

Capacidad antioxidante y antimicrobiana de películas comestibles a base de harina de cascara de plátano y extracto de cascara de cacao CCN-51

Antioxidant and antimicrobial capacity of edible films based on banana peel flour and cocoa shell extract CCN-51

Autores:

Natasha Auxiliadora Pachay Casanova^{1*}; Víctor Oswaldo Otero Tuarez¹.

¹Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Alimentos, Puerto Pesquero Artesanal de San Mateo, 130802 Manta, Manabí, Ecuador.

natashapachay24@gmail.com

victor.otero@uleam.edu.ec

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de películas comestibles a base de harina de cascara de plátano, incorporando extracto de cacao como agente activo a concentraciones de 0 %, 0,75 % y 1,5 %. La capacidad antioxidante fue determinada por el método de ABTS durante cero y 20 minutos de incubación. Los resultados mostraron valores de $683,29 \pm 16 \mu\text{mol TE}\cdot\text{g}$ en el minuto 20 para el tratamiento T2 (1,5%) de extracto de cacao, siendo el valor más alto registrado para los tratamientos, a diferencia de las películas sin extracto (Control) que mostraron valor de $164,70 \pm 24 \mu\text{mol TE}\cdot\text{g}$ en el mismo tiempo de incubación. Para el ensayo de actividad antibacteriana, se elaboraron discos a partir de películas comestibles sin y con extracto, para determinar el efecto inhibitorio mediante la técnica de difusión de discos en agar frente a bacterias *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Se determinó que estas películas poseen capacidad antimicrobiana baja, probablemente por la lenta difusividad de los compuestos, el tratamiento T2 (1,5%) de extracto de cacao el que mostro la mayor inhibición frente a cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en contraste con la muestra control que presentó un halo de inhibición menor para todas las cepas ensayadas. Por lo tanto, aunque la capacidad antimicrobiana de las películas comestibles es baja se podría utilizar mayores

concentraciones de extracto de cacao como mecanismo de barrera para minimizar la contaminación bacteriana en la industria alimentaria.

Palabras clave: capacidad antioxidante y antimicrobiana; harina de cáscara de plátano y extracto de cáscara de cacao

Abstrac

The objective of this work was to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacity of edible films based on banana peel flour, incorporating cocoa extract as an active agent at concentrations of 0%, 0.75% and 1.5%. The antioxidant capacity was determined by the ABTS method during zero and 20 minutes of incubation. The results showed values of $683.29 \pm 16 \mu\text{mol TE}\cdot\text{g}$ at minute 20 for the T2 treatment (1.5%) of cocoa extract, being the highest value recorded for the treatments, unlike the films without extract. (Control) that showed a value of $164.70 \pm 24 \mu\text{mol TE}\cdot\text{g}$ at the same incubation time. For the antibacterial activity assay, discs were made from edible films without and with extract, to determine the inhibitory effect using the agar disc diffusion technique against *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* bacteria. It will be discontinued that these films have low antimicrobial capacity, probably due to the slow diffusivity of the compounds, the T2 treatment (1.5%) of cocoa extract which showed the greatest inhibition against strains of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in contrast to the control sample that presented a lower inhibition halo for all the strains tested. Therefore, although the antimicrobial capacity of edible films is low, higher concentrations of cocoa extract could be used as a barrier mechanism to minimize bacterial contamination in the food industry.

Keywords: Antimicrobial, phenols, bioactives, by-products

INTRODUCCIÓN

Se estiman que las pérdidas postcosecha de los productos hortofrutícolas que se producen en el mundo sobrepasan el 20%, debido a deterioros microbiológicos y fisiológicos, como consecuencia de factores de orden tecnológico como inadecuado proceso de recolección, empaques no apropiados e insuficientes vías para la transportación, entre otros, lo que se traduce en un corto período de almacenamiento (Almeida *et al.*, 2011).

Con el objetivo de evitar o minimizar los efectos adversos de los factores citados y conjuntamente prolongar la vida postcosecha de los productos hortofrutícolas y la vida de anaquel de los productos alimenticios se han implementado diferentes tecnologías, entre ellas se pueden mencionar, el almacenamiento a bajas temperaturas, aplicación de radiaciones gamma y ultravioleta, el control biológico, la conservación por atmósfera controlada, la utilización de empaques plásticos, el uso de películas y recubrimientos comestibles, entre otras (Núñez *et al.*, 2012; Aguilar, 2012; Fernández *et al.*, 2015).

Siendo los recubrimientos y películas comestibles un papel significativo en la vida de anaquel de los alimentos debido a que reducen la pérdida de agua, permiten el control respiratorio, retrasan el envejecimiento y mejoran la calidad y valor comercial de los mismos, manteniendo sus atributos de calidad y valor nutritivo. Por tal motivo muchas investigaciones han dedicado su estudio sobre el uso de estas tecnologías aplicadas a una amplia gama de productos hortofrutícolas (Vargas *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2010; Restrepo y Aristizába, 2010)

Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz transparente continua, comestible y delgada, que se estructura alrededor de un alimento generalmente mediante la inmersión de este en una solución formadora del recubrimiento con el fin de preservar su calidad y servir de empaque (Fernández *et al.*, 2015). Por otra parte, una película comestible (PC) es una matriz preformada, obtenida por moldeo, cuyo espesor es siempre es mayor al de los RC (Sharma & Rao, 2015; Del-Valle *et al.*, 2005).

Dichas soluciones formadoras de la película o recubrimiento pueden estar conformadas por un polisacárido, un compuesto de naturaleza proteica, lipídica o por una mezcla de éstos (López, Rivas, Loaiza & Sabino, 2010), el uso de almidón o de harinas para la elaboración de películas comestibles tiene gran importancia debido a que es un materia biodegradable, reusable, barato, comestible y fácilmente disponible. A pesar de sus diferencias, ambas proceden de igual manera frente a diversas sustancias que actúan sobre el alimento como barrera frente al transporte de gases y vapor de agua durante su conservación (Vasconez *et al.*, 2009).

La utilización de películas y recubrimientos comestibles como medio de transporte de agentes bioactivos ha sido científicamente comprobado (Otero, *et al.* 2020). La aplicación de películas elaboradas con biomoléculas, también puede funcionar como un

microsistema que ayuda a modificar las atmósferas del interior de los productos alimenticios, contrarrestar el crecimiento microbiano, lo que representa una alternativa para la conservación de productos de la industria alimentaria, al reducir significativamente la pérdida de peso, agua y el intercambio de gases, así como retrasar el envejecimiento y mejorar la calidad sensorial de éstos (Salinas et al., 2015)

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas (Navarro et al., 2017). Además de intervenir en el crecimiento y reproducción de las plantas, participan en procesos de defensa frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta (Crozier et al., 2005). Así mismo, contribuyen en gran medida al sabor, color y textura de los alimentos (Cheynier, 2005). Todos los compuestos fenólicos tienen en común una estructura molecular con grupos funcionales entre los que destacan ésteres, metil-ésteres, glicósidos, etc. Así dentro de los compuestos fenólicos podemos encontrar desde moléculas simples como los ácidos benzoicos, hasta polímeros complejos como ligninas y taninos (Navarro et al., 2017). La función biológica de los compuestos fenólicos va a depender del compuesto al que esté conjugado, que pueden ser azúcares como la galactosa, glucosa o arabinosa, y también ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos (Cheynier, 2005).

Actualmente, se conocen más de 8000 compuestos fenólicos, que han sido clasificados como flavonoides (que incluyen flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas, isoflavonoides y antocianinas) y no flavonoides (entre los que están los ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos) (Del Río et al., 2013).

Estudios en otros países indican que la cascara de cacao tiene una importante actividad antioxidante (Olalekan y Ayodeji, 2010; Del-Valle et al., 2005), y quizás una de las formas más eficientes de aprovechar esa propiedad sería a través de su uso en la elaboración de películas bioactivas con la adición de estos compuestos presentes en la cascara de cacao.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades antimicrobianas in vitro de las películas biodegradables a base de harina de cascara de plátano con adición de compuestos fenólicos de cascara de cacao frente a cepas de *Salmonella spp.*, *Escherichia Coli* y *Listeria Monocytogenes*.

Materiales y métodos

La cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*) fue recolectada en una empresa procesadora de chifles en la ciudad de Manta, Ecuador. La cáscara de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L) fresca fue proporcionado por la Finca BONANZA ubicada en la vía Santa María sitio la alegría (El Carmen, Ecuador). Se realizó un examen visual para desechar producto en mal estado ya que la calidad de las cáscaras es fundamental para la elaboración de las películas.

Los medios de cultivos y reactivos para las pruebas microbiológicas fueron adquiridos en Difco (USA). Las bacterias patógenas utilizadas en esta investigación, *Salmonella* spp. (ATCC CECT-708), *Escherichia coli* (ATCC CECT-4076), y *Listeria monocytogenes* (ATCC CECT-5672) que fueron aisladas en muestras de queso perteneciente a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y proporcionadas en estado liofilizado por Laboratorios Certificados Españoles (Universidad de Valencia, España).

Activación de las bacterias patógenas

Para realizar las pruebas de patógenos de control se utilizaron cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Para su posterior activación se realizó en caldo de soja tríptico (TSB- HIMEDIA), caldo infusión cerebro corazón (BHI-HIMEDIA) y caldo nutritivo (BN-MERCK) a pH $7,2 \pm 0,2$. Se realizó un proceso de esterilización de 15 minutos a 121°C , posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 24 h.

Extracto de cáscara de cacao

Las cáscaras de cacao CCN-51 congeladas pasaron a un liofilizador Labconco modelo FreeZone 4.5 L, Republica Checa, por 48 horas a -50°C para su secado. Para la extracción se tomó 5 g de muestra en 50 mL de etanol (1:10 p/v), se dejó en agitación a 125 rpm en una plancha de agitación Fisher Scientific (modelo 11-100-49SH, japon) durante 24 horas. Se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos (centrífuga marca SIGMA, Germany) y separar el sobrenadante (extracto) en alícuotas de 15 ml (Otero, 2019).

Obtención de la harina de cascara de plátano

Extracción y blanqueamiento de la harina. Las cáscaras de plátano se cortaron en trozos aproximados de 3×2,5 cm y se sumergieron inmediatamente en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (p/p) para luego ser sumergidas por 5 minutos en solución de ácido cítrico al 1% (p/p) con el fin de evitar el pardeamiento enzimático de las cáscaras de plátano durante el secado posterior se secaron en un horno de convección de aire forzado a 60°C durante 48 horas. Las cáscaras secas se molieron en un molino de cuchillos (Molino desintegrador Biobase MD120) a 25.000 rpm. Para la harina de cáscara resultante, se blanqueó por soluciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 30%) a concentración de 15% por 3 horas, consecutivamente se secaron y molieron. La harina resultante se pasó a través de un tamiz N° 200 Advantech, USA, que proporciona 75 µm de tamaño de partícula.

Preparación de las películas

La película se elaboró utilizando la metodología propuesta por Anchundia et al. (2016) con ligeras modificaciones, mediante la disolución de harina de cáscara de plátano al 4% con agua destilada con calentamiento hasta 90 °C y agitación constante. Una vez alcanzada esta temperatura se dejó enfriar la solución hasta 45 °C y se adicionó glicerol al 0,5% y los extractos en concentraciones de 0.75 y 1.5 % manteniendo la temperatura durante 5 minutos. Las muestras obtenidas fueron homogenizadas en ultraturrax (Polytron, Suiza) a 11.000 rpm por 4 minutos y transferidas luego a cajas Petri de 9 cm de diámetro. El secado de las películas se realizó introduciendo las cajas Petri en una cámara de incubación (SCI Finetech Co., Corea) a 30 °C con humedad relativa de 45% durante 24 horas. El experimento se desarrolló bajo un diseño unifactorial en donde el factor A corresponde a la concentración de compuestos fenólicos de cascara de cacao (0.75 y 1.5 %).

Determinación de la capacidad antioxidante de las películas comestibles

La actividad antioxidante presentes en las muestras se midió por medio del ensayo Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) de acuerdo con la metodología propuesta por Terán y Morán (2021), usando la decoloración por el radical catión ABTS. El radical ABTS●⁺ se preparó mediante la reacción acuosa de persulfato de potasio 2,45 mM y ABTS 7 mM., se dejó reposar en la oscuridad por 16 h a 20 °C. La solución de ABTS●⁺ obtenida fue estable durante 48 horas y se diluyó con etanol (95%) hasta obtener una

absorbancia de 0,70 (\pm 0,1) a 734 nm a 30°C. La curva de calibración se realiza con la preparación de soluciones de Trolox de diferente concentración. Para la solución madre se diluyen 0,01 g de Trolox en 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. Se coloca en la celda del espectrofotómetro 2 mL de la solución de radical ABTS●+, y se registran las absorbancias iniciales, luego se añade 20 μ L de tres concentraciones (20 μ M, 40 μ M, y 60 μ M) de soluciones del estándar Trolox, y se toman las absorbancias a 734 nm. Para la evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de la muestra se reemplaza los 20 μ L de la solución de Trolox por el extracto de cada tratamiento. La absorbancia será leída a los min 1 y 20 de haber incorporado los 20 μ L de extracto. Utilizando la curva de calibración se obtienen las actividades antioxidantes de la muestra expresadas en mg Trolox/g muestra.

Determinación de la actividad antimicrobiana de las películas

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas elaboradas con harina de plátano y compuestos fenólicos de cascara de cacao, se empleó la técnica de difusión en agar basada en los métodos propuestos por (Hernández et al., 2011 y Cutter, 1999). Para esta técnica se estandarizo el inóculo a una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL. Se inocularon cajas con agar salmonella-shigella SS (DIFCO); BD Listeria Agar y BD MacConkey II Agar, empleando un hisopo con las suspensiones bacterianas. Se utilizaron discos de películas de 0.5 mm de diámetro de cada una de las formulaciones y con unas pinzas se colocaron las películas en el centro de la superficie del agar previamente inoculado con los microorganismos patógenos. Cada película se presionó para asegurar contacto pleno con dicha superficie, después las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados por medio de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Duncan con un nivel de significancia $p < 0,05$ (95%), utilizando el paquete estadístico Infostat 2020.

Resultados y Discusión

Capacidad antioxidante de las películas

En figura 1, se muestran los resultados sobre el estudio de la capacidad antioxidante que presentaron las soluciones formadoras de películas a lo largo de 20 minutos. En los dos tratamientos y control se evidenció actividad antioxidante. Todas las formulaciones con extracto de cacao mostraron una mayor capacidad antioxidante en relación con el grupo control. Aunque, los tratamientos no fueron diferentes entre ellos ($p < 0,05$), se observó una tendencia a una mayor capacidad antioxidante de las muestras con concentración del compuesto activo al 1.5% (T2), mostrando un valor de $647,26 \pm 10 \mu\text{mol TE} \cdot \text{gMS}$ en el minuto 0 y $683,29 \pm 16 \mu\text{mol TE} \cdot \text{gMS}$ en el minuto 20, en contraste a las películas sin extracto (Control) la cual evidencio un valor de $148,33 \pm 12 \mu\text{mol TE} \cdot \text{gMS}$ para el minuto 0 y $164,70 \pm 24 \mu\text{mol TE} \cdot \text{gMS}$ para el minuto 20.

Figura 1. Capacidad antioxidante en películas a base de harina de cascara de plátano y extracto de cascara de cacao.

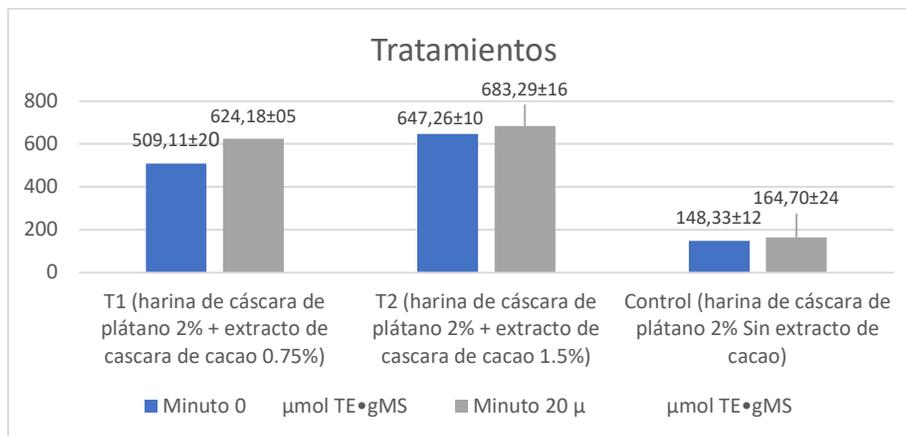


Figura 1: Muestra resultados de los 3 tratamientos de películas comestibles, en diferentes concentraciones y en 2 tiempos

Con los resultados mencionados anteriormente se demuestra que tanto la harina de cascara de plátano y el extracto de cacao tienen propiedades antioxidantes gracias a los compuestos activos que poseen. Estos datos se corroboran con los datos que se obtuvieron en el trabajo de Quiroz-Reyes et al. (2013) quienes mencionan que la cáscara de cacao contiene una significativa cantidad de compuestos fenólicos. Esta actividad presenta una tendencia a ir incrementando a medida que transcurre el tiempo. En la formulación control con 0% de extracto de cacao también se observa una leve actividad antioxidante. Esta capacidad de la muestra control está justificada, debido a que existe presencia de

compuestos fenólicos en la cascara de plátano, Gimeno et al. (2015) reportaron una capacidad antioxidante de $(173.10 \pm 65 \mu\text{mol TE} \cdot \text{gMS muestra seca})$, Rojas et al. (2019) indicaron que la capacidad antioxidante es de $(161.10 \pm 50 \text{ mg Trolox}/100\text{g muestra seca})$.

La actividad antioxidante de los coproductos del cacao podría atribuirse a los compuestos fitoquímicos que contienen y especialmente, a los compuestos polifenólicos principalmente compuestos flavan-3-ol como los monómeros catequina y epicatequina, y la dímera procianidina B2 (Guevara et al., 2002). Según el trabajo de investigación realizado por Arreaga (2020), la cascarilla de cacao es rica en compuestos fenólicos como Catequina y Epicatequina y metilxantinas como Teobromina y Cafeína, además contiene epicatequina y ácido p-hidrobenczoico (Quiroz-Reyes et al., 2013).

En los frutos de cacao, se pueden distinguir tres tipos de polifenoles: catequinas o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es (-)-epicatequina con un máximo de hasta el 35% del contenido de polifenoles. También se han encontrado en cantidades menores (+)-catequina (+)-galocatequina y (-) epigalocatequina (Wollgast y Anklam, 2000; Ortega et al., 2008).

En el estudio realizado por Sangronis et al. (2014), encontraron que los polifenoles en la cascarilla de cacao mostro valores entre 2,40 a 2,51 g GAE/100g de muestra seca; Abdul et al. (2014) tuvo el mayor contenido de polifenoles en cascarilla $41,35 \pm 2,23 \text{ mg de extracto de GAE/g muestra seca}$. Pero fue superior a lo reportado por Manzano et al., (2017), $6,04 \pm 0,12 \text{ mg GAE/g de la muestra desgrasada}$.

También es importante conocer, que debido a las propiedades de barrera de los recubrimientos y películas comestibles a base de almidones o harinas la difusión del compuesto activo fue muy lenta. La difusión presentada fue casi similar para todos los casos de las formulaciones que poseían el compuesto activo. Por tanto, en caso de utilizar otra matriz de recubrimiento puede que la difusión del compuesto activo sea mayor y se observe aún más capacidad antioxidante a medida que aumenta la concentración de dichos compuestos (Fernández-Pan et al., 2012).

Carpio et al (2018), señalan que la actividad antioxidante fue evidente en la variedad de cacao CCN-51. La mazorca de cacao contiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos. Los pocos estudios encontrados presentan valores que difieren de este trabajo

de investigación o utilizan otros métodos para la determinación de capacidad antioxidante. En el estudio de Martínez et al. (2012), se evaluaron diversas propiedades antioxidantes; en la cascarilla de cacao de dos lugares de procedencia (Cone y Taura) reportaron valores de 4.45 y 4.56 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}$ para actividad antioxidante medida por ABTS y 1.51 y 1.78 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}$ para el método FRAP. La extracción de metabolitos antioxidantes se realizó empleando metanol: acetona, como disolventes para muestras procedentes de Cono y Taura (Guayas, Ecuador).

Ordoñez et al. (2019) por su parte, reportaron valores de 4,22 mg TE \cdot g (16.86 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}$) para la capacidad antioxidante medida por el método ABTS, para muestras de cascarilla de cacao comercial procedente de planta de procesamiento de la cooperativa Agroindustrial Naranjillo (Huánuco, Perú). Los valores obtenidos por Ordoñez son inferiores a los reportados en esta investigación. La variación de los resultados obtenidos en este estudio frente al trabajo 46 desarrollado por otros autores, puede deberse a varios factores como los tipos de disolventes empleados en el proceso de extracción y la zona geográfica de procedencia de la muestra. De acuerdo con los estudios realizados por Arnao (2000), Guevara et al. (2019) y Mazzuti et al. (2018), la recuperación de componentes antioxidantes como los polifenoles y otros fitoquímicos de los materiales vegetales se ven influenciadas por la solubilidad de estos compuestos bioactivos en el solvente utilizado y la polaridad del disolvente, que jugará un papel clave en el aumento de la solubilidad fenólica.

De acuerdo con el trabajo de Martínez 2012, el uso de diferentes solventes como etanol y metanol; acetona pueden generar una variación de los resultados. Este autor demostró que los extractos etanólicos (2,48 y 2,56 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}$) presentan una menor actividad antioxidante que los extractos metanol:acetona (4,10-4,17 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}$). Es así como, se pueden utilizar varios métodos para la extracción de compuestos bioactivos, dependiendo de las sustancias de destino. Sin embargo, un proceso de validación de los procesos de extracción puede garantizar la obtención del 100% de los compuestos antioxidantes de interés (Coronel, 2021).

Según, investigaciones realizadas por Samaniego et al. (2020), existe un efecto de la zona de producción (Costa y Amazonía) sobre el contenido de compuestos antioxidantes de muestras de cacao de diferentes regiones y cantones del Ecuador. Karin et al. (2014) reportaron valores de 1.87 $\mu\text{M Te}\cdot\text{g}$ (33.60 $\mu\text{M Te}\cdot\text{g}$) en cascarillas de cacao procedentes

de una mezcla de clones procedentes de la colección del Centro de Investigación y desarrollo de Cacao en Malasia.

Capacidad antimicrobiana

En el ensayo de capacidad antimicrobiana se observó actividad antimicrobiana baja para los tratamientos evaluados, mostrando diferencias significativas en las películas enriquecidas con extractos de cacao ($p < 0,05$) en contraste a las películas sin extracto.

En las tablas (2, 3 y 4) se muestra la actividad antibacteriana de los discos con y sin extractos de cáscara de cacao frente a las bacterias *Salmonella. spp.*, *E. coli*, y *L. monocytogenes*. Se observó efecto antibacteriano con las dos concentraciones de estudio frente a las tres cepas utilizadas en este trabajo. Sin embargo, un fuerte poder inhibitorio se percibió con la concentración de 1,5 % de extracto frente a *L. monocytogenes* que fue significativamente diferente ($p < 0,05$) a la actividad antibacteriana presenciada en las otras bacterias. No obstante, la capacidad antibacteriana de los extractos fue efectiva desde 0,75 %. No se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones utilizadas, excepto para *Salmonella*, que cuyo halo de inhibición fue inferior en comparación al resto de bacterias.

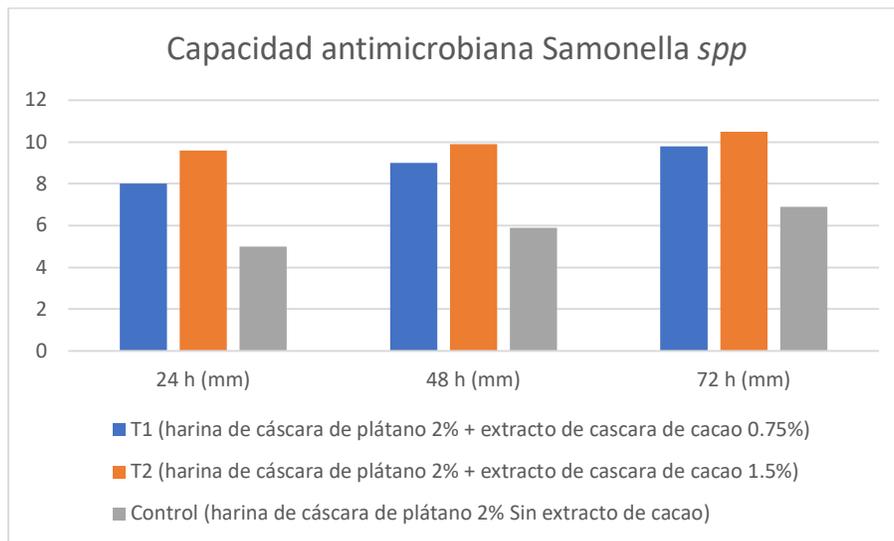


Figura 2. Capacidad antimicrobiana in vitro de películas a base de harina de plátano y extracto de cacao frente a *Salmonella. spp.*

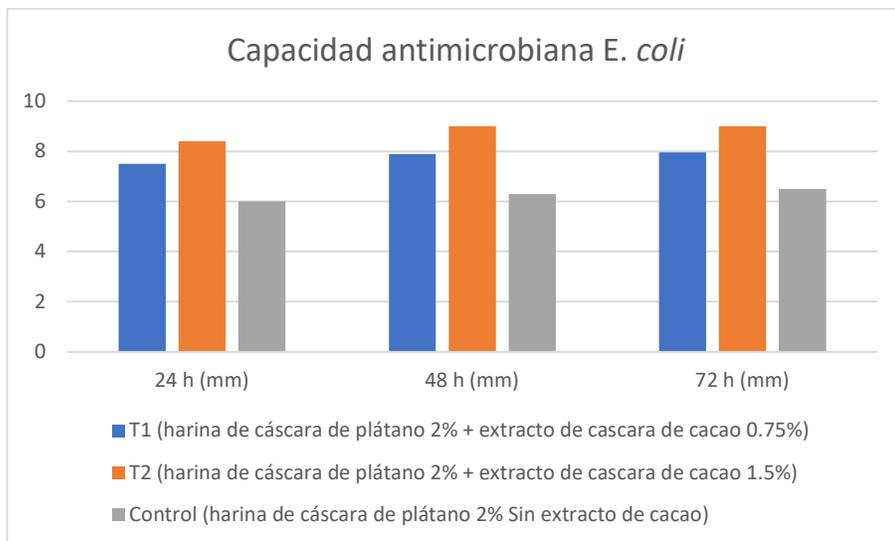


Figura 3. Capacidad antimicrobiana in vitro de películas a base de harina de plátano y extracto de cacao frente a *E. coli*.

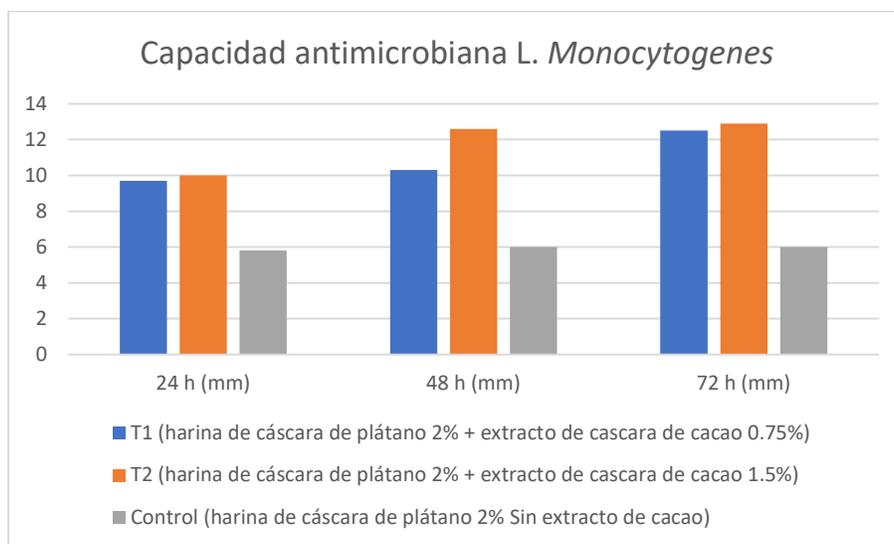


Tabla 4. Capacidad antimicrobiana in vitro de películas a base de harina de plátano y extracto de cacao frente a *L. Monocytogenes*.

Existen estudios que demuestran que *Listeria innocua* es el microorganismo más sensible a los compuestos bioactivos de las plantas halófilas y, por el contrario, *E. coli* y *Salmonella* las más resistente. Esto se debe a que al ser gram-positiva y gram-negativas, respectivamente, los compuestos bioactivos no afectan igual a su estructura, ya que por lo general las gram-negativas son más resistentes gracias a la estructura de su pared

celular (Iturriaga et al., 2012). Sin embargo, las películas a base de cascara de plátano y de cacao han mostrado actividad antimicrobiana baja frente a las bacterias del estudio realizado en este trabajo. La suposición planteada a este estudio es que el aumento del pH ácido hasta llegar a un pH neutro ha podido afectar a los resultados, es decir, se cree que este aumento de pH haya podido inhibir algún ácido orgánico del extracto afectando su capacidad antimicrobiana.

Como explican Singh, ho Lee, Park, Shin, & Lee (2016) en su artículo científico, los ácidos orgánicos que hay presentes en esta clase de plantas son los responsables de esa capacidad antimicrobiana, estos al introducirse en las células de los microorganismos se disocian produciendo una sobreproducción de ATP para expulsar estos ácidos, mecanismo de protección de los microorganismos. En consecuencia, al producirse un agotamiento de la energía celular se consigue la inhibición de los microorganismos. Otro limitante sería que las películas comestibles a base de harina de cascara de plátano y extracto de cacao difunden muy lentamente los compuestos activos que poseen (Fernández-Pan et al., 2012), es decir, puede que los microorganismos crezcan más rápido de lo que se difunde el compuesto activo.

La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas está determinada por inhibir el crecimiento, reproducción, respiración y cualquier otra función vital de los microorganismos. Lo realizan mediante la oxidación de enzimas específicas las cuales pueden cumplir funciones vitales (Pastrana et al., 2017). Por otra parte, pueden también interrumpir el proceso de duplicación de ADN o interrumpiendo la síntesis de las proteínas (Gordo, 2018).

El resultado de los efectos inhibitorios de la cascara de cacao CCN-51, expuestos en este trabajo, muestra efectos antimicrobianos en todas las bacterias ensayadas. No obstante, un mayor efecto inhibitorio de las películas con extracto se observó frente a *L. monocytogenes*, en comparación al efecto antibacteriano observado en *Salmonella spp.*, y *E. coli*.

La literatura científica, reporta que las bacterias Gram-positivas son más sensibles que las bacterias Gram negativas (Otero-Tuarez et al. 2020), posiblemente se deba a que las bacterias Gram Positivas contienen una capa externa de péptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-negativas contienen una membrana fosfolipídica externa

(lipopolisacáridos), lo que impediría, que las bacterias experimentan diferentes tipos de interacciones con los agentes antimicrobianos (Rodríguez et al., 2017; Otero, 2019; Alvia et al., 2019; Ramón y Valderrama, 2020). Esta estructura celular en las bacterias Gram-negativas hace difícil que los extractos atraviesen la pared celular y causar daño en el funcionamiento bacteriano (Carrillo et al., 2014; Lima et al., 2020; González et al., 2020); Montero et al., 2017; Guevara et al., 2020); Carillo et al., 2015; Carrillo et al., (2020; Hernández et al., 2018; Morales et al., 2020).

Existen varios autores que mencionan presencia de compuestos bioactivos en la casaca de plátano como por ejemplo Niamah (2014) identificó, en el extracto metanólico crudo logrado por maceración, la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, glicósidos y la ausencia de taninos. Mordi et al (2016) obtuvieron un extracto metanólico a través del método Soxhlet en el cual identificaron terpenos, taninos, esteroides y compuestos fenólicos en trazas, reconociendo además la ausencia de flavonoides. Ahmed (2015) identificó la presencia de saponinas, carotenoides, compuestos fenólicos, taninos y ausencia de alcaloides en el extracto etanólico crudo.

En su estudio Pilco et al. (2018) manifiesta que los diferentes métodos de preparación de muestra, extracción y los solventes usados son los posibles responsables de la discrepancia en los resultados, así como las variaciones en los metabolitos que generan las plantas dependiendo de las condiciones de producción (suelo, riego, clima, plagas, agroquímicos, entre otros).

Varias investigaciones con respecto a la actividad antimicrobiana de la cáscara de banano han sido realizadas en todo el mundo, no obstante, existe una notable diferencia entre los datos generados en esta investigación y los existentes. Chinnappan, et al (2013), concluyó que la cáscara de banano posee actividad antimicrobiana significativa sobre *Aeromonas hydrophyla*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas citrii*, pero actividad nula frente a enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* y *thypinurium*. Niamah (2014), evidenció una elevada actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus sp.*, y una actividad menor sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Ahmed (2015), reportó una elevada actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* así como en los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum*; mientras que la actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* fue menor. Mordi et al (2016), identificó

una elevada actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, y *Pseudomona spp.*

Es importante recalcar que, pese a las investigaciones mencionadas, las cuales se realizaron en banano maduro de la misma especie, la fisiología de las plantas durante su desarrollo se ve afectada directamente por factores como el tipo de suelo, clima, cantidad de lluvias, época del año en la cual se produce, etc. Por lo tanto, existirán diferencias en la composición de los compuestos fitoquímicos presentes lo cual se traduce en variaciones en sus propiedades bioactivas, lo cual explicaría la discrepancia de los datos de actividad antimicrobiana. (Pavarini, D., Pavarini, S., Niehues, M., & Lopes, N., 2012).

La existencia de actividad antimicrobiana y la presencia de grupos fitoquímicos específicos en el extracto de la cáscara de banano *Musa paradisiaca* y en el extracto de cacao *Theobroma cacao* respaldan y prueban una posible utilización en la industria de conservación de alimentos como un empaque con características biológicas antimicrobianas y es una alternativa ecológica y sostenible.

CONCLUSIONES

El análisis realizado para determinar la actividad antioxidante de las películas indica que existe esta capacidad tanto para la harina de cascara de plátano como en los extractos de cascara de cacao, siendo muy promisoría la mezcla de estos dos componentes para contrarrestar el crecimiento microbiano de bacterias patógenas debido a la presencia de compuestos bioactivos en las dos fuentes vegetales utilizadas en este estudio

Los análisis microbiológicos realizados a nivel in vitro indicaron, que las películas a base de harina de plátano adicionada con extractos de la cáscara de cacao ostentan un mayor efecto antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes*. Y en menor proporción frente a bacterias como *Escherichia coli*, y *Salmonella spp.*, Por tanto, los agentes antibacterianos son más efectivo frente a las bacterias Gram-positivas, en comparación a las bacterias Gramnegativas.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se hace necesario la evaluación de películas comestibles a base de estas dos fuentes de origen vegetal aplicándolas en productos alimenticios para su conservación.

Bibliografía

Irisarri Urarte, M. (2018). Actividad antimicrobiana y antioxidante de películas comestibles basadas en WPI y extracto de hinojo marino.

Pilco, G., Borja, D., Goetschel, L., Andrade, P., Irazabal, J., Vargas-Jentsch, P., ... & Ramos, L. (2018). Caracterización bromatológica y evaluación de la actividad antimicrobiana en cáscara de banano Ecuatoriano (*Musa paradisiaca*). *Enfoque UTE*, 9(2), 48-58.

Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 64(2), 123-130.

González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030-1039.

Emaga, TH, Andrianaivo, RH, Wathelet, B., Tchango, JT y Paquot, M. (2007). Efectos del estado de maduración y variedades sobre la composición química de la cáscara de banano y plátano. *Química de los alimentos*, 103 (2), 590-600.

Mokbel, MS y Hashinaga, F. (2005). Actividades antibacterianas y antioxidantes de la cáscara de frutas de banano (*Musa*, AAA cv. Cavendish). *Revista estadounidense de bioquímica y biotecnología*, 1 (3), 125-131.

Olalekan, AJ y Ayodeji, KE (2010). Potenciales antioxidantes de extractos de cáscara de banano y plátano en aceite de palma crudo. *Folleto etnobotánicos*, 2010 (5), 1.

Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., & Galotto, MJ (2005). Desarrollo de un recubrimiento comestible de mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) y su aplicación para prolongar la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa*). *Química de los alimentos*, 91 (4), 751-756.

Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, IB, Marks, S., Saltmarsh, M. y Clifford, MN (2006). Metabolitos secundarios en frutas, verduras, bebidas y otros componentes dietéticos de origen vegetal. *Metabolitos secundarios de plantas: presencia, estructura y función en la dieta humana*, 208-302.

Cheyrier, V. (2005). Los polifenoles en los alimentos son más complejos de lo que se suele pensar. *La revista americana de nutrición clínica*, 81 (1), 223S-229S.

Navarro González, I., Periago, M. J., & García Alonso, F. J. (2017). Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 21(4), 320-326.

Del Río, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, JP, Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Fenólicos (poli) dietéticos en la salud humana: estructuras, biodisponibilidad y evidencia de efectos protectores contra enfermedades crónicas. *Antioxidantes y señalización redox*, 18 (14), 1818-1892.

Anchundia, K., Santacruz, S., & Coloma, J. (2016). Caracterización física de películas comestibles a base de cáscara de plátano (*Musa Paradisiaca*). *Revista chilena de nutrición*, 43(4), 394-399.

Hernández-Ochoa, L., Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Mendez, N., Muñoz-Castellanos, L. N., & Quintero-Ramos, A. (2011). Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(3), 455-463.

Terán, S. G. S., & Morán, W. A. M. (2021). Efecto del procesamiento de cacao negro en el contenido y actividad antioxidante de compuestos fenólicos. *Revista ESPAMCIENCIA ISSN 1390-8103*, 12(1), 41-45.

Otero-Tuárez, V; Fernández-Pan, I; Ignacio Maté, J. 2020. Effect of the presence of ethyl lauroyl arginate on the technological properties of edible fish gelatin films. *International Journal of Food Science & Technology* 55(5):2113-2121.

Gimeno-Martínez, D., Oria Almudí, R. M., & Venturini Crespo, M. E. (2015). Optimización de la extracción de compuestos de interés en subproductos de frutas tropicales para su aplicación en matrices alimentarias. *Trabajo Fin de Máster. Universidad Zaragoza*.

Rojas, A. F., Rodríguez-Barona, S., & Montoya, J. (2019). Evaluación de alternativas de aprovechamiento energético y bioactivo de la cascara de plátano. *Información tecnológica*, 30(5), 11-24.

Carpio, E. V., Castro, L. M., & Fernández, M. C. (2018, July). Caracterización físico-química de la cascarrilla de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51. In *Conference Proceedings UTMACH* (Vol. 2, No. 1).

Martínez, R., Torres, P., Meneses, MA, Figueroa, JG, Pérez-Álvarez, JA, & Viuda-Martos, M. (2012). Propiedades químicas, tecnológicas y antioxidantes in vitro de coproductos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Food Research International* , 49 (1), 39-45.

Ordoñez, E. S., Leon-Arevalo, A., Rivera-Rojas, H., & Vargas, E. (2019). Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis Vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 175-183.

Arnao, MB (2000). Algunos problemas metodológicos en la determinación de la actividad antioxidante mediante radicales cromógenos: un caso práctico. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos* , 11 (11), 419-421.

Coronel Álvarez, Z. J. (2021). *Determinación de la actividad antioxidante de cascarrilla de cacao (Theobroma cacao l.) provenientes de las variedades CCN-51 y nacional por distintos métodos* (Bachelor's thesis, Quevedo-Ecuador).

Guevara, M., Tejera, E., Granda-Albuja, M. G., Iturralde, G., Chisaguano-Tonato, M., Granda-Albuja, S., ... & Alvarez-Suarez, J. M. (2019). Chemical composition and

antioxidant activity of the main fruits consumed in the western coastal region of Ecuador as a source of health-promoting compounds. *Antioxidants*, 8(9), 387.

Mazzutti, S., Rodrigues, LGG, Mezzomo, N., Venturi, V. y Ferreira, SRS (2018). Procesos ecológicos integrados que utilizan CO₂ supercrítico y etanol presurizado aplicados para recuperar compuestos antioxidantes de la cáscara de los granos de cacao (*Theobroma cacao*). *The Journal of Supercritical Fluids* , 135 , 52-59.

Martínez, R., Torres, P., Meneses, MA, Figueroa, JG, Pérez-Álvarez, JA, & Viuda-Martos, M. (2012). Propiedades químicas, tecnológicas y antioxidantes in vitro de coproductos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Food Research International* , 49 (1), 39-45.

Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C., & Mena, P. (2020). Efecto del área de cultivo sobre el contenido de metilxantinas y flavan-3-oles en granos de cacao de Ecuador. *Diario de composición y análisis de alimentos* , 88 , 103448.

Karim, AA, Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P. y Abdullah, NA (2014). Propiedades antioxidantes de las vainas y cáscaras de cacao. *Cacao de Malasia J* , 8 , 49-56.

Arreaga Chevez, A. A. (2020). " *Identificación del perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) de las variedades CCN-51 y Nacional*" (Master's thesis, Quevedo: Ecuador).

Guevara, J. A. Z., Mori, J. R. C., Jiménez, W. J. J., & Santi, W. E. M. (2022). Actividad Antioxidante de Pulpa, Semilla y Pericarpio de Mazorca del *Theobroma Cacao*. *RECIAMUC*, 6(3), 564-574.

Ortega, N., M.P. Romero, A. Macia, J. Reguant, N. Angles, J.R. Morello and M.J. Motilva. 2008. Obtention and characterisation of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(20): 9621–9627.

Wollgast, J. and E. Anklam. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33(6): 423–447.