

Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens

Evaluación de nanoformulaciones en el desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos

Zormy Nacary Correa-Pacheco, CONACYT-Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yauatepec-Jojutla, Km. 6.8, San Isidro, CEPROBI 8, Yauatepec, C.P. 62731, Morelos. México; **Silvia Bautista-Baños***, **Mónica Hernández-López**, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6.8, San Isidro, CEPROBI 8, Yauatepec, C.P. 62731, Morelos. México; **Miguel Ángel Marquina-Valle**, Instituto Tecnológico de Zacatepec. Calzada Tecnológico 27, Plan de Ayala, Zacatepec de Hidalgo, C.P. 62780, Morelos. México. *Autor para correspondencia: sbautis@ipn.mx.

Recibido: 13 de Marzo, 2018.

Aceptado: 19 de Agosto, 2018.

Correa-Pacheco ZC, Bautista-Baños S, Hernández-López M, Marquina-Valle MA. 2018. Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Fito patología* 36(3): 457-467.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-2

Primera publicación DOI: 04 de Septiembre, 2018.
First DOI publication: September 04, 2018.

Resumen. En el control de microorganismos fitopatógenos, existen nuevas propuestas de nanomateriales que incluyen aquellas con quitosano y aceites esenciales, los cuales pueden aplicarse solo o en nanoformulaciones. Seis aislamientos fúngicos se sometieron a diferentes tratamientos para evaluar su efecto en el crecimiento micelial y germinación de las esporas. Se observó una inhibición total (100%) en la mayoría de los hongos cuando se incubaron en medio nutritivo adicionado con nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tomillo al 5%; solamente o en cubiertas

Abstract. For controlling phytopathogenic microorganisms, there exist new proposals of nanomaterials including those from chitosan and essential oils, which may be applied alone or in coating nanoformulations. Six fungal isolates were subjected to different nanoparticles treatments in order to evaluate their effect on mycelial growth and spore germination. It was observed a total growth inhibition (100%) in most fungi when they were incubated on nutrient media amended with nanoparticles of chitosan loaded with thyme essential oil at 5%, applied either alone or in nanostructured coatings. As for the spore germination tests, a notable inhibition (50 % and 100%) was observed at 1% concentration of thyme essential oil depending on the isolate. When fungi were grown on individually treatments, germination was delayed by 6 h but completely stopped when incubated on coated nanoformulations. Compared to the lime essential oil, it was the thyme essential oil which provided a remarkable control of the tested fungi.

Key words: nanomaterials, chitosan, essential oils.

nanoestructuradas. Dependiendo del aislamiento, hubo una inhibición notable (50% y 100%) en la germinación con el aceite esencial de tomillo 1%. Cuando los hongos crecieron en los tratamientos individuales, la germinación se retrasó 6 h pero se inhibió completamente cuando se incubaron en las nanoformulaciones. Comparado con el aceite esencial de limón, fue el aceite esencial de tomillo el que proporcionó un control remarcable en los hongos evaluados.

Palabras clave: nanomateriales, quitosano, aceites esenciales.

Como agentes antimicrobiales, actuando de manera individual o combinada, el quitosano y los aceites esenciales (AE) han demostrado su capacidad fungicida contra varios hongos poscosecha (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014). Como otra medida de control alternativa, la nanotecnología ha abierto nuevos caminos por medio del uso de nanopartículas, ya que debido a su gran área superficial relativa a la masa, pueden ser altamente reactivas. Según Foladori (2009), la fuerza de la nanotecnología reside principalmente en hacer productos más eficientes y multifuncionales, ahorrando así materias primas. Las nanopartículas de quitosano, ya sea de forma individual o en combinación con otros compuestos, pueden integrarse en cubiertas que pueden contener compuestos antimicrobiales tales como los AE (Sotelo *et al.*, 2015; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017). En estudios anteriores, Saharan *et al.* (2013) reportaron un mejor efecto inhibitorio al aplicar nanopartículas de quitosano a una concentración de 0.1% en *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*. Yien *et al.* (2012) también reportaron un efecto inhibitorio en *Fusarium solani*, con las nanopartículas de quitosano de peso molecular bajo y alto en

As antimicrobial agents, acting individually or combined, chitosan and essential oils (EO) have demonstrated their fungicidal performance against various postharvest fungi (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014). As another alternative control measure, nanotechnology has opened new avenues through the use of nanoparticles that due to their large surface area relative to the mass, they can be highly reactive. According to Foladori (2009) the strength of nanotechnology lies mainly in making more efficient and multifunctional products, thereby saving raw materials. Chitosan nanoparticles individually or in combinations with other compounds, eventually can be integrated into coating formulations that may contain antimicrobial compounds such as EO (Sotelo *et al.*, 2015; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017). In previous studies, Saharan *et al.* (2013) reported a better inhibitory effect by applying the chitosan nanoparticles at concentration of 0.1%, on *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. Yien *et al.* (2012) also reported an inhibitory effect for the low and high molecular weight chitosan nanoparticles in a range of minimum concentrations from 0.86-1.2 mg mL⁻¹ and 0.5-1.2 mg mL⁻¹, respectively on *Fusarium solani*, while Beyki *et al.* (2014) conducted a study on the effect against *Aspergillus flavus* using an 800 ppm concentration of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil encapsulated in chitosan nanogels with cinnamic acid. The aim of this research was to evaluate the fungal growth of various pathogenic fungi treated with chitosan nanoparticles, based chitosan-essential oil nanoparticles and chitosan-essential oil coating nanoformulations.

The studied isolates were *A. alternata* obtained from infected figs, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. fragariae* from fruit of papaya and soursop and custard apple, respectively, and *Rhizopus stolonifer* from papaya and strawberry. The lime and

un rango de concentraciones mínimas de 0.86-1.2 mg mL⁻¹ y 0.5-1.2 mg mL⁻¹, respectivamente, mientras que, Beyki *et al.* (2014) estudiaron el efecto contra *Aspergillus flavus* mediante la aplicación de una concentración de 800 ppm de aceite esencial de menta piperita (*Mentha piperita*) encapsulado en nanogeles de quitosano con ácido cinámico. El objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento fúngico de varios hongos patógenos tratados con nanopartículas de quitosano, nanopartículas de quitosano-aceite esencial y cubiertas nanoformuladas de quitosano-aceite esencial.

Los aislados evaluados fueron: *A. alternata*, que se obtuvo de de higos infectados, *Colletotrichum gloeosporioides* de papaya y guanábana, *C. fragariae* de chirimoya y *Rhizopus stolonifer* de papaya y fresa. Los aceites esenciales de limón y tomillo se obtuvieron de Essential Oils-Essencefleur (grado terapéutico) y el aceite de canola, de una marca registrada. El quitosano (peso molecular medio, desacetilación = 89%) se obtuvo de Sigma-Aldrich. Las nanopartículas de quitosano y de limón y tomillo se sintetizaron de la siguiente manera: soluciones de quitosano a concentraciones de 0.05% (w/v) se disolvieron en ácido acético glacial (1% v/v) (Fermont Chemicals Inc.) y agua destilada. Se agregaron 2.5 mL de la solución de quitosano al limón y tomillo en concentraciones de 1, 3, 5% (w/v) previamente disueltos en etanol (40 mL) (Fermont Chemicals Inc.) usando una bomba peristáltica (Bio-Rad, EP-1 Econo Pump) y revolviendo de manera moderada. La solución obtenida se colocó en un evaporador giratorio (Rotary Evaporator RE 300, BM 500 Water Bath, Yamato CF 300) a 40 °C y 50 rpm. El volumen final de nanopartículas fue de 2 mL. Los tratamientos independientes fueron: nanopartículas de quitosano al 0.05% (ChNp 0.05%), nanopartículas de quitosano y aceite esencial de limón al 1%, (Ch-LEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) y 5% Ch-LEO-Np 5%), nano-

white thyme essential oils were supplied by Essential Oils-Essencefleur (therapeutic degree) and canola oil from a trademark. Chitosan (Medium molecular weight, deacetylation = 89%) was obtained from Sigma-Aldrich. Chitosan and lime and thyme essential oils nanoparticles, were synthesized as follows: chitosan solutions at concentrations of 0.05% (w/v) were dissolved in glacial acetic acid (1% v/v) (Fermont Chemicals Inc.) and distilled water. 2.5 mL of chitosan solution was added to lime and thyme at concentrations of 1, 3, 5 % (w/v) previously dissolved in methanol (40 mL) (Fermont Chemicals Inc.) by using a peristaltic pump (Bio-Rad, EP-1 Econo Pump) under moderate stirring. The obtained solution was placed in a rotary evaporator (Rotary Evaporator RE 300, BM 500 Water Bath, Yamato CF 300) at 40 °C and 50 rpm. The final volume of nanoparticles was 2 mL. The independent treatments were: chitosan nanoparticles at 0.05% (ChNp 0.05%), chitosan-lime essential oil nanoparticles at 1%, (Ch-LEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) and 5% Ch-LEO-Np 5%), chitosan-thyme essential oil nanoparticles at 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) and 5% (Ch-TEO-Np 5%), and controls [control-Potato Dextrose Agar (C-PDA) and methanol (Meth) and canola oil at 0.1 % (CO 0.1 %)]. The nanostructured coatings were: 98.6% chitosan + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1), 89.6% chitosan + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2), 49.6% chitosan + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3), 46.6% chitosan + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4), 44.6% chitosan + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) and control-PDA (COAT6) (Correa-Pacheco *et al.*, 2017). All formulations contained glycerol at 0.3% (J.T.Baker®) and canola oil at 0.1%. Treatments (0.5 ml) were uniformly dispersed in the PDA culture medium. Disks of 5 mm in diameter of each strain (4-14 days old) were placed separately in the center of the Petri dishes containing the treatment and incubated at 20-25 °C

partículas de quitosano y aceite esencial de tomillo al 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) y 5% (Ch-TEO-Np 5%), y controles [control-Papa Dextrosa Agar (C-PDA) y metanol (Meth) y aceite de canola al 0.1 % (CO 0.1 %)]. Las cubiertas nanoestructuradas consistieron en: 98.6% quitosano + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1), 89.6% quitosano + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2), 49.6% quitosano + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3), 46.6% quitosano + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4), 44.6% quitosano + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) y control-PDA (COAT6) (Correa-Pacheco *et al.*, 2017). Todas las formulaciones contenían glicerol al 0.3% (J.T.Baker®) y aceite de canola al 0.1%. Los tratamientos (0.5 ml) se esparcieron de manera uniforme en el medio de cultivo PDA. Discos de 5 mm de diámetro de cada aislado (4-14 días de edad) se colocaron por separado en el centro de las placas de Petri con el tratamiento y se incubaron a 20-25 °C, hasta que los hongos alcanzaron su desarrollo máximo (4-14 días). El crecimiento micelial radial de los hongos se midió (cm) en 5 placas Petri (8 cm de diámetro) por tratamiento al final del periodo de incubación, con un calibrador vernier Truper, que fue de 14 días para *A. alternata*, 10 para las especies de *Colletotrichum* y cuatro para *R. stolonifer*. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Se llevó a cabo un experimento adicional para evaluar el proceso de germinación durante periodos de incubación de 0, 6, 8 y 10 h. Para esto se colocaron alícuotas de esporas de 30 ml de una concentración de 10^5 en 6 discos de PDA con el tratamiento individual o con las formulación de las cubiertas. La germinación se detuvo cuando se adicionó lactofenol-safranina. Las observaciones se llevaron a cabo con el uso de un microscopio óptico Nikon ALPHAPHOT-2YS2-H con un lente 40X. Los datos para cada periodo de incubación se expresaron como porcentaje de germinación. Los tratamientos se arreglaron

until fungi reached its maximum development (4-14 days). Radial mycelial growth of the fungi was measured (cm) in 5 Petri dishes (8 cm of diameter) per treatment at the end of incubation period, with a Truper vernier caliper, which was 14 days for *A. alternata*, 10 for all *Colletotrichum* species and four days for *R. stolonifer*. The results were expressed as percentage inhibition of mycelial growth. An additional experiment was carried out to evaluate the germination process during a given 0, 6, 8 and 10 h incubation periods. For this, spore aliquots of 30 ml of a 10^5 concentration were placed onto 6 PDA discs containing the individual treatment or the coating formulation. Germination was stopped by adding lactophenol-safranin. Observations were carried out using a Nikon ALPHAPHOT-2YS2-H optical microscope with a 40X objective. Data for each incubation period was expressed as percentage germination. Treatments were arranged in a completely randomized design. Mean and standard deviations were also calculated. Data of the final mycelial growth and germination were subjected to ANOVA and means comparison by Tukey test at $p \leq 0.05$ at the end of the incubation period. For both variables, the square root transformation was carried out to fulfil the ANOVA assumptions of homogeneity and data normal distribution. The statistical software used was Sigmaplot v.13.

The final mycelial inhibition and germination showed significant differences ($p \leq 0.05$) among individual treatments and nanoformulations. Overall, the isolates response, showed growth differences and spore survival according to the treatment applied and isolate. In this study, in all tested fungi, mycelial growth was considerably affected by the application of chitosan-thyme essential oil nanoparticles at 1, 3 and 5 % (Ch-TEO-Np 1%, Ch-TEO-Np 3% and Ch-TEO-Np 5%). In addition, at the last two concentrations; 3% and 5%, inhibition reached 100% and therefore, there were no spore

en un diseño completamente aleatorio. También se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Los datos del crecimiento micelial y germinación finales se sometieron a un ANOVA y la prueba Tukey de comparación de medias a $p \leq 0.05$, al final del periodo de incubación. Para ambas variables, se realizó una transformación de la raíz cuadrada para cumplir las suposiciones del ANOVA de homogeneidad y distribución normal de los datos. El software estadístico que se utilizó fue Sigmaplot v.13.

La inhibición micelial final y la germinación presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos individuales y las nanoformulaciones. En general, la respuesta de los aislados presentaron diferencias en el crecimiento y la sobrevivencia de las esporas, según el tratamiento aplicado y el aislado. En este estudio, en todos los hongos estudiados, el crecimiento micelial se afectó de forma considerable por la aplicación de nanopartículas de quitosano-aceite esencial de tomillo al 1, 3 y 5 % (Ch-TEO-Np 1%, Ch-TEO-Np 3% and Ch-TEO-Np 5%). Además, en las últimas dos concentraciones, 3% y 5%, la inhibición alcanzó el 100% y por lo tanto, no hubo formación de esporas (Cuadro 1). En cuanto a las cubiertas nanoestructuradas, la inhibición del crecimiento micelial en todos los aislados fue evidente en aquellos tratamientos en los que el porcentaje de nanopartículas de quitosano-aceite esencial 5%, aumentó en 50, 53 y 55% (COAT3, COAT4 y COAT5). En general, a medida que el aceite esencial de tomillo aumentó, la inhibición fúngica se incrementó, siendo más sensibles aquellos tratados con COAT3 en *C. fragariae*, seguido por ambos aislados de *R. stolonifer* (Cuadro 2). Para todos los aislados, se observó que el número de esporas germinadas aumentó con el tiempo de incubación. Con respecto a los aislados no tratados, no existió un patrón definido con los tratamientos restantes. Sin embargo, en *C. fragariae* el proceso de germinación se retrasó hasta la

formación (Table 1). As for the tested nanostructured coatings, mycelial growth inhibition in all isolates was evident in those where the percentage of nanoparticles of chitosan-thyme essential oil 5%, increased by 50, 53 and 55% (COAT3, COAT4 and COAT5). Overall as the thyme essential oil increased, the fungal inhibition increased, being the most sensitive those treated with COAT3 on *C. fragariae*, followed by both isolates of *R. stolonifer*. (Table 2). For all isolates, it was observed that the number of germinated spores increased as the incubation time increased. With respect to the untreated isolates, there was not a defined pattern with the remaining treatments. However, in *C. fragariae* the process of germination was able to be delayed until the 6th h of incubation in most treatments (Figure 1). For *C. gloeosporioides* (soursop) and *R. stolonifer* (papaya) most treatments promoted their germination after 6 h of incubation. As for the nanostructured coatings, at the highest percentage of nanoparticles (55%), a total inhibition was obtained in the isolates *A. alternata*, both *C. gloeosporioides* and *R. stolonifer* and *C. fragariae* during the whole 10 h incubation period (Figure 2).

In general, the results of our research coincide with those previously published by Zahid *et al.* (2013) and Correa-Pacheco *et al.* (2017) in which the effective control of *C. gloeosporioides* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and avocado (*Persea americana*) and treated with chitosan nanoemulsions resulted from the low molecular weight chitosan 1%, and nanostructured formulations chitosan-thyme essential oil 1-5 %, respectively, in terms of inhibition of mycelia and conidial germination of the fungus compared to the untreated control. In other research carried out by Khalili *et al.* (2015) it was demonstrated a better efficacy of thyme EO when encapsulated in chitosan and benzoic acid – made nanogels, in comparison with free thyme EO, against *A. flavus*. In those studies,

Cuadro 1. Resumen del efecto de nanopartículas de quitosano y nanopartículas de aceites esenciales sobre la inhibición micelial al final del periodo de incubación.

Table 1. Summary of the effect of chitosan nanoparticles and chitosan-essential oils nanoparticles on mycelial inhibition at the end of the incubation period.

Individual treatments	Mycelial inhibition (%)					
	<i>A. alternata</i> (fig)	<i>C. gloeosporioides</i> (papaya)	<i>C. gloeosporioides</i> (soursop)	<i>C. fragariae</i> (custard apple)	<i>R. stolonifer</i> (papaya)	<i>R. stolonifer</i> (strawberry)
ChNp 0.05%	0 ^{a*}	0 ^{a*}	0 ^{a*}	1.6 ^{a*}	0 ^{a*}	0 ^{a*}
Ch-LEO-Np 1%	0 ^a	24.5 ^c	0 ^a	1.6 ^a	0 ^a	0 ^a
Ch-LEO-Np 3%	0 ^a	28.1 ^c	0 ^a	3.4 ^b	0 ^a	0 ^a
Ch-LEO-Np 5%	2.4 ^a	50.0 ^d	10.8 ^b	6.5 ^b	33.5 ^b	2.4 ^a
Ch-TEO-Np 1%	40.3 ^b	45.3 ^d	54.4 ^c	52.7 ^c	74.0 ^c	71.7 ^c
Ch-TEO-Np 3%	100 ^e	100 ^e	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
Ch-TEO-Np 5%	100 ^e	100 ^e	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
C-PDA	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Meth	0 ^a	5.2 ^b	1.7 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CO 0.1%	0 ^a	35.6 ^{cd}	0 ^a	4.7 ^b	0 ^a	0 ^a

*Promedios seguidos de la misma letra no representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) determinadas por la prueba múltiple de Tukey. Valores p después de la transformación raíz cuadrada / *Means followed by the same letter are not significant different ($p \leq 0.05$) determined by Tukey's multiple test. p values after square root transformation.

Etiquetas de los tratamientos: Nanopartículas de quitosano 0.05% (ChNp 0.05%); nanopartículas de quitosano y aceite esencial de limón 1%, (Ch-LEO-Np 1%); 3% (Ch-LEO-Np 3%), 5% (Ch-LEO-Np 5%); nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-TEO-Np 3%), 5% (Ch-TEO-Np 5%); Control-Papa-Dextrosa-Agar (C-PDA); metanol (Meth) y aceite de canola 0.1% (CO 0.1%) / Treatment labels: Chitosan nanoparticles 0.05% (ChNp 0.05%); Chitosan-lime essential oil nanoparticles 1%, (Ch-LEO-Np 1%); 3% (Ch-LEO-Np 3%), 5% (Ch-LEO-Np 5%); Chitosan-thyme essential oil nanoparticles 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-TEO-Np 3%), 5% (Ch-TEO-Np 5%); Control-Potato-Dextrose-Agar (C-PDA); methanol (Meth) and canola oil 0.1% (CO 0.1%).

Cuadro 2. Resumen del efecto de las cubiertas nanoestructuradas a base de quitosano-aceites esenciales, sobre la inhibición micelial al final del periodo de incubación.

Table 2. Summary of the effect of coating nanoformulations based on chitosan-essential oils on mycelial inhibition at the end of the incubation period

Treatments	Mycelial inhibition (%)					
	<i>A. alternata</i> (fig)	<i>C. gloeosporioides</i> (papaya)	<i>C. gloeosporioides</i> (soursop)	<i>C. fragariae</i> (custard apple)	<i>R. stolonifer</i> (papaya)	<i>R. stolonifer</i> (strawberry)
COAT1	0 ^{a*}	0 ^{a*}	0 ^{a*}	0 ^{a*}	0 ^{a*}	0 ^{a*}
COAT2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
COAT3	19.2 ^b	17.7 ^b	30.0 ^b	85.0 ^b	72.5 ^b	62.0 ^b
COAT4	70.2 ^c	65.0 ^c	92.0 ^c	100 ^c	100 ^c	62.4 ^b
COAT5	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^c	100 ^c	100 ^c
COAT6	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

* Promedios seguidos de la misma letra no representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) determinadas por la prueba múltiple de Tukey. Valores p después de la transformación raíz cuadrada / *Means followed by the same letter are not significant different ($p \leq 0.05$) determined by Tukey's multiple test. p values after square root transform.

Etiquetas de los tratamientos: 98.6% quitosano + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1); 89.6% quitosano + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2); 49.6% quitosano + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3); 46.6% quitosano + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4); 44.6% quitosano + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) y control (COAT6) / Treatment labels: 98.6% chitosan + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1); 89.6% chitosan + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2); 49.6% chitosan + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3); 46.6% chitosan + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4); 44.6% chitosan + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) and control (COAT6).

6^o hora de incubación en la mayoría de los tratamientos (Figura 1). Para *C. gloeosporioides* (guanábana) y *R. stolonifer* (papaya) la mayoría de los tratamientos promovieron su germinación después de 6 h de incubación. Con respecto a las cubiertas nanoestructuradas, en el más alto porcentaje de nanopartículas (55%), se obtuvo una inhibición total en los aislados de *A. alternata*, en ambos aislados de *C. gloeosporioides*, así como en *R. stolonifer* y *C. fragariae* durante las 10 h de incubación (Figura 2).

En general, los resultados de nuestra investigación coinciden con lo que anteriormente publicó Zahid *et al.* (2013) y Correa-Pacheco *et al.* (2017), donde el control efectivo de *C. gloeosporioides* aislado de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) y aguacate (*Persea americana*), tratado con nanoemulsiones de quitosano, preparadas con quitosano de bajo peso molecular al 1%, y formulaciones nanoestructuradas de quitosano-aceite esencial de tomillo al 1-5%, respectivamente, en términos de inhibición micelial y germinación conidial del hongo, en comparación con el control sin tratamiento. En otra investigación llevada a cabo por Khalili *et al.* (2015), se demostró una mayor eficacia del AE de tomillo encapsulado en quitosano y ácido benzoico convertido en nanogeles, en comparación con el AE de tomillo contra *A. flavus*. En dichos estudios, la mejor concentración fungicida de 300 mg L⁻¹ bajo condiciones herméticas, fue suficiente para inhibir de forma significativa el número de colonias fúngicas, mientras que a 700 mg L⁻¹, la vida de anaquel de los jitomates tratados se prolongó hasta un mes. En esta investigación, el principal efecto fungicida provino en su mayoría del AE de tomillo y su concentración. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores. Por ejemplo, Barrera-Necha *et al.* (2009) y Sellamuthu *et al.* (2013) expusieron la actividad antifúngica del AE de tomillo *in vitro* y en la fruta del aguacate contra *C. gloeosporioides*. En otros reportes, también se reportó un notable efecto

the best fungicidal concentration of 300 mg L⁻¹ under sealed conditions was enough to inhibit significantly the number of fungal colonies, while at 700 mg L⁻¹, the shelf life of the treated tomatoes was extended up to one month. In this research, the major fungicidal effect seems to be mostly from the thyme essential oil and its concentration, results that agree with various other researchers. For example, Barrera-Necha *et al.* (2009) and Sellamuthu *et al.* (2013) stated the antifungal activity of thyme EO *in vitro* and on avocado fruit against *C. gloeosporioides*. In other reports, a noticeable fungicidal effect was also reported on *A. flavus*, *A. alternata* and *F. oxysporum* with low concentrations (1.0-8-0 µg mL⁻¹) from two different species of the genus *Thymus*: *T. kotschyanus* and *T. daenensis* (Mohammadi *et al.*, 2014) while the minimal concentration of 62.5 µg mL⁻¹ was exhibited on *A. flavus* to avoid spore germination with this same EO species (Pekmezovik *et al.*, 2015). The above finding results clearly state the traditional results of the thyme EO either alone or incorporated with other substances; however, a problem for most EO and their respective major compounds is their high volatility when applied alone. As stated by Correa-Pacheco *et al.* (2017) 'to overcome the volatility aspect of EO, the incorporation of nanomaterials and antimicrobials, including EO into edible coatings will give new properties to the nanostructured coating, in addition, their synergistic effects can improve'.

The development of new fungi-control treatments with environmentally friendly compounds by employing nanotechnology can offer effective and more reliable means for controlling microorganism. In this research chitosan-thyme EO nanoparticles at the highest concentrations (5%), tested either independently or integrated in a formulation (50, 53 and 55 %) gave a notable *in vitro* growth control on the evaluated fungi, but it is necessary to study their effects of *in situ* control assessments.

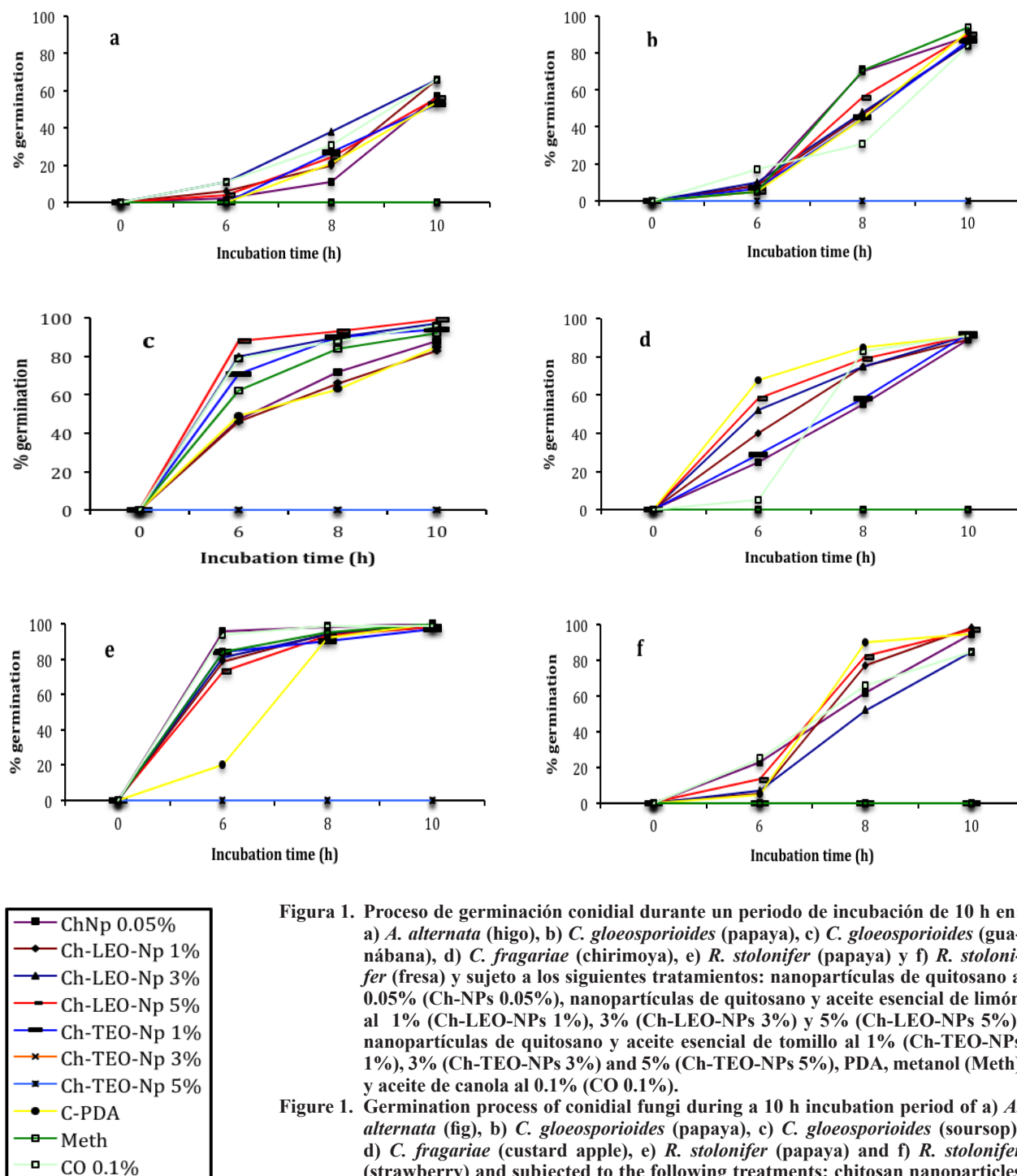


Figura 1. Proceso de germinación conidial durante un periodo de incubación de 10 h en: a) *A. alternata* (higo), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (guanábana), d) *C. fragariae* (chirimoya), e) *R. stolonifer* (papaya) y f) *R. stolonifer* (fresa) y sujeto a los siguientes tratamientos: nanopartículas de quitosano a 0.05% (Ch-NPs 0.05%), nanopartículas de quitosano y aceite esencial de limón al 1% (Ch-LEO-NPs 1%), 3% (Ch-LEO-NPs 3%) y 5% (Ch-LEO-NPs 5%), nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo al 1% (Ch-TEO-NPs 1%), 3% (Ch-TEO-NPs 3%) and 5% (Ch-TEO-NPs 5%), PDA, metanol (Meth) y aceite de canola al 0.1% (CO 0.1%).

Figure 1. Germination process of conidial fungi during a 10 h incubation period of a) *A. alternata* (fig), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (soursoop), d) *C. fragariae* (custard apple), e) *R. stolonifer* (papaya) and f) *R. stolonifer* (strawberry) and subjected to the following treatments: chitosan nanoparticles at 0.05% (Ch-NPs 0.05%), chitosan-lime essential oil nanoparticles at 1% (Ch-LEO-NPs 1%), 3% (Ch-LEO-NPs 3%) and 5% (Ch-LEO-NPs 5%), chitosan-thyme essential oil nanoparticles at 1% (Ch-TEO-NPs 1%), 3% (Ch-TEO-NPs 3%) and 5% (Ch-TEO-NPs 5%), PDA, methanol (Meth) and canola oil at 0.1% (CO 0.1%).

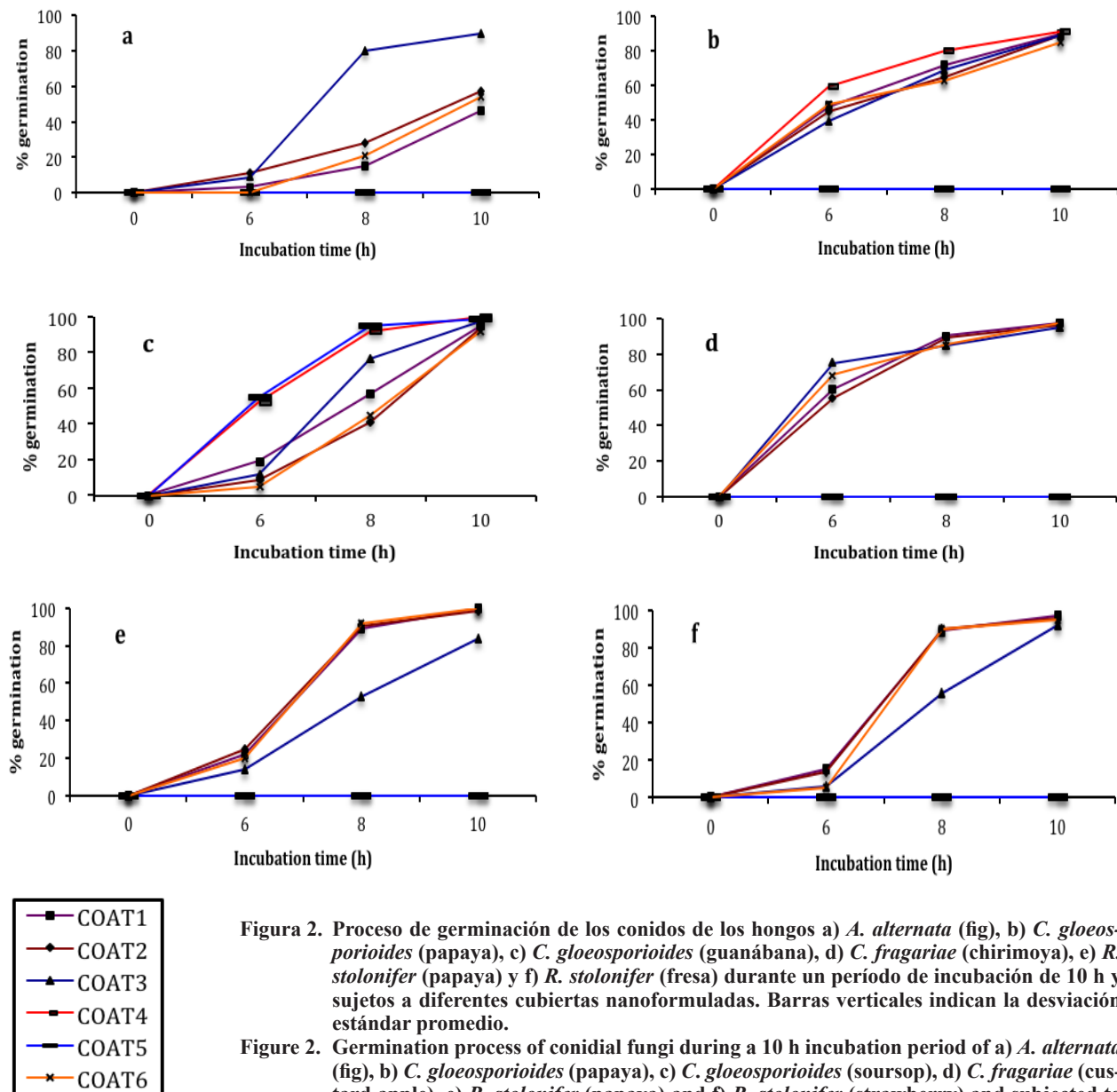


Figura 2. Proceso de germinación de los conidios de los hongos a) *A. alternata* (fig), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (guanábana), d) *C. fragariae* (chirimoya), e) *R. stolonifer* (papaya) y f) *R. stolonifer* (fresa) durante un periodo de incubación de 10 h y sujetos a diferentes cubiertas nanoformuladas. Barras verticales indican la desviación estándar promedio.

Figure 2. Germination process of conidial fungi during a 10 h incubation period of a) *A. alternata* (fig), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (soursop), d) *C. fragariae* (custard apple), e) *R. stolonifer* (papaya) and f) *R. stolonifer* (strawberry) and subjected to different coating nanoformulations. Vertical bars indicate mean standard deviations.

antifúngico en *A. flavus*, *A. alternata* y *F. oxysporum* con bajas concentraciones ($1.0-8-0 \mu\text{g mL}^{-1}$) de dos diferentes especies del género *Thymus*: *T. kotschyanus* y *T. daenensis* (Mohammadi *et al.*, 2014) mientras que, la concentración mínima de $62.5 \mu\text{g}$

~~~~~ End of the English version ~~~~~

mL<sup>-1</sup> se presentó en *A. flavus* para evitar la germinación de esporas con estas mismas especies de AE (Pekmezovic *et al.*, 2015). Los resultados de las investigaciones anteriores demuestran con claridad los resultados tradicionales del AE de tomillo, ya sea solo o incorporado en otras sustancias; sin embargo, un problema para la mayoría de los AE y sus principales componentes respectivos, es su alta volatilidad al ser aplicados solos. Como expusieron Correa-Pacheco *et al.* (2017) 'para superar el aspecto de volatilidad de los AE, la incorporación de nanomateriales y antimicrobiales incluyendo los AE en cubiertas comestibles, dará nuevas propiedades a la cubierta nanoestructurada, además, de que sus efectos sinérgicos pueden mejorar'.

El desarrollo de nuevos tratamientos para el control de hongos con compuestos amigables con el ambiente mediante el uso de la nanotecnología puede ofrecer medios efectivos y más confiables para el control de microorganismos. En esta investigación, las nanopartículas de quitosano-AE de tomillo en las más altas concentraciones (5%), probadas, individualmente o integradas en una formulación (50, 53 o 55 %), presentaron un control notable en el crecimiento *in vitro* sobre los hongos evaluados, aunque aún es necesario estudiar sus efectos *in situ*.

## LITERATURA CITADA

- Barrera-Necha LL, Garduño-Pizaña G and García-Barrera J. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hensen. *Plant Pathology Journal* 8:17-21. Disponible en línea: <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/ppj/2009/17-21.pdf>
- Beyki M, Zhavesh S, Khalili TS, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Mansour B, Bayat Tabatabaei M and Mohsenifar A. 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 54:310-319. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
- Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Marquina-Valle MA and Hernández-López M. 2017. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* and on cv Hass and fruit quality. *Journal of Phytopathology* 165:297-305. DOI: 10.1111/jph.12562
- Foladori G. 2009. La gobernanza de las nanotecnologías. *Sociológica* 24:125-153. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-01732009000300006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-01732009000300006)
- Khalili ST, Mohsenifar A, Beyki M, Zhavesh S, Rahmani-Cherati T, Abdollahi A, Bayat M and Tabatabaei M. (2015) Encapsulation of *Thyme essential* oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT-Food Science and Technology* 60:502-508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>
- Mohammadi A, Nazari H, Imani S and Amrollahi H. 2014. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants *Activite's antifongiques et composition chimique de quelques plantes médicinales*. *Journal of Mycologie Médicale* 24:e1-e8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.02.006>
- Pekmezovic M, Rajkovic K, Barac A, Senerovic' L and Arsic Arsenijevic V. 2015. Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal* 99:131-137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.024>
- Saharan V1, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS and Pal A. 2013. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their *in vitro* evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules* 62:677-683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- Sellamuthu P, Sivakumar D and Soundy P. 2013. Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. *Journal of Food Safety* 33:86-93. DOI: 10.1111/jfs.12026
- Sivakumar D and Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* 64:27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sotelo BME, Bautista BS, Aldana LL, Solorza FJ, Jiménez AA, Barrera NLL, Valverde AG y Plascencia JM. 2015. La nanotecnología en el control de microorganismos patógenos e insectos de importancia económica. *In: C. Laréz VC, Koteich KS y López GF eds. Nanotecnología: fundamentos y aplicaciones*. Comisión de Publicaciones del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Caracas Venezuela 307-321.
- Sotelo-Boyás M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Gómez and Gómez Y. 2017. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* 103:409-414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063>

- Yien L, Mohammad N, Sarwar A and Katas H. 2012. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials* 2012:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/632698>
- Zahid N, Alderson P, Ali A, Maqbool M and Manickam S. 2013. In vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides* by using chitosan loaded nanoemulsions. *Acta Horticulturae* 1012:769-774. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.1012.104