

Funcionalización de recubrimientos comestibles de quitosano y alginato de sodio a partir de compuestos fenólicos de jamaica (*hibiscus SABDARIFFA*)

^a Daniela Padró Nombret, ^a Ma. Del Rosario Abraham Juárez, ^a Abel Cerón García, ^{ab} Ma. Cristina del Rincón Castro, ^a Julián Andrés Gómez Salazar ^b Fátima Luz María Herrera Castillo y ^{ac} Everardo Mares Mares*

^a Departamento de Alimentos, ^b Posgrado Biociencias. División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carr. Irapuato-Silao km 9. Ex-Hacienda El Copal. CP. 36000. Irapuato, Guanajuato. México Tel: (+52) 01 462-624 1889 Ext 1870. ^c Ingeniería en Industrias. Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior de Guanajuato. Carr. Guanajuato-Puentecillas km 10.5 Predio El Carmen Tels. 01 (473) 734 7878. Email: e.maresmares@ugto.mx

RESUMEN:

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de los recubrimientos comestibles en fresa a base de quitosano y alginato de sodio con la adición de compuestos fenólicos de flor de jamaica. Se extrajeron los compuestos fenólicos (CF) con acetona, etanol y metanol para ser deshidratados mediante secado por aspersión a 80, 100 y 120°C y se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu. Con los polvos obtenidos, se formularon recubrimientos de quitosano (1%) y alginato de sodio (1%) a concentraciones del 0.1, 0.5 y 1%. Los recubrimientos formulados se aplicaron en fresa por inmersión y se dejaron en almacenamiento de refrigeración a 4°C durante 15 días. Se evaluaron los parámetros de firmeza, color (CIELAB) y microbiológicos (mesófilos aerobios y hongos-levaduras). Como resultados, los CF presentaron termoestabilidad durante el secado hasta los 120°C cuando se extrajeron con etanol. La fórmula de quitosano al 0.5% y 0.1% de CF permitió conservar las características de color y firmeza con respecto al control a los 15 días de almacenamiento. Finalmente, los recubrimientos mostraron una actividad fungicida y bactericida. En conclusión, los recubrimientos comestibles base de quitosano con CF de jamaica se pueden considerar una excelente alternativa para la conservación de alimentos altamente perecederos..

ABSTRACT:

The main objective of this work was to evaluate the effect of edible coatings (based on chitosan and sodium alginate) with phenolic compounds of Jamaica's flower in strawberry's fruits. The phenolic compounds (PC) were extracted with acetone, ethanol and methanol, then they were dehydrated by spray drying (80, 100 and 120 ° C) to be finally quantified by the Folin-Ciocalteu method. With the obtained powders, the coatings base on chitosan (1%) and sodium alginate (1%) were formulated at concentrations of 0.1, 0.5 and 1% (w/v). The formulated coatings were applied by immersion in strawberry's fruits and were left in refrigeration storage at 4 ° C for 15 days. The parameters of firmness, color (CIELAB) and microbiological parameters (aerobic mesophiles and fungi-yeasts) were evaluated. According to the results, PC showed thermostability during drying up to 120 ° C when they were extracted with ethanol. The formula of chitosan at 0.5% and 0.1% of PC allowed to preserve the characteristics of color and firmness compared to the control after 15 days of storage. Finally, the coatings showed a fungicidal and bactericidal activity. In conclusion, edible base coatings of chitosan with CF from Jamaica's flower can be considered an excellent alternative for the conservation of highly perishable foods..

Palabras clave: Compuestos Fenólicos, Quitosano, Jamaica, Recubrimientos Comestibles

Área: Frutas y hortalizas y Desarrollo de nuevos productos

INTRODUCCIÓN

El uso de recubrimientos comestibles es una tecnología que está ganando importancia para prolongar la vida útil de frutas frescas y mínimamente procesadas, debido a que actúan como una barrera contra la humedad. La pérdida de humedad en frutas, disminuye su firmeza y su peso provocando cambios en el sabor y la apariencia. Además presentan permeabilidad a gases, en fruta almacenada disminuye su respiración, evita pérdida de compuestos volátiles y retarda la oxidación enzimática. Éstos reducen la abrasión durante la manipulación de la fruta y son portadores de ingredientes funcionales con potencial antimicrobiano y antioxidante (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013). Los compuestos más comúnmente usados para formar los recubrimientos comestibles incluyen quitosano, almidón, celulosa, alginato, carragenano, zeína, gluten, suero de leche, carnauba, cera de abejas y ácidos grasos. En la mayoría de los casos, aditivos como antimicrobianos, antioxidantes y nutrientes se añaden a la formulación del revestimiento para ayudar a preservar la calidad de los productos recién cortados (Olivas y Barbosa-

Canovas 2005; Ayala-Zavala *et al.*, 2008b). Recientemente, las nuevas tecnologías aplicadas en la industria alimentaria implican el uso de compuestos naturales con propiedades bioactivas. En este contexto, varios proyectos de investigación han afirmado que los fitoquímicos podrían mejorar o prolongar la vida útil de los productos (Schieber *et al.*, 2001; Wijngaard *et al.*, 2009 y 2012). Actualmente las investigaciones se han centrado en los compuestos fenólicos de la flor de jamaica por su potencial antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, inhibición de la agregación plaquetaria, anti-cancerígeno sin embargo estos compuestos aún no se han aplicado en el rubro de revestimientos para la prolongación de la vida de anaquel de productos alimenticios (Marquez, De la Rosa *et al.*, 2007; Gradinaru *et al.*, 2003). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de los recubrimientos comestibles a base de quitosano y alginato de sodio con la extracción y adición de compuestos fenólicos de la flor de jamaica en la retención de la calidad y reducción de la población microbiana en alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y cuantificación de compuestos fenólicos (CF) de la flor de Jamaica.- La flor de jamaica fresca se deshidrató por calentamiento directo en un horno por 24 horas, después se molió en un molino RESTCH con una malla de 100 (0.150 mm). Para la extracción de CF, la muestra seca se llevó a una relación de 1:10 (g:mL) con tres diferentes solventes por separado (Etanol 70%, Metanol 80% y Acetona 80%). Finalmente se cuantificaron los compuestos fenólicos en los extractos empleando el método de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton *et al.* (1999). Para ello, se realizó una curva patrón de ácido gálico (1-150 $\mu\text{g/mL}$) (Restrepo-Sánchez, D., Narváez-Cuenca, C., Restrepo-Sánchez, L. (2009). Todas las muestras se manejaron por triplicado y los resultados se expresaron como g equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca.

Secado por aspersión de los compuestos bioactivos. Los extractos de CF, se sometieron a secado por aspersión en un equipo mini-spray Büchi-290 (tobera de 150 μm) a 80, 100 y 120°C. Para evaluar la efectividad del secado, se evaluó el rendimiento del polvo obtenido (expresado como mg/ 100mL de extracto). Los polvos obtenidos se reconstituyeron a una concentración de 1g/mL y se procedió a la cuantificación de CF para evaluar la afectación de la temperatura de secado.

Formulación de recubrimientos comestibles. Se prepararon diez formulaciones variando la concentración de quitosano (Q) en ácido acético al 2%, sal de sodio del ácido alginico (A) en agua y compuestos fenólicos deshidratados (CF), donde: T1 = 1%(Q) + 0.1%(CF), T2 = 1%(Q) + 0.5%(CF), T3 = 1%(Q) + 1%(CF), T4 = 1%(A) + 0.1%(CF), T5 = 1%(A) + 0.5%(CF), T6 = 1%(A) + 1%(CF), T7 = 0.5%(A) + 0.1(Q) + 0.5%(CF), T8 = 0.5%(A) + 0.5(Q) + 0.5%(CF), T9 = 0.5%(A) + 1%(Q) + 1%(CF), T10= Control (Solo fresa).

Aplicación de los recubrimientos comestibles en alimentos. Se utilizó fresa variedad camino real como material de prueba, a las cuales se les aplicaron los recubrimientos por inmersión durante 10 segundos, y se les aplicó un ligero flujo de aire caliente para eliminar el exceso de los recubrimientos comestibles. Se envasaron lotes de 200g de fresas en cajas de polietileno y se almacenaron a 5°C durante 15 días. En una primera etapa experimental, se realizó un screening de la efectividad de los tratamientos, con la finalidad de reducir y seleccionar las formulaciones de los recubrimientos más efectivas.

Determinaciones: En la segunda etapa experimental, a las fresas almacenadas durante 15 días a 4°C y a diferentes intervalos de tiempo se les realizaron las siguientes determinaciones: **a) Color:** Se evaluaron los parámetros el color L*, a* y b* empleando un espectrofotocolorímetro de reflectancia Minolta CM508-d. **b) Firmeza.** Se utilizó un analizador de textura TA-XT2 para la evaluación de firmeza expresada en Newtons (N). Se utilizó una probeta de 20 mm de diámetro y una velocidad de cabezal de 10 mm/s, penetrando 2 veces a una distancia de 10mm a partir de la superficie de la fresa, durante un intervalo de tiempo de 10 segundos y **c) Evaluaciones Microbiológicas.** Hongos y levaduras de acuerdo a la NOM 111-SSA1-1994 y Recuento total de mesófilos aerobios con la técnica descrita por la NOM-092-SSA1-1994. Los resultados se expresaron como UFC/g. Todas las muestras se manejaron por triplicado.

Análisis Estadístico. Todos los datos se reportan como la media \pm desviación. Para conocer la diferencia en la variación del efecto de los tratamientos (tipo de solvente de extracción de CF, temperatura de secado, etc.,) se realizó

un análisis de varianza con un 95% de confiabilidad y una prueba de comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados, el contenido de compuestos fenólicos utilizando etanol al 70%, metanol al 80% y acetona al 80% fue de 3956 ± 200 , 3583 ± 135 , y 3024 ± 344 mg de Ácido Galico/100 g de flor de jamaica seca respectivamente. El valor obtenido con metanol, es similar al reportado por Abou-Arab *et al.*, (2011). Cuando los extractos se deshidrataron, los compuestos fenólicos (polvo) que se extrajeron con etanol y metanol presentaron el mismo rendimiento con respecto a acetona de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$), sin embargo se observó un mayor rendimiento cuando los extractos se deshidrataron a 120°C (**Tabla 1**).

Para evaluar la afectación de la temperatura en el contenido de compuestos fenólicos, se rehidrataron en agua los polvos (1mg/mL) y se cuantificaron. De acuerdo a la **Tabla 2** y al análisis estadístico (Prueba de Tukey ($p < 0.05$)), la temperatura y el tipo de solvente, no presentaron un efecto significativo en el contenido de compuestos fenólicos expresados en mg de Acido Gálico/ g de muestra seca (extracto en polvo). Por lo anterior y de acuerdo al rendimiento, los extractos a utilizar en los recubrimientos son los obtenidos con etanol al 70°C y deshidratados a 120°C .

Tabla 1. Rendimiento de compuestos fenólicos deshidratados (mg/100mL de extracto)

Temperatura de secado ($^\circ\text{C}$)	Etanol	Acetona	Metanol
80	656.71 ^{a/a}	505.57 ^{b/a}	499.28 ^{b/a}
100	651.76 ^{a/a}	670.28 ^{a/b}	540.42 ^{b/a}
120	774.85 ^{a/b}	546.00 ^{b/a}	786.71 ^{a/b}

Los superíndices numeradores indican diferencia entre el tipo de solvente de extracción y los superíndices denominadores diferencia entre temperatura de secado. Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En la primera parte de la investigación se observó, que los recubrimientos a base de quitosano (T1, T2, y T3) presentaron una mayor efectividad en comparación con los formulados con la sal de sodio del ácido alginico y en mezcla (**Figura 1**).

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos deshidratados (mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca)

Temperatura de secado ($^\circ\text{C}$)	Etanol	Acetona	Metanol
80	822.04 \pm 19.54 ^{a/a}	797.03 \pm 19.90 ^{a/a}	865.44 \pm 34.64 ^{a/a}
100	812.35 \pm 18.30 ^{a/a}	771.34 \pm 10.30 ^{a/a}	747.46 \pm 53.57 ^{a/a}
120	765.03 \pm 44.32 ^{a/a}	864.84 \pm 42.20 ^{a/a}	751.67 \pm 67.64 ^{a/a}

Media \pm D.E. Los superíndices numeradores indican diferencia entre el tipo de solvente de extracción y los superíndices denominadores diferencia entre temperatura de secado. Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Lo anterior, con base a la observación del crecimiento de hongos filamentosos y el control (sin recubrimiento). En un estudio similar presentado por Velázquez-Moreira, y Guerrero-Beltrán, (2014) determinaron que la concentración de quitosano efectiva en recubrimientos comestibles para una actividad antifungica es de 0.1 al 0.5%, lo anterior es similar a lo obtenido en la presente investigación. Por lo tanto, se redujo el diseño experimental se redujo a los tratamientos T1 (1%(Q) + 0.1%(CF)) y T2 (1%(Q) + 0.5%(CF)), con los respectivos controles (Quitosano al 1% y sin recubrimiento).



Figura 1. Recubrimientos comestibles a base de quitosano y sal de sodio de ácido alginico con compuestos fenólicos

Para cada una de las determinaciones, se observó que el tratamiento 2 (1%(Q) + 0.5%(CF)), fue el más efectivo. En la **Figura 2** se puede generalizar el efecto de los compuestos fenólicos (CF) a una concentración del 0.5%. Las cinéticas de deterioro para los parámetros L^* (**Figura 2a**) y a^* (**Figura 2b**), muestran que no hay diferencia significativa en los días de almacenamiento cuando se utiliza una concentración de 0.1 o 0.5% de CF. El vector de color (**Figura 2d**) se representó con la herramienta colorimétrica NIX (<https://nixsensor.com/free-color-converter/>) para observar el efecto conservador y antioxidante de los recubrimientos en el color de las fresas (**Figura 2e**). Los recubrimientos a base de quitosano y CF mantienen 6 días el color de las fresas con respecto al control (sin recubrimiento). Sin embargo, el quitosano por si solo muestra un efecto antioxidante, pero estadísticamente (Prueba de Tukey $p < 0.05$) inferior al que presentan los recubrimientos formulados con compuestos fenólicos.

Los valores de firmeza (**Figura 3**) para los tratamientos T1 y T2 no mostraron diferencia significativa durante la cinética de deterioro de las fresas en refrigeración. Sin embargo el empleo de CF, mantuvo una mayor firmeza con respecto a los controles. Han, C., *et al.*, (2004) realizó un estudio similar de la aplicación de quitosano (0-1%) en fresa. Los valores de firmeza son similares para el control (quitosano), comprobando así, que el quitosano es un polímero antifúngico que genera una barrera permeable que evita la migración de agua al exterior, manteniendo así la firmeza de las fresas.

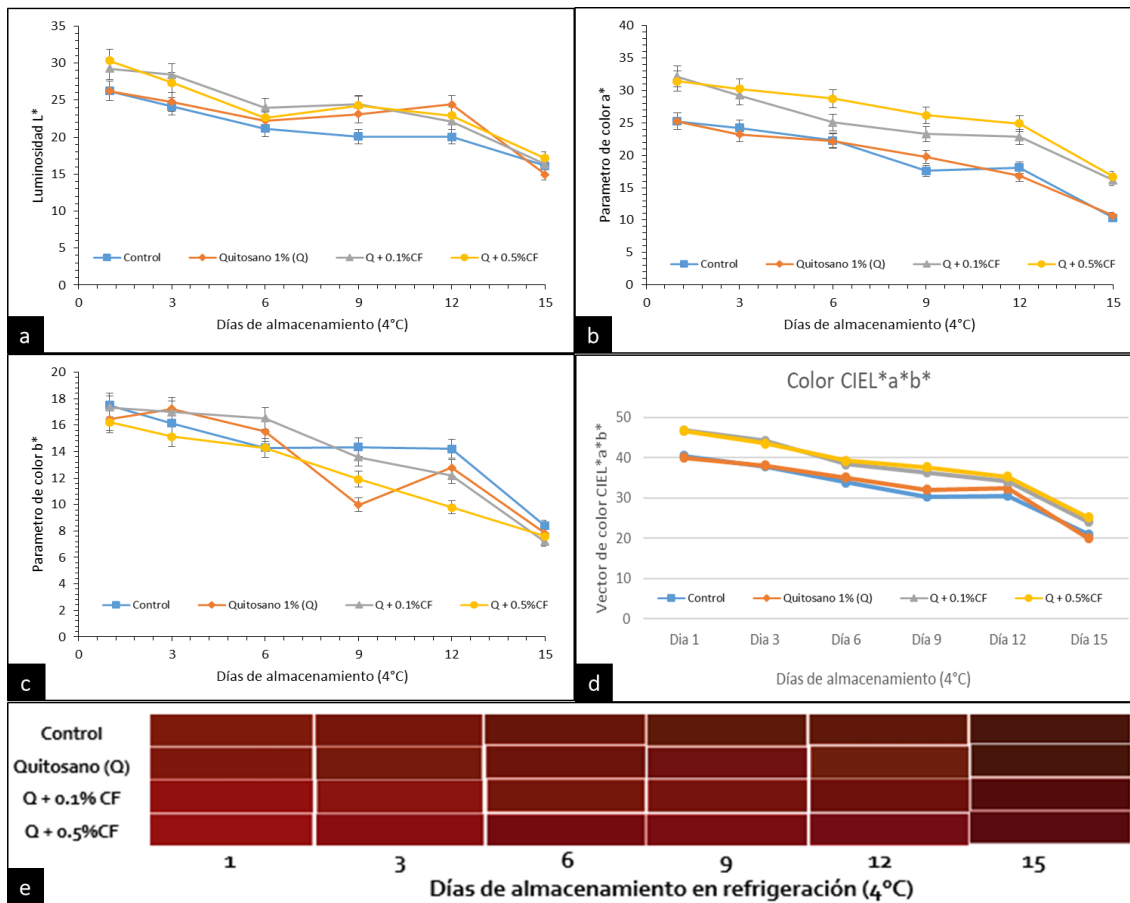


Figura 2. Evaluación de color de las fresas con recubrimientos comestibles a base de quitosano y compuestos fenólicos de la flor de jamaica. Dónde: a) L*. b) a*, c) b*, d) Vector de color y e) Escala de color NIX del vector resultante.

Con respecto al conteo de mesófilos aerobios (**Figura 4a**) y hongos y levaduras (**Figura 4b**) se observó que la concentración de 0.1% de CF de la flor de jamaica presento una mayor actividad antifúngica con respecto al tratamiento T2 con 0.5%. Los valores del recuento de Hongos y Levaduras coinciden con lo reportado a Ali *et al.*, (2010) para una concentración de quitosano al 1% (Control) y Djioua *et al.*, (2010).

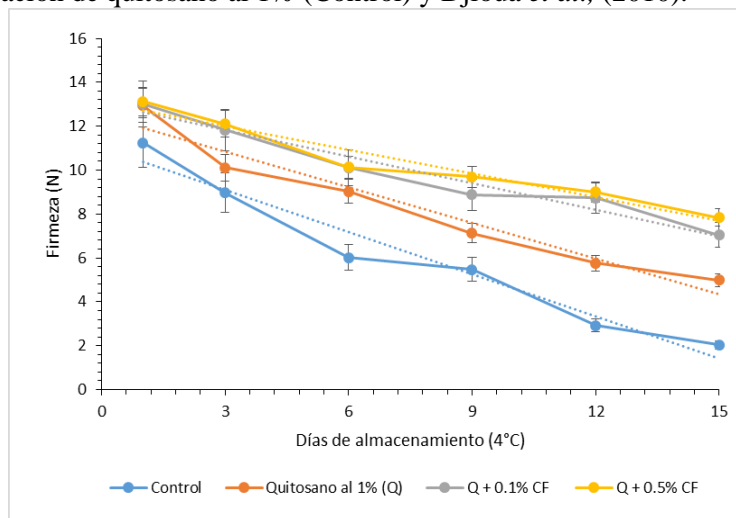


Figura 3. Perfil de textura (Firmeza) de fresas con recubrimientos comestibles a base de quitosano y compuestos fenólicos de la flor de jamaica

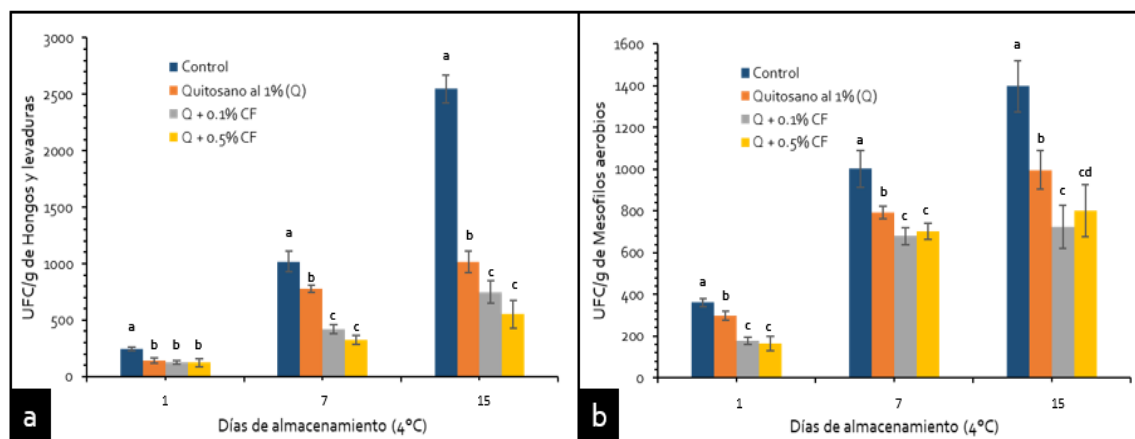


Figura 4. Análisis microbiológico de recubrimientos comestibles a base de quitosano y compuestos fenólicos de la flor de jamaica. Donde a) Hongos y Levaduras y b) Aerobios mesofílicos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de la presente investigación, se concluye que los compuestos fenólicos de la flor de jamaica se pueden extraer con diferentes solventes (etanol, metanol y acetona), sin que se vea afectado su rendimiento de extracción y son termoestables en un amplio rango de temperatura de secado para su aplicación en alimentos. Su incorporación (o inmovilización) en los recubrimientos comestibles a base de quitosano, es una alternativa para la conservación de alimentos perecederos, haciendo posible la prolongación de la vida útil de los mismos, gracias a su potencial antioxidante y antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, F. M. y Abou-Arab, E. A. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7):445-456.
- Ali, A., Muhammad, M., Sijam, K. y Siddiqui, Y. (2010). Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(10), 2134-2140.
- Ayala-Zavala JF, del Toro-Sanchez L, Alvarez-Parrilla E, Soto-Valdez H, Martin-Belloso O, Ruiz-Cruz S, González-Aguilar G (2008b) Natural antimicrobial agents incorporated in active packaging to preserve the quality of fresh fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Rev* 4(3):1-9
- Djioua, T., Charles, F., Freire, M., Filgueiras, H., Ducamp-Collin, M. y Sallanon, H. (2010). Combined effects of postharvest heat treatment and chitosan coating on quality of fresh cut mangoes (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Food Science and Technology*, 45(4), 849-855.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C. G., Kallithraka, S., Kefalas, P., & Garcia-Viguera, C. (2003). Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83(3), 423-436.
- Han, C., Lederer, C., McDaniel, M. y Zhao, Y. (2004). Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan based edible coatings. *Journal of Food Science*, 70, S172-8.
- Marquez, R., De la Rosa, C., Agosto, C., & Medina, M. (2007). Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. administrado en ratas albinas variedad Wistar. *Scientia et Technica*, 8(33), 377-381
- Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994), Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

- Norma Oficial Mexicana (NOM-111-SSA1-1994) Bienes y servicios. Métodos para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos
- Olivas G, Barbosa-Cánovas G (2005) Edible coatings for fresh-cut fruits. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(7–8):657–670
- Rebolo, S.(2007) Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra. Universidad de Santiago Compostela. España.
- Restrepo-Sánchez, D., Narváez-Cuenca, C., Restrepo-Sánchez, L. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en VélezSantander, Colombia. *Química Nova*, 32(6), 1517-1522
- Schieber A, Stintzing F, Carle R (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends Food Sci Technol* 12(11):401–413
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Vázquez-Briones, M. C., y Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 5-1
- Velázquez-Moreira, A., y Guerrero-Beltrán, J. A. (2014). Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 5-12.
- Wijngaard H, Hossain MB, Rai DK, Brunton N (2012) Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res Int* 46(2):505–513
- Wijngaard HH, Rößle C, Brunton N (2009) A survey of Irish fruit and vegetable waste and byproducts as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chem* 116(1):202–207