

ENCAPSULACIÓN DE RESVERATROL PARA SU APLICACIÓN COMO FUNGICIDA



Máster en Calidad, Innovación y Desarrollo de alimentos

E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Proyecto fin de Máster

AUTOR: JAIME RODRÍGUEZ BLANCO

TUTORES: M^a JOSÉ COCERO ALONSO

SORAYA RODRÍGUEZ ROJO

MARTA SALGADO DÍEZ

Índice

Índice.....	2
Resumen.....	3
Antecedentes	4
Objetivos	9
Material y métodos.....	10
<i>Preparación de la emulsión</i>	10
<i>Eliminación del disolvente</i>	10
<i>Secado de las partículas</i>	11
PGSS-drying (Secado de partículas a partir de disoluciones saturadas)	11
Secadero en spray	12
<i>Caracterización</i>	12
Tamaño de gota y tamaño de partícula	12
Morfología externa de las partículas	13
Eficiencia de encapsulado de resveratrol.....	13
Porcentaje de humedad.....	13
Ensayo de actividad anti-fúngica “ <i>in vitro</i> ”	13
Resultados y discusión	15
<i>Secado de las muestras</i>	15
<i>Caracterización</i>	16
Tamaño de gota y tamaño de partícula	16
Morfología externa de las partículas	19
Eficiencia de encapsulado de resveratrol.....	20
Porcentaje de humedad.....	21
Efecto anti-fúngico con técnicas de cultivo “ <i>in vitro</i> ”	21
Conclusiones	26
Bibliografía	27

Resumen

En esta investigación se ha tratado de mejorar la formulación de un anti-fúngico contra la *Botrytis cinerea*; se ha empleado el resveratrol con dicho fin ya que es una sustancia que producen las plantas de forma natural contra este hongo. Se ha estudiado, a través de técnicas de cultivo in vitro, las diferencias presentes en la eficacia del resveratrol como antifúngico cuando estaba encapsulado en distintas matrices como lecitina de soja, β -glucanos o una mezcla de ambas sustancias que pueden favorecer la penetración de este compuesto a través de la pared celular. Se han llevado a cabo dos técnicas de secado, PGSS-drying (Partículas a partir de disoluciones saturadas) y secado en spray, para la obtención del resveratrol encapsulado y se ha comprobado que la calidad de las partículas formadas es notablemente superior cuando se emplea el secado en spray. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento del hongo sí se ve ligeramente disminuido cuando la formulación presenta una mezcla de lecitina + β -glucanos en la envoltura de las partículas y un contenido en resveratrol de 200 μ g/mL. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para determinar la eficacia de estas formulaciones contra el hongo.

Abstract

During this research, the formulation of a fungicide against the *Botrytis cinerea* has been developed; resveratrol has been employed with that purpose because it is a substance that plants produce in a natural way against this fungus. The differences of resveratrol efficiency when encapsulated on soybean lecithin, β -glucans or a mixture of both have been studied through in-vitro culture techniques to determine whether these compounds enhance the penetration of the product through the cell wall of the fungus. Two different techniques of drying have been carried out in order to encapsulate resveratrol, PGSS-drying (Particles from gas saturated solutions) and spray drying. The quality of the particles produced was considerably higher with spray drying. Results show that fungal growth is slightly reduced with a solution of particles containing a mixture of lecithin and β -glucans in the shell and 200 μ g/mL of resveratrol. Nevertheless, more researches need to be developed in order to establish the efficiency of these formulations against the fungus.

Antecedentes

Botrytis cinerea es un hongo filamentoso que resulta patógeno en la mayor parte de cosechas como fresas, tomates, cerezas, manzanas, uvas, etc., dando lugar a la “podredumbre gris”. Este hongo se reproduce y sobrevive saprofiticamente hasta que el fruto es susceptible de ser atacado y es entonces cuando lo degrada. Puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo de este y además puede hacerlo en cualquier parte de la planta (Benito et al., 2000). En el caso de los viñedos, las pérdidas se producen tanto en la cantidad de uva final, ya que se desecan las uvas y se pudren, como en la calidad de las mismas, ya que el metabolismo del hongo hace que se degraden compuestos fenólicos, se produzcan desnaturalizaciones en el color y los azúcares del fruto (glucosa y fructosa) se conviertan en glicerol y ácido glucónico, empeorando el sabor y la apariencia del producto final. En determinadas ocasiones, la infección producida por este hongo no deriva en la podredumbre gris, sino en la “podredumbre noble”, que da lugar a vinos dulces muy complejos (Tosi, 2012). Para que esto se produzca es necesario que existan unas condiciones climáticas muy específicas, tales como una humedad elevada acompañada de baja temperatura (al amanecer), seguida de condiciones de sequedad y temperaturas cálidas durante el resto del día, para evitar la proliferación excesivamente rápida de *Botrytis*. Cuando esto ocurre, normalmente en zonas como riberas, el hongo capta agua del fruto, concentrando sus azúcares pero sin llegar a desecarlo por completo y hacerlo inservible.

Los métodos de control que se han empleado hasta la actualidad contra este hongo han sido principalmente químicos, usándose fungicidas, lo cual ha hecho que surjan variedades genéticamente resistentes y sea cada vez menor su efectividad (Gullino et al., 2000). Es por ello, y por reducir la contaminación ambiental asociada, que se están estudiando alternativas al empleo de los fungicidas clásicos. Por un lado se está investigando el empleo de cepas de vides genéticamente resistentes al ataque de *Botrytis* (Zheng et al., 2011); sin embargo la gran variabilidad de fenotipos que presenta este hongo hace que esta alternativa sea poco viable. Por otro lado, se están haciendo ensayos con técnicas alternativas de agricultura ecológica, empleando organismos que tengan una acción antagonista ante *Botrytis*. El problema de estas técnicas, que apuestan por un menor daño y contaminación ambiental, es que no resultan muy efectivas por el momento. De este modo, la tercera vía de acción contra la aparición de la “podredumbre gris” es la mejora de los antifúngicos clásicos para

hacerlos más efectivos, siendo necesario para ello conocer ampliamente la estructura, metabolismo y mecanismo de infección de *Botrytis cinerea*.

Cuando una planta es atacada por *Botrytis cinerea*, su primer mecanismo de defensa es la síntesis de sustancias antimicrobianas, llamados fitoalexinas (Caruso et al., 2011). Existen numerosos grupos de éstas, siendo uno de ellos los compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los estilbenos, que a su vez engloba sustancias de defensa como el pterostilbeno o el resveratrol. La síntesis de las fitoalexinas debería ser suficiente para vencer el ataque del hongo; sin embargo, éste realiza un segundo ataque a la planta activando su mecanismo enzimático, produciéndose la síntesis de Lacasa y Peroxidasa, enzimas fenoloxidasas y oxidorreductasas, respectivamente, tan potentes que pueden llegar no sólo a inactivar las fitoalexinas, sino a provocar la muerte de la planta debido a la producción de compuestos tóxicos insolubles, y por tanto fácilmente acumulables, por la degradación de los compuestos fenólicos. La manera que emplea la planta para evitar su muerte es la encapsulación molecular de estas sustancias tóxicas para aumentar su solubilidad y facilitar su expulsión (Favaron et al., 2009).

El resveratrol, o 3.5.4'-trihidroxiestilbeno, es una fitoalexina que fue detectada por primera vez en 1940 en las raíces de *Veratrum grandiflorum*. Es un polifenol que ha sido ampliamente estudiado y empleado como remedio natural en medicina tradicional ante numerosas afecciones debido a sus propiedades antioxidantes, mitigantes de enfermedades cardiovasculares, obesidad, etc. Se encuentra presente en la piel de las uvas rojas principalmente (50-100mg/g uva) y en uvas blancas y rosadas en menor medida (Chun Fu et al., 2013).

Esta fitoalexina es sintetizada por la planta cuando es atacada por un microorganismo patógeno. Se ha comprobado que altos niveles de resveratrol en la planta infectada hacen que se vea retrasada e incluso inhibida la propagación de la infección. Son numerosas las investigaciones que se han llevado a cabo estudiando la actividad y eficacia de este compuesto. En 1976, Langcake y Pryce fueron los primeros en probar la actividad biológica del resveratrol contra la *Botrytis cinerea* y desde entonces se han sucedido más ensayos como los de Adrian, Jeandet, Veneau, Weston, y Bessis (1997) o Jeandet et al., (2002) en los que estas conclusiones han sido ratificadas. Zheng C. et al., en 2011 estudiaron cómo interacciona este compuesto con el metabolismo del hongo y vieron que el resveratrol influye en la regulación de la

transcripción de al menos 110 genes de *Botrytis*, entre los cuales se encuentran algunos implicados en procesos de la germinación primaria de los conidios, por lo que esta se ve notablemente afectada. Otros genes afectados desempeñan funciones detoxificadoras, secretoras, etc., por lo que la virulencia del hongo se ve reducida debido a la alteración de su metabolismo.

Para lograr aumentar la eficacia de los antifúngicos es imprescindible estudiar con detalle el hongo que se quiere eliminar; tener conocimientos acerca del genotipo, mecanismo reproductivo, condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo, estructura morfológica, etc. que pueden resultar clave a la hora de desarrollar compuestos específicos y efectivos. Las paredes de los hongos filamentosos están formadas principalmente por polisacáridos, siendo los más abundantes los β -D-glucanos, cuya estructura molecular está formada por una cadena principal de glucosas unidas por enlaces β -(1-3) con ramificaciones en β -(1-6) (Figura 1).

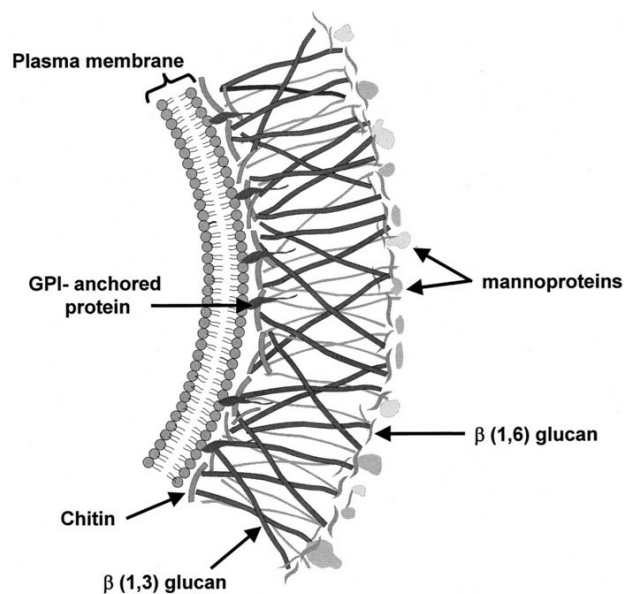


Figura 1: Representación de la pared celular de los hongos (Selitrennikoff, 2001).

En esta investigación se pretende mejorar la efectividad antifúngica del resveratrol introduciéndolo en cápsulas cuya envoltura esté formada por β -glucanos. De este modo la hipótesis que se quiere comprobar es si la penetración del compuesto activo a través de la pared celular del hongo es facilitada al encapsularlo en polisacáridos similares a los presentes en su estructura externa y por tanto, aumente su acción contra la *Botrytis*. Además, también se investigará el efecto de la lecitina de soja y su combinación con el β -glucano ya que ésta ha demostrado ser un soporte eficiente en

el transporte de sustancias por su carácter anfipático. La lecitina de soja es una mezcla compleja de fosfolípidos que forman liposomas de manera espontánea en soluciones acuosas; estas estructuras pueden retener sustancias solubles en agua en la fase acuosa de su interior, así como solubles en aceite en su membrana de la bicapa lipídica (Varona et al., 2013). En cuanto a las características de los β -glucanos como biopolímeros para la formulación, varias investigaciones han demostrado que son capaces de estabilizar emulsiones (Burkus et al., 2000; Kontogiorgos et al., 2004).

Para llevar a cabo el secado de las soluciones y obtener las partículas en estado sólido se va a emplear un secadero en spray convencional, así como fluidos supercríticos. El secado en spray es una operación en la cual un producto líquido es atomizado en una corriente de gas caliente para obtenerlo instantáneamente en polvo (Beirão-da-Costa et al., 2011). Este tipo de secado es una de las tecnologías más usadas para la precipitación y co-precipitación de partículas empleada en alimentación y farmacología. Sin embargo, las altas temperaturas de operación necesarias resultan un gran inconveniente, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas que empleen condiciones menos degradativas en su funcionamiento.

Los fluidos supercríticos son aquellos cuya presión y temperatura es superior a su presión y temperatura críticas, de modo que se ven modificadas propiedades como su densidad, conductividad térmica, viscosidad, difusividad, etc. Una menor viscosidad hace que estos fluidos posean gran facilidad para el transporte de una masa a mayor velocidad. En las últimas décadas ha aumentado significativamente el interés en estas técnicas por la baja toxicidad e inflamabilidad que presentan estos disolventes frente a los clásicos, así como por la mayor eficacia en la obtención de micro y nano-partículas en comparación con métodos empleados hasta el momento, como puede ser la molienda. Las principales técnicas de formación de partículas con fluidos supercríticos son SAS (Sistema de Antisolvente Supercrítico), PGSS y PGSS-drying, que fue la empleada en esta investigación, y RESS (Expansión Rápida de Soluciones Supercríticas) (Cocero et al., 2009). El fluido empleado en esta investigación fue CO_2 debido a que es un gas inerte, no tóxico y sus condiciones críticas son accesibles; su temperatura crítica es baja, lo cual resulta una ventaja para evitar la degradación térmica de compuestos de interés (Luque, 1993).

En el proceso de PGSS-drying se satura la solución acuosa que se quiere secar con dióxido de carbono, empleando un mezclador que funciona a una presión superior a la crítica del CO₂ (7.38 Pa) y expandiendo a continuación esa solución saturada de gas hasta presión atmosférica de manera inmediata. Esta despresurización conlleva una evaporación del CO₂ disuelto y una expansión volumétrica de las burbujas de gas formadas, por lo que se producen pequeñas gotitas cuyo contenido en agua se evaporará rápidamente precipitando el soluto disuelto en ellas. Una de las principales ventajas de esta técnica es que se puede secar el producto a temperaturas en torno a los 50°C, reduciendo la posible degradación de compuestos termolábiles típica del secado convencional (Cocero et al., 2009).

Objetivos

El objetivo de esta investigación ha sido el desarrollo de un compuesto antifúngico formado por partículas compuestas de diferentes matrices (lecitina, β -glucanos y una mezcla de ambas) que contienen resveratrol en su interior. La obtención de estas partículas se ha llevado a cabo empleando una planta de fluidos supercríticos (PGSS-drying) así como un secadero en spray convencional, por lo que un segundo objetivo es la comparación de los productos tanto morfológica, a través de microscopía electrónica, como funcionalmente, a través de test de actividad fungicida in-vitro contra *Botrytis cinerea*.

Material y métodos

Para la realización de los ensayos, los componentes que se han empleado fueron 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), formulado comercial en forma de emulsión aceite-agua con 20%*m/v* de tebuconazol (Orius) cedido por Aragonesas agro S.A., etanol con una pureza de 96% (Panreac) y agar de extracto de malta (Panreac).

Preparación de la emulsión

Los encapsulantes empleados fueron lecitina, β -glucanos y una mezcla de ambos. Inicialmente fueron preparadas disoluciones saturadas con acetato de etilo de 30g/L de lecitina (90%) y β -glucanos (10%). En ensayos posteriores se incrementó hasta un 20% la proporción de β -glucanos. En el caso del secadero en spray, el primer ensayo se llevó a cabo empleando una solución de lecitina (60g/L) igualmente saturada con acetato de etilo. En el segundo, se empleó una mezcla de lecitina (80%) y β -glucanos (20%). En el tercer ensayo, se emplearon exclusivamente β -glucanos (15g/L). En todos los casos, se adiciona resveratrol (6.5g/L) disuelto en acetato de etilo.

Una vez formada la macroemulsión, se lleva al ultra turrax (IKA Pilot Labor plant) durante 2 minutos a 70Hz para la formación de la microemulsión (de Paz et al., 2012)

Eliminación del disolvente

Para extraer el acetato de etilo se introduce la emulsión en el rotavapor (Heidolph), donde se mantiene a 60°C y una presión de vacío de -0.8 bar durante dos horas aproximadamente con una agitación de 130 rpm.

Secado de las partículas

PGSS-drying (Secado de partículas a partir de disoluciones saturadas)

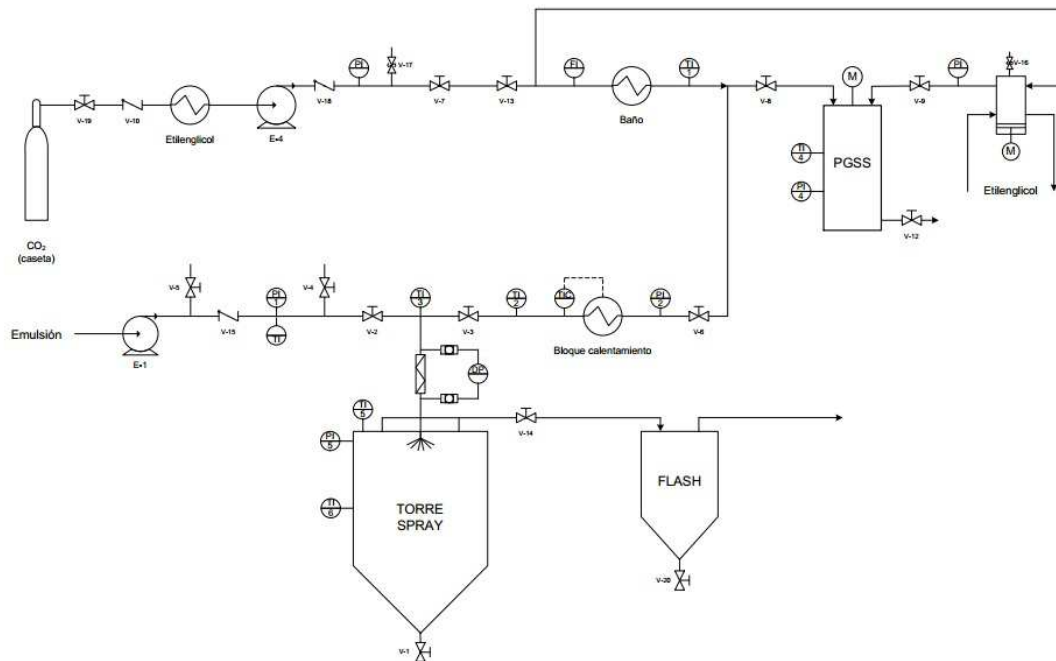


Figura 2: Esquema de la planta de secado PGSS

El CO₂ fue alimentado a través de una bomba de membrana (Milton Roy, caudal máximo 15kg CO₂/h) y precalentado, usando resistencias eléctricas, antes de introducirlo en el mezclador. La velocidad de flujo de CO₂ fue determinada a través de un medidor de Coriolis (sensor Micro Motion Elite CMF010 NB, transmisor Micro Motion Elite RFT91). Por otro lado, la solución de los ensayos fue bombeada a través de una bomba (Milton Roy, caudal máximo 0.66L/h).

La expansión de la solución saturada de gas se realiza en la torre de pulverización utilizando una boquilla (Spraying Systems, diámetro de boquilla 500 μm). Las partículas se recogen en una malla metálica que se encuentra en el interior de la torre y cuyo diámetro de poro es de 1-5μm.

El ensayo con PGSS-drying comienza con un precalentamiento del mezclador hasta alcanzar 140-150°C. Seguidamente se introducen las soluciones ensayo y de CO₂, lo que hará que la temperatura en el mezclador descienda hasta 120-130 °C. El flujo de CO₂ bombeado es de 10kg/h y el de la emulsión 6.6ml/minuto. La temperatura de la torre de pulverización fue de 55-70°C.

Secadero en spray

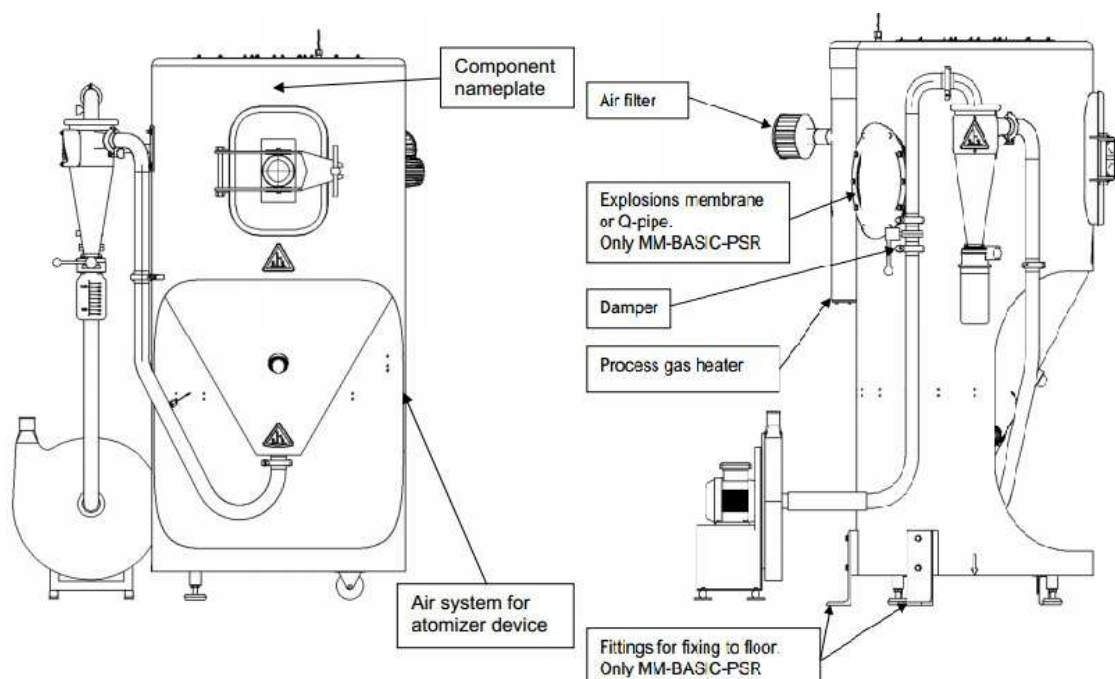


Figura 3: Esquema de secadero en spray

El equipo empleado fue Mobile Minor de Gea NIro. Su funcionamiento consiste en bombear la suspensión formada a través de un inyector que gira a alta velocidad por la entrada de aire previamente calentado. El flujo de bombeo empleado fue de 0.6L/h y la temperatura de entrada de aire en nuestros ensayos fue de 135°C y de 75-85°C en la salida del mismo.

Caracterización

Tamaño de gota y tamaño de partícula

El análisis de la distribución de tamaño de gotas de las emulsiones iniciales y del tamaño de partícula de las suspensiones después de eliminar el acetato de etilo en el rotavapor, se llevó a cabo mediante difracción láser (Mastersizer 2000 de Malvern). El fundamento de este análisis es que la luz difractada por las partículas es captada por distintos detectores y transformada en valores de tamaño en función de los índices de refracción de los materiales. Las mediciones las realizan dos láser, rojo y azul, que trabajan a 633 y 466 nm respectivamente. Este mismo equipo acoplado a un sistema de alimentación de polvo seco (Sirocco, Malvern) fue usado para el análisis de estas mismas muestras una vez que fueron secadas; la muestra en polvo es transportada

por aire comprimido a una presión de 1.4bar hacia la célula de medida. Los resultados se calculan empleando el índice de refracción de la lecitina (1.63).

Morfología externa de las partículas

A través de un microscopio electrónico de barrido (SEM) se analizan las muestras obtenidas; su fundamento consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra a analizar, la cual debe estar recubierta por un metal conductor, en nuestro caso oro, dando lugar a imágenes en tres dimensiones. El equipo empleado fue un SEM (JEOL JSM-820) a alto vacío.

Eficiencia de encapsulado de resveratrol

La eficiencia de encapsulación del resveratrol se calculó como la relación entre el contenido real de resveratrol en las partículas formadas, (g de resveratrol/ g de producto), y la concentración teórica en función de la emulsión preparada.

La concentración de resveratrol se determinó mediante espectroscopía UV-VIS a 305 nm (UV 2550 Shimadzu). A esta longitud de onda se detectó que tanto la lecitina como el β -glucano presentaban interacción, por lo que las rectas de calibrado se prepararon a concentración constante de estos compuestos (0.2 g/L de β -glucano y mezcla de β -glucano y lecitina; y 0.1 g/L de lecitina) con concentraciones de resveratrol entre 0.6 – 5 ppm.

Porcentaje de humedad

Se determinó el porcentaje de humedad de las muestras obtenidas por diferencia de masas entre el producto inicial y tras su paso por una estufa a 105°C durante 24h.

Ensayo de actividad anti-fúngica "in-vitro"

Una vez analizados los parámetros anteriores, se comprobó la eficacia anti-fúngica de las partículas producidas. Para ello se hacen placas de agar de extracto de malta, específico para el crecimiento de mohos y levaduras, donde se siembran porciones de una "placa madre" de *Botrytis cinérea*. Sobre esas placas se distribuyen diferentes concentraciones de las muestras para su análisis.

El cultivo de las porciones de *Botrytis* se realiza haciendo cortes con un bisturí en la placa madre y depositando esos segmentos en las nuevas placas de agar malta. A continuación, se hacen pasar 200 μ L de la muestra disuelta que corresponda a través

de filtros de acetato de celulosa de 0.2µm de poro y se distribuyen uniformemente por la placa. Con este filtro pretendemos que el cultivo se contamine lo menos posible. Para finalizar, se sellan las placas cultivadas y se incuban a 22°C durante 7 días. Pasado ese tiempo, se mide el diámetro de crecimiento del hongo y se comparan los efectos del uso de resveratrol encapsulándolo en una u otra envoltura. En la tabla 1 están recogidos los ensayos in-vitro realizados. Las concentraciones de resveratrol empleadas fueron las descritas por Adrian et al., 2012. En algunos de los ensayos se añade etanol, ya que el resveratrol presenta baja solubilidad en agua, pero se ve incrementada al incorporar etanol (Sun et al., 2008).

Tabla 1: Ensayos in vitro realizados en placas de agar de extracto de malta contra *Botrytis cinerea*.

Muestra	Disolvente	Concentración
Control 1 (Agua)	Agua	-
Control 2 (Agua- etanol)	Agua – etanol 4%	-
Tebuconazol	Agua	0.5-2.5 (µg/mL)
Resveratrol puro	Agua – etanol 4%	2-2000 (µg/mL)
Lecitina	Agua	10 (mg/mL)
Lecitina + β glucanos (80-20%)	Agua	10 (mg/mL)
β glucanos	Agua	10 (mg/mL)
Resveratrol en Lecitina	Agua - etanol 4%	10 (mg/mL)
Resveratrol en Lecitina+β glucanos (80-20%)	Agua - etanol 4%	10 (mg/mL)
Resveratrol en β-glucanos	Agua - etanol 4%	10 (mg/mL)

Resultados y discusión

Secado de las muestras

Se realizaron numerosas pruebas con la planta PGSS-drying y algunas de las condiciones de trabajo no resultaron reproducibles (tabla 2). Se produjeron problemas constantes a la hora de alcanzar las presiones y temperaturas indicadas para cada una de las partes de la planta (De Paz, 2012) y ello hacía que no se obtuviesen como resultado partículas sólidas en la mayoría de las experiencias. El resto de las condiciones de trabajo fueron 100-105 bares de presión de CO₂, cuya temperatura fue de unos 150°C y 95-100 bares de la mezcla CO₂ – solución. Se empleó un flujo de CO₂ de 10 kg/h, y 6.6 mL/min de líquido, siendo por tanto la relación gas-líquido de 25. Por lo general, los materiales que recogíamos resultaban ser demasiado húmedos, agregados o inexistentes, a excepción de dos ensayos, en los que obtuvimos suficiente muestra sólida y seca como para poder analizarla.

Tabla 2: Condiciones de presión y temperatura alcanzadas en algunos de los ensayos realizados en PGSS. Se encuentran subrayados aquellos ensayos en los que se extrajo materia seca.

Ensayos	T Mezcla (°C)	T Torre (°C)	Presión solución (bar)
1	130	55	90
2	145	90	120
<u>3</u>	<u>120</u>	<u>80</u>	<u>90</u>
4	135	65	90
5	140	50	90
6	140	65	90
<u>7</u>	<u>135</u>	<u>70</u>	<u>90</u>
8	150	55	90

En el caso del secadero hemos obtenido en cada experiencia aproximadamente un 50% del material que introducíamos, lo cual está dentro de lo esperado para procesos de secado en spray con cortos periodos de procesado. (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de obtención de muestra seca a través de secadero en spray.

Muestra	Cantidad introducida	Cantidad obtenida	Porcentaje muestra seca
Lecitina	470 mL (60g/L)	13,45g	48,04 %
Lecitina+ β -Glucanos	300 mL (60g/L)	9,82g	54,56 %
β -glucanos	800 mL (15g/L)	7,45g	49,67 %

Caracterización

Tamaño de gota y tamaño de partícula

Con el estudio de las muestras a través del equipo de análisis de tamaño de partículas por difracción láser, vemos que no se aprecian diferencias significativas en el tamaño de partícula entre las emulsiones de lecitina y β -glucanos con y sin acetato de etilo (figuras 4 y 5). Sin embargo sí se aprecia un aumento del tamaño de las partículas cuando se adiciona β -glucanos a la formulación. En el caso de la emulsión de lecitina+ β -glucanos, aparece una mayor variación al analizar la muestra sin acetato de etilo, lo cual puede ser debido a que el análisis de dicha muestra no se realizó en el momento de su extracción del rotavapor, sino que fue días después, por lo que las partículas al no ser estables, hayan modificado su tamaño con el tiempo (figura 6).

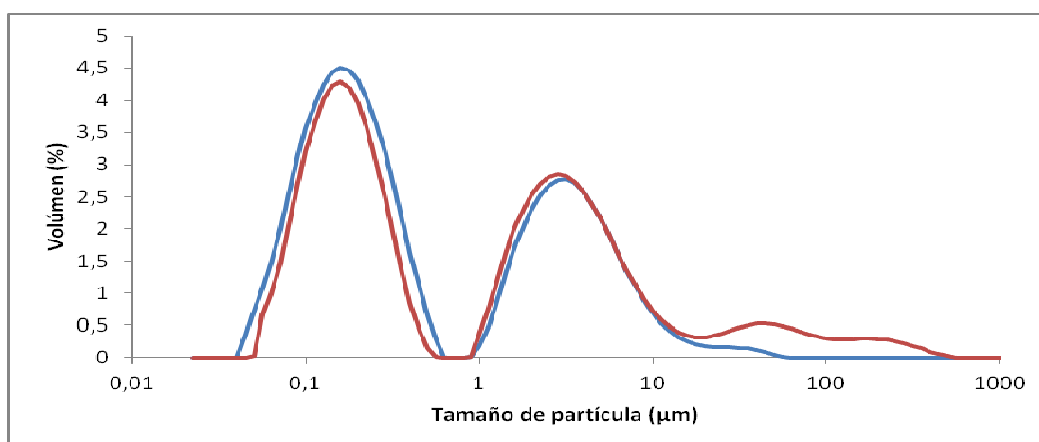


Figura 4: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol en lecitina (línea azul) y del tamaño de la partícula de suspensión formada tras la eliminación del disolvente (línea roja).

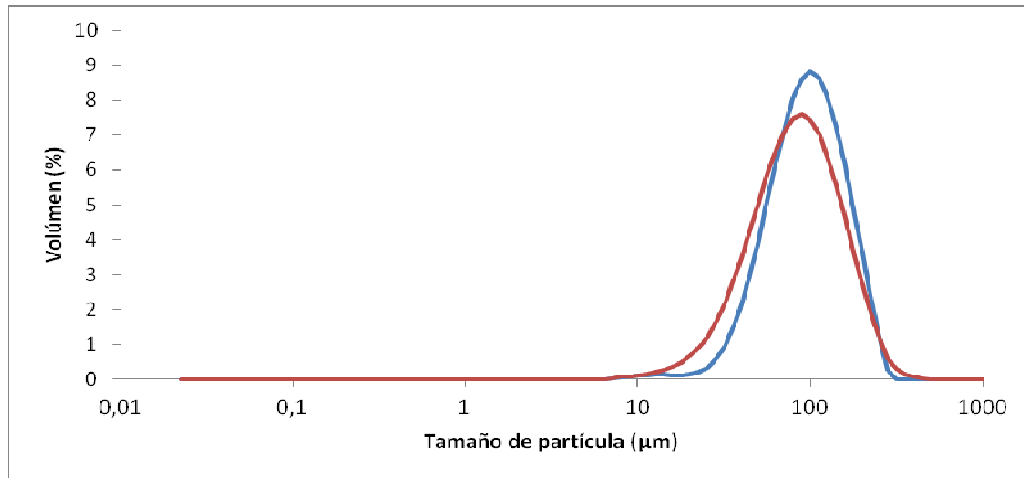


Figura 5: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol en β -glucanos (línea azul) y del tamaño de la partícula de suspensión formada tras la eliminación del disolvente (línea roja)

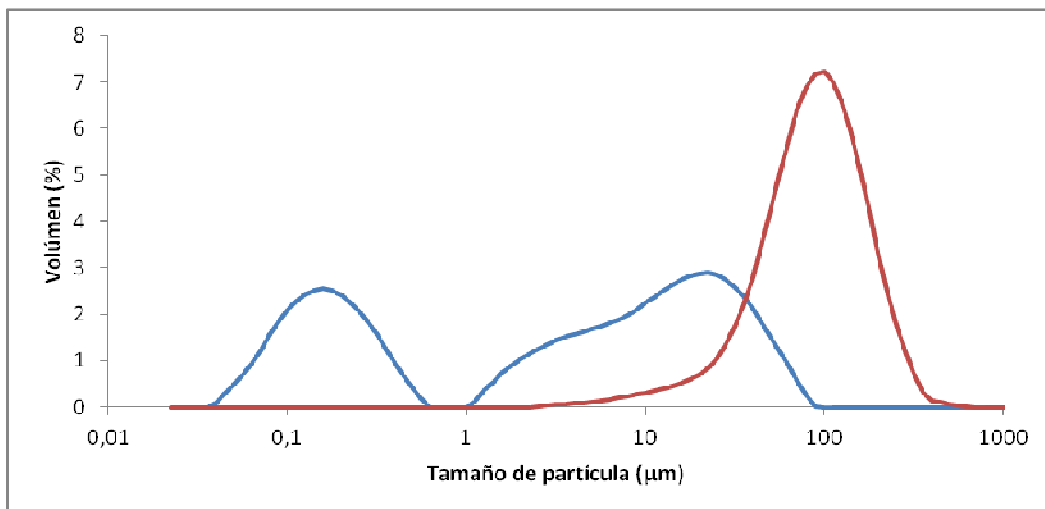


Figura 6: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol en lecitina + β glucanos (línea azul) y del tamaño de la partícula de suspensión formada tras la eliminación del disolvente (línea roja).

El posterior análisis de las partículas, cuando las muestras ya habían sido secadas, reflejó que pese a que en estado líquido existían ciertas diferencias en los tamaños medios de las partículas cuando estas contenían β -glucanos, en estado sólido estas diferencias resultan inferiores en las muestras secadas por PGSS-drying y prácticamente inexistentes en las de secadero en spray (figuras 7 y 8).

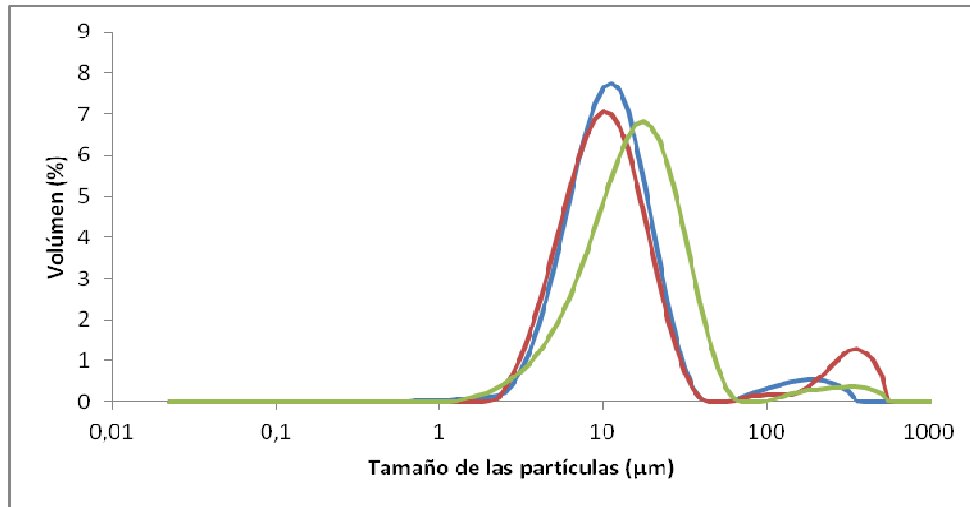


Figura 7: Análisis del tamaño de las partículas de resveratrol encapsulado en lecitina (línea azul), lecitina+ β -glucanos (línea verde) y β -glucanos (línea roja) secadas a través de secadero en spray.

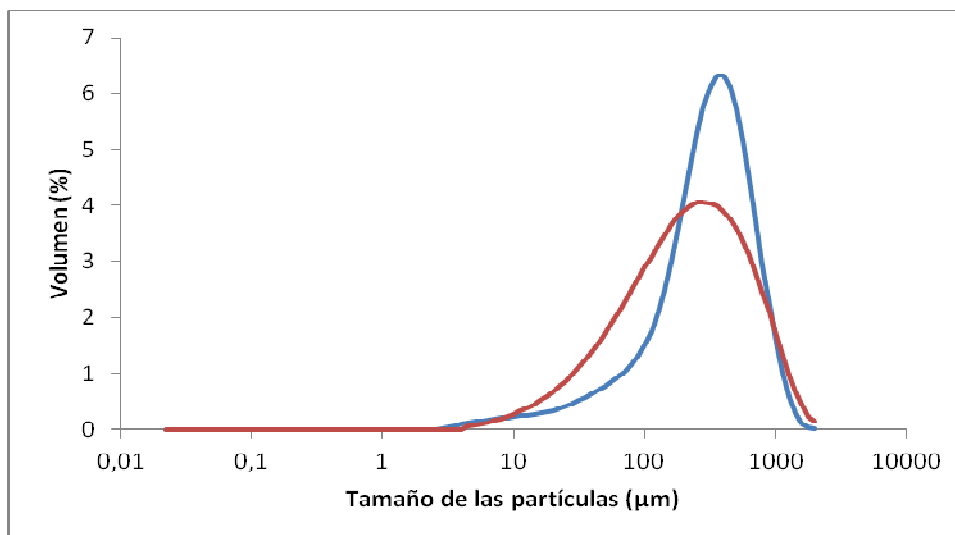


Figura 8: Análisis del tamaño de las partículas de resveratrol encapsulado en lecitina (línea roja), lecitina+ β -glucanos (línea azul) secadas a través de PGSS-drying.

Además, como puede verse en la figura 8, en las muestras secadas a través de PGSS-drying parecen haberse producido aglomerados, puesto que comparándolas con las secadas en secadero, el tamaño es 10 veces superior. La formación de estos agregados de partículas quedó patente cuando la morfología externa de las partículas fue analizada a través de microscopía electrónica de barrido.

Morfología externa de las partículas

La morfología de las partículas obtenidas con ambas técnicas se observó mediante SEM. Como se puede ver en las figuras 8 y 9 las partículas obtenidas por secado en spray presentan una morfología esférica bien definida aunque no completamente regular, lo cual es debido a que el SEM trabaja en condiciones de alto vacío y las deforma. Por el contrario, las obtenidas por PGSS forman aglomerados; parece que éstas se han formado por cohesión de gotas pequeñas muy húmedas (figuras 9 y 10).

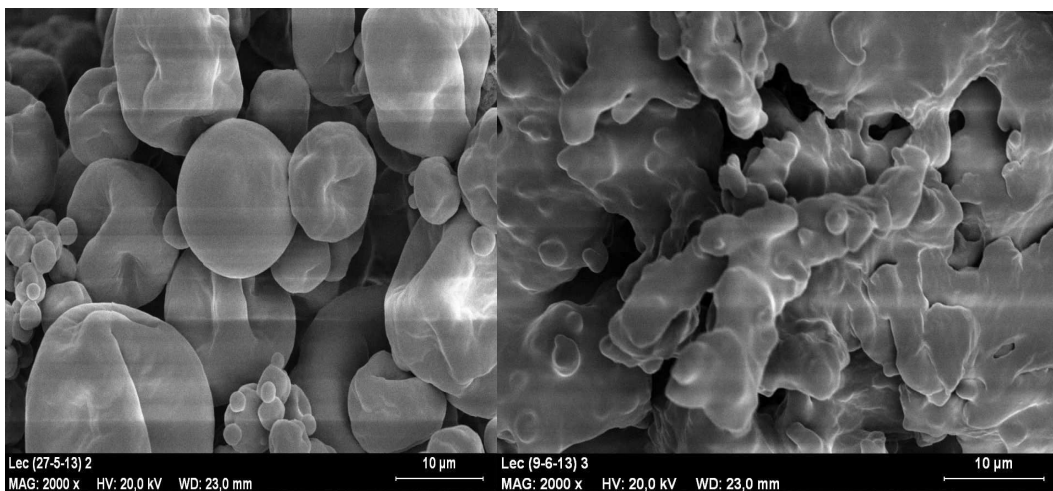


Figura 9: Comparación de partículas de resveratrol encapsulado en lecitina a través de secadero en spray (izq.) y PGSS (dcha.).

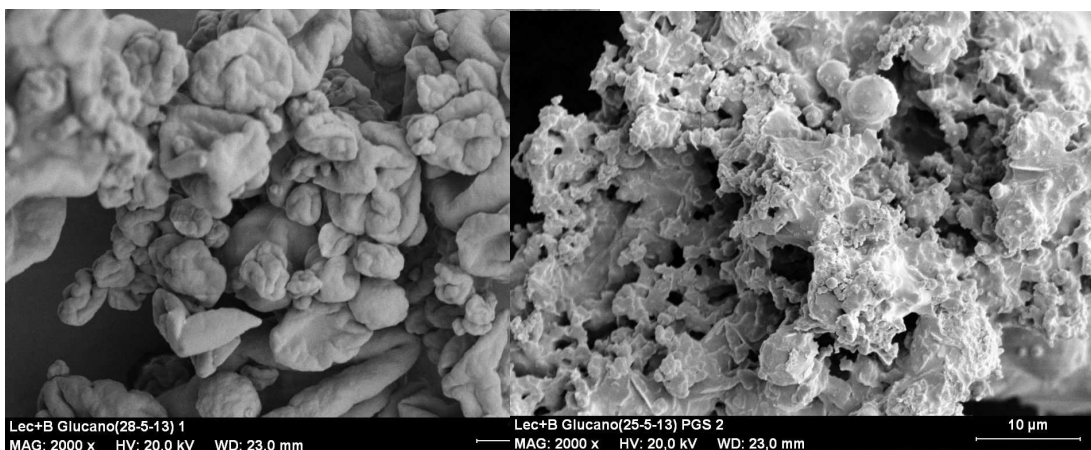


Figura 10: Comparación de partículas de resveratrol encapsulado en lecitina+β-glucanos a través de secadero en spray (izq.) y PGSS (dcha.).

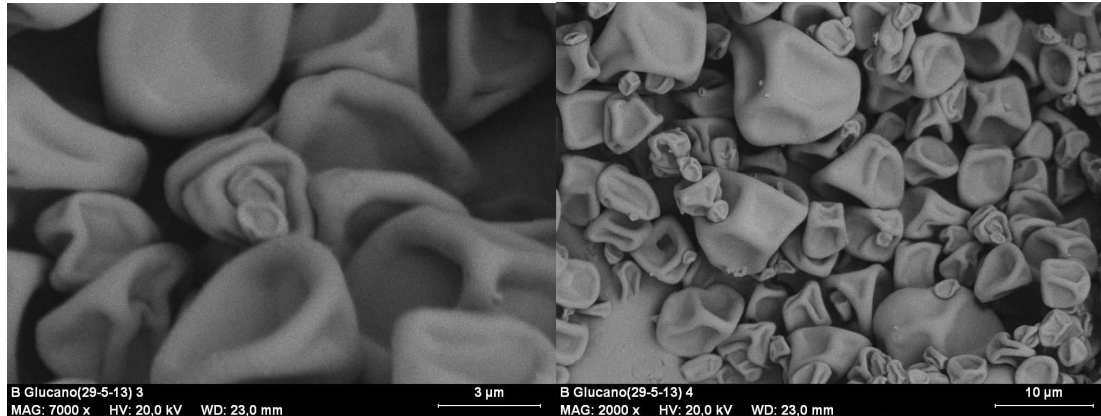


Figura 11: Fotografías de partículas de resveratrol encapsulado en β -glucanos a través de secadero en spray.

Eficiencia de encapsulado de resveratrol

La tabla 4 recoge los valores medios y el porcentaje de encapsulación de resveratrol en función de la técnica de secado y de las distintas matrices que conforman la envoltura de las partículas.

Tabla 4: Porcentaje y contenido medio de resveratrol encapsulado en las distintas muestras.

Muestra	Contenido de resveratrol encapsulado (mg resv/g de muestra)	Encapsulación (%)
Lecitina PGSS-drying	6.0 \pm 1.4	114
Lecit+β-Glucano PGSS-drying	322 \pm 28	1219
Lecitina Secadero	19.0 \pm 0.8	72
Lecitina+β-Glucano secadero	18.0 \pm 0.7	68
β-glucano secadero	27 \pm 4	102

Los valores de porcentaje de resveratrol encapsulado en las partículas por secado en spray son bastante elevados, llegando al 100% cuando se emplea β -glucano como encapsulante. Además ponen de manifiesto que no ha habido degradación del producto por la alta temperatura del aire durante el secado. Los valores de contenido en resveratrol para los productos obtenidos por PGSS-drying, superiores al 100%,

indican que ha precipitado preferentemente el resveratrol contenido en la suspensión frente a los materiales de encapsulación, particularmente en el caso de la mezcla lecitina- β -glucano.

Porcentaje de humedad

Se analizó la cantidad de agua que presentaban las muestras obtenidas a través del secadero en spray y los resultados que obtuvimos dejan patente que el proceso de secado fue muy eficiente, ya que la mayor humedad recogida fue sólo del 6% en el caso de los β -glucanos (Tabla 5)

Tabla 5: Porcentaje de humedad contenido en cada tipo de muestra.

Tipo de muestra	% de humedad
Resveratrol en lecitina	1,8
Resveratrol en lecitina+ β-glucanos	2,3
Resveratrol en β-glucanos	6,3

Efecto anti-fúngico con técnicas de cultivo "in vitro"

En el primer ensayo se inoculan las placas con muestras puras de lecitina, β -glucanos y resveratrol para poder comparar posteriormente la acción de nuestras partículas con estos resultados. Sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento del hongo (Figura 12).

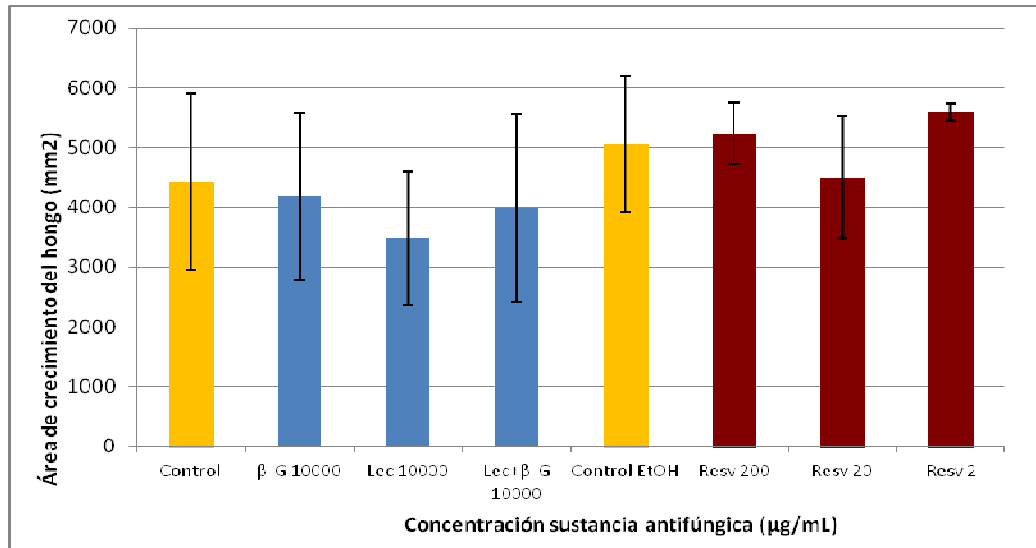


Figura 12: Áreas de crecimiento de la Botrytis en el primer ensayo tras 7 días de inoculación.

Por este motivo, algunas placas del segundo ensayo se inoculan con el formulado comercial, Orius, que contiene tebuconazol en forma de emulsión. Pese a haber empleado la concentración máxima recomendada para el control de la Botrytis, los crecimientos de las placas del segundo ensayo tampoco presentaron diferencia alguna ni en las placas del anti-fúngico comercial ni en aquellas que contenían muestras obtenidas en el secadero (figura 13).

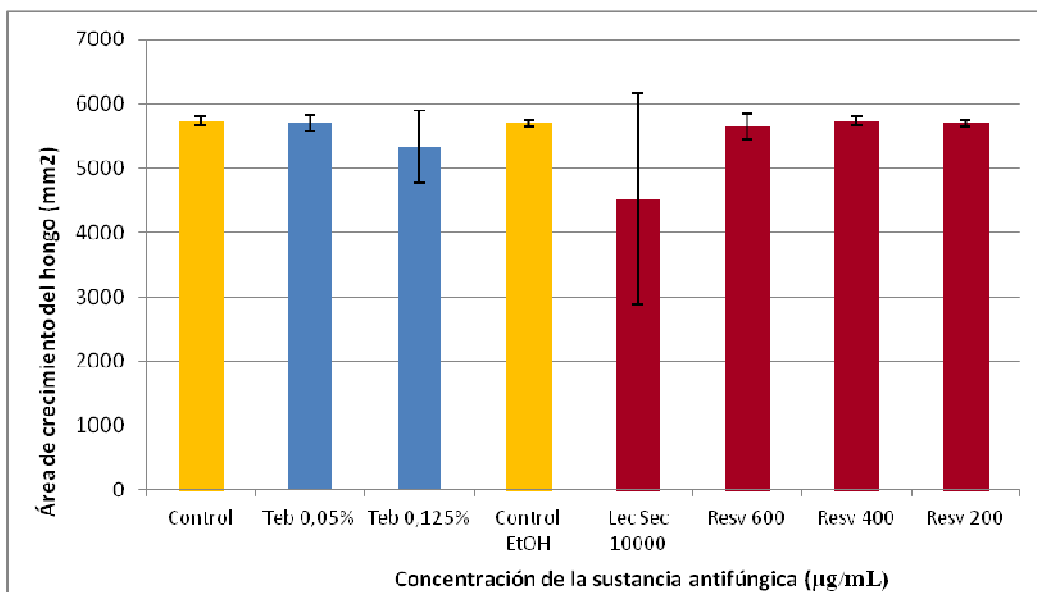


Figura 13: Áreas de crecimiento de la Botrytis en el segundo ensayo tras 7 días de inoculación.

En el tercer ensayo realizado, se emplea *Botrytis* de dos cepas distintas para realizar el cultivo en placa y se incrementa al doble de la concentración máxima la cantidad de tebuconazol (0.25%). Sin embargo, el hongo no vio disminuido su crecimiento en ningún caso (figura 14).

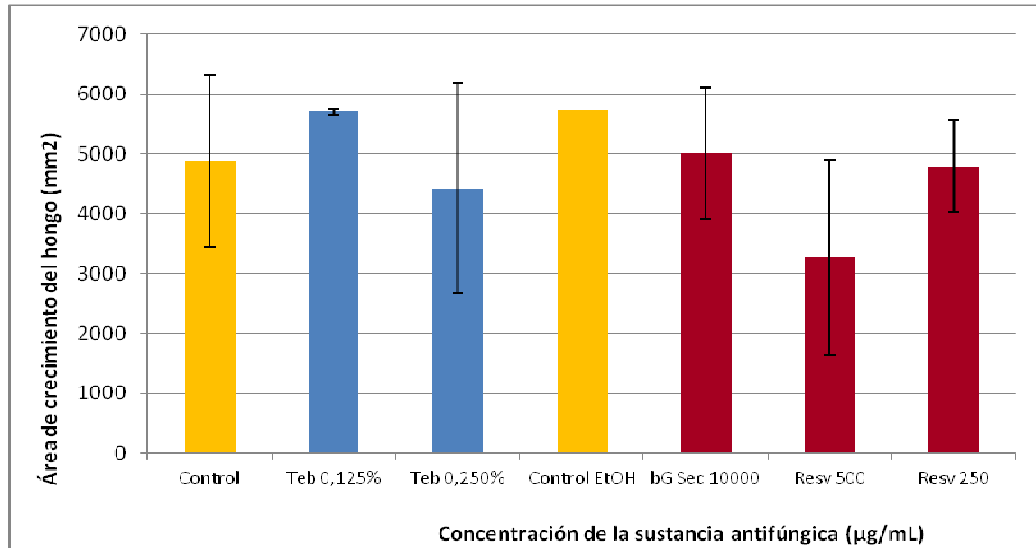


Figura 14: Áreas de crecimiento de la *Botrytis* en el tercer ensayo tras 7 días de inoculación.

En el último ensayo realizado, se tuvo conocimiento a través de personal del laboratorio de una posible interacción entre los filtros de acetato de celulosa y compuestos orgánicos de tipo polifenol, como la quercetina o el resveratrol, por lo que se realizó este ensayo sin emplear dichos filtros y los resultados obtenidos reflejan que se estaba produciendo dicha interacción, ya que las placas que fueron inoculadas con tebuconazol no han presentado crecimiento del hongo. Además, se aprecia un menor crecimiento respecto al control, de aquellas inoculadas con la solución mezcla de lecitina + β -glucanos y resveratrol a una concentración de $200\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, las placas inoculadas con resveratrol puro con las concentraciones citadas en la bibliografía (Adrian et al., 2012) no han presentado el efecto esperado (Figura 15).

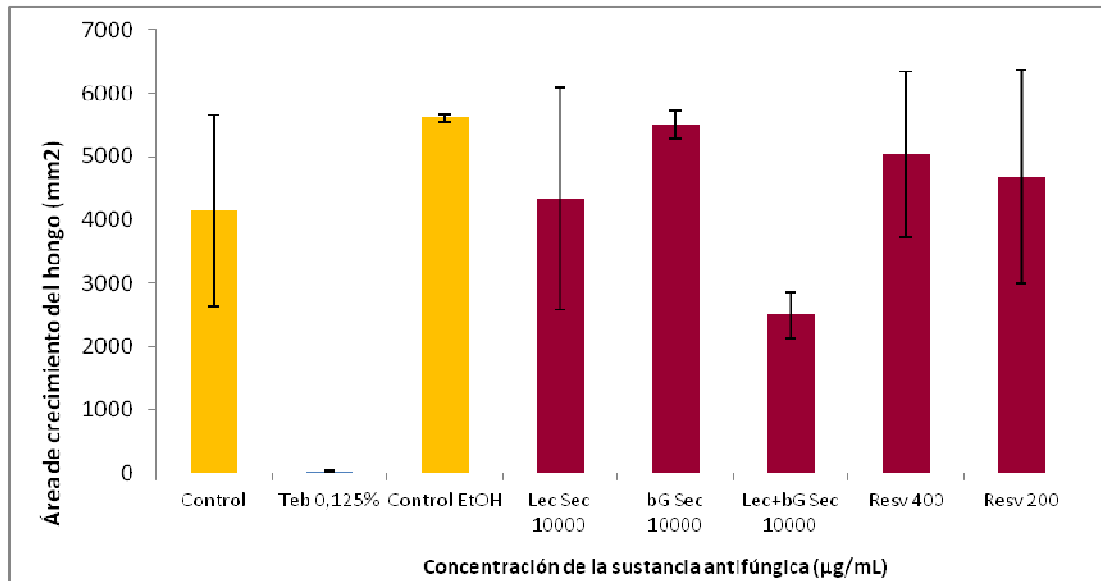


Figura 15: Áreas de crecimiento de la *Botrytis* en el cuarto ensayo tras 7 días de inoculación.

En las siguientes figuras pueden apreciarse las diferencias en el crecimiento del hongo entre las placas de control con agua-etanol y las de tebuconazol (figura 16) y las de control y las de resveratrol encapsulado con la mezcla de lecitina y β -glucanos obtenidas mediante secado en spray (figura 17).

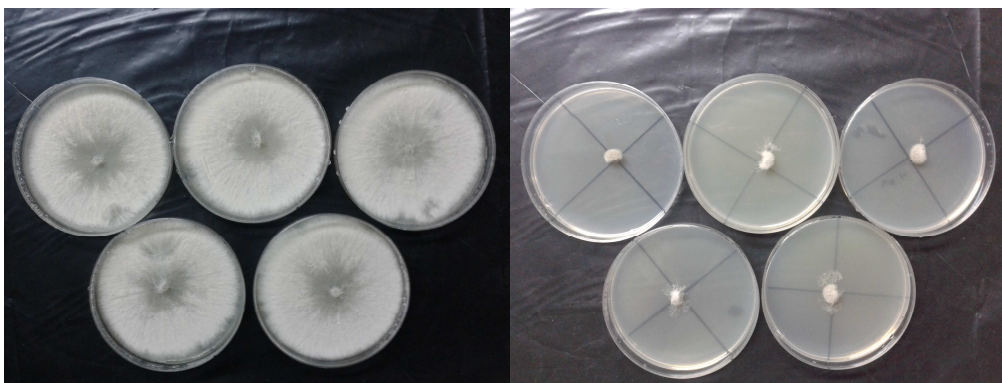


Figura 16: Comparación del crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar de extracto de malta inoculadas con agua+etanol (izq.) y tebuconazol (dcha.).

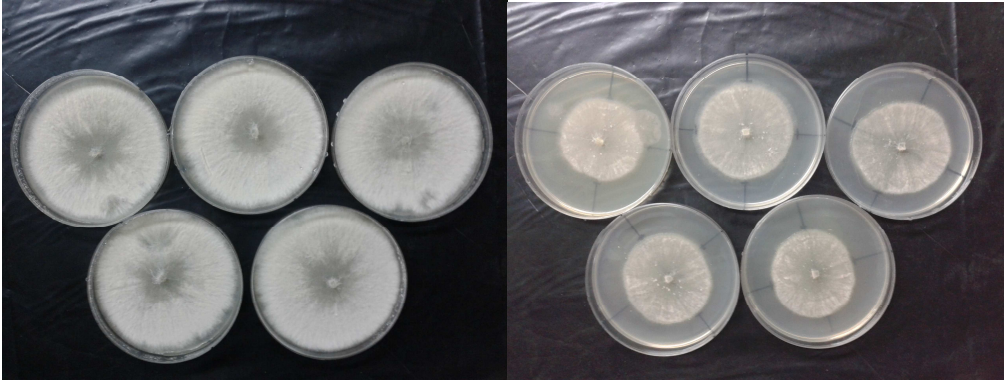


Figura 17: Comparación del crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar de extracto de malta inoculadas con agua+etanol (izq.) y resveratrol encapsulado en lecitina + β -glucanos (dcha.).

Conclusiones

El objetivo principal de esta investigación fue la formulación de un anti-fúngico que tuviese un mayor poder de penetración y por tanto, una mayor eficacia contra el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Para ello se desarrollaron emulsiones con diferentes polímeros (lecitina de soja, β -glucanos y una mezcla de ambos) y una sustancia de origen natural y no-tóxica, el resveratrol. Se emplearon dos técnicas para el secado de las partículas formadas, PGSS-drying y secadero en spray.

La formación de partículas que presentan resveratrol en su interior resultó muy eficaz, alcanzándose valores superiores al 70% de encapsulación, cuando se llevó a cabo emulsionando la solución con acetato de etilo como fase orgánica y su posterior eliminación a vacío y secado convencional por atomización en spray. Sin embargo, cuando se emplea el PGSS-drying como método de secado la formación de partículas se ve afectada negativamente.

Además, puesto que el resveratrol sin formular no ha presentado el efecto esperado de acuerdo a la bibliografía consultada, resultaría necesario estudiar el efecto de mejora de la penetración del anti-fúngico con las matrices naturales investigadas, lecitina, β -glucanos y una mezcla de ambos, empleando tebuconazol puro en lugar de resveratrol.

Bibliografía

- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., et al., 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, on *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1689-1702.
- Adrian, M., Jeandet, P., 2012. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83 (8) 1345-1350.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Moldão-Martins, M., et al., 2011. Physical characterization of rice starch spherical aggregates produced by spray-drying. *Journal of Food Engineering* 104, 36–42.
- Benito, E.P., Arranz, M., Eslava, A.P., 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de micología* 17, 43-46.
- Burkus, Z., Temelli, F., 2000. Stabilization of emulsions and foams using barley β -glucan. *Food Research International* 33, 27-33.
- Caruso, F., Mendoza, L., Castro, P., et al., 2011. Antifungal Activity of Resveratrol against *Botrytis cinerea* Is Improved Using 2-Furyl Derivatives. *PLoS ONE* 6(10): e25421. doi:10.1371/journal.pone.0025421.
- Chun-Fu, W., Jing-Yu, Y., Fang, W., et al., 2013. Resveratrol: Botanical Origin, Pharmacological Activity and Applications. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11 (1), 1-15.
- Cocero, M. J., Martín, A., Mattea, F., et al., 2009. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Fundamentals and Applications. *The Journal of Supercritical Fluids* 47 (3), 546-555.
- De Paz, E., Martín, A., 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
- Favaron, F., Lucchetta, M., Odorizzi, S., et al., 2009. The role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape pr proteins. *Journal of Plant Pathology* 91, (3) 579-588.

- Gullino, ML., Leroux, P., Smith, CM., 2000. Use and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19:1-11.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., et al., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 50, 2731–2741.
- Kontogiorgos, V., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V., et al., 2004. Stability and rheology of egg-yolk-stabilized concentrated emulsions containing cereal β -glucans of varying molecular size. *Food Hydrocolloids* 18, 987-998.
- Langcake, P., Pryce, R., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Cellul Mol Life Sci*, 33(2), 151-152.
- Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., Cases, M. V., 1993. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. *Reverté*.
- Selitrennikoff, C. P., 2001. Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology* 7, 2883-2894.
- Sun, X., Shao, Y., Yan, W., 2008. Measurement and Correlation of Solubilities of trans-Resveratrol in Ethanol +Water and Acetone + Water Mixed Solvents at Different Temperatures. *Journal Chemistry. Engineering* 53, 2562–2566.
- Tosi, E., Fedrizzi, B., Azzolini, M., et al., 2011. Effects of noble rot on must composition and aroma profile of Amarone wine produced by the traditional grape withering protocol. *Food Chemistry* 130, 370–375.
- Varona, S., Martín, A., Cocero, M.J., 2009. Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. *Chemical Engineering and Processing* 48, 1121–1128.
- Varona, S., Rodríguez, S., Martín, A., et al., 2012. Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products* 42, 243– 250.
- Zheng, CH., Choquer, M., Zhang, B., et al., 2011. LongSAGE gene-expression profiling of *Botrytis cinerea* germination suppressed by resveratrol, the major grapevine phytoalexin. *Fungal biology* 115, 815-832.