ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, CONSERVANTE Y OBTENCIÓN DE UN COLORANTE NATURAL A PARTIR DE PLANTAS DE LA REGION DE BOYACA

RESUMEN

La extracción y caracterización preliminar de los metabolitos secundarios presentes en el epicarpio de Toronja (*Citrus máxima*) y la determinación de su actividad biológica frente a los hongos *Penicillium ssp*, *Rhizopus ssp* y *Botrytis cinerea*, en condiciones de Laboratorio como posible actividad conservante. También se obtuvo un colorante natural alimentario a partir de la extracción metanólica de antocianinas presentes en la mora de castilla (*Rubus glaucus benth*); y la caracterización del extracto por CCD, junto con un análisis de estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales y pruebas de toxicidad (bioensayo *Artemia salina*).

PALABRAS CLAVES: Toronja (*Citrus máxima*), actividad biológica, conservante, *Penicillium ssp*, *Rhizopus ssp* y *Botrytis cinerea*, colorante natural, (*Rubus glaucus benth*,)

ABSTRACT

The extraction and preliminary characterization of the present secondary metabolic in crust Grapefruit (Citrus Maxima) and the determination of its biological activity forehead to the Penicillium fungi ssp, Rhizopus ssp and cinerea Botrytis, in conditions of Laboratory like possible conservant activity. Also an nourishing natural colorant from the metanólic extraction of present antocianinas in the was obtained mora de castilla (Rubus glaucus benth); and the characterization of the extract by CCD, along with an analysis of stability as opposed to different environmental conditions and tests of toxicity (saline Artemia)

KEYWORDS: Grapefruit (Citrus Maxima), biological activity conservant activity , *Penicillium ssp*, *Rhizopus ssp* y *Botrytis cinerea*, natural colorant , (*Rubus glaucus benth*,)

1. INTRODUCCIÓN

El sistema agroalimentario es uno de los renglones más importantes de nuestra economía, gracias al inmenso potencial agrícola que presentan las diferentes regiones del país, por la gran variedad de productos de origen vegetal que se obtienen en todas las épocas del año, desafortunadamente se ven ampliamente afectados por enfermedades poscosecha que ocasionan pérdidas que en Colombia alcanzan y sobrepasan muchas veces el 30%, de las pérdidas totales de las cosechas. [1] Las enfermedades poscosecha son producidas por una amplia gama de microorganismos, donde las más frecuentes son originadas por especies de los géneros *Penicillium*, *Rhizopus* y *Botrytis*, que causan las enfermedades: podredumbre azul y verde, podredumbre blanda y podredumbre gris respectivamente[1], lo anterior se propone la extracción y caracterización preliminar de algunos metabolitos secundarios presentes en el epicarpio de Toronja y la determinación de su actividad biológica por la técnica de crecimiento radial frente a los hongos *Penicillium ssp*, *Rhizopus ssp* y *Botrytis cinerea*,

Frutas con colores fuertes como las uvas moradas, las cerezas y las moras contienen abundantes antocianinas; pigmentos naturales aceptados como colorante alimentario, por lo tanto pueden ser utilizadas como materia prima en la fabricación industrial de un colorante natural alimentario. Las antocianinas representan un factor importante en la industria alimentaría, debido a las restricciones sanitarias hacia el uso de colorantes sintéticos, [2]. La obtención de un colorante a partir de estos compuestos presentes en los frutos maduros de la mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) mejora las características físicas (color) de muchos productos; además de poseer propiedades antioxidantes [3] Los alimentos naturales tienen su propio color y lo ideal sería que se mantuviera a lo largo del proceso de transformación en la industria, pero la mayoría de veces no es así. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe en los diferentes lotes de fabricación de un producto y esto solo puede obtenerse modificándolo de forma artificial, [4].

MARTHA BEATRIZ RAMIREZ GONZALEZ

Licenciado Química y Biología, Ms.C

Docente – Investigador
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
marberami@yahoo.com

ADRIANA NEIRA GONZALEZ

Químico de Alimentos
Docente – Investigador
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
adrinegonza@yahoo.es

LADY JOHANA CORREA,

Químico de Alimentos
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
johanac06@yahoo.es

2. CONTENIDO

Actividad conservante: Los frutos de Toronja, se recolectaron en el Municipio de Chitaraque Boyacá, Vereda "El Páramo", A partir de 425 g de pericarpio se obtuvo el extracto crudo seco por el método de maceración en frío con etanol (95%).

Se obtuvieron las fracciones éter de petróleo (Etp), cloroformo (Cl), acetato de etilo (Act) y metanol (Met) mediante el método de extracción líquido – líquido. A cada una de las fracciones se les realizaron pruebas fitoquímicas preliminares para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios. (Fehling, Legal, Dragendorff, Cloruro férrico Libermann Burchard, Legal), comparando cada uno de los resultados obtenidos con soluciones patrón. Las fracciones Etp presentando lactonas y esteroides y en las fracciones de Cl, Act y Met presentaron flavonoides, taninos, alcaloides fenólicos aldehídos y cetonas, correlacionando con cromatografía en capa delgada (Sílice gel 60 F₂₅₄), y como agentes reveladores: UV, vapores de yodo y cloruro de Cobalto al 5%, [5].

Aislamiento de las Cepas. Aisladas de material vegetal enfermo, frutos de naranja, durazno y fresa encontrados en la Central de Abastos de la Ciudad de Tunja, los cuales presentaban los síntomas característicos de las respectivas enfermedades siguiendo el procedimiento descrito por [6]. Pruebas de Actividad Biológica. Se evaluaron las fracciones obtenidas en el control del crecimiento y esporulación de las cepas *Penicillium Spp*, *Rhizopus Spp*, *Botrytis cinerea*, en condiciones de laboratorio. Se realizó en cajas de petri de 5cm de diámetro con PDA y las fracciones disueltas en DMSO; la siembra, se realizó por suspensión en agua destilada estéril. Todas las cajas se incubaron a una temperatura de 24°C. Monitoreo de las variables. Se tuvieron en cuenta dos variables dependientes: crecimiento micelial y concentración de conidias. Se midió el diámetro de crecimiento de los hongos, *Rhizopus spp*, *Botrytis cinerea* *Penicillium sp* hasta cuando el hongo invadió el medio de cultivo del testigo absoluto. Se hizo conteo de Conidias, utilizando la cámara de New Beauwer. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se determinó la dosis a la fracción con mejor actividad biológica, en concentraciones de 100%, 50% 25% 12%, utilizando el mismo procedimiento anterior.

Diseño experimental. Diseño factorial una vía de clasificación con un total de ocho tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento, para cada una de las cepas estudiadas, utilizando el paquete estadístico SAS para Windows XP. Con análisis de Varianza. (ANOVA) y prueba DUNCAN.

OBTENCIÓN COLORANTE NATURAL (ALIMENTARIO)

Se recolecto frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) de un cultivo orgánico, se determinó el índice de madurez. Se realizó obtuvo un extracto seco a partir de 1.852 g de fruto fue triturada en presencia de metanol absoluto acidulado con 1%

de ácido cítrico durante 72 horas.,(Domínguez-1988) se identificó por CCD en una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ utilizando como fase móvil EtOAc:CH₃COOH:H₂O:MeOH (10:2:3:2). Además se obtuvo cromatografía preparativa, utilizando placas de sílica gel 60 MERCK fase móvil EtOAc:CH₃COOH:H₂O:MeOH 10:2:3:2

Cuantificación por espectrofotometría

Para calcular la concentración de antocianinas en el extracto crudo, se utilizó la Ley de Beer Lambert. Se hizo una dilución acuosa del extracto obtenido (1g en 100 ml de agua destilada) y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a la longitud de onda de máxima absorción para antocianinas, y se expresó en gramos de cianidina-3-glucósido /Kg de pulpa de mora de castilla *Rubus glaucus benth*.

Para realizar la curva patrón se prepararon soluciones de Carmoisina (colorante sintético mora) de diferente concentración (2,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50 ppm), las cuales se leyeron junto con el extracto de antocianinas, en un espectrofotómetro GENESYS 10 a una longitud de onda de 530 nm [6] y por extrapolación se determinó la concentración de antocianinas en la muestra expresada como g de cianidina-3-glucósido /Kg de pulpa de mora *Rubus glaucus benth*.

PRUEBA DE TOXICIDAD

Para determinar el nivel de toxicidad del extracto metanólico, se desarrollo el bioensayo con *Artemia salina* para evaluar citotoxicidad en extractos crudos y/o metabolitos secundarios, por medio del método probitt. [7]

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En las pruebas de actividad biológica realizadas para el control de *Penicillium spp*, *Rhizopus spp* y *Botrytis cinerea*, la fracción metanolica del epicarpio de Toronja, presentó actividad total en la inhibición del crecimiento y la esporulación de *Botrytis cinerea*, a una concentración de 100mg/ml y 50mg/ml efectiva en un 100%; por tanto se recomienda su uso en el control de podredumbre gris, enfermedad poscosecha ocasionadas por *Botrytis cinerea* en donde se determinaron metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides fenólicos, los cuales pueden ser los directos responsables de la actividad ya que presentan diversas actividades biológicas como la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias patógenos [9].

Las fracciones del epicarpio de Toronja, no inhiben el crecimiento del micelio de *Penicillium spp*, *Rhizopus*

spp y probablemente solo retrasan su esporulación. Por tanto no se recomienda su uso en el control de las enfermedades poscosecha ocasionadas por *Penicillium spp*, *Rhizopus spp*.

El colorante alimentario resultó ser efectivo, relativamente estable; manteniendo la naturalidad de los productos de aplicación, garantizando la inocuidad de los mismos.

El contenido de antocianinas totales encontrado en el extracto de mora de castilla *Rubus glaucus benth*, 1,478 g/Kg cianidina-3-glucósido, fue superior comparado con estudios realizados los cuales reportan valores de 1,10 g/Kg. de pulpa [10g]

La respuesta biológica de *Artemia salina* frente al extracto metanólico de Mora de Castilla *Rubus glaucus benth*, presentó valores con los cuales se determinó la DL₅₀: 223.6 µg/ml que lo clasifican como MODERADAMENTE TÓXICO (500-100µg/ml),

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AGRIOS, George N. Fitopatología. Editorial Noriega Editores. 2001. 151 -170 p.
- [2] MARCANO DE, Deanna y HASEGAWA, Masahisa. Fitoquímica Orgánica. S./.: Litopar, 1991. p. 105-111
- [3] NAGEM, T y TOLEDO DE OLIVIERA. Propiedades biológicas de los tintes naturales. Brasil: Universidad Federal de Vicosá, 2000
- [4] CUBERO, Nubia; MONFERRER, Albert y VILLALTA, Jordi. Aditivos alimentarios. Madrid. España: Mundi-Prensa, 2002. p. 21-49
- [5] SANABRIA GALINDO, Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar. Santa fe de Bogota: Profesores Asociados U. Nacional. 1999. 362-225 p.
- [6] AGRIOS, George N. Fitopatología. Editorial Noriega Editores. 2001. 151 -170 p.
- [7] GOMARA, F; SATO, Meo y PONTAROLO, L. Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de ácido Kójico. Brasil: Ars Pharm. Vol 45 No2, 2004
- [8] MARTÍNEZ, Clemente y BELTRÁN, Maritza. Estudio fitotoxicológico preliminar de 10 especies vegetales utilizadas en medicina natural. Bogotá: Tesis Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. 1999
- [9] BILBAO RODRÍGUEZ A, Introducción a la Fitoquímica. Mexico: Limusa. 1997. 53– 58 p.
- [10] MORENO, Mario; VILORIA, Alfredo y LOPEZ, Eliezer. Estabilidad de las antocianinas en jugos pasterizados de mora *Rubus glaucus benth*. Venezuela: Laboratorio de biomoléculas. Universidad SIMÓN RODRÍGUEZ, 2002
- [11] CARPENA, O. Estudios sobre los flavonoides de los Citrus. Mexico: continental S.A. 1979. 38–42 p.
- [12] DOMINGUEZ, Jorge. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ª edición. México Limusa S.A. 1973. 193 – 220 p.
- [13] LOCK DE UGAZ, Olga. Investigación Fitoquímica: Lima: Pontificia U. Católica del Perú. 2000 . 220–238 p.
- [14] MANNERS, J. G. Introducción a la fitopatología. Editorial Limusa. 1994 58p.
- [15] PEDROZO, Julio. Introducción a la Fitoquímica . Grupo de investigación Fitoquímica Universidad Javeriana. 1998 . 56–97 p.