

Evaluación del efecto anitimicrobiano de la reuterina en cubiertas
comestibles en fresas

Tipo de financiamiento

Sin financiamiento

Autores del reporte técnico:

Yuridia Ortiz-Rivera
Jocelin Gabriela Hernández-Carillo
Emmanuel Orta-Zavalza
Susana Elizabeth González-Rodríguez

Resumen del reporte técnico en español

La fresa tiene un periodo de vida de anaquel sumamente corto (de 3 a 7 días), por lo que su deterioro durante el transporte es frecuente, ocasionando importantes pérdidas económicas. Como solución se han implementado diferentes estrategias como el uso de conservadores alimenticios, sin embargo, la utilización de sustancias químicas ha perdido popularidad y la tendencia mundial es optar por nuevas técnicas que sean inocuas para el consumidor, de tal forma que se produzcan alimentos menos procesados, saludables y con una vida de anaquel más extensa. El objetivo de esta investigación fue evaluar la vida de anaquel de fresas con cubiertas comestibles adicionadas con reuterina y aceite de limón en comparación con fresas sin recubrimientos. Además, las fresas se inocularon con un importante hongo de deterioro (*Penicillium spp.*) para evaluar la capacidad de la reuterina como antimicrobiano en las cubiertas comestibles. La realización de este proyecto incluyó la extracción de pectina a partir de cáscaras de naranja obteniendo un rendimiento de 15.33 %. La cubierta comestible con reuterina no afecta significativamente la calidad, por el contrario, mejoró el aspecto físico de la fruta. Finalmente, la cubierta comestible con reuterina logró la inhibición del hongo *Penicillium* hasta 2 ciclos logarítmicos con respecto al control y aunque las esporas estaban presentes no germinaron en las fresas con cubierta con reuterina lo que extendió la vida de anaquel hasta 27 días.

Resumen del reporte técnico en inglés

Strawberries has a very short shelf life about 3-7 days, due to that spoilage during transportation is frequent, that result in important economic losses. With the finality of preserve stawberries some strategies has been developed such as the chemical preservatives, however, utilization of chemicals in food has been lose popularity and actually people wants more natural foods, healthy and with extended shelf life. The aim of this proyect was to evaluate shelf life of stawberries with edible films added with reuterin and lemmon oil in comparison with stawberrries without edible films. Futhermore, stawberries were inoculated with spores of an important spoilage microorganism called *Penicillium spp.* to make possible the evaluation of reuterin efectivity as antimicrobial in

edible films. The development of this project includes the pectin extraction from orange peel, with a pectin yield of 15.33 %. Edible films with reuterin does not significantly affect quality of the fruit, in contrast, strawberries were observed more attractive. Finally, edible films with reuterin achieve the inhibition of *Penicillium* spp. growth up to 2 logarithmic cycles in comparison with control, although when spores were present never germinated and extended shelf life of strawberries up to 27 days.

Palabras clave: fresa, cubierta, pectina, biopreservación, reuterina

Usuarios potenciales

El desarrollo de nuevas técnicas de conservación de alimentos como la de este proyecto tienen el potencial de beneficiar a productores, comerciantes y al consumidor final, al poder tener alimentos más sanos y con una mejor vida de anaquel.

Reconocimientos

Los autores de este proyecto quieren agradecer al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por el apoyo para realizar este proyecto.

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Chihuahua no es productor de fresa, por lo que es necesario transportarla del interior de la república mexicana. Cinco estados destacan en la producción de esta fruta: Michoacán, Jalisco, Baja California, Puebla y el Estado de México (FIRA, 2016). Debido a

que la fresa tiene un periodo de vida de anaquel sumamente corto (de 3 a 7 días) (Boyer & McKinney, 2013; Harris & Mitchmam, 2007), el mayor problema por enfrentar es la conservación de la fresa durante el transporte hacia Chihuahua. El deterioro, es un punto crucial que tiene como consecuencia pérdidas económicas importantes; para solucionarlo se ha implementado el uso de conservadores de alimentos. Sin embargo, se busca proponer una alternativa al uso de productos químicos como conservadores, siendo la biopreservación una opción viable, debido al aumento en el interés de los consumidores hacia productos naturales, sanos y nutritivos que sean provechosos a la salud, existe una opción atractiva la cual es la utilización de microorganismos y productos derivados de ellos (Boyer & McKinney, 2013; Harris & Mitchmam, 2007). El uso de antimicrobianos en cubiertas comestibles ha sido una opción atractiva para evitar el deterioro por microorganismos en la fresa, ya que la tendencia mundial es evitar el uso de sustancias químicas como conservadores o el procesamiento de alimentos. Así mismo, el uso de la reuterina como bioconservador resulta ser una gran elección ya que tiene un alto potencial como conservante de alimentos debido a sus características químicas y su actividad antimicrobiana contra los patógenos transmitidos por los alimentos, microorganismos de deterioro y bacterias de descomposición (Schillinger, Geisen & Holzapfel, 1996). En este proyecto se pretende evaluar el efecto antimicrobiano de la reuterina utilizada en cubiertas comestibles en fresas para la inhibición del principal microorganismo de deterioro (*Penicillum spp.*). Existe bastante información acerca de cubiertas adicionadas con antimicrobianos aplicadas en diferentes frutos. Sin embargo, para nuestro conocimiento, existen escasos estudios específicos en fresas o el empleo de ruterina en cubiertas comestibles. El estudio va dirigido a los productores de fresa como una alternativa para evitar el uso de conservadores químicos. Por ello, este proyecto se basa en proponer el desarrollo de una cubierta comestible que no afecte la calidad, pero alargue la vida de anaquel de las fresas. Beneficiando a los productores y comerciantes que son los principales afectados por el deterioro y de manera secundaria, al consumidor final.

2. PLANTEAMIENTO

Fresa

La fresa es una planta que pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoideas y género *Fragaria*. Las principales variedades comerciales de la fresa se han derivado del producto del cruce entre la especie *Fragaria virginiana*. Su origen tiene en Norteamérica, con la especie *Fragaria chiloensis*. Y se caracterizan por poseer frutos de mayor tamaño que las especies originales, son frutas más jugosas, sin embargo, son menos aromáticas que las especies originales; poseen flores hermafroditas y descendencia fértil, lo cual explica la razón por la que se convirtieron en el origen de las variedades modernas. En la actualidad esos híbridos se encuentran clasificados como *Fragaria X ananassa* Duchesne o *Fragaria ananassa*. La fresa es una fruta de extensa distribución mundial, y los principales países productores son Estados Unidos, Italia, Japón, Polonia, México, URSS, Francia y el Reino Unido.

Factores que influyen en el crecimiento de la fresa

El desarrollo de la fresa se ve altamente influenciado por la temperatura, la luminosidad y la duración del día (fotoperiodo y termoperiodo). La temperatura óptima es de 14 °C y necesita 12 horas de luz para lograr su producción. Las temperaturas excesivamente altas provocan un crecimiento vegetativo exuberante con deterioro de la floración. Si los días son cortos, se estimula la formación de flores y disminuye la formación de estolones. Igualmente, la intensidad lumínica es determinante para el contenido de azúcares; la excesiva precipitación acompañada de humedad, así como noches con altas temperaturas, afectan de manera negativa el sabor de los frutos (Cockrell & Sancho, 1998).

Cultivo de fresa

Las fresas comerciales (*Fragaria x. Ananassa* Duch.) se cultivan con éxito en una amplia gama de climas, incluidos templado, mediterráneos, y subtropicales, así como diferentes ecosistemas, pastizales y taiga. Sin embargo, la mayor parte de la producción actual se limita a climas templados y mediterráneos ubicados entre las latitudes 28 y 60. En estas áreas, las temperaturas medias de mediados de verano en julio oscilan entre 15 y 30 °C, con

máximas medias de verano de 20 a 40 °C. Las temperaturas medias de mediados de invierno en enero oscilan entre 15 y -20 °C, con mínimas medias de hasta -40 °C (Galletta & Bringham, 1990; Hancock & Luby, 1995). Al cultivar fresas en ambientes cálidos, se debe prestar atención a los patrones de temperatura y fotoperíodo en toda la temporada, no sólo en el verano. La fresa está compuesta de varios meristemos diferentes que están regulados por la interacción entre el fotoperíodo y la temperatura (Darrow, 1966; Durner y Poling, 1988; Guttridge, 1985; Larson, 1994). La fresa crece erguida a través de estructuras especializadas llamadas coronas, pero también tiene brotes axilares en la base de cada hoja que pueden formar inflorescencias, corredores o permanecer dormidos dependiendo de las señales ambientales que recibe. El desarrollo de la hoja y el crecimiento de la raíz también están fuertemente regulados por la temperatura. Existen pocos cultivares que estén específicamente adaptados a temperaturas muy superiores a 30 °C, pero el calor del verano se puede evitar mediante el uso de cultivares adaptados a los sistemas de siembra de otoño e invierno. Al igual que con cualquier otro cultivo, con las fresas, si se desea obtener una cosecha abundante es necesario sembrar una semilla de calidad. Las plantas de fresa son propagadas por medio de estolones, que son aquellos frutos que nacen de la planta madre, cuyo desarrollo se ve influenciado por horas luz y temperatura. No todas las variedades de la fresa producen la misma cantidad de estolones, pues existen grandes diferencias en la forma en que reaccionan con el medio ambiente. Es necesario que el lugar en que se establecerá la producción de estolones sea seleccionado con cuidado, intentando que el suelo sea suelto y cuente con un alto grado de fertilidad y libre de malas hierbas, así como estar aislado mínimo un kilómetro de distancia de otros cultivos comerciales. Para lograr una producción alta de plantas sanas, es fundamental contar con un suelo con alto nivel de fertilidad, la cual depende de las condiciones en que el suelo se encuentre y de los cultivos previamente sembrados. La época de siembra se da durante los meses de febrero y marzo. Los riegos se deben realizar de manera frecuente principalmente cuando los estolones comienzan a formarse. Para los cultivos de fresa, es recomendado un regado por aspersión y no es necesario realizar tablones, además, los surcos deben establecerse en distancias de 1 a 1.5 metros y entre plantas con una distancia de 1 metro. El espacio suficiente facilita las labores del cultivo y por lo tanto, se logra un crecimiento mucho más favorable para el desarrollo correcto de las raíces de los estolones. La frecuencia del riego de las plantas

depende del tipo y del drenaje de los suelos y es sumamente importante el cuidado de los riegos para evitar que exista deficiencia o exceso de humedad. La fruta está lista para la cosecha 4-6 semanas después de la floración y la cosecha puede durar hasta 3 semanas. (Guillen & Atlee, 1990).

Vida de anaquel

La temperatura perfecta de almacenamiento de las fresas en el hogar es de 0 a 2 °C. Las fresas maduras pueden almacenarse en el refrigerador aproximadamente de entre 3 a 7 días en condiciones óptimas, sin embargo, la vida útil también depende de la madurez de la fruta cuando se compra o es recolectada (Boyer & McKinney, 2013; Harris & Mitchmam, 2007). La fresa cuenta con una epidermis turgente y una elevada tasa de respiración lo que la hacen susceptible a daños mecánicos y a la invasión de algunos microorganismos de deterioro, por esto, es necesaria la utilización de tratamientos fungicidas para evitar pérdidas económicas (Abdelfattah et al., 2016; Fraire et al., 2003).

1.1.4 Microorganismos de deterioro en fresa

Los hongos y pseudohongos que han sido encontrados en postcosecha de fresa son *Aspergillus niger*, *Podosphaera aphanis*, *Botrytis cinerea*, *Mucor* spp., *Phytophthora cactorum*, *Colletotrichum acutatum*, *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora fragariae* var., *Pestalotia longisetula*, *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae*, *Verticillium albo-atrum* y *Penicillium* sp. (Agrios, 2005; Maas, 1998; Sharon, 2007).

1.2 *Penicillium* spp

Penicillium es uno de los hongos de deterioro más comunes que crecen sobre las frutas y hortalizas, la importancia que tienen estos mohos en la alimentación humana y animal está dada por su capacidad de causar deterioro y producir toxinas (Pitt & Leistener, 1991). Cuando encuentra las condiciones óptimas para su crecimiento, como actividad del agua y nutrientes necesarios, es un hongo con suma persistencia y de difícil eliminación. Tiene la capacidad de crecer sobre alimentos preparados o sus materias primas ya sean de origen animal o vegetal (Carrillo, 2003). Debido a las pérdidas económicas que representa el deterioro de la fresa, se han desarrollado estrategias para mejorar su conservación, como tratamientos de agua caliente, control de atmósferas, luz ultravioleta. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos tienen efectos adversos sobre el color, sabor, aroma y textura

(Sallato et al., 2007), por estas razones, es necesario realizar investigaciones acerca del uso de cubiertas comestibles.

Cubiertas comestibles

Las cubiertas comestibles se definen como capas delgadas de material comestible y biodegradable aplicada a un alimento que actúan como una barrera en contra de los diferentes factores externos como: humedad, vapor, aceite, entre otros, de esta manera, son auxiliares para la protección del producto y prolongación de vida de anaquel (Krotcha & De Mulder-Johnston, 1997). Los revestimientos comestibles son una tecnología amable con el medio ambiente que se aplica a muchos productos para controlar la transferencia de humedad, el intercambio de gases o los procesos de oxidación (Dhall, 2013). Estos recubrimientos deben ser legales, seguros para su consumo, aceptables para los consumidores y deben proporcionar valor agregado al alimento (Baldwin, Hagaenmaier & Bai, 2012). Las cubiertas comestibles involucran la formación de una estructura del polímero directamente en la superficie del objeto que se pretende proteger o mejorar de alguna manera, de este modo, las cubiertas llegan a ser parte del producto y permanecen en el mismo durante su uso y consumo (Krochta & De MulderJohnston, 1997).

Ventajas de las cubiertas

Algunas ventajas importantes del uso de películas y recubrimientos comestibles son que varios ingredientes activos se pueden incorporar en la matriz del polímero y el consumo con los alimentos, mejorando así la seguridad o incluso los atributos nutricionales y sensoriales, retrasan la tasa de respiración y la pérdida de clorofila, reducen las tasas de metabolismo y oxidación, asimismo reducen la utilización de envases sintéticos, retardan la producción de etileno, 8 proporcionan un mejor atractivo para el consumidor, además de retener color, ácido, azúcares y compuestos de sabor (Dhall, 2013).

Composición de las cubiertas

La composición de las cubiertas comestibles es sumamente variada. Pueden contener ingredients como nutrimentos adicionales, agentes antioxidantes, compuestos

antimicrobianos, entre otros, adicionados con la finalidad de incrementar la calidad del producto. Los revestimientos comestibles frecuentemente están hechos de uno o una combinación de sustancias como lípidos, polisacáridos y proteínas. Además, los plastificantes, como alcoholes polihídricos, ceras y aceites, son incorporados para mejorar la flexibilidad y la elongación de sustancias poliméricas (Gennadios & Weller, 1990; Velázquez & Beltrán, 2015). La adición de agentes surfactantes y emulsionantes producen una reducción en la actividad de agua superficial y la tasa de pérdida de humedad en productos alimenticios (Roth & Loncin, 1984). De la misma forma, se le añaden agentes de liberación y lubricantes para evitar que los alimentos recubiertos se adhieran, estos pueden incluir grasas y aceites, emulsionantes, vaselina, polietilenglicol y silicona. Los recubrimientos a base de lípidos están hechos de ceras y aceites, como cera de parafina, cera de abeja, carnauba, candelilla, aceite mineral, vegetal, monoglicéridos acetilados, ácido esteárico, ácido láurico o ésteres de sacarosa de ácidos grasos. Estos recubrimientos son generalmente barreras efectivas contra la humedad, mientras que las que contienen resinas (goma laca, madera colofonia, resina de cumarona-indeno) son más permeables al vapor de agua que los lípidos, pero menos que algunos recubrimientos hechos a base de polisacáridos (Hagenmaier & Shaw, 1990). Estos materiales son ampliamente utilizados en frutas y vegetales enteros. Algunos lípidos y la mayoría de los revestimientos a base de resina pueden originar condiciones anaeróbicas a temperaturas de almacenamiento más altas, esto debido a la baja capacidad de permeabilidad al gas (Hagenmaier & Shaw, 1992), además de no adherirse a superficies hidrofílicas. Las proteínas como la caseína, la gelatina, soja, zeína, albúmina de huevo, entre otras, forman películas y se adhieren a superficies hidrofílicas, sin embargo, en la mayoría de los casos, no tienen la capacidad de resistencia a la difusión del vapor de agua (Gennadios & Weller, 1990). Las cubiertas constituidas por polisacáridos como lo son la celulosa, pectina, almidón, alginatos, quitosano, carragenano, gomas, etcétera, son generalmente buenas barreras de gas y se adhieren bien para cortar superficies de frutas o vegetales, a pesar de esto, poseen una naturaleza hidrofílica lo que los hace deficientes como barreras contra la humedad (Kester y Fennema, 1988). Las cubiertas comestibles a base de pectina han probado ser las cubiertas con mejores propiedades organolépticas. (Nápoles et al., 1997; Oms-Oliu et al., 2008; Rhoades & Roller, 2000).

Pectina

El uso de la pectina se ha aplicado a cubiertas comestibles, ya que los revestimientos comestibles obtenidos a partir de pectina y derivados (pectato y pectina amidada) se han propuesto recientemente en aplicaciones relacionadas con alimentos, ya que muestran una excelente capacidad de conservación de alimentos puesto que funciona como barrera al oxígeno y al aceite, preservación del aroma y buenas propiedades mecánicas, sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, no son efectivas contra la transferencia de humedad (Ciolacu et al., 2014).

Uso de la pectina en cubiertas comestibles

Los recubrimientos comestibles a base de pectina contribuyen a reducir la humedad y aumentar firmeza en las frutas, también se ha demostrado que la 10 pectina mantiene atributos de calidad mejores en comparación con las muestras recubiertas con otros compuestos como el alginato, sin afectar su sabor. Las cubiertas comestibles de pectina también se han estudiado por su capacidad de retardar la migración de lípidos y pérdida de humedad, y para mejorar la apariencia y el manejo de los alimentos (Jandric et al., 2008; 2000; Mariniello et al., 2003; Zaleska et al.). Sin embargo, la naturaleza hidrofílica de la pectina no inhibe el crecimiento por hongos por eso es importante agregar un antimicrobiano natural.

Biopreservación

La preservación de alimentos ha sido uno de los mayores desafíos para los humanos. El descubrimiento del salado, ahumado, el secado de alimentos, así como la realización de conservas, la refrigeración y congelación han hecho posible que los alimentos se encuentren disponibles para el consumo durante un mayor tiempo, sin embargo, hoy en día, sigue siendo una lucha. Es por ello, que actualmente se están buscando alternativas que favorezcan a una prolongada vida de anaquel para los alimentos. La biopreservación se refiere a la utilización de sustancias naturales para producir una vida de almacenamiento

prolongada y la seguridad mejorada de los haciendo uso de la microflora natural, como lo son las bacterias ácido – lácteas, y/o sus productos antibacterianos; y combina el potencial antimicrobiano de los microorganismos naturales en los alimentos y / o sus metabolitos con un largo historial de uso seguro (García et al., 2010).

Bacterias ácido-lácticas

Los microorganismos a menudo viven en ecosistemas complejos donde deben interactuar con los componentes bióticos y abióticos para poder sobrevivir, lo que ha conllevado a su desarrollo evolutivo de diferentes maneras como la competencia por nutrientes y espacio, la especialización metabólica, la diferenciación celular, entre otros. Una de las estrategias más comunes para defender el espacio territorial de la población microbiana es el amensalismo o antagonismo, el cual está basado en la modificación del medio ambiente mediante la liberación de sustancias tóxicas, o creación de condiciones que inhiben el crecimiento o incluso matan a los competidores. Las bacterias son capaces de liberar una variedad de sustancias antimicrobianas como producto de su actividad metabólica normal. También pueden producir armas antimicrobianas más específicas codificadas por determinantes genéticos destinados a combatir otros microorganismos. Los productos metabólicos, así como los péptidos antimicrobianos de las bacterias ácido - lácticas (LAB), han atraído una gran atención para la biopreservación de los alimentos. Al estar presentes de forma natural o intencional en las fermentaciones de alimentos, las bacterias ácido-lácticas se consideran por sí mismas como conservantes naturales, así como fábricas de antimicrobianos naturales para la biopreservación de alimentos. Otros grupos bacterianos (especialmente los del género *Bacillus*) también están atrayendo la atención debido a la diversidad de péptidos antimicrobianos que producen, algunos de los cuales también podrían explotarse como bioconservantes (Galvárez et al., 2014) Varias especies de *Lactobacillus*, incluidos aquellos que habitan en el sistema gastrointestinal de los humanos y otros animales, producen proteínas bactericidas denominadas bacteriocinas. Se ha demostrado que estos lactobacilos también son capaces de producir sustancias antimicrobianas con características únicas y de bajo peso molecular (Axelsson et al., 1988; Klaenhammer, 1988). Los agentes antimicrobianos son sustancias activas o preparaciones

que contienen una o más sustancias activas, que se utilizan con la intención de destruir, impedir, prevenir la acción o ejercer un efecto controlador de algún 12 microorganismo perjudicial, por medios químicos o biológicos (Quintavalla, 2002; Trejo, 2004).

Lactobacillus reuteri

Algunas de las especies de *Lactobacillus* son miembros de la microbiota intestinal de aves y mamíferos. Dado que se cree que varias especies intestinales de *Lactobacillus* desempeñan papeles biológicos beneficiosos para los huéspedes, se usan ampliamente como probióticos. Los efectos más importantes incluyen la protección contra los patógenos, así como diversos efectos fisiológicos (Holzapfel et al., 1998). *Lactobacillus reuteri* también se considera un importante probiótico porque algunas cepas de Lb. reuteri tienen varios efectos beneficiosos para los organismos hospedadores, incluidos los efectos protectores contra patógenos como *Salmonella*, *Cryptosporidium* y rotavirus. Además, es capaz de producir bacteriocinas y antimicrobianos, tales como la reuterina (Edens, Parkhurs, Casas & Dobrogosz, 1997; Alak, Wolf, Mdurvwa, Pimentel-Smith, Adeyemo, 1997; Chen, Sung, Liang, Chang, 2002).

Reuterina como bioconservador

La reuterina es un producto de bajo peso molecular, no proteico, altamente soluble y de pH neutro producido por las especies *Lactobacillus reuteri*. La reuterina ha sido descrita como un agente antimicrobiano con un amplio espectro, el cual es activo contra ciertas bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras, hongos y protozoarios. Algunos microorganismos de importancia para la salud pública que son inhibidos por la reuterina son *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Trypanosoma*. Los lactobacilos productores de reuterina pueden tener aplicación en la conservación de alimentos humanos y animales, al reducir la carga de microorganismos y el deterioro de los mismos (Schillinger, Geisen & Holzapfel, 1996; Chen, Sung, Liang & Chang, 2002).

3. METODOLOGÍA

Obtención de pectina.

Se pesaron y picaron tres muestras de 35 g de cáscara de naranja en una balanza analítica (Analytical balance®, mod. VE-210) para posteriormente depositarlas en un recipiente y se calentaron durante 1 minuto con el uso de un microondas (Daewoo®). Se le agregaron 105 mL de agua destilada y se licuaron en un procesador de alimentos (NutriBullet®, mod. 600 series) hasta obtener una pasta homogénea. Luego, se vertieron 160 g de la mezcla preparada en un matraz Erlenmeyer y se adicionó HCl (0.1N, HYCEL®) ajustando hasta alcanzar un pH ácido de 2 con un potenciómetro (Hanna Instruments®, mod. HI8424). 2.2 Purificación de pectina. Una vez ajustado el pH de la solución, se sometió a calentamiento a una temperatura de 85 °C en la platina (Corning®, mod. PC420D) durante 1 h en agitación constante, posteriormente se filtró a través de 6 capas de manta de cielo y se vertió en frascos, posteriormente, se añadió una proporción de 1.5 volúmenes de etanol absoluto (99%, AZ®), las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio en un refrigerador (Whirlpool®, mod. WT1818A) a temperatura de 2 a 4 °C, por un lapso de 24 horas. La pectina obtenida se depositó en vidrios reloj y se dejó secar a 50 °C en horno (Fisher Scientific®, mod. Isotemp 637G) durante un periodo de 24 horas. Terminado el proceso de secado, las muestras se pesaron, pulverizaron y se almacenaron a temperatura ambiente en envases de plástico.

Producción reuterina.

La producción de reuterina se logró siguiendo un proceso de dos pasos descrito por Doleyres et al., (2005). Un stock congelado de una cepa de *Lb. reuteri* ATCC 53608 se inoculó al 1% en caldo MRS (Man Rogosa and Sharp, Agar Sigma-aldrich®) y se incubó (Incubadora VWR 16 International®) a 37°C por 15 h, manteniendo el pH a 5.5 usando NaOH (5M, Alfa Aesar®). Las células fueron recolectadas por centrifugación a 1, 500 x g por 10 minutos a 20 ° C (Centrífuga 5430R Eppendorf®) después de la incubación y se lavaron dos veces con búfer fosfato de potasio (0,1 M, pH 7, Golden Bell Reactivos®). Las

células obtenidas del procedimiento anterior fueron suspendidas en solución de glicerol 200 mM e incubadas a 37°C durante 120 min para la producción de reuterina. Para recuperar la reuterina, la suspensión celular se centrifugó a 12,000 x g por 20 min a 4°C para obtener el sobrenadante que es donde se encuentra la reuterina.

Elaboración de la cubierta con reuterina.

Las soluciones de los diferentes tratamientos para los recubrimientos se prepararon en una proporción de pectina al 3% (p/v) con agua destilada (95%) y glicerol grado alimenticio (DEQ®) en proporción del (p/v) 1.5% para el tratamiento 1. Para los tratamientos 2 y 3 se siguió el mismo procedimiento, añadiendo aceite de limón (Productos del Roble®) 2% y tween (Sigma Aldrich®) 0.75%. Todos los tratamientos se sometieron a calentamiento a una temperatura de 85 a 90 °C hasta su completa solubilización. Las soluciones se dejaron enfriar a 25°C y posteriormente, se añadió la reuterina en concentración de 10 mM al tratamiento 3. Las soluciones se homogenizaron hasta lograr una emulsión, para posteriormente, almacenarlas en un frasco estéril.

Desinfección de las fresas.

Se seleccionaron las fresas (Discroills®) en condiciones óptimas, es decir, sin daño mecánico o ablandamiento. Se lavaron sumergiéndolas 5 veces en agua jabonosa, con 38 g de detergente (Eficaz, Pinol®) en 19 L de agua purificada (Alaska®) seguido de esto, se enjuagaron bajo agua corriente hasta eliminar el jabón en su totalidad. Luego, se eliminó el exceso de agua de enjuague y se colocaron en 19 L de agua purificada con desinfectante a base de plata coloidal (Members Mark®) en las cantidades sugeridas por el proveedor, durante 15 min. Pasado el tiempo, se retiraron las 17 fresas del desinfectante y se dejaron secar a temperatura ambiente en una superficie con papel canela. 2.6 Aplicación de las cubiertas. Las fresas se inocularon por inmersión con el hongo *Penicillium* sp. a una concentración de 3.36×10^7 unidades formadoras de esporas cuantificadas previamente en cámara Neubauer, después se dejaron secar por completo en un lapso de 30 min. aproximadamente. El recubrimiento para los tratamientos 1, 2, y 3 se colocó al introducir la

fresa en la solución correspondiente durante 2 minutos para posteriormente esperar 40 min hasta su completo secado. Para las muestras control, sólo se inocularon con el hongo y no fue aplicado recubrimiento, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente por un lapso de 40 min. Todos los tratamientos se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 2 a 4 °C para el análisis que fue realizado semanalmente durante 1 mes, utilizando el macerado de una fresa por triplicado por cada tratamiento.

Análisis microbiológico durante la vida de anaquel.

Las fresas fueron maceradas y posteriormente se realizaron diluciones colocando 1 g del macerado en 9 mL de agua inyectable y a partir de esta solución se realizaron diluciones seriales. Cada dilución se cultivó en agar utilizando la técnica de extensión de placa y se incubó durante un lapso de 72 h para cuantificar el crecimiento. El análisis se realizó comenzando en el día 0 y se continuó analizando en los días 6, 13, 20 y 27.

4. RESULTADOS

Extracción de pectina

Una vez realizadas múltiples extracciones del polisacárido, se obtuvo un rendimiento promedio de $15.33 \pm 2.53\%$. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores con métodos de extracción y/o condiciones similares. En el estudio de Shakirah en 2007 se reporta un porcentaje de rendimiento que va del 10.10% al 15.20%. Del mismo modo, Casas Orozco, Villa, Bustamante, & González, (2015) observaron un rendimiento de 16.7% en pectina extraída a partir de cáscara de naranja. Un valor ligeramente mayor (18.32%) se reportó bajo condiciones similares (pH=2) pero con el doble de tiempo (2h), a partir de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* L. osbeck) (t=2h; pH=2, 2 volúmenes de etanol) (Boukroufa, Boutekedjiret, Petigny, & Rakotomanomana, 2015).

La pectina también se ha extraído de residuos de otros cítricos como cáscara de citrón (*Citrus medica*) (Pasandide, Khodaiyan, Mousavi, & Hosseini, 2017) y de mandarina (*Citrus reticulata*) (Wang, Chen, & Lü, 2014), con rendimientos de 5.94-20.0% y 19.21-21.95%, respectivamente. Con esto se muestra una alternativa para la utilización de

subproductos de la industria agroalimentaria como fuente para la extracción de pectina, que de otra manera pueden representar un problema de contaminación ambiental.

Análisis microbiológico

En el análisis microbiológico se realizó una comparación entre los diferentes tratamientos para evaluar la efectividad de las cubiertas y de la reuterina durante la vida de anaquel de la fresa y determinar la capacidad para inhibir el crecimiento del hongo *Penicillium spp.* Durante la evaluación durante un período de 27 días y con frecuencia semanal se observó que el tratamiento con reuterina (T3) presentó una disminución en el número de esporas del hongo *Penicillium sp.* en comparación del control (Figura 1).

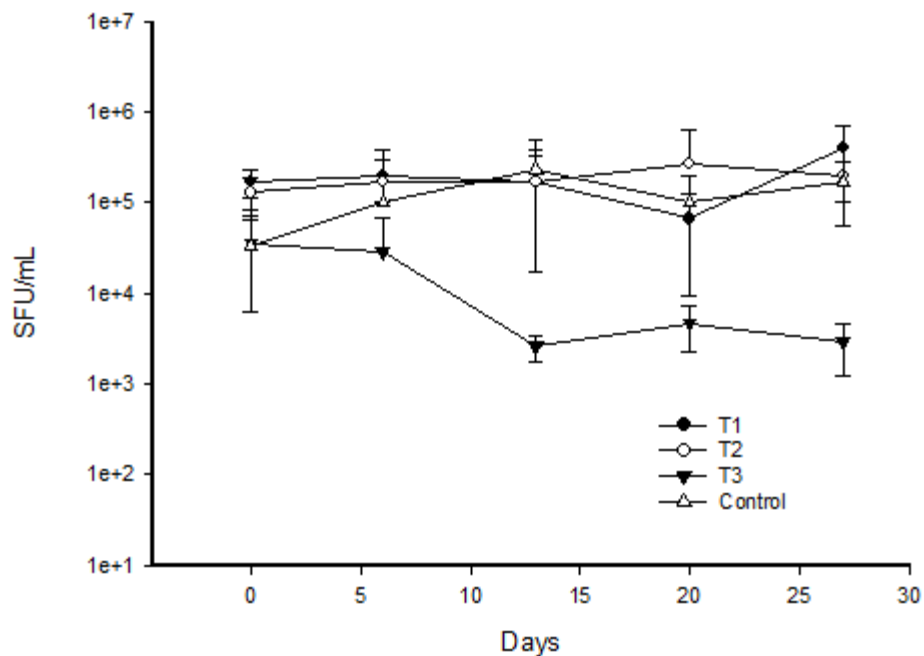


Figura 1. Crecimiento de *Penicillium sp.* en fresas control y con recubrimientos comestibles de pectina durante su almacenamiento en refrigeración (T1: Pectina; T2: Pectina + Aceite esencial de limón; T3: Pectina + Aceite esencial de limón + Reuterina; SFU: unidades formadoras de esporas).

Como se puede observar en la Figura 1, la reuterina en el tratamiento 3 (T3) fue capaz de disminuir 2 ciclos logarítmicos el número de esporas de *Penicillium sp.* lo que significa que se cuantificaron 100 veces menos esporas que en los demás tratamientos. Cabe destacar que en el T3 aunque algunas esporas persistieron no germinaron, por lo tanto no se observa crecimiento micelial del hongo durante la vida de anaquel y la apariencia de la fresa se conserva por un período de tiempo mayor (27 días) en comparación a los demás tratamientos (Figura 2).

A pesar de que la reuterina, ha demostrado su potencial como conservador de alimentos, de acuerdo a múltiples publicaciones (Ortiz-Rivera et al., 2017; Arqués et al., 2014) aún no se utiliza en la industria y no se ha probado su efectividad en algunos alimentos, para nuestro conocimiento es la primera vez que se prueba en una cubierta comestible y a pesar de la deshidratación durante la elaboración de la cubierta logró detener el crecimiento de un hongo cuyas esporas son muy resistentes y ocasionan importantes pérdidas económicas por el deterioro de las frutas. La reuterina es considerada uno de los antimicrobianos para conservación de alimentos más valiosos, esto se atribuye a importantes características como resistencia a temperaturas altas, capacidad de solubilizarse en agua, y su alto valor de estabilidad en un extenso intervalo de pH, entre muchas otras (Gyawali e Ibrahim, 2014). La capacidad antimicrobiana de la reuterina y la facilidad con la que se pueden producir grandes volúmenes en un proceso biotecnológico relativamente barato con respecto a otros procesos de producción en la industria alimentaria, ofrecen grandes oportunidades para el uso de la reuterina como conservante de alimentos (Lacroix, 2011).

Lb. reuteri, es considerado como un microorganismo seguro, por consiguiente, el empleo de reuterina como conservador en la industria alimentaria resultaría factible y seguro. Martín Cabrejas (2017), reveló que acorde con sus resultados, la reuterina mostró ser un compuesto con un grado de toxicidad baja, mucho menos tóxica que la acroleína y sólo cuatro veces más tóxica que el diacetilo, el cual es un compuesto saborizante de uso seguro reconocido.

Apariencia visual

En la figura 2 se muestra fotografías de las fresas sin y con recubrimientos comestibles de pectina durante su almacenamiento en refrigeración. Se puede apreciar como la aplicación

de los recubrimientos mejoró el aspecto general de las fresas y ayudo a mantenerlo por más tiempo, principalmente en aquellas fresas con el tratamiento 3 (pectina + aceite esencial de limón+ reuterina).

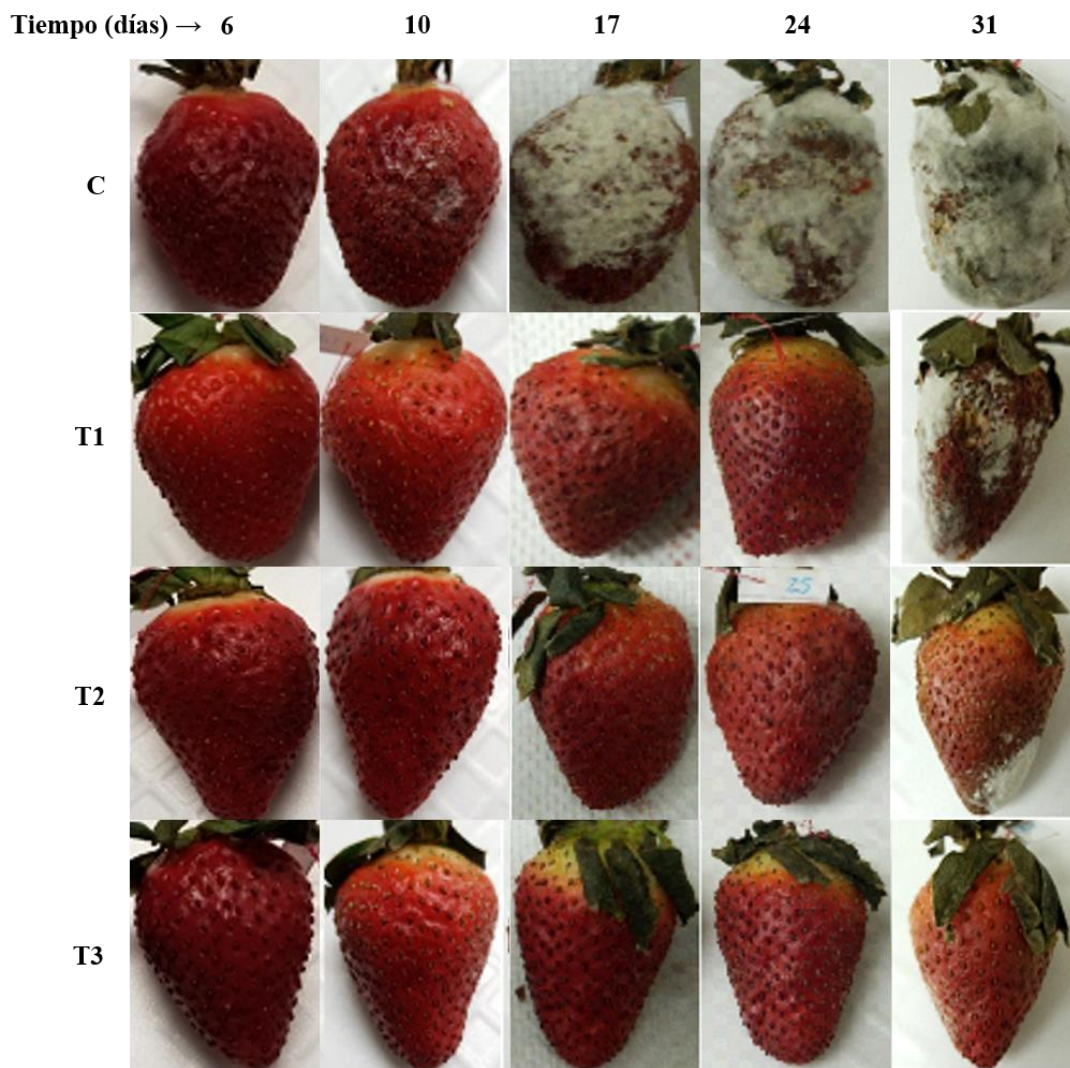


Fig. 2. Aspecto de las fresas control y con recubrimientos comestibles de pectina durante su almacenamiento en refrigeración (T1: Pectina; T2: Pectina + Aceite esencial de limón; T3: Pectina + Aceite esencial de limón + Reuterina; SFU: unidades formadoras de esporas).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, es posible deducir que la cubierta comestible de pectina obtenida a partir de cáscara de naranja, adicionada con reuterina, es capaz de alargar la vida de anaquel de la fresa sin comprometer su calidad por la inhibición del principal microorganismo de deterioro *Penicillium* spp. Además, demostró prolongar la vida de anaquel del fruto hasta cuatro veces más que el tiempo de vida útil promedio de la fresa, mostrando una apariencia más atractiva comparado al de las fresas sometidas a los tratamientos de cubiertas sin reuterina y al tratamiento de control.

REFERENCIAS

Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Giulia, M., & Destri, L. (2016). Metagenomic Analysis of Fungal Diversity on Strawberry Plants and the Effect of Management Practices on the Fungal Community Structure of Aerial Organs. 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160470>

Algunos, C. D. E., & Fitopatogenos, H. (1997). Comunicación corta EFECTO DE DIFERENTES POLISACÁRIDOS FITOPATOGENOS. (April 2018).

Ávila, M., Gómez-torres, N., Hernández, M., & Garde, S. (2014). International Journal of Food Microbiology Inhibitory activity of reuterin , nisin , lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. International Journal of Food Microbiology, 172, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002>

Axelsson, L. T., Chungf, T. C., Dobrogosz, W. J., & Lindgrent, S. E. (1989). Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. 2, 131–136.

Baldwin, E. Hagenmaier, R y Bai, J. Edible coatings and films to improve food quality. 2012.

Boca Raton: CRC Press Chen, C., Sung, H., Liang, H., & Chang, W. (2001). Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues.

Ciolacu, L.; Nicolau, A.I.; Hoorfar, J. Global Safety of Fresh Produce. A Handbook of Best Practice, Innovative Commercial Solutions and Case Studies; Woodhead Publishing Limited: Sawston, UK, 2014. Cockrell, M. B., & Sancho, E. (1998). *Fruticultura Especial* (2a ed.). San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.

Concha-meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22(3–4), 485–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.032>

Cordero, F., Lourdes, M. De, Morales, Y., Jesús, M. De, Angel, N., Fraire-cordero, M. D. L., ... Politécnico, I. (2003). Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch .) en Postcosecha. Darrow, G.M. (1966). *The strawberry: history, breeding and physiology*. Holt, Rinehart and Winston, New York.

Durner, E.F., and Poling, E.B. (1988). Strawberry developmental responses to photoperiod and temperature. *Adv. Strawberry Prod.* 7, 6–15. Edition, F. (n.d.). *Plant pathology*. Felipe, V. (2015). *Ac ce p te d cr t*. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.06.006>

Food, P. F., & Extends, P. S. (2018). *Food Storage Guidelines For Consumers*. 960.

Galletta, G.J. and Bringhurst, R.S. (1990). Strawberry management. In *Small fruit crop management*. (eds. Galletta G.J. and Himelrick D.) Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp 83–156.

Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *FRIN*, 43(10), 2402–2408. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.020>

Gennadios, A. and C.L. Weller. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. Food Technol. Guillen, Marco T., Atlee, Charles B. (1982). Informe agrícola de la encuesta sobre alternativas de producción en el cultivo de la fresa. Guatemala.

Guttridge, C.G. (1985). *Fragaria x ananassa*. In CRC Handbook of flowering. (ed. 28 Halvey A.H.) Vol. III. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 16–33 Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. Food Control.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>

Hagenmaier, R. D., & Shaw, P. E. (1990). Moisture Permeability of Edible Films Made with Fatty Acid and (Hydroxy propyl) methylcellulose. 1799–1803. Hagenmaier, R. D., & Shaw, P. E. (1992). Gas Permeability of Fruit Coating Waxes. 117(1), 105–109.

Hancock, J. F. and Luby, J.J. (1995). Adaptive zones and ancestry of the most important North American strawberry cultivars. Frt. Var. J. 49, 85–89. Hans Beyer, Wolfgang Walter. Manual de química orgánica. Alemania, 1987. Pp. 487.

Harris, L. J., Safety, F., & Specialist, A. M. (n.d.). Apples : Safe Methods to Store , Preserve , and Enjoy. (table 1). Larson, K.D. (1994) Strawberry. In Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops: Volume I. Temperate Crops (eds. Schaffer B. and Anderson P.C.). CRC Press, Boca Raton, Florida. Maas JL (1998) Compendium of strawberry diseases: American Phytopathological Society (APS Press). Pitt, J. I. (2007). Species 25. (51).

Rhoades, J., & Roller, S. (2000). Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods. 66(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.80-86.2000>.

Updated Rodri, L., Rodri, A., & Marti, B. (2010). Food biopreservation : promising strategies using bacteriocins , bacteriophages and endolysins. 21. 29

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.010>

Roth, T. and M. Loncin. 1984. Superficial activity of water, p. 433–443. In: B.M. McKenna (ed.). Engineering and food. vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers, London. Sallato,

B. V, Torres, R., Zoffoli, J. P., & Latorre, B. A. (2007). Effect of boscalid on postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. 5(1), 67–78.

Sharon, M., & Freeman, Æ. S. (2007). Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. 247–265. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9091-7>
Stiles, M. E. (1996).

Biopreservation by lactic acid bacteria. 331–345. Taylor, P., & Dhall, R. K. (2013).
Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables : A Review Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables : (February), 37–41.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568> Titular, P. (2003).

Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad complutense de madrid. (2017).

Zaritzky, N. E. (2009). Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1> Zurich, E. T. H., Series, P., Science, F., No, N., Limited, W. P., Pilet, M., Cedex, N. (2011). Archimer.

Productos generados

Los productos generados por la realización de este proyecto es una tesis de licenciatura, un artículo indizada y una presentación en congreso.