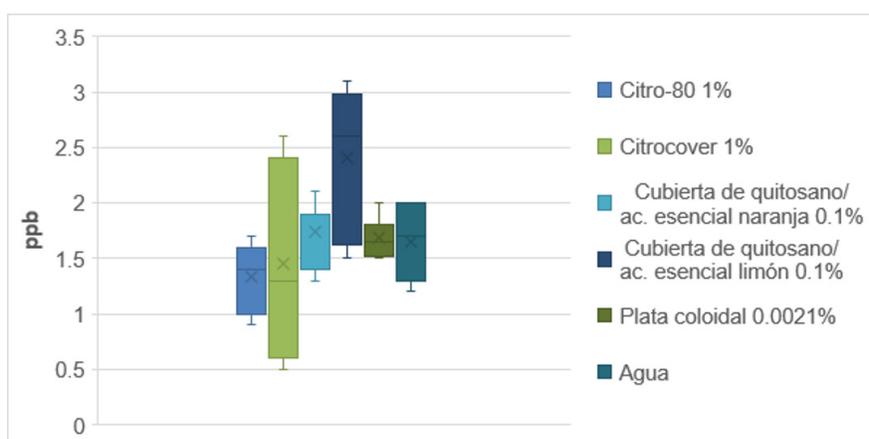


Figura 2. Efecto de los productos naturales sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus* desarrolladas en jitomate saladette deshidratado

---

## Referencias

1. Alshannaq A, Jae-Hyuk Y. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International journal of environmental research and public health*. 2017. doi:10.3390/ijerph14060632
2. Nguyen T, König S, Eggert S, Endres K, & Kins, S. The role of mycotoxins in neurodegenerative diseases: current state of the art and future perspectives of research. *Biological Chemistry*. 2022. doi: 10.1515/hsz-2021-0214
3. Salgado-Escobar I, Hernández-Rodríguez G, Suárez-López Y, Mancera-Ugarte M, & Guerra-Ramírez D. Efficacy of disinfection methods and effects on nutritional properties in coriander and strawberry. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2021; 11(2): p. 327-337.
4. Da Silva L, Bitencourt A, Saltoratto L, Selegim H, & Assis B. Antifungal activity of chitosan and its quaternized derivative in gel form and as an edible coating on cut cherry tomatoes. *Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)*. 2018. Doi:10.2298/JAS1803271S
5. Liu Y, Benohoud M, Yamdeu G, Gong Y, et al. Green extraction of polyphenols from citrus peel by-products and their antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Food chemistry*: 2021. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.100144
6. Moreno Guarín D. Evaluación y estandarización de las condiciones del proceso de deshidratación de tomate. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Ciencias.
7. Segura-Palacios M, Correa-Pacheco Z, Corona-Rangel M, Martínez-Ramírez O, Salazar-Piña D, Ramos-García M, et al. Use of Natural Products on the Control of *Aspergillus flavus* and Production of Aflatoxins In Vitro and on Tomato Fruit. *Plants*. 2021. doi.org/10.3390/plants1012255
8. Restuccia C, Oliveri G, Zuccarello P. et al. Efficacy of different citrus essential oils to inhibit the growth and B1 aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus*. *Environ Sci Pollut Res*. 2019. doi.org/10.1007/s11356-019-06169-9