

Antifungal activity of a thymol-based active packaging system for tomato preservation

Actividad antifúngica de un sistema de envasado activo a base de timol para la preservación de tomate

M.H. Alvarez-Hernández*, G.B. Martínez-Hernández, N. Castillejo, J.A. Martínez, F. Artés-Hernández

Postharvest and Refrigeration Group, Agronomical Engineering Department & Institute of Vegetal Biotechnology, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*hazel.alvarezhdz@gmail.com

Abstract

Tomato fruit is highly nutritious, but it is susceptible to fungal diseases including gray mold caused by *Botrytis cinerea*. In this study, an antifungal sachet-based packaging system was made using Tyvek® film to form the sachet and thymol as the active agent. The effect of the sachet was assayed both *in vitro* against *B. cinerea* growing on PDA medium and *in vivo* to control gray mold on artificially infected cherry tomatoes. According to the assay, inoculated plates or infected fruit were stored at 11 °C inside a packaging system with and without a sachet attached to the lid inner side. The results showed that the prepared sachet was effective at inhibiting the *B. cinerea* growth during the 6 incubation days, with 97 % of inhibition. Furthermore, when the sachet was evaluated during storage of infected tomato, the incidence and severity of decay was reduced, especially from the second day to the day 20 of storage. Thus, this thymol-carrying sachet has a potential application as an antifungal-releasing packaging system for preserving cherry tomato, and probably other fruit and vegetables susceptible to *B. cinerea* infection.

Keywords: *Botrytis cinerea*; antifungal-releasing sachet; essential oils.

Resumen

El tomate es altamente nutritivo, pero muy susceptible a enfermedades fúngicas, incluido el moho gris causado por *Botrytis cinerea*. En este estudio, se elaboró un sistema de envasado antifúngico a base de un sachet utilizando una película Tyvek® para formar la bolsa y timol como agente activo. El efecto del sachet se evaluó *in vitro* contra *B. cinerea* en medio PDA e *in vivo* para controlar el moho gris en tomates tipo *cherry* infectados artificialmente. Según el caso, las placas inoculadas o frutos infectados fueron almacenados a 11 °C en un sistema de envasado con y sin el sachet adherido a la parte interna de la cubierta. Los resultados mostraron que el sachet elaborado fue eficaz para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* durante los 6 d de incubación, con un 97 % de inhibición. Además, cuando el sachet fue evaluado durante el almacenamiento del tomate infectado, la incidencia y la severidad se redujeron, especialmente desde el segundo día hasta los 20 d. Por lo tanto, este sachet activo con timol tiene una aplicación potencial como un sistema de envasado antifúngico para preservar tomates tipo *cherry*, y probablemente otros productos hortofrutícolas susceptibles a la infección por *B. cinerea*.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*; sachet antifúngico; aceites esenciales.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate es una fruta de gran importancia económica a nivel mundial. Particularmente, el tomate *cherry* es una fruta de consumo popular, debido a los beneficios que se han reportado para la salud, así como a sus características sensoriales (1). No obstante, es altamente perecedero y susceptible a enfermedades, principalmente al moho gris causado por *Botrytis cinerea* (2).

Numerosos aceites esenciales de origen vegetal tienen actividad antifúngica contra diversos patógenos postcosecha. Entre estos destaca el aceite esencial de tomillo, cuyo componente principal es el timol (2). El timol es un monoterpenoide que presenta una estructura de un anillo fenólico simple, cuyo poder antimicrobiano ha sido atribuido a la presencia de un grupo hidroxilo y a un sistema de electrones deslocalizado (3). El timol es una sustancia volátil lo cual resulta de gran interés para ser liberado en el espacio de cabeza de un envase alimentario (4). En la última década, el envasado activo ha suscitado gran atención como una tecnología emergente (1). El compuesto activo puede ser incorporado dentro de un dispositivo portador (*sachets* o *pads*), el cual se coloca dentro del envase sin tener contacto con el alimento. En el caso del envasado activo antimicrobiano, el modo de acción se basa en la evaporación de un compuesto volátil con actividad antimicrobiana (4). Así, el objetivo del presente trabajo fue elaborar un *sachet* activo que libere timol y evaluar su actividad antifúngica contra *B. cinerea* tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Elaboración del *sachet* activo, y preparación de material vegetal e inóculo

Se elaboró un sistema de envasado activo utilizando timol (Sigma–Aldrich, Alemania) como agente activo y una película Tyvek® (220 µm de espesor; DuPont, EEUU) para formar una pequeña bolsa (6,0 × 6,5 cm) conocida como *sachet*. Tras introducir 0,57 g de cristales de timol en el *sachet*, esta fue termo-sellada. Como producto se usaron tomates (*Solanum lycopersicum* D'Arcy. 'Dolcetini'), obtenidos de Agrícola Gaobe SL (Almería, España), los cuales fueron higienizados con NaClO (100 mg L⁻¹; pH 6,5).

B. cinerea fue inicialmente aislado de un espécimen de pimiento infectado con moho gris y purificado mediante la transferencia de muestras de agar-micelio (7,4 mm de diámetro) a placas Petri de agar de patata-dextrosa (PDA; Scharlau Chemicals, España) tal como se ha descrito anteriormente (5). Las placas inoculadas se mantuvieron 5 d en luz/oscuridad a 20 °C.

2.2 Efecto *in vitro* del *sachet* preparado en el crecimiento micelial y desarrollo de *B. cinerea*

Fragmentos de agar-micelio (2,2±0,4 cm²) fueron extraídos del cultivo de *B. cinerea* (con 5 d de edad) y sembrados en el centro de placas Petri (90 mm de diámetro) con PDA suplementado con estreptomycin. Se inocularon 4 placas por tratamiento y se colocaron por duplicado dentro de bandejas de polipropileno (PP) rígido sobre una cama de tomates (10 tomates por bandeja) para simular las condiciones atmosféricas que se presentan *in vivo*. Las bandejas fueron cubiertas con una película de PP (35 µm de grosor), la cual tenía un *sachet* adherido en un punto medio del lado interno. Un grupo de placas inoculadas fueron incubadas en ausencia de *sachet* y usadas como control.

Las placas envasadas fueron incubadas a 11 °C con exposición constante a luz, y el crecimiento micelial fue registrado diariamente mediante mediciones del área superficial, hasta que la colonia se encontró próxima al borde de la placa Petri. Adicionalmente, el porcentaje de inhibición de crecimiento fue determinado a partir de la diferencia entre el área de la colonia creciendo en ausencia de un *sachet* y el área de aquella colonia incubada con un *sachet* con timol en el mismo día. El desarrollo fúngico fue caracterizado como la extensión de colonia a través de la tasa de crecimiento: incremento de la superficie cubierta en cm² d⁻¹.

2.3 Eficiencia del *sachet* preparado para controlar la infección por moho gris en tomate

Para evaluar el efecto *in vivo* del *sachet* elaborado, un grupo de tomates higienizados (10 unidades por tratamiento) fueron artificialmente infectados realizando una incisión (2 mm de largo y 1 mm de profundidad) sobre ellos e inoculando 5 μL de una suspensión de conidios de *B. cinerea* ($2,6 \times 10^5$ conidios mL^{-1}). Los tomates fueron colocados en bandejas de PP, las cuales fueron cubiertas como se ha detallado en el subapartado anterior. Como control, un grupo de frutas infectadas fueron envasadas sin *sachet*. El ensayo se realizó a 11 °C durante 26 d. La incidencia y la severidad de podredumbre fue determinada en cada bandeja mediante el índice de podredumbre (ID) usando la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{(P_1 \times 0) + (P_2 \times 1) + (P_3 \times 2) + (P_4 \times 3)}{TF} \quad (1)$$

donde P_1 es el número de frutos sin podredumbres, P_2 es el número de frutos deteriorados sin micelio, P_3 es el número de frutos deteriorados con micelio blanco, P_4 es el número de frutos deteriorados con micelio gris, y TF es el número total de frutos en la bandeja.

2.4 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron de acuerdo con un diseño bifactorial (tratamiento \times tiempo de conservación o incubación). El efecto de los tratamientos se determinó mediante un Análisis de Varianza usando el programa estadístico SPSS Statistics versión 22 (IBM Corporation, NY, EE.UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *sachet* con timol mostró eficiencia para inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* en placas con PDA a 11 °C (Fig. 1A), mostrando una inhibición del 97 ± 2 % al final del periodo de incubación. Tras 5 d de incubación en ausencia de timol, se observó una tasa de crecimiento máxima promedio de aproximadamente $184 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$ (Fig. 1B). Por el contrario, cuando se usó el *sachet* de timol, la mayor tasa de crecimiento fúngica encontrada fue de alrededor de $8,2 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$ en el día 6. En concordancia con lo observado *in vitro*, el *sachet* con timol disminuyó la podredumbre del tomate *cherry* causada por *B. cinerea* durante 20 d a 11 °C (Fig. 2). Zhang y col. (2) describieron que el poder antifúngico del timol contra *B. cinerea* se debe a que dicho agente cambia la morfología de las hifas mediante la disrupción y distorsión de los micelios. Dichos autores, también encontraron que el timol afectaba de manera negativa al contenido lipídico de las células de *B. cinerea* y que la permeabilidad de la membrana incrementaba a medida que la dosis de timol aumentaba, causando la destrucción de la membrana celular.

Los resultados obtenidos sugieren que el sistema elaborado en este trabajo fue capaz de liberar timol en concentraciones suficientes para afectar el desarrollo de *B. cinerea* tanto en medio PDA como en tomate *cherry* fresco. En este sentido, se ha encontrado que la concentración fungicida mínima de timol contra *B. cinerea* es de 100 mg L^{-1} en medio PDA (2). Por ello, la película Tyvek® resulta ser una buena opción para el desarrollo de dispositivos de liberación/emisión de agentes como el timol.

4. CONCLUSIONES

Un *sachet* activo con timol minimizó el crecimiento de *B. cinerea* (*in vitro*) y fue efectivo para reducir la patogenicidad de *B. cinerea* en tomate *cherry*. Por lo tanto, este sistema tiene un alto potencial para ser usado como sistema de envasado activo antifúngico para la preservación de tomate *cherry*. No obstante, será necesario realizar nuevas investigaciones para su optimización, así como su uso para otros productos hortofrutícolas.

5. AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a Agrícola Gaobe SL por suministrarnos el material vegetal a través de la Cooperativa CASI, y a BIOCONSERVACIÓN S.A (Barcelona, España) por facilitarnos la película Tyvek®. También agradecemos a Roberta Passafiume y Francisca por su ayuda técnica.

6. REFERENCIAS

1. Buendía-Moreno L, Soto-Jover S, Ros-Chumillas M, Antolinos V, Navarro-Segura L, Sánchez-Martínez MJ, et al. Innovative cardboard active packaging with a coating including encapsulated essential oils to extend cherry tomato shelf life. *LWT*. 2019;116:108584.
2. Zhang J, Ma S, Du S, Chen S, Sun H. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *J Food Sci Technol*. 2019;56:2611-20.
3. Kachur K, Suntres Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(18):3042-53.
4. Kapetanakou AE, Skandamis PN. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds. *Curr Opin Food Sci*. 2016;12:1-12.
5. Martínez JA, Navarro A, Fernández JA, Bañón S. Using paclobutrazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamelaucium uncinatum*. *Australas Plant Pathol*. 2007;36:39-45.

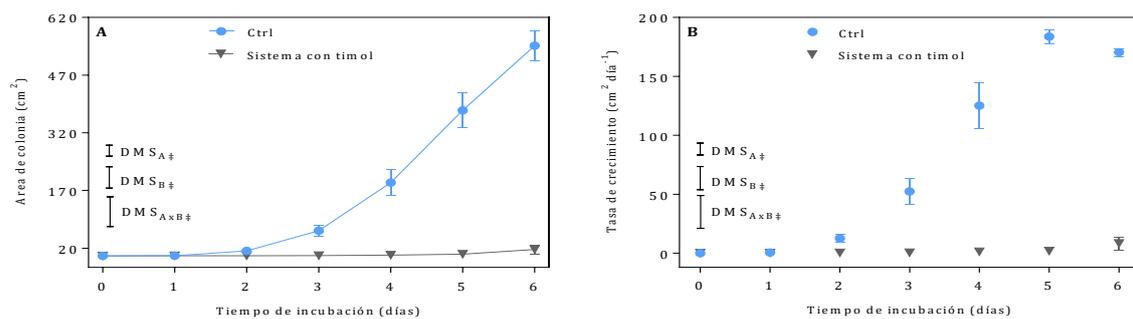


Figura 1. Crecimiento micelial (A) y tasa de crecimiento (B) de *Botrytis cinerea* en placas de PDA a 11 °C con o sin (Ctrl) sachet de timol. Cada punto es el promedio de 4 colonias y las líneas verticales son la desviación estándar. Las letras mayúsculas A y B denotan el sistema de envasado y el tiempo de incubación, respectivamente. DMS: Diferencia mínima significativa; ‡ significancia para $P \leq 0,001$.

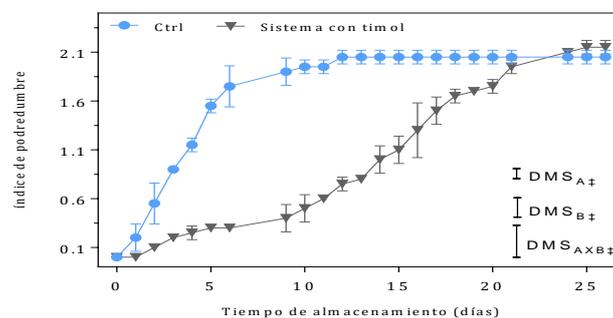


Figura 2. Índice y severidad de podredumbre en tomate *cherry* inoculado con *Botrytis cinerea* y conservado a 11 °C con y sin (Ctrl) sachet de liberación de timol. Las líneas verticales indican la desviación estándar ($n=3$). Las letras mayúsculas (subíndices) A y B denotan el sistema de envasado y el tiempo de almacenamiento, respectivamente. DMS: Diferencia mínima significativa; ‡ significancia para $P \leq 0,001$.