

Determinación de fenoles totales en subproductos de mandarina y su efecto sobre *Listeria monocytogenes*

Echeverría-Arteaga, Y.J.¹, Marín-Iniesta, F.² y Minor-Pérez, H.¹

¹División de ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n Esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central), Col. Valle de Anáhuac, C. P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México. Correo: hminor@tese.edu.mx

²Universidad de Murcia, España

Palabras clave: Cáscara, bagazo, semilla, mandarina, fenoles totales, ácido gálico, *Listeria monocytogenes*

Introducción

Varios estudios hacen mención al uso de subproductos de cítricos para el control de las poblaciones microbianas indeseables en alimentos. Así mismo, se reporta, que son fuente importante de compuestos bioactivos, e.g. sustancias con actividad antioxidante [1]. Algunos de estos subproductos pueden emplearse en el diseño de alimentos que contengan conservadores naturales. Actualmente existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su elevado efecto antioxidante, el cual puede ser empleado en el control de oxidación de los lípidos de los alimentos y algunos estudios mencionan que puede contribuir a reducir o prevenir algunos procesos biológicos que causan por ejemplo el daño celular [2]. A nivel molecular, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos. Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides los cuales tienen comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplásica, antimicrobiana, entre otras [3,4]. Los flavonoides son uno de los grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son moléculas de compuestos derivados del benceno. La extracción de los diferentes fenoles puede realizarse a partir del material fresco o incluso seco. Los fenoles, son considerados polares por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol y agua [3]. Los cítricos contienen flavonoides en forma de flavonas polimetoxiladas y flava-nonas glicosiladas. Algunos autores mencionan el efecto antimicrobiano del aceite esencial y el extracto etanólico de la mandarina sobre varios microorganismos indicadores. El estudio determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC) del aceite esencial de mandarina sobre *Pseudomonas aeruginosa* y de *Staphylococcus aureus*, obteniendo un resultado una inhibición del 7% y 15% respectivamente [5]. El objetivo de este estudio fue evaluar los fenoles totales de cáscara de mandarina (CM), bagazo de mandarina (BM) y semilla de mandarina (SM) en extractos metanólicos, etanólicos y acuosos (EM, EE y EA) y evaluar el efecto del ácido gálico sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994.

Metodología

Determinación de fenoles totales. Se empleó una modificación de una técnica previamente reportada [6,7]. Se pesaron 0.002 g de las muestras de las CM, BM y SM y se vaciaron en tubos de polietileno con 1000 µL de metanol, etanol o agua. Las muestras se dejaron reposar 24 h a temperatura ambiente. Se tomó un volumen de 200 µL de los extractos y se adicionó un volumen de 1000 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (J.T.

Baker), posteriormente se adicionó 400 µL de una solución de carbonato de sodio al 7.5% (p/v, J.T. Baker) y se dejaron en reposo durante 1.5 h a una temperatura de 30°C. Se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro (ThermoScientific, Genesys 10s UV-VIS, USA). Si las lecturas presentaban valores > 1.0 se realizaron diluciones con metanol, etanol o agua. El blanco fue una solución inicial de 100 µL de metanol, etanol y agua sometida al proceso antes mencionado.

**Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y condiciones de crecimiento. *Listeria monocytogenes* NCTC pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Durante este estudio la cepa se conservó en crioviales a -20°C. Ésta se sembró por estría cruzada en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y 1.5% de agar bacteriológico (w/v Bioxon, México). La muestra se incubó a 37°C por 24 h. Una colonia de la bacteria control se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a 37°C por 12 h. Se tomaron 100 µL de este pre-cultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE y la muestra se incubó durante 24 h 37°C para obtener el cultivo de estudio.

**Análisis microbiológico.* Se evaluó el efecto del ácido gálico (J.T. Baker) a diferentes concentraciones (0%, 1%, 3% and 5%) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. El ácido fue pesado y vaciado en tubos Eppendorff previamente adicionados de 900 µL de agua estéril. En cada tratamiento se adicionó un volumen de 100 del cultivo de estudio. Las muestras fueron agitadas en un vortex (Cole-Parmer, USA). Los tratamientos fueron calentados en un baño de temperatura controlada (Polystat Temperature Controller, Cole-Parmer, USA) a 30°C durante 1 h. A los tiempos de 0 min y 60 min se realizó una cuenta en placa con la técnica de la gota [8].

**Análisis estadístico.* Los resultados se sometieron a un ANOVA y a una prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA.

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los resultados de Fenoles Totales en las muestras de estudio. El análisis estadístico (Tablas 1,2 y 3) muestra que los resultados experimentales se ajustaron a un modelo lineal, para el efecto de las variables fijas; solvente (metanol, etanol y agua), tipo de muestra cáscara, bagazo y semilla de mandarina sobre la variable respuesta (Fenoles totales, µg de ácido gálico/mL). El modelo describe la influencia de los factores investigados en forma independiente: tipo de muestra (A), solvente (B), además del efecto de la interacción (A*B). Se observó un efecto altamente significativo ($P < 0.0001$) del tipo de muestra (A), solvente (B). El coeficiente de determinación para el modelo lineal propuesto indica que < 1% de la variación total en la respuesta no puede ser explicado por el modelo desarrollado. Los valores F para los parámetros del modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones (Tabla 2). En las condiciones experimentales y considerando los valores de Pr y F se observó que los parámetros que tuvieron un mayor efecto significativo sobre la variable respuesta (FT) fueron en primer lugar el tipo de solvente. El segundo parámetro con mayor significancia fue la interacción. Esto significa que los cambios el tipo de solvente tiene un efecto mayor sobre la concentración de FT. Algunos estudios mencionan en relación a los mecanismos de la actividad antioxidante una correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad de captura de radicales libres. Este fenómeno permite sugerir la aplicación de las muestras estudiadas en el control de la

oxidación e.g. de los lípidos en alimentos. El análisis con la prueba de Duncan muestra que la cáscara de mandarina tuvo el valor más alto en FT y posteriormente fue el BM y por último la SM. La Figura muestra la mayor reducción de las poblaciones de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a los 60 min a concentraciones de 2.5% o mayor de ácido gálico. En estos valores de AG, hubo una reducción de 8 ciclos logarítmicos (población inicial de estudio).

Tabla 1. ANOVA para el efecto de la muestra (CM, BM, SM)** y el solvente (ME, ET y AG)** sobre la concentración de FT (μg ácido gálico/mL).

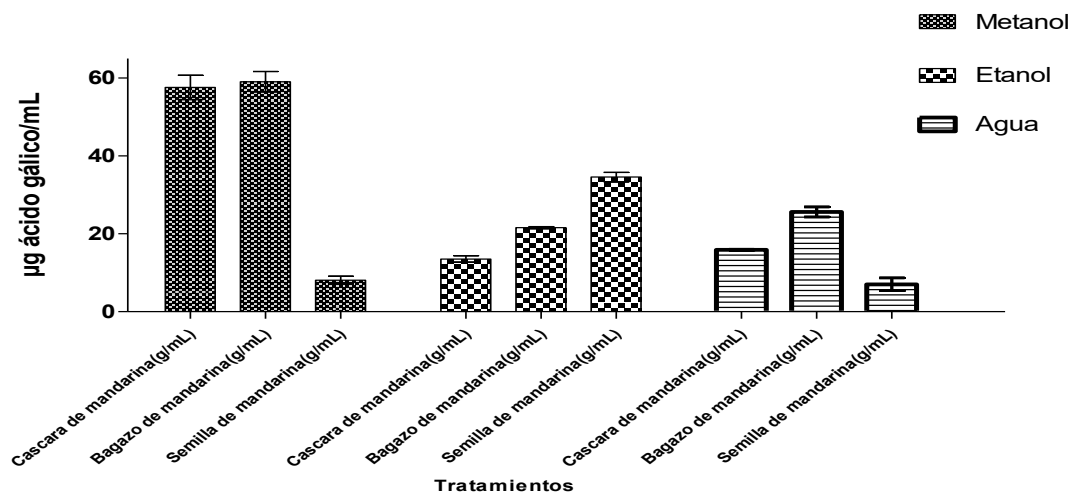


Figura 1. Determinación de fenoles totales en muestras de CM, BM y SM.

Tabla 1. ANOVA para el efecto del tipo de muestra (CM, BM, SM) y el solvente (ME, ET y AG) sobre la concentración de FT (μg ácido gálico/mL).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	8	6292.844	786.605	105.06	0.0001
Error	9	67.387	7.487		
Total	17	6360.232			

R-Square= 0.9891

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

**Muestra: Cáscara de mandarina (CM); bagazo de mandarina (BM); semilla de mandarina (SM)

***Solvente: metanol (80%, ME); etanol (ET); agua (AG)

Tabla 2. ANOVA para el efecto del tipo de muestra (CM, BM, SM), el solvente (ME, ET y AG) y la interacción sobre la variable respuesta: FT (μg ácido gálico/mL).

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
A-Muestra (CM, BM, SM)*	76.44	0.0001
B-Solvente (ME, ET y AG)**	138.73	0.0001
A*B – Muestra*Solvente	102.53	0.0001

*Muestra: Cáscara de mandarina (CM); bagazo de mandarina (BM); semilla de mandarina (SM)

**Solvente: metanol (80%, ME); etanol (ET); agua (AG)

Tabla 3. Prueba de Duncan para la comparación el efecto de la muestra (CM, BM, SM) y el solvente (ME, ET y AG) sobre la concentración de FT (μg ácido gálico/mL).

Muestra**	Muestra (CM, BM, SM)		Solvente***	Solvente (ME, ET, AG)	
	Promedio (μg ácido gálico/mL)	Prueba de Duncan*		Promedio (μg ácido gálico/mL)	Prueba de Duncan*
CM	36.589	A	ME	41.560	A
BM	27.716	B	ET	24.029	B
SM	17.082	C	AG	15.798	C

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

** Muestra: Cáscara de mandarina (CM); bagazo de mandarina (BM); semilla de mandarina (SM)

***Solvente: metanol (80%, ME); etanol (ET); agua (AG)

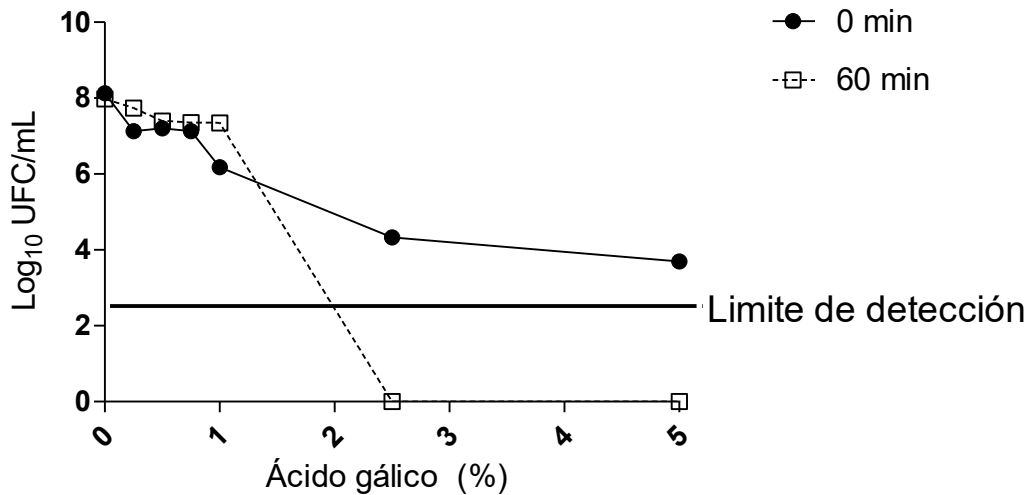


Figura 2. Efecto del ácido gálico a diferentes concentraciones en *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Conclusiones

Las cáscaras de frutas cítricas como la mandarina pueden ser empleadas como fuente de antioxidantes en el diseño de alimentos funcionales. El ácido gálico inhibió a la población de *Listeria monocytogenes* en 8 ciclos logarítmicos.

Bibliografía

- [1] Ma Y. Q., Chen J. C., Liu D. H., Ye X. Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrason Sonochem*, 16(1), 57-62. doi: 10.1016/j.ultsonch.2008.04.012
- [2] Bahadur B., Rajam M. V., Sahijram, L. Krishnamurthy, K. V. (Eds.). (2015). Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement. Springer.
- [3] Rappoport Z. (2003). The chemistry of phenols. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra
- [4] Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food. Practical applications. CRC Press. Cambridge, Inglaterra.
- [5] Tao N., Jia, L. Zhou H. (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chem.*, 153, 265-271. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.070
- [6] Zheng W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11): 5165 – 5170.
- [7] Kraujalyte V., Venskutonis P. R., Pukalskas A., Česonienė L., Daubaras, R. (2013). Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food Chem.*, 141, 3695–37
- [8] Miles A.A. Misra, S.S. Irwin, J.O. (1938 Nov). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg*, 38 (6): 732–49.