

Cuantificación de fenoles totales de *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana*, y su uso en cárnicos (Agosto de 2021)

D. Unigarro¹, H. Gomajoa² y J. Gustin³

Universidad Mariana San Juan de Pasto, Nariño Colombia

daunigarro@umariana.edu.co¹;

hgomajoa@umariana.edu.co²;

jegustin@umariana.edu.co³.

GAE/g muestra seca para *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana* respectivamente.

RESUMEN - Durante los últimos años el consumo de aditivos químicos en los alimentos ha disminuido al evidenciarse el daño en la salud que generan, y como resultado, se ha incrementado el interés de investigar sobre el uso extractos de plantas, los cuales son ricos en compuestos fenólicos responsables de propiedades antioxidantes, antimicrobianas, colorantes, condimentarias entre otras; permitiendo utilizarse para mantener la calidad sensorial y prolongar la vida útil de alimentos, sin comprometer la salud del consumidor. Los objetivos de esta investigación consistieron en determinar el contenido de fenoles totales y el tiempo óptimo de extracción de los de extractos obtenidos por maceración de *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana* para lo cual se utilizó el método de Folin & Ciocalteu, y se construyó una cinética de extracción sólido-líquido utilizando como solvente etanol, el segundo objetivo consistió realizar una revisión que permita destacar la aplicación de plantas para incrementar la vida útil en alimentos cárnicos, para ello se realizó una revisión bibliográfica de artículos generados en bases las bases de datos de: PubMed, SCIELO, DOAJ y EL SELVIER. Como resultados se determinó que el tiempo óptimo de extracción fue de 25 y 30 minutos, con una cantidad de fenoles totales de 5,615 GAE/g muestra seca y 21,305

Palabras claves: Compuestos fenólicos, *Salmonella typhimurium*, *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana*.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los hábitos de consumo han cambiado, cada vez son más las personas que buscan alimentos con excelente calidad, los cuales tengan una vida útil extendida, pero, sin hacer uso de conservantes químicos los cuales tienen efectos adversos en la salud humana, al contener componentes cancerígenos, como el benzoato de Sodio, Nitratos y BHT [3]. Entre los alimentos mayormente consumidos dentro de la dieta alimenticia humana se encuentran los productos cárnicos al ser una fuente importante de nutrientes, tales como vitaminas (tiamina, niacina, riboflavina, B12 y B6), minerales (hierro, magnesio, fósforo, potasio y zinc), y aminoácidos [4]. Sin embargo, estos alimentos están expuestos a contaminación bacteriana y oxidación [4].

En relación con lo mencionado, uno de los alimentos cárnicos con mayor contaminación bacteriana y una corta vida útil es la carne de aves de corral, dado que, son un producto alimenticio altamente perecedero que proporciona un medio casi perfecto para el deterioro por el crecimiento de

microorganismos patógenos, uno de estos microorganismos, es la denominada *Salmonella typhimurium*, que ha sido identificado como uno de los principales agentes etiológicos responsables de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos [1].

Por esta razón, muchas investigaciones en la actualidad se enfocan a la búsqueda de alternativas en las que se utilicen extractos de plantas vegetales como aditivos que permitan mantener las características organolépticas de los alimentos cárnicos, con baja presencia de agentes etiológicos [2]. Sin embargo, las plantas endémicas y autóctonas presentes en la región nariñense, tienen propiedades antimicrobianas que son escasamente utilizadas y poco conocidas, varias de ellas están en peligro de extinción, por ende, la escasez de la documentación y la falta de difusión y divulgación de los conocimientos tradicionales, científicos y tecnológicos disponibles conllevan a su escaso aprovechamiento [3].

Entre estas plantas, se destaca el limoncillo (*Cymbopogon citratus*) que es una hierba perenne, perteneciente a la familia de las poaceae. Es reconocida como una de las plantas medicinales más usadas en América Latina, por sus múltiples usos antimicrobianos y su agradable aroma a limón [5] en la hoja del limoncillo se han identificado algunos compuestos antioxidantes entre los cuales están: isoorientina 2-O-ramnósido, isoorientina y swerorriajaponina este último con mayor capacidad antioxidante otra planta también conocida por estas propiedades antimicrobianas es el achiote (*Bixa orellana*), la cual pertenece a la familia Bixaceae, de género *Bixa* y de especie: *orellana*, es un árbol o arbusto de una altura máxima de 3 a 8 metros, tiene hojas ovadas o acorazonadas lisas y puntiagudas con una flor hermafrodita y fruto en capsula espinosa, que encierra las semillas en su interior y que son de color rojizo, en las hojas de esta planta se encontraron los flavonoides como; (apigenina, hipoaetina y cosmosiina), diterpenos (farnesilacetona, geraniol y geraniol formato), y un derivado sesquiterpénico, alcaloides, asteroides, fenoles, taninos pirogálicos, antraquinonas, cumarinas fijas, aceites esenciales y ácido gálico [6].

Teniendo en cuenta el contexto anterior, en esta investigación estuvo enfocada en determinar el contenido de fenoles totales y el tiempo óptimo de extracción del limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y achiote (*Bixa orellana*) obtenidos por maceración y finalmente, realizar una revisión sobre el uso de extractos vegetales para incrementar la vida útil en alimentos cárnicos.

II. DESAROLLO DE CONTENIDO

A. *Recolección, limpieza y secado del material vegetal*

Las plantas de *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana*, se utilizaron como materia prima para la cuantificación de fenoles totales, realizando un secado de dichas plantas a una temperatura de 45°C, para conservar la calidad de compuestos fenólicos.

B. *Obtención del extracto*

La obtención de los extractos se llevó a cabo con el equipo SHAKER modelo GS-30. Los parámetros empleados fueron: temperatura a 40°C, relación material vegetal solvente 1:40, a una agitación constante de 400 rpm, y el solvente fue una mezcla hidroalcohólica 50% V/V.

C. *Tiempo óptimo de extracción*

Se realizó la cinética de extracción, donde se tomó muestras cada 5 minutos durante tres horas, los extractos obtenidos fueron centrifugados y filtrados, luego se almacenaron en un medio de congelación a una temperatura de -18°C. Previo a la determinación, los extractos fueron descongelados, y se procedió a cuantificar los fenoles totales. Los datos obtenidos fueron empleados para graficar la curva de concentración (mg GAE/L vs tiempo).

D. *Cuantificación de fenoles totales*

Para cada extracto, se evaluó el contenido de fenoles totales utilizando el método publicado por Folin y Ciocalteu (1997), la reacción se realizó con 0,1 ml del extracto, 0,5 ml del reactivo de Folin - Ciocalteu y 1,5 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20 % P/V; aforando a 10 ml con agua

destilada. Después de dos horas se tomó lectura de absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro, luego se realizó una interpolación de los resultados con la curva de ácido gálico y se determinó el contenido de fenoles totales.

E. Preparación del inóculo

Luego de la obtención y conservación de la cepa de *Salmonella Typhimurium*, antes de realizar cada prueba se reactivó la cepa cultivada en caldo soya tripticasa por 18 a 24 horas a 37 ° C +/- 2 °C. Se tomó un inóculo del caldo y se sembró en Agar Müller Hinton. Con esto se logró obtener siempre bacterias frescas y libres de contaminación. Posteriormente, para lograr una estandarización del inóculo se utilizó la escala de Mc Farland, para lograr una cantidad de colonias que represente 3x10⁸ UFC/ml.

F. Preparación del corte cárnico de pollo

Las muestras de carne de pollo se sumergieron en agua hirviendo durante tres min, con el fin de reducir el número de microorganismos adheridos a la superficie. La superficie cocida se eliminó con cuchillos estériles en condiciones asépticas y posteriormente fueron triturados.

G. Incubación de Salmonella spp en el corte cárnico de pollo

Se usaron 25 gramos de la muestra de carne pollo picada esterilizadas en bolsas stomacher y se inocularon con la cepa *Salmonella typhimurium*, las cuales fueron homogeneizadas por un tiempo de dos minutos a temperatura ambiente, adicionalmente se agregaron 1,25, 1,5 y 2,5 ml de cada extracto por cada 100 gramos de la carne de pollo. Posteriormente las muestras se incubaron en cajas Petri y se analizaron en un periodo de 72 horas, registrando datos cada como pH y color cada seis horas.

III. RESULTADOS

A. Fenoles totales de *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana*

Tabla I

Curva de calibración de ácido gálico

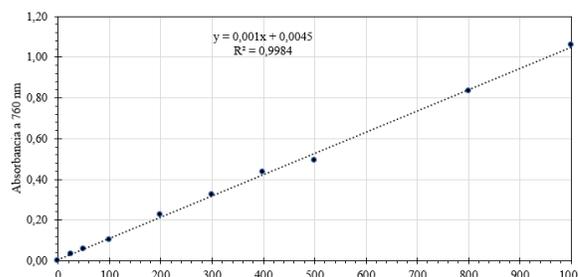
Concentración de ácido gálico (mg/L)	Absorbancia promedio
0	0,000 ± 0
25	0,033 ± 0,025
50	0,058 ± 0,013
100	0,105 ± 0,004
200	0,226 ± 0,020
300	0,324 ± 0,033
400	0,437 ± 0,019
500	0,493 ± 0,022
800	0,833 ± 0,013
1000	1,061 ± 0,044

Fuente: Elaboración de esta investigación.

Datos de absorbancia promedio de la curva de calibración de ácido gálico.

En Tabla 1 se muestran los datos de absorbancia promedio (tres réplicas) para la construcción de la curva de calibración de ácido gálico la cual se observa en la Figura 1, con un R² de 0,9984 lo cual permitió encontrar la Ec. [1] que permite relacionar el ácido gálico con los fenoles totales de cada muestra, siendo usado como patrón de referencia para la cuantificación de estos compuestos.

Figura 1
Curva de calibración de ácido gálico



Fuente: Elaboración de esta investigación.

$$[\text{Ácido gálico}] = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0045}{0,0010}$$

Ec. 1

B. Fenoles totales de *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana*

En la Tabla 2 y 3 se muestran los resultados de la cuantificación de fenoles totales de los extractos de

por el método de Folin-Ciocalteu, cuyos resultados se expresan en mg/L y GAE/g muestra seca, (mg/g), como se puede evidenciar en los el extracto hidro etanólico de *Bixa orellana* presentó una mayor cantidad de fenoles totales que *Cymbopogon citratus*.

Cymbopogon citratus tuvo un valor máximo recuperado de 5,79 GAE/g muestra seca lo cual corresponde a la investigación realizada por [7], que mencionan que encontraron este contenido fenólico en una extracción en caliente en un rango de 2.6 a 7.3 mgGAE/g dw lo cual corresponde a los resultados encontrados por esta investigación.

El valor final de los fenoles totales para *Bixa orellana* fue de 21,44 GAE/g muestra seca el cual fue menor a lo reportado por esto surgió a muchos factores entre los cuales se encuentran las características edafoclimáticas las cuales varían dependiendo del lugar de cultivo [8], así como los solventes utilizados que según la investigación realizada por [8], que utilizan ácido fórmico metanol los disolventes tales como metanol o etanol tienen una significativamente menor polaridad en comparación con el agua y esto favorece la solubilidad y difusión de los compuestos, sin embargo, utilizar estos disolventes con alta pureza puede causar un colapso en las células como la desnaturalización de las proteínas, haciendo que se dificulte la extracción de los fenoles [8], por su parte, también estos compuestos se ven afectados por la preparación como secado y disminución de partícula ya que para que se produzca una extracción eficaz, el disolvente debe entrar en contacto con los analitos objetivo de esta manera el tamaño de partícula y el secado son factores determinantes.

Tabla 2
Fenoles totales de *Cymbopogon citratus* mediante la cinética de extracción (40 °C, 400 rpm).

Tiempo (min)	<i>Cymbopogon citratus</i>	
	Concentración fenólica mg/L	Fenoles totales (mg/g muestra seca)
5	5,31 ± 0,000	0,17 ± 0,000
10	7,86 ± 0,070	0,23 ± 0,070
15	166,92 ± 0,003	5,23 ± 0,003
20	168,51 ± 0,003	5,26 ± 0,003
25	179,05 ± 0,003	5,59 ± 0,003
30	179,69 ± 0,000	5,62 ± 0,000
45	179,69 ± 0,000	5,62 ± 0,000
60	180,33 ± 0,003	5,65 ± 0,003
90	183,84 ± 0,003	5,74 ± 0,003
120	185,76 ± 0,003	5,79 ± 0,003

Fuente: Elaboración de esta investigación.

Tabla 3
Fenoles totales de *Bixa Orellana* mediante la cinética de extracción (40 °C, 400 rpm)

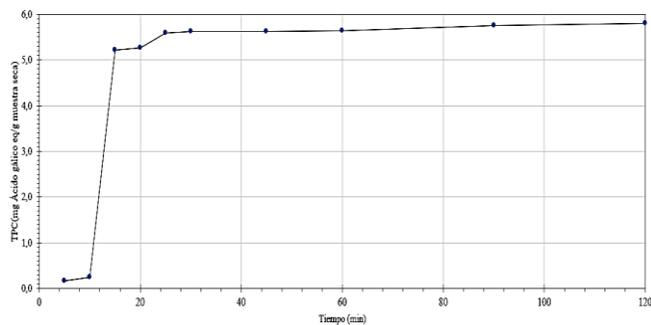
Tiempo (min)	<i>Bixa Orellana</i>	
	Concentración fenólica mg/L	Fenoles totales (mg/g muestra seca)
5	264,65 ± 0,004	8,27 ± 0,004
10	288,92 ± 0,003	9,03 ± 0,003
15	478,96 ± 0,001	14,97 ± 0,001
20	673,78 ± 0,001	21,06 ± 0,001
25	680,81 ± 0,000	21,28 ± 0,000
30	682,09 ± 0,001	21,32 ± 0,001
45	681,77 ± 0,000	21,31 ± 0,000
60	683,05 ± 0,001	21,35 ± 0,001
90	684,00 ± 0,001	21,38 ± 0,001
120	686,24 ± 0,002	21,44 ± 0,002

Fuente: Elaboración de esta investigación.

C. *Determinación del tiempo óptimo de extracción*

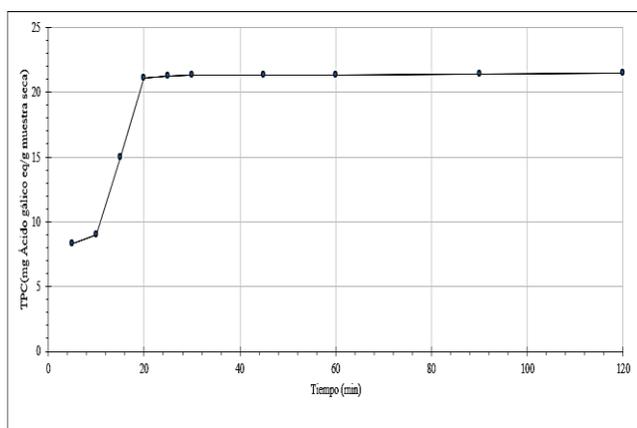
En la Figura 1 y 2 se muestra la cinética de extracción construida para *Cymbopogon citratus* y *Bixa orellana* en donde se puede observar que el gradiente de concentración de fenoles totales para el primer extracto se estandarizó a los 25 minutos y para el segundo a los 30 minutos, determinando que estos son los tiempos óptimos de extracción.

Figura 1
Cinética de extracción de *Cymbopogon citratus*



Fuente: Elaboración de esta investigación

Figura 2
Cinética de extracción de Bixa orellana



Fuente: Elaboración de esta investigación

utilizando solvente a 50% etanol, relación material vegetal-solvente 1:30 y temperatura de 40°C.

En las anteriores gráficas se identificó una tendencia creciente durante los primeros 20 minutos, en donde posteriormente se estandarizó el contenido fenólico total, esto se presenta dado que, dentro de los 10 min a 25,67 min, existe el proceso comúnmente como “lavado” en el cual se puede extraer la mayoría de compuestos fenólicos después de este tiempo el contenido de fenoles empieza a disminuir y cuando ya es mayor a 60 min se presenta una degradación de estos compuestos.

Extractos de plantas vegetales en alimentos cárnicos

Los alimentos cárnicos son de los más consumidos, sin embargo, son muy propensos al deterioro [8] dado por factores como el tipo de especie animal, manejo ante y post-mortem, higiene durante la manipulación,

pH de la carne, temperatura ambiente, y el empaque. De esta forma, la proliferación de microorganismos lipolíticos y/o proteolíticos alteran la composición de la carne y pueden generar productos de oxidación, y metabolitos microbianos provocando reacciones indeseables que deterioran el sabor, olor, color, propiedades sensoriales y de textura [8].

En relación a esto se muestra el auge de firmes movimientos en busca de la naturalidad promoviendo el uso de extractos vegetales, al poseer propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

Propiedades antioxidantes de extractos de plantas

Entre los estudios llevados a cabo en los últimos años, se ha prestado mucha atención al uso de extractos y aceites como antioxidantes y antimicrobianos naturales en la carne y los productos cárnicos, incluidos los aspectos normativos sobre la sustitución de antioxidantes sintéticos por ingredientes naturales en este sentido la eficacia demostrada de los antioxidantes naturales, ya sea en forma de extracto puro o en mezcla, para retardar la oxidación de lípidos, el color y el deterioro del sabor en los productos cárnicos ha estimulado un amplio interés [8].

Se han identificado varios compuestos con actividad antioxidante en extractos de plantas, en el que los compuestos fenólicos se consideran como el principal grupo activo. Generalmente, eso se atribuye a que los extractos naturales son muy susceptibles de ser oxidados, y es por esto que impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación debido a los diversos grupos hidroxilos presentes en el o los anillos aromáticos siendo importantes agentes antioxidantes.

Propiedades antimicrobianas de plantas

Cada vez, más investigaciones confirman el uso estos extractos como antimicrobianos naturales. Generalmente, el mecanismo de acción de estos en los microorganismos como ocurre con otros compuestos fenólicos, consiste en perturbar la membrana citoplásmica y alterar la fuerza motriz del protón, interfiriendo transporte activo y coagulación del contenido celular.

En este sentido se puede observar en la **tabla 1**. varios extractos de plantas que al ser adicionados benefician a alimentos cárnicos.

Balzan, et al. (2017) utilizaron fenoles purificados de las aguas residuales de aceite de oliva en salchichas crudas y salchichas cocidas, lo que resultó en una reducción significativa de varios marcadores de oxidación, manteniendo así la aceptación sensorial general. Mediante combinaciones con otros compuestos, también se han demostrado resultados esperados como el realizado por [8] que desarrollaron una mezcla de extractos de quitosano y menta, que juntos impartían propiedades antioxidantes y antimicrobianas, extendiendo la vida útil de la carne y los productos cárnicos

En cuanto a la actividad antimicrobiana se destacan algunas investigaciones como la de [8] que la adición de aceites esenciales de orégano a una concentración del 0,7% proporcionó una actividad antimicrobiana en la carne de oveja picada contra *S. enteritidis*. Las pruebas in vitro detectaron la actividad antibacteriana del aceite de orégano contra *S. enteritidis* en alimentos como el pescado salado tradicional y el bacalao. También se han realizado investigaciones para descubrir la actividad antimicrobiana del aceite de clavo contra *L. monocytogenes* en el cordero picado. El aceite esencial de timol de tomillo en una concentración de 250-750 mg se utiliza en la carne fresca picada en combinación con el envasado en atmósfera modificada contra diferentes microorganismos y también aumenta la vida útil de la carne de vacuno [4].

En cuanto a la carne de pollo existen muchas investigaciones enfocadas a evaluar el efecto de las plantas en la vida útil de este alimento como es la de Zhang, Wu, Guo, (2016) que evaluaron los efectos antioxidantes y antimicrobianos de los extractos de clavo o romero, solos o combinados, en la pechuga de pollo fresca. sobre el pH, análisis microbiológico, color, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y análisis sensorial durante el almacenamiento a 4°C. Los valores de TBARS de las muestras de T-RO-CL fueron los más bajos entre las muestras. Encontrando como resultado que los extractos de especias son altamente efectivos contra

el crecimiento microbiano y la oxidación de lípidos y muestran potencial como antioxidante natural en carnes de pollo crudas.

Compararon extractos de semilla de uva y té verde con ascorbato de sodio en albóndigas de cerdo cocidas durante el almacenamiento refrigerado (4 ° C en envases aeróbicos durante 0, 4, 8, 12 y 16 días). El recuento viable total indicó un comportamiento irregular durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo, exhibieron una significativa actividad antimicrobiana [10].

Se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), ajo (*Allium sativum*), toronja (*Citrus paradisi*) y vinagre (acético), sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* (SE) en diferentes tipos de carne. Cortes de 1 cm³ de carne de pollo, res y cerdo fueron sumergidos por 30 s en solución con 10E⁶ UFC/mL de SE, sugiriendo los autores que el uso de agentes antimicrobianos naturales sobre la carne de pollo, res y cerdo, podría extender su tiempo de vida útil debido a su efecto de inhibición sobre el crecimiento de SE.

Por otro lado, también el aceite esencial de salvia se usa en una concentración del 0.3% en la carne picada en combinación con proteína de soja. Se usa romero o caoba china (500, 1000 y 1500 ppm) para aumentar la salchicha de pollo fresca [7].

Así mismo Chan, et al. (2014) informaron que el extracto acuoso desodorizado de canela (CinDAE) contenía un contenido total de fenólicos y flavonoides de 315,3 ± 35,4 mg GAE / gy 99,3 ± 9,6 mg de equivalentes de rutina (RE) / g, respectivamente. En comparación con las muestras de control, informaron que las bolas de pollo cocidas que contenían CinDAE tenían un período de inducción y enrojecimiento incrementado, mientras que sus valores de peróxido y TBARS fueron significativamente más bajos durante el período de almacenamiento a 8 ° C. Además, CinDAE no afectó negativamente la aceptabilidad sensorial del producto alimenticio y se encontró que su actividad antioxidante era comparable a la del ácido ascórbico. BHA y BHT (Chan et al., 2014).

Se evaluó la viabilidad de utilizar extracto de granada (PE) como conservante en productos cárnicos listos para el consumo. En comparación con la muestra de control, el PE impidió el crecimiento en la carne en 4,1 log UFC / g durante 46 días a 4 ° C. La reducción alcanzó 9,2 log UFC / g en el día 18 de almacenamiento, además determinaron que a una temperatura más alta disminuyó la inhibición.

IV Conclusiones

Los estudios y las investigaciones revisadas, permitieron identificar que dentro de los métodos con más ventajas para obtener extractos de plantas, son los métodos de ultrasonido y maceración en caliente, por un lado, el primer método, permite obtener un mayor rendimiento, esto dado por la fuerza cavitacional presentada en las moléculas vegetales, permitiendo una mayor recuperación de compuestos, y por su parte, el método de maceración en caliente combina variables como agitación y temperatura permitiendo una buena recuperación de compuestos fenólicos estos dos métodos comparados con los de microondas necesitan menor cantidad de energía, son fácil manipulación y menor costo, sin embargo, si el efecto es reducir el tiempo el método más efectivo es el de extracción asistida por microondas. Realizando una comparación entre las dos plantas estudiadas, el contenido fenólico total recuperado para *Bixa orellana*, fue mayor que *Cymbopogon citratus*, y a su vez este último presentó un menor tiempo óptimo de extracción, observando un gran potencial al poder relacionar con su contenido fenólico con diferentes propiedades beneficiosas de estas plantas, adicional a esto se mencionan que, parámetros como temperatura, método de extracción, secado, condiciones edafoclimáticas, entre otras; se deben tener en cuenta dado que influyen en la cantidad de fenoles recuperados.

Referencias

[1] M. Barreto, M. Ruiz, and P. Retamal “Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Revista chilena de infectología” 2016.

[2] F. Ali, N. Abdel, and E. Helmy “Improving the quality and extending life of chilled fresh sausages using natural additives and their extracts” 2018.

[3] H. Bernal, and C. Mesa “Plantas medicinales endémicas de Colombia” 2014.

[4] M. Ramirez, R. Vargas, B. Torres, and G. Torrecano “Plant leaf extracts for preserving the quality of fresh meat and meat products” 2018.

[5] J. Montoya, “Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Bixa orellana*” 2019.

[6] A. Mohamed, Y. Sallam, and E. Saffaa “Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods, Annals of Agricultural Sciences” 2012.

[7] A. Govaris, N. Solomakos, A. Pexra, and P. Chatzopoulou “The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage” 2010.

[8] N. Medina, T. Ayora, H. Espinosa, A. Sanches, and N. Pacheco “Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources” 2019.

[9] A. López, T. Díaz, M. Mejía, and E. Quintero “). Contaminación microbiológica de la carne de pollo en 43 supermercados de El Salvador” 2018.

[10] Y. Sanchez, M. Alvarado, M. Medinilla, and M. Leiva “Actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Agronomía Mesoamericana” 2007.