

Evaluación de la capacidad antifúngica del salvado de arroz fermentado para la bioconservación de tomates

Noelia Belén Segovia Barrios

noesegovia1223@gmail.com

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències del'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, Universitat de Valencia, Facultat de Farmàcia.

Resumen

Los tomates constituyen uno de los vegetales más consumidos a nivel mundial y resultan ser altamente perecederos debido a su alta actividad de agua que los vuelve propensos al deterioro por agentes alterantes. Esto se traduce en pérdidas económicas importantes para la industria, teniendo como resultado la necesidad del empleo de conservantes químicos que a largo plazo pueden traer consigo efectos perjudiciales en la salud. Por tanto, existe una creciente demanda de aplicaciones novedosas de bioconservantes como sustituto de los pesticidas y agroquímicos clásicos en alimentos, más aún desde la existencia de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) propuestos por las Naciones Unidas (UN). Asimismo, existe un especial interés por las empresas en revalorizar y aprovechar los subproductos que abundan en la industria agroalimentaria, como el salvado de arroz, al ser este cereal uno de los más producidos y consumidos en el mundo, para fomentar así la economía circular.

En este estudio se evaluaron medios a base de salvado de arroz fermentados por bacterias ácido lácticas (BAL), en específico por una cepa de *Lactobacillus plantarum* (L. plantarum), para detectar su actividad antifúngica contra las especies que más afectan al cultivo de tomate y su almacenamiento luego de la cosecha. Se identificó y cuantificó los compuestos potencialmente responsables de esta característica, tales como ácidos orgánicos y compuestos fenólicos de los medios adicionados de diferentes concentraciones de salvado. Luego se comparó la inhibición producida por cada medio fermentado frente a los agentes fúngicos y posteriormente se aplicó el más eficiente en tomate cherry y se analizó su desempeño.

Como resultado, se obtuvo la prolongación de la vida útil del fruto con el tratamiento adicionado de salvado de arroz al 1 %, evidenciando una diferencia significativa respecto del control, proponiendo a este subproducto utilizado de sustrato para la fermentación por BAL como un potencial bioconservante exitoso para el futuro de la industria alimentaria.

Palabras clave Tomate, salvado de arroz, bacterias ácido lácticas, fermentación, bioconservación.

Abstract

Tomatoes are one of the most consumed vegetables worldwide and are highly perishable due to their high water activity that makes them prone to deterioration by altering agents. This translates into significant economic losses for the industry, resulting in the need for the use of chemical preservatives that in the long run can bring harmful effects on health. Therefore, there is a growing demand for novel applications of bioconservants as a substitute for classic pesticides and agrochemicals in food, even more since the existence of the Sustainable Development Goals (SDGs) proposed by the United Nations (UN). There is also a special interest in companies to revalue and take advantage of the byproducts that abound in the agrifood industry, such as rice bran, as this cereal is one of the most produced and consumed in the world, to promote the circular economy.

This study evaluated means based on rice bran fermented by lactic acid bacteria (BAL), specifically by a strain of *Lactobacillus plantarum* (L. plantarum), to detect its antifungal activity against the species that most affect tomato cultivation and storage after harvest. The compounds potentially responsible for this characteristic, such as organic acids and phenolic compounds of the added media of different bran concentrations, were identified and quantified. Then we compared the inhibition produced by each fermented medium against the fungal agents and then applied the most efficient in cherry tomato and analyzed its performance.

As a result, the fruit's shelf life was extended with the addition of 1 % rice bran treatment, showing a significant difference from the control, proposing this substrate byproduct used for fermentation by BAL as a successful bioconservative potential for the future of the food industry.

Keywords Tomato, rice bran, lactic acid bacteria, fermentation, bioconservation.

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo muy importante a nivel mundial, debido a su alto valor nutricional y demanda, por tanto, su producción ha ido en aumento en los últimos años, encontrándose distribuida

en gran parte del mundo (Salas Gómez et al., 2022). Este es un fruto climatérico, es decir, que tiene tendencia a producir etileno luego de la cosecha, lo que lo hace susceptible a procesos de maduración acelerados, que conlleva a mayor deterioro y pudrición, acortando su vida útil (Otero García, 2022). Es altamente perecedero debido a su alta tasa respiratoria y sensibilidad a la deshidratación de las cuales son responsables las características de su piel y su porcentaje de agua que oscila un 94 % del total del mismo (Escalona Contreras et al., 2019). Además, es muy susceptible al ataque de insectos, hongos, bacterias y demás causales de enfermedades durante todas sus fases, desde la siembra hasta la comercialización, lo que grandes impactos económicos y sociales (López Malo, 2020).

Los hongos juegan un papel importante en el deterioro de estos frutos y se estima que entre un 5 y 10 % de la producción mundial de alimentos se pierde por contaminación fúngica. Además, algunas especies de hongos producen micotoxinas, las cuales son productos químicos altamente tóxicos resultantes del metabolismo secundario de hongos filamentosos. Estas sustancias poseen propiedades dañinas que incluyen efectos cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, neurotóxicos e inmunosupresores, incluso cuando se ingieren en bajas concentraciones (Guimaraes et al., 2018). Según Ramírez Cariño et al., (2020), los géneros mayormente implicados en la contaminación de tomates son *Alternaria alternata* (*A. alternata*), *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*) y *Aspergillus niger* (*A. niger*).

Las prácticas agroindustriales actuales utilizan mayoritariamente métodos químicos para el control de especies fúngicas en tomates, cuyo uso intensivo ha causado una grave amenaza al medio ambiente debido a los efectos asociados a la utilización de fungicidas, como la contaminación del agua, el deterioro del suelo y la devastación de microorganismos benéficos. Por tanto, es constante la búsqueda de métodos de bioconservación con efectos antifúngicos (Ramírez Cariño et al., 2020).

Por tal motivo, es importante la constante búsqueda e implementación de técnicas postcosecha que permitan aumentar la vida útil del producto garantizando su calidad (Otero García, 2022). Las mismas se encuentran orientadas a preservar la calidad e inocuidad, y a reducir las pérdidas de cultivos hortícolas entre la etapa de producción y el consumo, de esta manera se incrementa la disponibilidad de alimentos para la creciente población mundial. (Pilataxi Ramírez, 2019).

La bioconservación es el uso controlado de microorganismos y sus compuestos a fin de aumentar la vida útil, calidad y seguridad de los alimentos (Cortés Sánchez et al., 2018). La creciente demanda de productos 100 % orgánicos requiere que los fabricantes encuentren

alternativas naturales para reemplazar los ingredientes derivados químicamente.

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son consideradas tanto por la "Food and Drug Administration" como por la "European Food Safety Authority" como una opción apta y segura para utilizarse como conservantes naturales en alimentos, empleándose para controlar el crecimiento de hongos y su producción de toxinas (Sadiq et al., 2019). Estas logran combatir estos patógenos debido a la competencia por la supervivencia y la inhibición que ejercen a través de los productos finales de su fermentación, como ser ácido láctico y el ácido acético, el peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas, entre otros. A su vez, confieren al fruto propiedades antioxidantes y probióticas, aumentando su valor nutricional (Otero García, 2022).

Yilmaz et al., (2022) destacan que *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*), una BAL presente en una amplia variedad de hábitats incluida la microbiota humana, ha sido ampliamente utilizada en la producción de diversos alimentos fermentados como cultivo iniciador, dando sabor, textura y propiedades organolépticas a los productos, además de que podría producir sustancias bioactivas que ofrezcan a los alimentos la característica de funcionales y podría utilizarse como conservante de alimentos, debido a su alta y diversa producción de potentes bacteriocinas y ácidos orgánicos.

Cabe destacar que Dallagnol et al., (2019) refiere que esta especie demostró ser efectiva para inhibir el crecimiento de hongos de descomposición, aislados de pan contaminado y frutas cítricas comerciales, relacionándose el efecto antifúngico con la producción de ácidos láctico, acético y feniláctico. De esta manera, la BAL en cuestión podría suplantar los métodos físicos y químicos que intentan prevenir el crecimiento fúngico, a los cuales los hongos han adquirido resistencia, obteniendo así una reducción de compuestos químicos en los alimentos, dando como resultado productos naturales y saludables. Por todo ello, considerando la especial relevancia que cobra la innovación en bioconservación con base en la fermentación de BAL, se propone un spray con salvado de arroz fermentado por *L. plantarum* para aplicar en tomates cherrys, prolongando su vida útil, tomando en cuenta también los resultados prometedores que obtuvo Otero García (2022) en su investigación con el fermento por BAL de mostos de tuna como solución conservante en tomate riñón.

La utilización de salvado de arroz cobra relevancia debido a que el arroz es uno de los cereales más producidos en el mundo alcanzando la cantidad de 645 millones de toneladas anuales (Ferronato et al., 2021) y el mismo es consumido en su gran mayoría pulido, proceso en el que se retira el salvado, por lo que la disponibilidad del

salvado de arroz es muy elevada a nivel mundial, sin embargo, el aprovechamiento de este subproducto está limitado en general a la alimentación de animales de granja o es eliminado por incineración (Sánchez Quintero, 2021).

Por tal motivo y teniendo en cuenta que la población mundial aumenta constantemente dentro de un planeta con recursos finitos, se deben revalorizar y aprovechar al máximo los subproductos de la industria alimentaria mediante estrategias innovadoras, como la fermentación, a fin de promover un sistema alimentario sostenible, sustentable y circular.

El salvado de arroz resulta rico en fibra, lo cual lo convierte en un medio con alta viabilidad para el crecimiento probiótico. Además, Ferronato et al., (2021) en un estudio que realizaron para desarrollar un simbiótico liofilizado a base de salvado de arroz obtuvieron resultados que sugirieron que este último se mostró como un prebiótico potencial para la cepa *L. plantarum*, que podría estar relacionado al alto valor nutricional que posee este subproducto.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el potencial antifúngico del salvado de arroz fermentado por BAL con el fin de desarrollar un producto aplicable para la bioconservación de tomates.

Objetivos específicos

- Análisis de metabolitos antifúngicos, como ser ácidos orgánicos o ácidos fenólicos de los medios fermentados mediante una cepa de BAL.
- Evaluación de la actividad antifúngica y la producción de metabolitos de los medios in vitro y selección de un medio en base a las características mencionadas.
- Valoración del efecto de la aplicación del tratamiento para la bioconservación de tomate cherry.
- Determinación de la actividad antifúngica y antimicotoxigénica del tomate con la aplicación del tratamiento.

Materiales y métodos

Los hongos utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos a partir de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) situada en la Universidad de Valencia y de la ITEM Collection (ITEM) situado en el Instituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) y fueron *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), *A. niger*, *Aspergillus steynii* (*A. steynii*), *Penicillium commune* (*P. commune*), *Penicillium expansum* (*P. expansum*), *Penicillium verrucosum* (*P. verrucosum*), *Fusarium graminearum* (*F. graminearum*), *F. oxysporum*, *Fusarium verticilloides* (*F. verticilloides*) y *A. alternata*. La bacteria utilizada para la

fermentación de los medios fue *L. plantarum* FR45, la cual fue obtenida previamente por el grupo de investigación, habiendo sido seleccionada por su potencial antifúngico frente a hongos toxigénicos. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de estas bacterias fue MRS-Broth (Man Rogosa Sharpe-Broth). Los medios de cultivo utilizados para estos experimentos fueron el PDA (Potato Dextrose Agar) y el PDB (Potato Dextrose Broth).

Los alimentos utilizados consistieron en tomates cherrys y salvado de arroz, subproducto de la industria productora del arroz marca Dacsa, el cual constituyó el ingrediente principal utilizado para los medios de cultivo. A su vez, estos medios fueron adicionados de un suplemento bacteriano denominado Cultipliy.

Para llevar a cabo los diferentes métodos analíticos se utilizaron reactivos y patrones, los cuales son Carbonato sódico, Ácido gálico, Ácido láctico, todos de la marca SIGMA-ALDRICH (Dublín, Irlanda). Los disolventes utilizados en los métodos analíticos fueron Agua MilliQ, obtenida a partir del equipo de purificación ECOMATIC Wasserlab, Acetonitrilo de EMD Millipore Corporation (Alemania) y Metanol de SIGMA-ALDRICH (Dublín, Irlanda).

Se prepararon 4 medios de cultivo diferentes a base de salvado de arroz con adición de un suplemento para el crecimiento de bacterias lácticas. Los mismos fueron elaborados con un volumen de agua destilada de 1 L, a concentraciones crecientes de salvado de arroz: 1 %, 5 % y 10 % además de un medio control sin salvado. De cada medio preparado se realizó una réplica que no fue fermentada para evaluar la producción bacteriana de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Una vez elaborados, los medios fueron esterilizados en autoclave a 120 °C – 15 minutos. Además, se asignó un código a cada medio, el cual se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1 Codificación de los medios elaborados a base de salvado de arroz.

Código	Constituyentes
CUC	Cultipliy Control
CUF	Cultipliy Fermentado
SC1	Salvado Control al 1 %
SF1	Salvado Fermentado al 1 %
SC5	Salvado Control al 5 %
SF5	Salvado Fermentado al 5 %
SC10	Salvado Control al 10 %
SF10	Salvado Fermentado al 10 %

Los medios a base de salvado de arroz esterilizados fueron inoculados al 5 % con un cultivo en crecimiento exponencial de *L. plantarum* (12 horas a 37 °C) y fueron incubados a 37 °C durante 72 horas. Finalizada la fermentación, los medios fueron centrifugados a 4000 rpm 4 °C durante 15 minutos y luego los sobrenadantes fueron recogidos y guardados en congelación para posterior análisis.

Para la medición del pH se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante del medio fermentado y el control de todos los niveles de adición de salvado en falcons de 15 mL. Luego con un pH-metro de líquidos Sension+ PH3 con electrodo de alto rendimiento 5012 de Hach (Alemania) se obtuvieron las mediciones correspondientes directamente de cada falcon.

Se realizó la medición de los grados Brix para determinar el contenido de sólidos solubles a través del método refractométrico, utilizándose un refractómetro portátil de VWR (Pensilvania, Estados Unidos). Para ello, se centrifugaron las muestras y de cada sobrenadante, con ayuda de una pipeta de Pasteur, se tomaron un par de gotas que se colocaron directamente sobre el prisma de muestreo del refractómetro. Posteriormente se colocó la cubierta difusora, se ajustó el enfoque ocular y se realizó la observación para determinar la medida en cuestión (Otero García, 2022).

Para la determinación de ácidos láctico y acético, a partir de alícuotas de 0,5 mL del sobrenadante de los medios, se realizó una dilución 1/20 con agua MilliQ. Las diluciones fueron filtradas mediante filtro de 22 µm y vializadas para su inyección en HPLC-DAD. El sistema de LC utilizado para la determinación cromatográfica fue un Agilent 1200 (California, EE.UU.) equipado con un desgasificador de vacío, un automuestreador y una bomba binaria. La columna utilizada fue una Gemini C18 de 50 x 2 mm, 100 Å y tamaño de partícula de 3 µm (Phenomenex). Las fases móviles consistían en agua como disolvente A y ACN como disolvente B, ambos acidificados (ácido sulfúrico al 0,1 %). A su vez, se construyó paralelamente una recta de calibrado a partir de un patrón de ácido láctico y otra a partir de un patrón de ácido acético para la cuantificación.

Para la determinación de ácidos fenólicos, se purificó el sobrenadante de los medios fermentados mediante el método de QuEChERS para eliminar posibles interferencias antes del análisis cromatográfico. Para ello, se mezclaron 5 mL del sobrenadante con 5 mL de acetato de etilo al 1 % de ácido fórmico, 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl, y luego se agitó en vórtex durante 1 minuto. Posteriormente, el extracto se centrifugó y el sobrenadante se evaporó en un secador de nitrógeno.

Al momento del análisis cromatográfico, el extracto purificado se resuspendió en 1 mL de H₂O: ACN (90:10).

El análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando un Q-TOFMS (6.540 Agilent Ultra High Definition Accurate Mass), equipado con una interfaz de ionización negativa.

Se evaluó el potencial antifúngico de manera cualitativa in vitro empleando el método de difusión en agar, que consiste en un ensayo en el que se estudia la capacidad de un determinado compuesto de inhibir el crecimiento microbiano, en este caso fúngico, ya que se estudiaron los medios frente a 10 hongos, algunos de los cuales se mencionaron en la introducción y otros por ser alterantes alimenticios, que son: *A. flavus*, *A. niger*, *A. steynii*, *P. commune*, *P. expansum*, *P. verrucosum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticilloides* y *A. Alternata*.

Para la realización del ensayo, en primer lugar, se sembró cada hongo en una placa Petri de PDA en esterilidad. Posteriormente, utilizando puntas de micropipeta de 1 mL se perforó el agar y con una lanceta estéril se desprendió el fragmento de la placa. A continuación, se introdujeron 100 µL de CUF, SF1, SF5, SF10 y el control sin fermentar de cada uno en los pocillos creados para luego dejar incubar las placas a 25 °C durante 48 horas. Al momento de interpretar los resultados, se observó el halo de inhibición producido por los tratamientos alrededor del pocillo y en función del tamaño del radio se determinó el grado de actividad antifúngica.

Para la obtención del tratamiento bioactivo, se seleccionó y preparó el medio fermentado con mayor propiedad antifúngica según el test difusión en agar y se lo secó junto a su control sin fermentar utilizando un secador por pulverización. Una vez obtenido el tratamiento bioactivo a partir del medio de cultivo seleccionado, se procedió a su caracterización mediante distintos análisis.

Para la evaluación cuantitativa in vitro de la actividad antifúngica se utilizó el ensayo MIC-MFC, cuya finalidad es determinar la concentración mínima a la que un compuesto es capaz de inhibir el crecimiento fúngico luego de 72 horas de crecimiento (MIC) y la concentración mínima capaz de presentar actividad fungicida (MFC). Todo ello frente a una misma concentración de esporas.

Los pasos que se siguieron fueron los utilizados por Dopazo et al., (2022b) y en este caso se testeó el tratamiento seleccionado con su control sin fermentar frente a los mismos 10 hongos elegidos en la difusión agar. Primeramente, se realizó la MIC, y para comenzar se prepararon suspensiones de los hongos en agua estéril con reactivo tween al 0,1 %. Luego se resuspendieron esporas de los hongos cultivados en PDA en 5 mL de agua tween. Por consiguiente, se realizó un recuento del número de esporas utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó el volumen a 5 · 10⁴ esporas/mL.

A su vez, en una placa de 96 pocillos estéril, con ayuda de una pipeta multicanal, se añadieron 200 µL de PDB en

la primera columna de pocillos y 100 μ L en el resto de ellas. Tras esto, se añadieron 100 μ L de la muestra sin fermentar en los primeros 4 pocillos de la tercera columna y 100 μ L del fermentado en los 4 pocillos restantes de la misma, ya que la prueba se realizó por cuadruplicado. Luego se mezcló el contenido y se recogieron 100 μ L que se pasaron a la cuarta, en la cual se mezcló el contenido y se repitió el procedimiento sucesivamente hasta la doceava columna. Los 100 μ L cargados en la última columna fueron desechados y con ello se finalizaron las diluciones seriadas que van desde la columna 3 a la 12, donde la primera concentración es 125 g/L de tratamiento y las siguientes la mitad de concentración que su anterior. Finalmente, se alicuotaron 100 μ L de la suspensión de esporas en agua tween en todos los pocillos exceptuando los de la primera columna, ya que constituirá el control negativo y en teoría no debería haber crecimiento fúngico. La segunda columna sería el control positivo, debido a que no se aplica ningún tratamiento para inhibir el crecimiento fúngico.

En síntesis, se aplicó la misma concentración de esporas a una concentración decreciente del tratamiento fermentado y el sin fermentar para poder establecer a cuál de todas ellas comenzaba a verse inhibición en el crecimiento fúngico, al mismo tiempo que se estableció un control negativo y otro positivo para poder comparar los resultados. Las placas fueron llevadas a incubar durante 72 horas a 25 °C y se determinó la MIC, con el criterio de la concentración a partir de la cual hubo una reducción igual o mayor al 50 % del crecimiento fúngico respecto al control positivo.

Posteriormente, se realizó la MFC, cuya finalidad es encontrar la concentración a la cual el hongo no crece en PDA, es decir, la concentración a la cual existe actividad fungicida. Para esto, se sembró en placas de PDA 10 μ L del pocillo con la MIC y también los pocillos con una concentración mayor. Luego se llevaron a incubar durante 72 horas a 25 °C.

Se determinó la actividad antifúngica y potencial contra la producción de metabolitos fúngicos de los medios ya seleccionados para la prueba anterior mediante un ensayo in vitro frente a 3 especies de hongos toxigénicos: *A. flavus*, *P. expansum* y *F. verticilloides*. Para ello, se centrifugó los medios y el sobrenadante fue concentrado por liofilización para posteriormente ser resuspendido con agua estéril a la concentración equivalente a la MFC. Luego, el tratamiento fue incorporado en placas Petri con PDA a 45 °C, en una relación 1:10, por lo que la concentración aplicada resultó 10 veces menos que la MFC. Una vez enfriado y solidificado el PDA, las placas fueron inoculadas en el centro con 10 μ L de suspensión de esporas de los hongos mencionados. Por último, se dejó incubar durante 4 días realizando una medición del

diámetro de crecimiento fúngico diariamente, con el fin de establecer el % de reducción de crecimiento en comparación con el control. Para la extracción de metabolitos fúngicos se recogió el agar con cada uno de los hongos luego de los 4 días de incubación colocándolo en otro recipiente con la adición de 25 mL de metanol. Luego se dejó en agitación durante 12 horas. Finalmente se centrifugó y el sobrenadante se pasó a viales con un filtro de 22 μ m para su posterior inyección en Q-TOFMS (6.540 Agilent Ultra High Definition Accurate Mass).

Para la aplicación del tratamiento en tomates, adaptando los pasos de Dopazo et al., (2021) el ensayo se realizó como se describe a continuación. En condiciones estériles en campana de flujo laminar Telstar MH 100 (Terrassa, España) se descontaminaron los tomates cherry sumergiéndolos en una solución de agua e hipoclorito de sodio al 1 %, luego lavado con agua destilada estéril, para después sumergirlos nuevamente en una solución de agua y alcohol al 70 % también con posterior lavado en agua. En cada remojo, los tomates se secaron por 30 minutos. En total se utilizaron 80 tomates divididos en 10 para cada tratamiento, colocados en grupos de 5 por placa Petri. Cada tomate se perforó con una aguja estéril tres veces, donde luego se introdujo 10 μ L del tratamiento fermentado y el sin fermentar a la concentración MFC del hongo *A. niger*, duplicada y triplicada, y después 10 μ L del hongo *A. niger* a una concentración de 104 esporas por mL, a excepción de los controles donde solo se introdujeron 10 μ L del hongo en el positivo y 10 μ L de agua destilada estéril en el negativo. Posteriormente, los frutos se almacenaron en una caja de plástico estéril cerrada (dimensiones 30 cm x 40 cm) durante 3 días a 24 °C y en condiciones de oscuridad.

Finalmente, se homogeneizaron 2 repeticiones al azar, en una proporción de 1/10 (p/v) con agua destilada, 0,1% de peptona y 0,1 % de Tween 80 (v/v) utilizando un Stomacher (IUL, Barcelona, España) durante 30 s, y se realizaron 2 réplicas de una dilución en serie hasta alcanzar la dilución 10⁻⁷ que luego se cultivaron en placas de PDA. Tras 48 horas de incubación a 25 °C, se realizó un recuento de las esporas.

El análisis estadístico se realizó como lo hicieron Dopazo et al., (2021), mediante el software InfoStat 2019 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Las diferencias entre los grupos se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba post-hoc Tukey HSD para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Con respecto al pH, se observa en la Tabla 2 una reducción similar en todos los medios tras la fermentación. La variación en las concentraciones de

salvado no afecta significativamente sobre el pH final, por lo que la rebaja es debida principalmente a la producción de ácidos orgánicos por las BAL. En cuanto a los ° Brix, se puede apreciar un mayor valor de sólidos solubles en las muestras con mayor concentración de salvado, cuyo motivo es la presencia del mismo. Además, se denota una disminución de los ° Brix en todos los medios fermentados, debido al consumo de nutrientes por parte de las BAL durante la fermentación.

Tabla 2 Valor de pH y ° Brix de los medios antes y después de la fermentación. Las diferencias estadísticamente significativas para cada muestra se indican con letras diferentes por columna (P < 0,05).

Muestras	pH		Brix	
	0 hs	48 hs	0 hs	48 hs
Cultipliy	4,91 ± 0,01 ^a	3,34 ± 0,01 ^a	3,00 ± 0,00 ^a	2,60 ± 0,00 ^a
Salvado 1%	4,98 ± 0,01 ^b	3,36 ± 0,02 ^b	3,50 ± 0,00 ^b	2,80 ± 0,00 ^b
Salvado 5%	5,15 ± 0,00 ^c	3,48 ± 0,02 ^b	5,30 ± 0,00 ^c	4,50 ± 0,00 ^c
Salvado 10%	5,24 ± 0,02 ^d	3,65 ± 0,01 ^c	6,87 ± 0,12 ^d	6,50 ± 0,00 ^d

Los resultados obtenidos de la determinación de los ácidos láctico y acético del sobrenadante de los medios fermentados se observan en la Tabla 3. Se destaca una mayor concentración de ácido láctico en la muestra adicionada de salvado de arroz al 10 % y siguiendo en orden descendiente, siendo el medio sin salvado el que posee la menor concentración. Dopazo et al., (2022a) analizaron la producción de ácido láctico de diferentes cepas de *L. plantarum* y obtuvieron resultados que oscilan entre 4 y 6,6 g/L, producción inferior a la del presente trabajo. Por tanto, se presume que la adición del salvado aumenta la producción de este ácido orgánico.

En torno al ácido acético, se observan concentraciones similares en todas las muestras fermentadas analizadas, sin embargo, al igual que en el caso del ácido láctico, la muestra con adición de salvado al 10 % resulta la de mayor concentración. Cabe aclarar que en los medios sin fermentar los ácidos en cuestión no han sido detectados (n.d.).

En cuanto a los resultados de la determinación de ácidos fenólicos, se encontró una amplia variedad de los mismos en las muestras con adición de salvado. Una recopilación gráfica de la abundancia relativa de los diferentes ácidos fenólicos encontrados se muestra en el siguiente mapa de calor (Figura 1). Queda evidenciada como tendencia la abundancia relativa de ácidos fenólicos en las muestras fermentadas con respecto a sus controles. Además, se aprecia que el aumento de la concentración de salvado se traduce en una mayor abundancia de ácidos fenólicos,

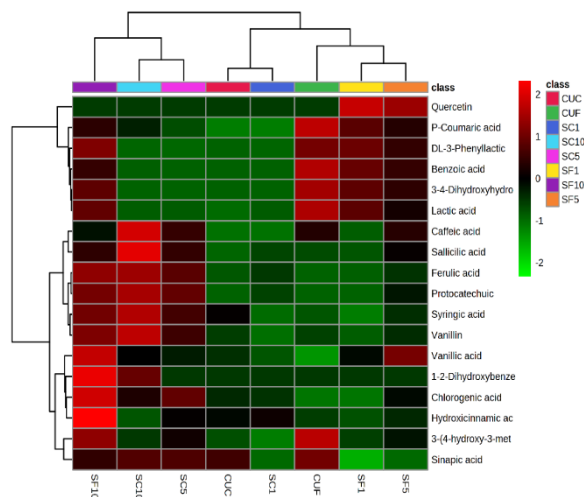
debido a que la muestra que mayor cantidad denota es la SF10.

Tabla 3 Concentración de ácido láctico y acético en los medios fermentados por BAL. Las diferencias estadísticamente significativas para cada muestra se indican con letras diferentes por columna (P < 0,05). Las cantidades se encuentran expresadas en g/L.

Muestras	A. Láctico		Muestras	A. Acético	
	0 hs	48 hs		0 hs	48 hs
Cultipliy	n.d.	12,01 ± 0,88 ^a	Cultipliy	n.d.	0,96 ± 0,44 ^a
Salvado 1%	n.d.	12,83 ± 0,17 ^a	Salvado 1%	n.d.	1,21 ± 0,02 ^d
Salvado 5%	n.d.	15,57 ± 0,21 ^b	Salvado 5%	n.d.	0,90 ± 0,13 ^a
Salvado 10%	n.d.	18,12 ± 0,67 ^c	Salvado 10%	n.d.	1,86 ± 0,74 ^d

Los resultados de la evaluación cualitativa in vitro empleando el método de difusión en agar se observan por hongo en la Tabla 4. Se puede observar un halo de mayor magnitud contra todos los hongos en las muestras fermentadas con BAL y con adición de salvado al 1 %. A su vez, la totalidad de las muestras con BAL obtuvo mayor inhibición que los controles, en algunos casos con amplia diferencia en el halo, variación que disminuye a medida que aumenta la concentración del ingrediente adicionado. En comparación, Dopazo et al., (2022b) obtuvieron halos de medición similar para el hongo *A. niger* tras la utilización del fermento de cepas de *L. plantarum* aisladas de tomates.

Figura 1 Mapa de calor sobre la abundancia relativa de ácidos fenólicos en las muestras.



Asimismo, las especies que denotaron un menor crecimiento ante la aplicación del tratamiento son los *Fusarium*, resultado que se evidencia a modo de ejemplo en la Figura 2. Cabe destacar la amplia inhibición para el hongo *F. oxysporum* debido a que, tal y como se mencionó anteriormente, resulta uno de los principales contaminantes del tomate.

Tabla 4 Resultados de la prueba de difusión en agar por hongo (medición del halo en mm). Los códigos utilizados para cuantificar las medidas tomadas del radio del halo son un “-” para los resultados sin actividad y un “+”, “++”, “+++” o “++++” para los resultados que sí habían presentado actividad, siendo el criterio de clasificación “+” inhibición de 1-4,9 mm, “++” inhibición de 5-9,9 mm, “+++” inhibición de 10-14,9 mm y “++++” inhibición mayor a 15 mm.

Hongo	Muestra							
	CUC	SC1	SC5	SC10	CUF	SF1	SF5	SF10
<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	+++	++	++	+
<i>A. niger</i>	-	+	+	-	+++	++	+++	++
<i>A. stinky</i>	++	+	+	+	+++	+++	+++	++
<i>P. commune</i>	++	+	++	+	+++	+++	+++	++
<i>P. expansum</i>	++	+	+	+	+++	+++	++	++
<i>P. verrucosum</i>	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>F. graminearum</i>	++	+	++	++	++++	++++	+++	+++
<i>F. oxysporum</i>	++	+	++	++	++++	++++	+++	+++
<i>F. verticilloides</i>	++	+	++	+	++++	++++	+++	+++
<i>A. Alternata</i>	+++	+	-	-	++++	++++	++	+

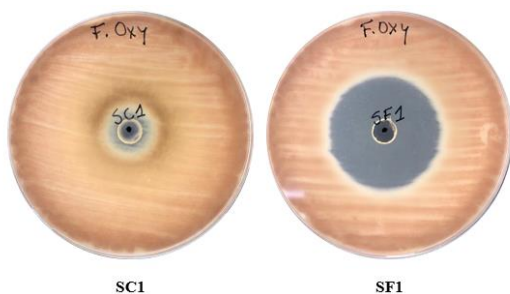


Figura 2 Ejemplo del test de difusión en agar del hongo *F. Oxysporum*: comparación de SC1 y SF1.

Los resultados arrojados por los test realizados dificultan la selección de un medio que posea superior potencial debido a que en cada una de las pruebas se destacaron medios a diferentes concentraciones de salvado adicionado. Sin embargo, teniendo en cuenta la actividad antifúngica resultante de la prueba de difusión en agar, el que mostró un potencial ampliamente mayor al resto fue el tratamiento SF1, por lo que fue el medio seleccionado para aplicar en el tomate. Por tanto, las propiedades antifúngicas pueden no estar relacionadas a la producción de los ácidos orgánicos ni compuestos fenólicos

estudiados, sino a otros elementos presentes en las muestras analizadas.

Los resultados de la evaluación cuantitativa in vitro empleando el método MIC-MFC contra los 10 hongos se aprecian en la Tabla 5. Las concentraciones se encuentran expresadas en g/L. Se observa una inhibición a menor concentración de todas las muestras fermentadas en comparación con el control, destacándose la MIC para la especie *A. alternata*, hongo que resultó inhibido a una concentración de 1,95 g/L de SF1. La concentración inhibitoria más elevada la obtuvo el hongo *A. niger*, cuya prueba se puede apreciar en la Figura 3, en la que la inhibición con SF1 se observó en la columna 5 de la placa de 96 pocillos, a una concentración de 31,25 g/L. Respecto a la MFC, en el caso de SC1 solo *A. alternata* y *F. oxysporum* no crecieron en concentraciones menores a 125 g/L y, en cuanto a SF1, la totalidad de los hongos no mostraron crecimiento en la concentración 62,5 g/L (Figura 4), sin embargo, destacan nuevamente los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata* con una MFC inferior a los 16 g/L.

Tabla 5 Resultados de la prueba MIC-MFC de SF1 y SC1 para los 10 hongos.

Hongos	Medios Salvado 1%			
	SC1		SF1	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A. flavus</i>	62,50	>125,00	15,63	62,50
<i>A. niger</i>	62,50	>125,00	31,25	62,50
<i>A. steynii</i>	31,25	>125,00	7,81	62,50
<i>P. commune</i>	31,25	>125,00	7,81	62,50
<i>P. expansum</i>	62,50	>125,00	15,63	62,50
<i>P. verrucosum</i>	31,25	>125,00	7,81	31,25
<i>F. graminearum</i>	31,25	>125,00	7,81	62,50
<i>F. oxysporum</i>	15,63	125,00	3,91	15,63
<i>F. verticilloides</i>	62,50	>125,00	7,81	62,50
<i>A. alternata</i>	15,63	62,50	1,95	3,91

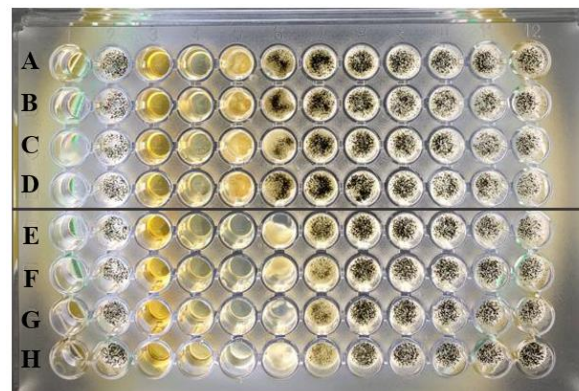


Figura 3 Ejemplo del test de MIC del hongo *A. niger* (filas A-D tratadas con SC1 y filas E-H con SF1)

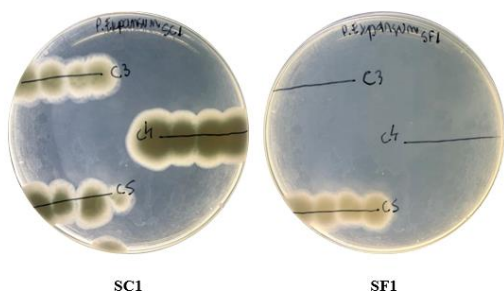


Figura 4 Ejemplo del test de MFC del hongo *P. expansum*: comparación de SC1 y SF1

Respecto a la actividad contra la producción de metabolitos fúngicos, para los 3 hongos ensayados se midió el diámetro de crecimiento de los días 2, 3 y 5 del SC1, SF1 y el CTRL y posteriormente se obtuvo el porcentaje de reducción del mismo para SC1 y SF1 respecto del control en los casos correspondientes. Los resultados de la determinación in vitro para cada hongo se observan en la Tabla 6.

Tabla 6 Resultados de la determinación in vitro de la actividad antifúngica según hongo.

<i>A. flavus</i>						
Día	Día 2		Día 3		Día 5	
Muestra	Diámetro (mm)	% Reduc	Diámetro (mm)	% Reduc	Diámetro (mm)	% Reduc
Control	19,5 ± 2,1	-	30,3 ± 1,9	-	40,5 ± 0,7	-
SC1	20,5 ± 1,2	-	32,7 ± 0,9	-	43,5 ± 0,7	-
SF1	13,3 ± 0,0	31,8	25,7 ± 0,5	15,2	36,8 ± 0,2	9,1
<i>P. expansum</i>						
Día	Día 2		Día 3		Día 5	
Muestra	Diámetro (mm)	% Reduc	Diámetro (mm)	% Reduc	Diámetro (mm)	% Reduc
Control	16,3 ± 1,9	-	23,0 ± 1,4	-	31,8 ± 1,2	-
SC1	14,8 ± 3,1	9,2	25,0 ± 4,2	-	34,3 ± 3,8	-
SF1	9,2 ± 0,2	43,6	16,7 ± 0,9	27,4	25,7 ± 1,9	19,2
<i>F. verticilloides</i>						
Día	Día 2		Día 3		Día 5	
Muestra	Diámetro (mm)	% Reduc	Diámetro (mm)	% Reduc	Diámetro (mm)	% Reduc
Control	19,7 ± 0,5	-	34,0 ± 0,0	-	50,0 ± 0,0	-
SC1	17,5 ± 0,2	11,2	34,0 ± 0,0	-	50,0 ± 0,0	-
SF1	5,5 ± 0,2	72,1	9,5 ± 2,1	72,1	21,7 ± 0,5	56,6

En los resultados obtenidos, se destaca un diámetro inferior de crecimiento sobre PDA en todas las placas tratadas con SF1, en algunos casos con amplia diferencia, la cual persiste durante la totalidad del periodo de incubación, pero disminuye con el pasar de los días teniendo en cuenta el porcentaje de reducción con respecto al control. Tanto en el test contra *P. expansum* como para *F. verticilloides*, las muestras de SC1 tuvieron un diámetro de crecimiento igual o superior al control, lo cual podría deberse a nutrientes presentes en el salvado de arroz que favorecen el crecimiento fúngico.

Los resultados de la extracción de metabolitos fúngicos in vitro se expresan en una recopilación gráfica de las diferentes cantidades representadas en un mapa de calor para cada especie. Los colores se basan en la abundancia relativa (escala logarítmica) de metabolitos

producidos de forma independiente para cada hongo, donde el rojo representa abundancia alta y el verde representa abundancia baja. Los metabolitos producidos por *A. flavus* se encuentran en la Figura 5, los que fueron producidos por *P. expansum* en la Figura 6 y los que resultaron de *F. verticilloides* en la Figura 7.

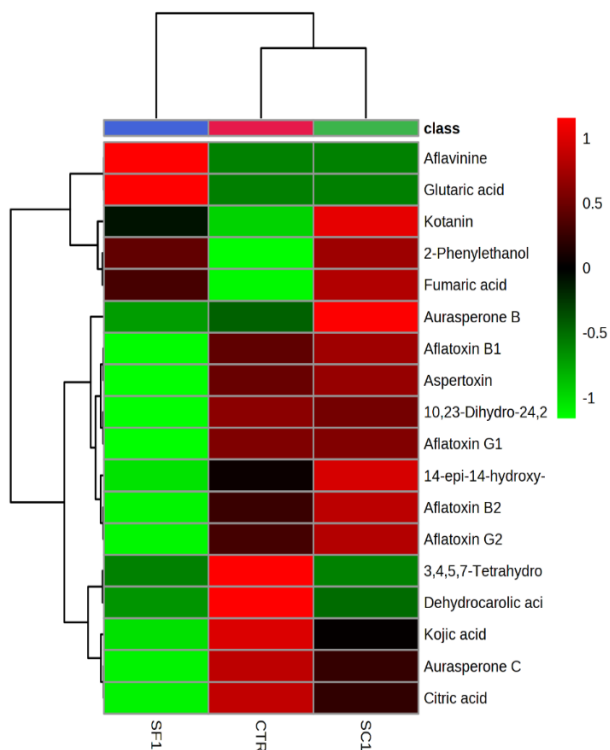


Figura 5 Mapa de calor sobre la abundancia de metabolitos fúngicos de *A. flavus* en cada muestra.

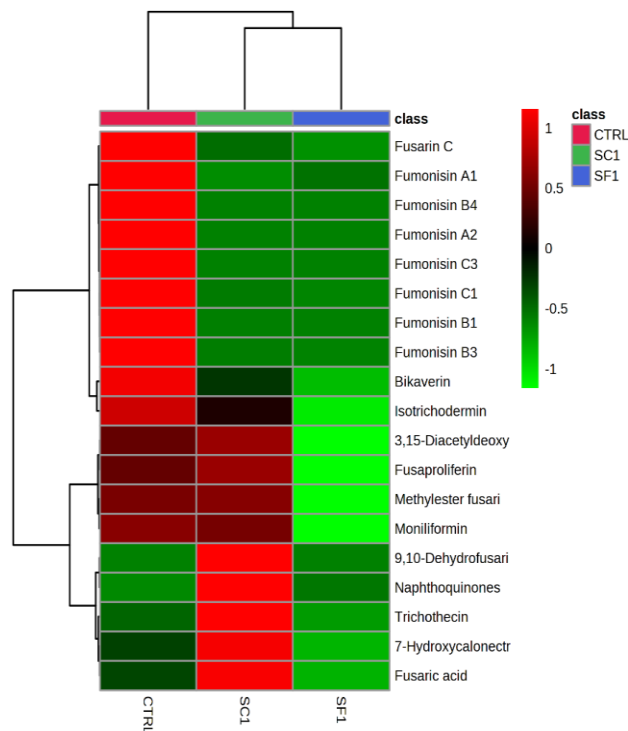


Figura 7 Mapa de calor sobre la abundancia de metabolitos fúngicos de *F. verticilloides* en cada muestra.

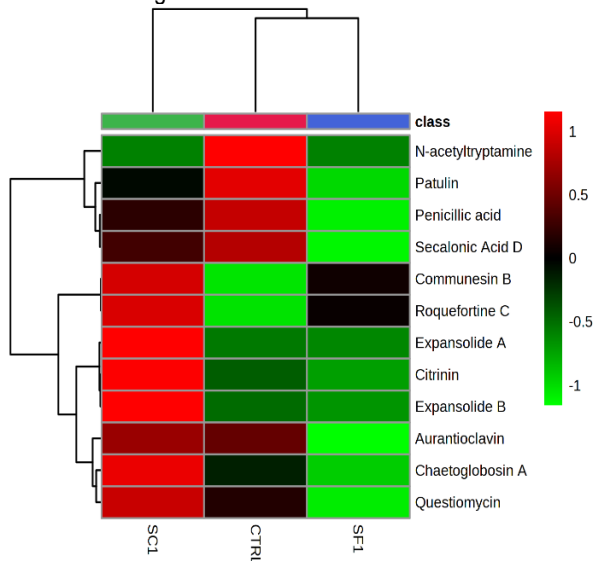


Figura 6 Mapa de calor sobre la abundancia de metabolitos fúngicos de *P. expansum* en cada muestra.

Los diferentes mapas de calor denotan una misma característica que es la inferior producción de metabolitos fúngicos en las muestras tratadas con SF1, sin embargo, el SC1 mostró una producción igual e incluso superior a la muestra CTRL, por lo tanto, la fermentación es la responsable de la disminución producida. En cuanto a los compuestos encontrados en grandes cantidades en la muestra del SF1 contra *A. flavus*, esta producción puede deberse al estrés que ocasionaron los metabolitos de las BAL al hongo.

Los resultados del ensayo de la vida útil se observan en la Tabla 7 en cantidad de spots con crecimiento fúngico y también con el equivalente en porcentajes. Se evidencia una amplia diferencia en el crecimiento a dos días de incubación en el CTRL y todos los SC1 respecto del SF1 que solo tuvo 2 spots con crecimiento fúngico en su concentración más baja. Los tomates que poseían concentraciones más elevadas de SF1 no presentaron crecimiento fúngico en ningún spot, no siendo el caso de los tomates con concentraciones más elevadas de SC1, diferencia que se exhibe a modo de ejemplo en la Figura 8. Sin embargo, luego de tres días de incubación solo mostró inhibición el SF1 con la concentración de la MFC triplicada, arrojando un resultado de 80 % de los spots con crecimiento fúngico.

Tabla 7 Cantidad y porcentaje de spots fúngicos de *A. niger* crecidos en tomates. Las cantidades de tratamiento equivalen a la MFC del hongo en cuestión (62,5 g/L), duplicada (125 g/L) y triplicada (187,5 g/L). Las letras distintas evidencian diferencias significativas entre las medias de las muestras ($p < 0,05$)

Muestra	Día 2		Día 3	
	Spot	%	Spot	%
CTRL +	1,60 ± 1,17 ^b	53,3	3,00 ^e	100
CTRL -	0,00 ^a	0	0,00 ^a	0
SC1 x 1	2,00 ± 0,94 ^b	66,7	3,00 ^e	100
SC1 x 2	2,40 ± 1,07 ^b	80	3,00 ^e	100
SC1 x 3	2,20 ± 0,79 ^b	73,3	3,00 ^e	100
SF1 x 1	0,20 ± 0,63 ^a	6,7	3,00 ^e	100
SF1 x 2	0,00 ^a	0	3,00 ^e	100
SF1 x 3	0,00 ^a	0	2,40 ± 0,70 ^b	80

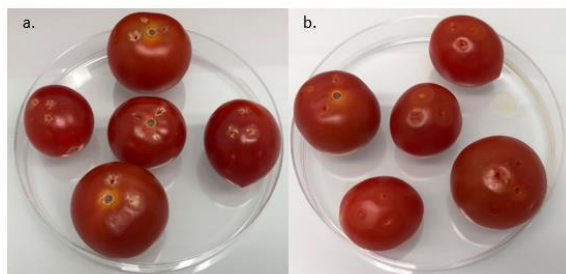


Figura 8 Tomates contaminados con *A. niger* a dos días de incubación: a. SC1 a concentración MFC por 2; b. SF1 a concentración MFC por 2.

De esta prueba se podría deducir que el tratamiento retrasó un día el crecimiento fúngico en los tomates, sin embargo, el test se realizó con inoculación del hongo y en condiciones favorables para el crecimiento del mismo. Por tanto, este resultado podría traducirse quizás en una semana de prolongación de la vida útil en la postcosecha del tomate. Además, se deben hacer pruebas con concentraciones más altas de tratamiento para evaluar aún más su eficiencia.

A su vez, se obtuvo el recuento de los hongos in vitro cuyos resultados se encuentran expresados en log₁₀ de esporas de hongo por gramo de tomate en la Tabla 8.

Tabla 8 Recuento del hongo *A. niger* crecido en el tomate contaminado. Las cantidades de tratamiento equivalen a la MFC del hongo en cuestión (62,5 g/L), duplicada (125 g/L) y triplicada (187,5 g/L). Las letras diferentes evidencian diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

Muestra	<i>A. niger</i> (Log ₁₀ esporas/g)		
	MFC	MFC x 2	MFC x 3
Control agua	nd	-	-
Control <i>A. niger</i>	5,62 ± 0,11 ^b	-	-
SC1	5,72 0,09 ^b	5,88 ± 0,20 ^b	5,80 ± 0,14 ^b
SF1	5,71 ± 0,14 ^b	5,68 ± 0,24 ^b	4,54 ± 0,01 ^a

Los resultados de este test evidencian significativamente el crecimiento inferior del microorganismo patógeno en los tomates tratados con SF1 por 3, es decir, a una concentración de 187,5 g/L, no siendo así a menores concentraciones de tratamiento, por lo que debería evaluarse la efectividad del mismo a concentraciones superiores.

Otero García (2022) realizó la misma prueba para tomate cherry aplicando BAL aisladas de tuna contra aerobios, mohos y levaduras en la cual obtuvo resultados similares, destacando que la aplicación de soluciones bacterianas influye en los cambios físicos, químicos y microbiológicos de los tomates durante su conservación, sobre todo si se trata de BAL. A su vez, concluyó en su estudio que las aplicaciones de tratamientos biológicos ayudan a controlar las contaminaciones microbianas haciendo más lenta la propagación de estos microorganismos y, por ende, extendiendo la vida útil del producto.

Asimismo, Luz et al., (2020) analizaron el potencial de *L. plantarum* aisladas de tomates para la bioconservación del mismo en la postcosecha y concluyeron que estas bacterias poseen una actividad antifúngica significativa contra un amplio espectro de hongos toxigénicos. De esta manera, relatan que la prometedora aplicación presentada en su estudio para aumentar la vida útil de este fruto contribuye a satisfacer la demanda de los consumidores de reducir el uso agrícola de compuestos sintéticos y aumentar las alternativas naturales.

Conclusiones

Analizando los resultados arrojados por los ensayos llevados a cabo a lo largo de la investigación experimental realizada, se concluye que:

Los medios adicionados de una mayor concentración de salvado evidenciaron una mayor producción de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, sin embargo, fue el medio con menor adición de este subproducto de la industria el que resultó con mayor potencial antifúngico, por lo que se concluye que la actividad antifúngica podría

deberse a otros compuestos no estudiados en el presente trabajo.

En cuanto a la actividad antifúngica in vitro, destacó ampliamente el tratamiento SF1, por lo cual fue seleccionado para las pruebas posteriores y la aplicación en tomates, habiendo arrojado un halo de inhibición superior a los 10 mm de radio en el 80% de los hongos testeados en la prueba de difusión en agar. Asimismo, los resultados obtenidos en las demás evaluaciones del potencial antifúngico resultaron significativos respecto del control. Sin embargo, se requiere el desarrollo de más estudios frente a diferentes contaminantes fúngicos, concentraciones de tratamiento, condiciones ambientales y variedades de tomates para evaluar la actividad antifúngica del salvado de arroz fermentado por BAL.

Respecto a la aplicación en tomate, el resultado de un día de retraso en el desarrollo del hongo en los spots resulta positivo y podría traducirse en una semana de protección contra agentes fúngicos en condiciones de almacenamiento sin inoculación de hongo. A su vez, una mayor concentración de tratamiento podría aumentar ampliamente la vida útil del fruto, por lo que se requiere

mayor investigación para evaluar verdaderamente la eficacia del SF1.

Sobre la producción de micotoxinas, el tratamiento aplicado demostró reducir significativamente la misma, convirtiéndose en una alternativa prometedora en ámbitos de bioconservación, más aún, teniendo en cuenta la exigencia de los consumidores por la reducción de pesticidas utilizados en cultivos agrícolas.

De este modo, como conclusión final, se propone al salvado de arroz fermentado por BAL como una alternativa de bioconservación que puede ser empleado en la industria alimentaria en reemplazo de conservantes químicos para alargar la vida útil de frutos, los cuales resultan perecederos por la alta actividad de agua. A su vez, cobra interés el aporte nutricional del tratamiento, ya que la fermentación por BAL le brinda características que podrían considerarlo como alimento funcional aportando posibles beneficios para la salud, además de evitar las consecuencias del consumo de agroquímicos, no obstante, futuras investigaciones serán necesarias para profundizar más al respecto.

Bibliografía

- Cortés Sánchez ADJ, Díaz Ramírez M, Salgado Cruz M. Bioconservación, Alimentos y Pescado. *Agro Productividad*. 2018; 11 (11): 11-16; <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1276>
- Dallagnol AM, Bustos AY, Martos GI, Font de Valdez G, Gerez CL. Efecto antifúngico y antimicotoxigénico de *Lactobacillus plantarum* CRL 778 a diferentes valores de actividad de agua. *Revista Argentina de Microbiología*. 2019; 51 (2): 164-169; <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.004>
- Dopazo V, Luz C, Calpe J, Vila-Donat, P, Rodríguez L, Meca G. Propiedades antifúngicas del suero fermentado por bacterias ácido lácticas en películas para la conservación de lonchas de queso. *International Journal of Dairy Technology*. 2022a; 75 (3): 619-629; <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12847>
- Dopazo V, Luz C, Mañes J, Quiles JM, Carbonell R, Calpe J, et al. Potencial Bioconservante de Microorganismos Aislados de Uva Roja contra Hongos Contaminantes de Alimentos. *Toxinas*. 2021; 13 (6): 412. <https://doi.org/10.3390/toxins13060412>
- Dopazo V, Luz C, Quiles JM, Calpe J, Romano R, Mañes J, et al. Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en la bioconservación de uva tinta a partir de hongos micotoxigénicos. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022b; 102 (3): 898-907; <https://doi.org/10.1002/jsfa.11422>
- Escalona Contreras VH, Correa San Martín J, González Olivares A. Manejo postcosecha de tomates y pimientos frescos y de IV gama. *Serie Ciencias Agronómicas*. 2019; 32; <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/175675/Manejo-postcosecha-de-tomates-y-pimientos-fresco.pdf?sequence=1>
- Ferronato AN, Rossi R, Massochin Nunes Pinto L, Garavaglia J. Desarrollo de un simbiótico liofilizado obtenido a partir de salvado de arroz. *Informes de Biotecnología*. 2021; 30; <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00636>
- Guimaraes A, Santiago A, Teixeira JA, Venancio A, Abrunhosa L. Efecto antiflatogénico de los ácidos orgánicos producidos por *Lactobacillus plantarum*. *Revista Internacional de Microbiología Alimentaria*. 2018; 264: 31-38; <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.025>
- López Malo T. Cultivo y conservación de variedades tradicionales de tomate en la provincia de Alicante. Trabajo de Fin de Grado; Universidad de Alicante, 2020. <http://hdl.handle.net/10045/107690>
- Luz C, Calpe J, Quiles JM, Torrijos R, Vento M, Gormaz M, et al. Caracterización probiótica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de leche materna y empleadas para la elaboración de un producto lácteo fermentado. *Diario de Alimentos Funcionales*. 2021; 84; <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104599>
- Luz C, Dopazo V, Quiles JM, Romano R, Mañes J, Meca G. Bioconservación de tomates utilizando medios fermentados por bacterias del ácido láctico. *LWT*. 2020; 130; <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109618>

- Otero García JV. Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en el mosto de dos tipos de tuna, amarilla y roja, para la bioconservación de tomate (*Solanum lycopersicum*): Riñón, cherry, redondo y pera. Trabajo de Fin de Grado; Universidad de las Fuerzas Armadas, 2022. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/32562/1/T-ESPESD-003242.pdf>
- Pilataxi Ramírez JE. Efecto del recubrimiento con tres soluciones de almidón de yuca en la conservación del fruto de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*, Mill). Trabajo de Fin de Grado; Universidad Central del Ecuador, 2019. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19846>
- Ramírez Cariño H, Guadarrama Mendoza P, Sánchez López V, Alioscha Cuervo Parra J, Ramírez Reyes T. Biocontrol de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* por *Trichoderma asperelloides* y *Bacillus paralicheniformis* en plantas de tomate. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020; 113: 1247-1261; <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>
- Sadiq FA, Yan B, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen W. Las bacterias del ácido láctico como agentes antifúngicos y antimicotoxígenos: una revisión exhaustiva. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019; 18 (5): 1403-1436; <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>
- Salas Gómez AL, Osorio Hernández E, Espinoza Ahumada CA, Rodríguez Herrera R, Segura Martínez MT, Ramírez EN, et al. Principales enfermedades del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*L.) en condiciones de campo. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2022; 6 (1): 4190-4210; https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i1.1793
- Sánchez Quintero A. Desarrollo y caracterización de un cono para helado elaborado con salvado de arroz. Tesis de Especialización; Instituto Politécnico Nacional, 2021. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/31050>
- UN, United Nations. Objetivos de Desarrollo Sostenible. [actualizada el 10 de diciembre de 2020; acceso 15 de mayo de 2023]. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>
- Yilmaz B, Bangar S, Echegaray N, Suri S, Tomasevic I, Lorenzo J, et al. Los impactos de *Lactiplantibacillus plantarum* en las propiedades funcionales de los alimentos fermentados: una revisión del conocimiento actual. *Microorganismos*. 2022; 10, 826: 1-18; <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040826>