



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE BIOPOLÍMEROS Y ACTIVOS NATURALES POTENCIALMENTE ANTIMICROBIANOS PARA QUESO

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Sarai Salas-Martínez

TUTOR/A ACADEMICO: Chelo González-Martínez

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, 13 de septiembre de 2019

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE BIOPOLÍMEROS Y ACTIVOS NATURALES POTENCIALMENTE ANTIMICROBIANOS PARA QUESO

Sarai Salas-Martínez, Chelo González-Martínez

RESUMEN

La aplicación de recubrimientos no comestibles que incorporan antibióticos en quesos ha sido la técnica más utilizada a nivel industrial para controlar la pérdida de humedad y el crecimiento fúngico superficial de los mismos. Una alternativa más saludable a este problema es la utilización de recubrimientos a base de polímeros comestibles y la adición de conservantes naturales. En base a esto, se ha estudiado el efecto de dos biopolímeros comestibles, gelano y κ -carragenato, como recubrimientos de queso, sobre el control de la pérdida de peso durante la etapa de maduración. A su vez, se ha evaluado el efecto de la adición de varios compuestos antifúngicos naturales como son el aloe vera, el safranal y un extracto acuoso del azafrán, sobre la pérdida de peso y el control fúngico superficial. Los resultados mostraron que los recubrimientos a base de safranal mejoraron notablemente la capacidad de retención de agua del queso, a la vez que limitaron el crecimiento fúngico de los hongos *Penicillium roqueforti* y *Penicillium discolor*. Por otro lado, las formulaciones que incorporaron aloe vera a la concentración empleada no fueron eficaces, especialmente en el control de la pérdida de peso, ya que su aplicación potenció la pérdida de humedad con respecto al queso control sin recubrimiento. Por último, los recubrimientos con el extracto acuoso de azafrán tampoco fueron eficaces.

PALABRAS CLAVE: aloe vera, azafrán, safranal, pérdida de peso, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium discolor*.

RESUM

L'aplicació de recobriments no comestibles amb antibiòtics en formatges ha segut la tècnica mes utilitzada a nivell industrial per a controlar la pèrdua de humitat i el creixement fúngic superficial dels mateixos. Una alternativa mes saludable a este problema es l'ús de recobriments basats en polímers comestibles y la adició de conservants naturals. En este treball, se ha estudiat el efecte de dos biopolímers comestibles, gelano i κ -carragenato, com recobriments de formatges, sobre el control de la perduda de pes durant l'etapa de maduració. Al mateix temps, se ha avaluat el efecte de l'adició de compostos antifúngics naturals com aloe vera, safranal i un extracte aquos

del safrà, sobre la perduda de pes i el control fúngic superficial del formatge. Els resultats mostraren que els recobriments amb safranal milloraren notablement la capacitat de retenció d'aigua dels formatges i limitaren el creixement fúngic del *Penicillium roqueforti* i *Penicillium discolor*. Per un altra banda, les formulacions que incorporaren aloe vera a la concentració empleada no van ser eficaços, especialment en el control de la perduda de pes, ja que la seua aplicació va potenciar la sortida d'aigua, en comparació amb el formatge control sense recobriment. Per últim, els recobriments amb l'extracte aquos de safrà tampoc van ser eficaços.

PARAULES CLAU: aloe vera, safrà, safranal, perduda de pes, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium discolor*.

ABSTRACT

The application of non-edible coatings incorporating antibiotics to cheeses has been the most widely used technique at industrial level to control moisture losses and surface fungal growths. A healthy alternative to this problem is the use of coatings based on edible polymers incorporating natural preservatives. Taking this into account, the aim of this work was to study the effect of the application of edible coatings to cheeses on the control of weight loss. The coatings were based on two edible biopolymers, gellan and κ -carrageenan. At the same time, the addition of some natural antifungal compounds such as aloe vera, safranal and an aqueous saffron extract on weight loss and surface fungal control was also evaluated. The results showed that the coatings based on safranal significantly improved the water retention capacity of cheeses, while limiting the fungal growth of *Penicillium roqueforti* and *Penicillium discolor*. The formulations based on aloe vera were not effective at the concentration used, especially when controlling the weight loss, as its application increased the moisture losses in comparison to the uncoated control cheese. On the other hand, those coatings incorporating the aqueous saffron extract exhibited the worse results in terms of weight loss and antifungal capacity.

KEY WORDS: aloe vera, saffron, safranal, weight loss, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium discolor*.

1. INTRODUCCIÓN

La vida útil de los quesos se ve limitada debido a la pérdida de humedad y al crecimiento bacteriano y fúngico en su superficie, que se genera durante el almacenamiento, transporte y distribución de los mismos. Esto da como resultado el deterioro y, por tanto, la pérdida de calidad del queso. La alternativa más empleada a nivel industrial es la aplicación de recubrimientos con antibióticos como la piramicina o la natamicina en la superficie de los quesos (Var et al., 2006). Sin embargo, esto hace que la superficie del queso no sea comestible y la posibilidad de transmisión del antibiótico al interior del queso pueda ocasionar un riesgo para la salud del consumidor.

Actualmente hay una creciente tendencia en el uso de recubrimiento comestibles para quesos utilizando compuestos activos naturales. Estos recubrimientos activos son capaces de reducir la pérdida de peso, así como evitar el crecimiento microbiano a través del control del intercambio gaseoso o portando compuestos antimicrobianos. Además, pueden mantener o incluso mejorar las características organolépticas y el valor nutricional de los quesos, debido a la incorporación de compuestos aromáticos o agentes colorantes (Costa et al., 2018). Para su desarrollo, se han empleado numerosos polisacáridos, proteínas y combinaciones de estos componentes para desarrollar recubrimientos comestibles adecuados en queso. Uno de los más estudiados es el quitosano, un polímero natural biodegradable con propiedades antimicrobianas (Rehan et al., 2018). Estos recubrimientos pueden reemplazar a las capas comerciales como la parafina o el acetato de polivinilo (Galus y Kadzinska, 2015).

En la bibliografía podemos encontrar algunos estudios donde han incorporado agentes antimicrobianos a recubrimientos para alargar la vida útil de quesos. Así, por ejemplo, en el estudio realizado por Ramos et al. (2012) se aplicaron recubrimientos emulsionados antimicrobianos a quesos a partir de aislado de proteína de suero, con una combinación de compuestos antimicrobianos como la natamicina, el ácido láctico o los citooligosacáridos. Los resultados mostraron una disminución de la pérdida de agua, de la dureza, y cambios de color durante el almacenamiento, además de una limitación en el crecimiento de patógenos.

El empleo de aceites esenciales como aceite de limón, tomillo o romero, incorporados en recubrimientos comestibles debido a su eficacia antioxidante y antimicrobiana (Galus y Kadzinska, 2015) ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, Ozcakmak et al. (2012) comprobaron el efecto antifúngico del bálsamo de limón y aceites esenciales de salvia sobre el crecimiento de *Penicillium verrucosum* aislado de queso Kashar. Otro ejemplo es el estudio

realizado por Ahmed et al. (2017) sobre la efectividad de aceite esencial de canela incorporado en un film empleado en queso Cheddar, dando como resultado una excelente eficacia antimicrobiana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.

El gel de Aloe vera es un mucílago producido por las células parenquimáticas de la pulpa de *Aloe badensis* y está constituido por polisacáridos, aminoácidos, lípidos y esteroides, así como enzimas y taninos. Es muy empleado a nivel medicinal, estético y alimentario por su carácter antimicrobiano, antiinflamatorio, inmunológico e hipoglucémico, además de sus beneficios en la curación y cicatrización de heridas y quemaduras. Sin embargo, la naturaleza y las propiedades de los diferentes componentes en la mezcla no están completamente caracterizados para poder conocer el mecanismo de acción del gel de Aloe vera (Medellín et al., 2019). El aloe vera ha sido empleado para el desarrollo de films y recubrimientos antimicrobianos. Así, Castillo et al. (2010) evaluaron su eficacia antifúngica sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*, como posible tratamiento para mantener la calidad de la uva de mesa. También Monzón et al. (2018) caracterizaron films compuestos por quitosano y Aloe vera para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* en papaya, con resultados positivos. Esto convierte al Aloe vera en un compuesto óptimo para el tratamiento fúngico superficial en la maduración de quesos. En el estudio realizado por Ordoñez (2018), se refleja la efectividad en la inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium roqueforti* en la superficie del queso, cuando se utilizó como recubrimiento en un ratio polímero:aloe de 1:1. Sin embargo, la aplicación de este recubrimiento afectó negativamente a la pérdida de peso durante el almacenamiento del queso.

El azafrán es un compuesto formado por los estigmas desecados de la flor de *Crocus sativus* L. Se trata de una especie muy valorada culinariamente por sus propiedades organolépticas, y muy empleada por otros sectores como la medicina, la industria farmacéutica, la alimentaria o la de perfumería. Los principales componentes del azafrán son la crocina, carotenoide responsable del color anaranjado; la picrocrocina, aldehído monoterpénico de la crocina, responsable del sabor amargo; y el safranal, que constituye el 70% de los componentes volátiles del azafrán y por tanto es responsable de su aroma característico. Estos compuestos han sido aislados para investigar sobre su efecto citotóxico a nivel celular, aunque poseen más propiedades bioactivas como su poder antioxidante o sus propiedades antiinflamatorias (Martín, 2014). Librán et al., (2014) estudiaron las propiedades antifúngicas de una disolución a base de proteínas del suero fortificado con safranal añadida a la cuajada sobre *Penicillium verrucosum* en queso, concluyendo que podría ser

un método eficaz para prevenir la esporulación en quesos durante su maduración.

En el contexto de lo anteriormente mencionado, el presente estudio tiene como objetivo analizar el efecto de la aplicación de recubrimientos comestibles a queso, basados en dos biopolímeros comestibles, gelano y κ -carragenato, sobre el control de la pérdida de peso durante la etapa de maduración. A su vez, se estudiará el efecto de la adición de compuestos antifúngicos naturales como son el aloe vera, el safranal y un extracto acuoso de azafrán, sobre la pérdida de humedad y el control fúngico superficial del queso.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Las disoluciones formadoras de recubrimiento (DFR) fueron preparadas a partir de dos biopolímeros, goma gelano (CP Kelco Atlanta, GA, USA) y κ -carragenato (Sosa ingredients, Moia, Barcelona). Como antifúngicos naturales se utilizó gel de Aloe Vera (Suministrado por el grupo dirigido por el Dr. Daniel Valero de la UMH, Elche, como producto extraído directamente de las hojas y pasteurizado a 75°C), safranal (Sigma-Aldrich St Louis, Mo, USA, $\geq 90\%$ pureza) y un extracto acuoso de hebras de azafrán comercial. El queso empleado fue queso tierno de la marca Entre Pinares por su disponibilidad comercial y corto tiempo de maduración (menor a 30 días) para simular una matriz fresca, de fácil manejo. Las cepas seleccionadas para el control fúngico fueron de *Penicillium roqueforti* y *Penicillium discolor*, aisladas por el grupo de investigación del departamento de Ecosistemas Agroforestales a cargo de María Pilar Santamarina.

2.2. Preparación del extracto acuoso de azafrán

Se realizó un extracto acuoso a partir de hebras de azafrán comercial, en base al método descrito por Sani y Mohseni (2014) modificado. En una mezcla de agua/etanol (50:50 v/v) se añadió azafrán en un ratio 1:30 (m/v), se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos y se mezcló en un ultraturrax durante 1 minuto más para reducir el tamaño de las hebras. Tras ello, se mantuvo en agitación magnética durante una hora a temperatura ambiente y, transcurrido ese tiempo, se procedió a la separación de la fase acuosa mediante doble centrifugación a 10000 rpm y 10°C durante 4 minutos, en una centrífuga (*Centrifuge 5804 R*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Para determinar la concentración de sólidos solubles en el extracto, el residuo sólido se sometió a secado con vacío a 60°C en una estufa para

deseccación al vacío “Vaciotem-T” (TP Selecta, S.A., Barcelona) hasta alcanzar el equilibrio. La concentración de sólidos solubles se determinó mediante la ecuación (1).

$$\% S.S. = \frac{A_i - (R_f - R_s)}{A_i} \times 100 \quad (1)$$

Donde A_i = masa de azafrán inicial, R_f = masa de residuo sólido fresco, una vez separado de la fase acuosa, y R_s = masa de residuo sólido seco, una vez secado en estufa.

2.3. Preparación de las disoluciones formadoras de recubrimiento (DFR)

Se realizaron dos dispersiones iniciales de los biopolímeros gelano y κ -carragenato, con un porcentaje de sólidos de 0,9% y 0,6% respectivamente, mediante agitación magnética a 35°C. A su vez, se llevaron a cabo seis formulaciones basadas en cada DFR formada a partir de los polímeros, con adición de los agentes antifúngicos. Así, se obtuvieron mezclas de las DFR (v/v) con aloe vera al 33,3%, con safranal al 0,2%, y con extracto acuoso de azafrán al 30%.

2.4. Análisis de control de pérdida de peso

Con el fin de observar la pérdida de humedad durante el almacenamiento en el queso, se llevó a cabo un control de peso en muestras con los diferentes recubrimientos y en muestras control sin recubrir, siguiendo el procedimiento realizado por Ordoñez (2018). Se obtuvieron cilindros de queso de 20 mm de diámetro y 24 mm de altura aproximadamente por medio de un sacabocados. Se midieron las dimensiones exactas de los cilindros para poder cuantificar la pérdida de volumen tras el almacenamiento. Las muestras de queso previamente pesadas se sumergieron en las diferentes formulaciones de DFR durante 1 minuto, dejándolas escurrir posteriormente durante 20 min. Una vez escurridas, se volvieron a pesar y, tras ello, se almacenaron a 4°C y 60% de humedad relativa. El control de peso se realizó diariamente durante 11 días.

2.5. Análisis del efecto antifúngico

La efectividad de los diferentes agentes antifúngicos sobre la inhibición del crecimiento fúngico superficial en queso, se comprobó mediante la inoculación de *Penicillium roqueforti* y *Penicillium discolor* en muestras de queso recubiertas con antifúngicos y sin antifúngicos y en muestras control sin recubrir. Para ello, se llevó a cabo el procedimiento descrito por Ordoñez (2018). Se obtuvieron rebanadas de queso de 3 mm de espesor y se

introdujeron en placas de Petri de 50 mm de diámetro. Se aplicaron 2.5 g de las diferentes formulaciones y se extendieron homogéneamente cubriendo totalmente la superficie expuesta de las placas. La masa de DFR añadida corresponde a la masa de DFR por unidad de superficie de los cilindros, cuantificada a través del proceso de inmersión de los mismos en el estudio de pérdida de peso. Las muestras obtenidas fueron inoculadas con un disco de 8 mm de diámetro, de una colonia de 5 días de crecimiento del hongo en PDA, mediante el método de *printing* (Sapper et al., 2018). Tras ello, las placas se incubaron a 25°C en ausencia de luz durante 5 días.

El crecimiento fúngico se determinó a partir del área de expansión de la colonia inoculada, calculada mediante análisis de imagen utilizando el programa ImageJ. Las mediciones se corrigieron restando el área inicial del disco de inoculación. La efectividad de cada tratamiento se evaluó mediante el índice de inhibición de crecimiento micelial (MGI) a través de la ecuación (2).

$$MGI = \frac{AC - AO}{AC} \times 100 \quad (2)$$

Donde AC = área promedio de las placas control sin recubrir y AO = área promedio de las placas con los diferentes recubrimientos.

2.6. Análisis estadístico

El tratamiento de datos se realizó mediante Statgraphics Centurion XVII (versión 17.2.04), realizando un análisis de la varianza (ANOVA) estableciendo que las diferencias entre muestras son significativas para una $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efectividad de los recubrimientos en el control de la pérdida de humedad

La Tabla 1 muestra la masa de cada DFR adherida después del escurrido, así como la masa de los sólidos adheridos, expresados por gramo de queso y por m² de superficie.

En general se puede decir que la incorporación de los compuestos antifúngicos no dio lugar a diferencias significativas en la cantidad de DFR adherida de los quesos dentro de un mismo tratamiento, excepto para la formulación de gelano con aloe vera, donde la masa de DFR y sólidos adherida fue significativamente menor, encontrándose con niveles similares a algunas formulaciones con κ-carragenato.

Por otro lado, las formulaciones con gelano (excepto la comentada anteriormente) presentaron una mayor cantidad de recubrimiento adherido, así como una cantidad de sólidos adheridos mayor ($p < 0.05$). Esto es debido a que el gelano presenta una mayor viscosidad que el κ -carragenato, facilitando la adherencia a la superficie del queso y la retención de sólidos en la estructura.

TABLA 1. Cantidad de recubrimiento y de sólidos adheridos en el queso de cada DFR.

Tratamiento		DFR adherida (g/g queso)	Sólidos adheridos (g/g queso)	Sólidos adheridos (g/m ²)
Gelano	-	0,29 ± 0,00 ^{ef}	0,003 ± 0,000 ^c	10,5 ± 0,5 ^d
	aloe vera*	0,09 ± 0,01 ^a	0,001 ± 0,000 ^{ab}	3,3 ± 0,5 ^a
	extracto**	0,31 ± 0,04 ^f	0,003 ± 0,000 ^c	10,3 ± 0,9 ^{cd}
	safranal	0,25 ± 0,00 ^{de}	0,002 ± 0,000 ^c	9,1 ± 0,1 ^c
k-carragenato	-	0,17 ± 0,01 ^{bc}	0,001 ± 0,000 ^{ab}	4,2 ± 0,3 ^{ab}
	aloe vera*	0,12 ± 0,02 ^{ab}	0,001 ± 0,000 ^a	3,5 ± 0,5 ^a
	extracto**	0,14 ± 0,02 ^{ab}	0,001 ± 0,000 ^{ab}	3,3 ± 0,4 ^a
	safranal	0,21 ± 0,08 ^{cd}	0,001 ± 0,000 ^b	5 ± 2 ^b

*considerando Xss (aloe vera) = 0,99%

**considerando Xss (extracto) = 0,6%

En la Figura 1 aparecen representadas las curvas de pérdida de peso de las muestras de queso a lo largo del almacenamiento durante 11 días. Se aprecia una mayor velocidad en los primeros 3 días, tanto en la muestra control como en las muestras con los diferentes tratamientos, debido a la humedad de los recubrimientos y a que todavía no se ha formado la corteza. Esta velocidad de pérdida de peso va decreciendo a lo largo del tiempo, a medida que disminuye la humedad superficial y se va formando la corteza propia de la maduración, dando como resultado recubrimientos protectores frente a la pérdida de agua interna del queso. La misma tendencia se refleja en el estudio realizado por Ordoñez (2018), donde muestras de queso con los diferentes recubrimientos siguen un comportamiento cinético parecido.

La cinética de pérdida de peso se ajustó mediante la ecuación (3) donde w es el porcentaje de pérdida de peso, t es el tiempo en días y a y b son constantes características para cada tratamiento. El coeficiente a representa la pendiente de la curva en escala logarítmica, pudiendo ser una medida de la velocidad media de pérdida de peso y el coeficiente b representa el corte de la curva con el eje y , pudiendo tomarse como una medida de la pérdida inicial.

$$w(t) = a \ln(t) + b \quad (3)$$

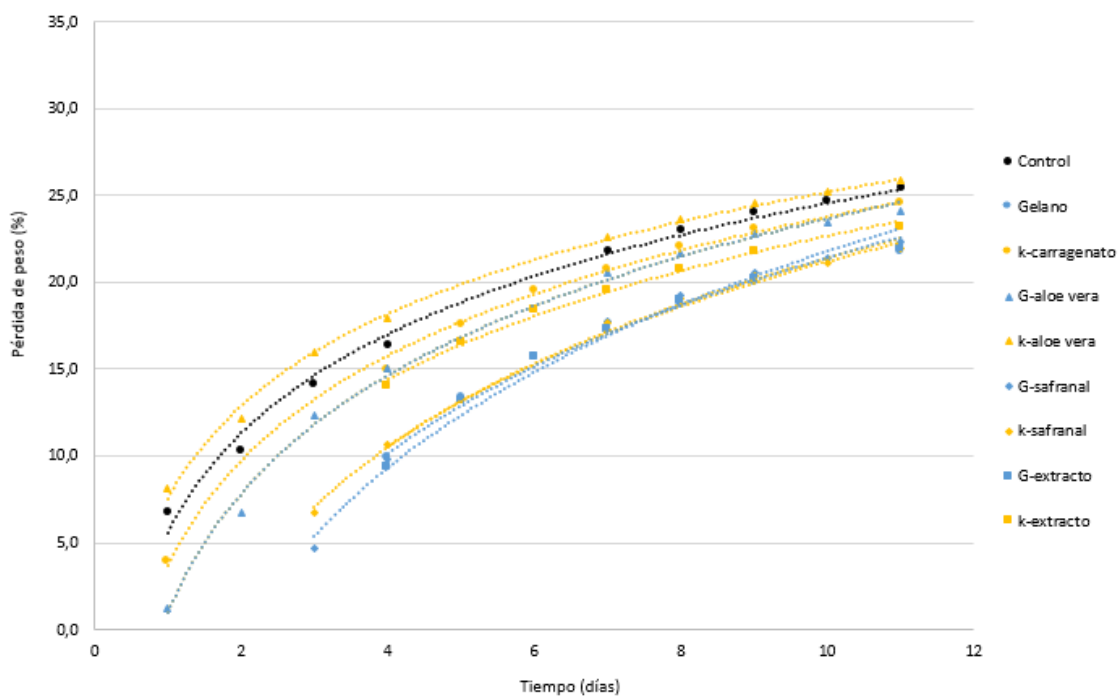


FIGURA 1. Evolución de la pérdida de peso de las muestras de queso con los diferentes recubrimientos y de la muestra control (no recubierta) durante el almacenamiento.

En la Tabla 2 aparecen reflejados los valores de las constantes del modelo, así como la bondad del ajuste, para cada tratamiento.

La pérdida de peso inicial fue muy parecida para todas las muestras recubiertas y el control, excepto para la formulación de gelano con aloe vera, que fue muy pequeña, en comparación con el resto de formulaciones.

En cuanto a la velocidad media de pérdida de peso, se puede observar que todos los tratamientos presentaron una velocidad media mayor que la muestra control, debido a que, antes de perder la humedad propia del queso, pierden la humedad del recubrimiento. La mayor velocidad media de pérdida de peso se dio en los tratamientos con gelano, a excepción del aloe vera, y al tratamiento de κ -carragenato con safranal.

TABLA 2. Valores de las constantes del modelo logarítmico ajustado y coeficiente de correlación para cada tratamiento.

Tratamiento		a	b	R ²
Control		8,236	5,595	0,991
Gelano	-	11,604	5,529	0,990
	aloe vera	9,846	0,999	0,996
	extracto	12,307	6,909	0,986
	safranal	13,599	9,538	0,991
κ-carragenato	-	8,736	3,669	0,997
	aloe vera	7,658	7,572	0,997
	extracto	9,029	1,881	0,993
	safranal	11,879	5,957	0,995

La Tabla 3 muestra las pérdidas de peso de las muestras recubiertas y control a diferentes tiempos, junto con la pérdida de volumen tras 11 días de almacenamiento. Los resultados del análisis estadístico se muestran en las Figuras 2, 3 y 4. Como se puede observar, las diferencias en las pérdidas de peso fueron estadísticamente significativas para todos los factores simples (tipo de tratamiento y tiempo), así como la interacción doble. Entre los factores simples, el tiempo fue el factor más significativo.

Como se muestra en la Tabla 3 y Figura 2, los diferentes recubrimientos lograron reducir la pérdida de peso de las muestras durante su maduración, con respecto a la muestra control sin recubrir, a excepción del tratamiento de κ-carragenato con aloe vera, cuya pérdida de peso fue similar a la muestra control. Los tratamientos de gelano, gelano con extracto de azafrán, gelano con safranal y κ-carragenato con safranal resultaron ser los más efectivos en el control de la pérdida de humedad del queso (Figura 2).

TABLA 3. Pérdida de peso y de volumen (%) del queso control y con las diferentes DFR tras almacenamiento.

Tratamiento		Pérdida de peso día 4 (%)	Pérdida de peso día 11 (%)	Pérdida de volumen día 11 (%)
Control		16,4 ± 0,3	25,4 ± 0,5	24 ± 3
Gelano	-	10 ± 1	22 ± 1	20,4 ± 0,6
	aloe vera	15,0 ± 0,5	24,1 ± 0,3	23 ± 3
	extracto	9 ± 1	22 ± 1	19,9 ± 0,8
	safranal	9,8 ± 0,3	22,3 ± 0,3	21 ± 2
κ-carragenato	-	15,0 ± 0,9	24,6 ± 0,6	20 ± 4
	aloe vera	18,0 ± 0,3	25,9 ± 0,5	24 ± 6
	extracto	14,0 ± 0,1	23,2 ± 0,4	18 ± 2
	safranal	11 ± 6	22 ± 5	24 ± 4

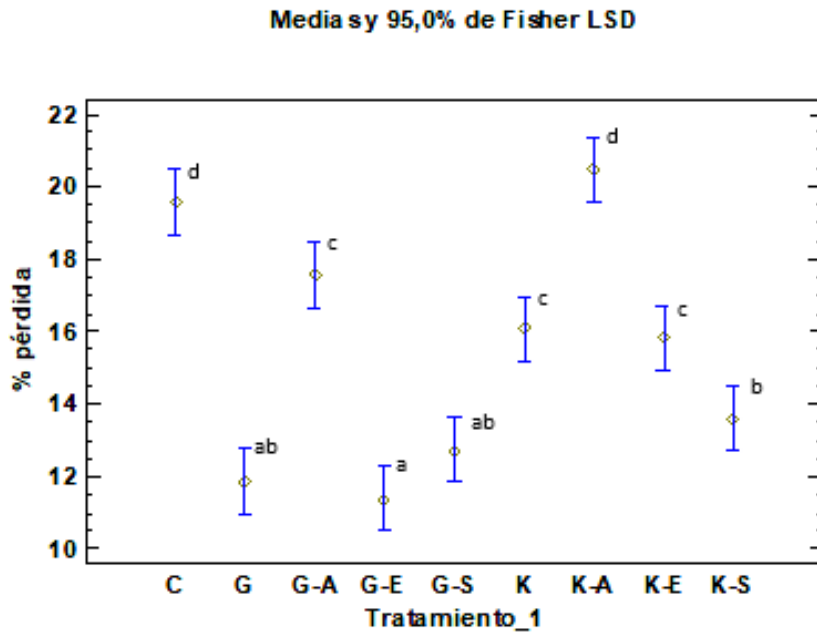


FIGURA 2. Valores medios de pérdida de peso (%) con respecto a los diferentes tratamientos.

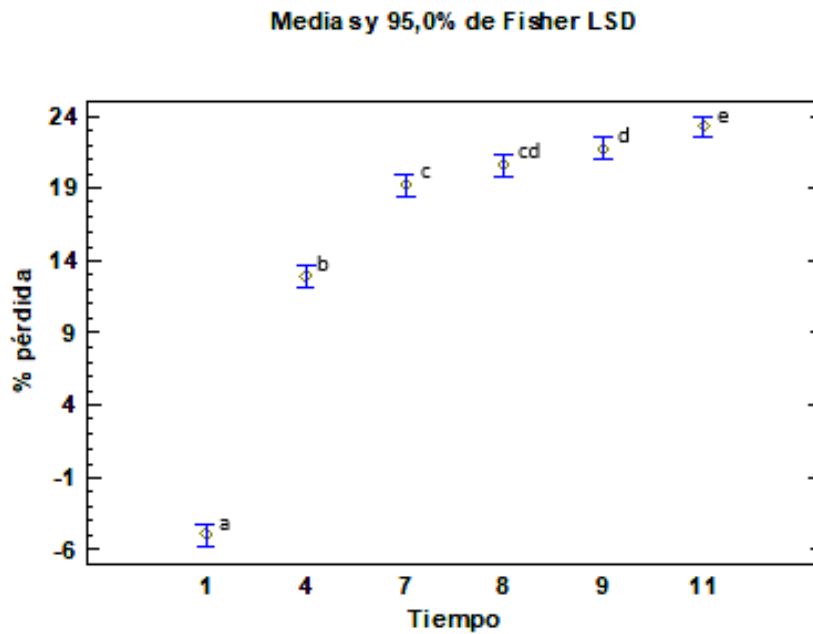


FIGURA 3. Valores medios de pérdida de peso (%) con respecto al tiempo de almacenamiento.

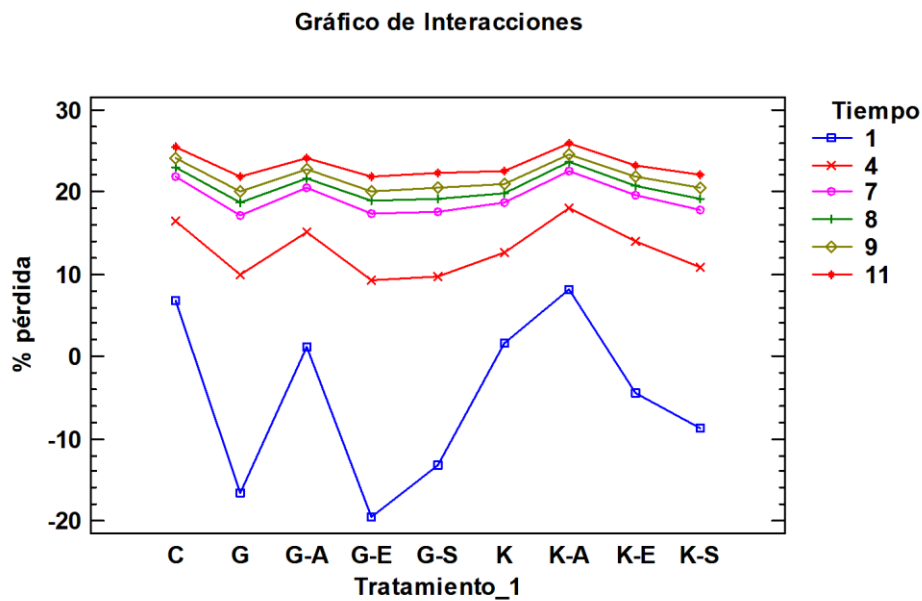


FIGURA 4. Pérdida de peso (%) con respecto al tiempo y al tratamiento.

Con respecto al tiempo de almacenamiento, se refleja una pérdida de peso inicial con mucha variabilidad entre tratamientos y negativa en algunos casos debido a que el recubrimiento aún no ha perdido humedad y no se ha formado totalmente la corteza (Figura 4). La pérdida de peso va siendo mayor conforme aumenta el tiempo, aunque se aprecia una tendencia a estabilizarse en los últimos días, ya que la humedad del queso es muy baja y la corteza superficial está bien definida (Figuras 3 y 4).

En cuanto a la pérdida de volumen, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, siendo la pérdida en todas las muestras del 20% aproximadamente (Tabla 3).

3.2. Efectividad de los recubrimientos en el control fúngico superficial

El área de crecimiento fúngico en las muestras de queso inoculadas con *Penicillium roqueforti* y *Penicillium discolor* se midió a los 4 y 5 días de crecimiento, respectivamente. Los valores obtenidos fueron corregidos restando el área inicial de 0,50 cm² del inóculo y aparecen representados en la Figura 5. En general, las diferencias en áreas entre tratamientos no fueron muy notables, siendo estadísticamente significativas para las muestras con *P. roqueforti* (p-value=0,016), pero no para aquellas con *P. discolor*, para un nivel de significación del 95%, seguramente debido a la alta variabilidad entre las muestras.

Las muestras cubiertas con gelano y κ -carragenato, sin ningún antifúngico, presentaron áreas de crecimiento mayores con respecto a las muestras control sin recubrir, posiblemente debido a que se trata de dos polisacáridos que sirven como nutriente para los hongos. Con respecto a los antifúngicos, las formulaciones con mayor crecimiento superficial fueron las muestras con extracto de azafrán, que fueron similares o incluso mayores a las formulaciones sin antifúngicos. Los resultados más favorables se obtuvieron con las formulaciones con safranal, el cual es un compuesto puro del azafrán que, al ser muy volátil, no se encontraba en grandes cantidades en el extracto.

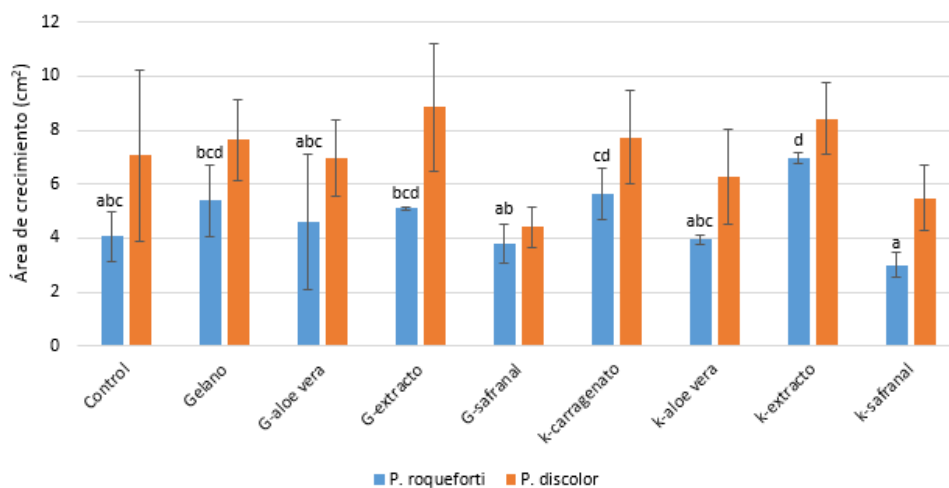


FIGURA 5. Área de crecimiento fúngico de *Penicillium roqueforti* y *discolor* con los diferentes tratamientos.

El índice de inhibición del crecimiento micelial (MGI) de las diferentes formulaciones estudiadas con ambos hongos se muestra en la Figura 6. Al igual que se puede comprobar con el área de crecimiento, las muestras sin antifúngico y con extracto de azafrán dan resultados negativos con respecto al control, mientras que el safranal consigue inhibir el crecimiento fúngico en la superficie del queso, especialmente en mezcla con gelano para *P. discolor* en un máximo de 38% aproximadamente. La muestra con mezcla de safranal y κ -carragenato presenta la misma inhibición con las dos variedades de hongos. Esto confirma la conclusión del estudio realizado por Librán et al. (2014), donde comprobaron que el safranal era un compuesto potencial para mejorar la prevención de la esporulación en quesos durante su maduración. En cuanto al aloe vera, en el estudio realizado por Ordoñez (2018) se obtuvo un MGI del 100% en la formulación de gelano con aloe vera (1:1) en muestras inoculadas con *P. roqueforti* a los 7 días de crecimiento. En nuestro caso, las formulaciones con aloe vera en proporción 2:1 (polímero: aloe vera) parecen mostrar cierta inhibición pero con unos valores poco significativos.

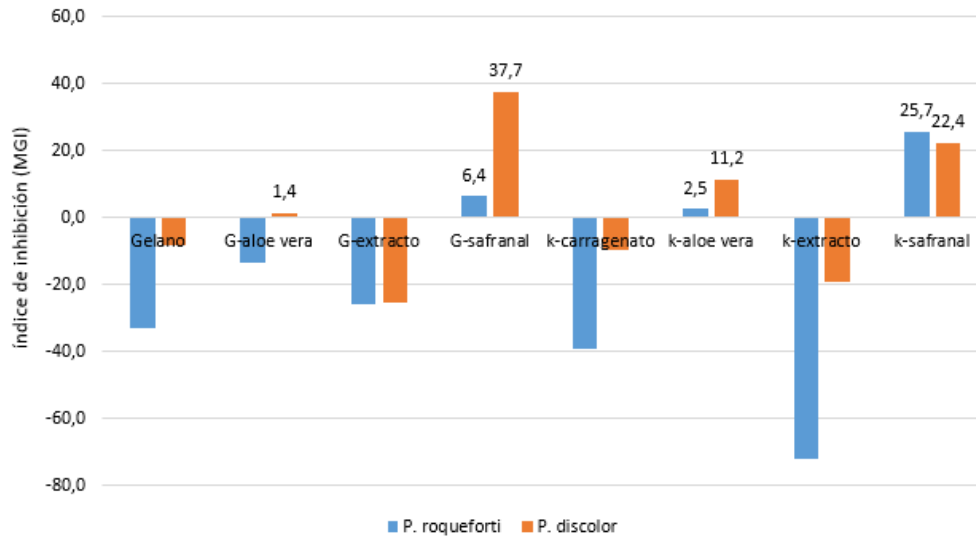


FIGURA 6. Índice de inhibición del crecimiento micelial (MGI) de *Penicillium roqueforti* y *discolor* con los diferentes tratamientos respecto al control sin recubrimiento.

Las muestras de queso con los diferentes recubrimientos y la muestra control cultivadas con *Penicillium roqueforti* y las cultivadas con *Penicillium discolor* aparecen reflejadas en las Figuras 7 y 8, respectivamente. Se puede comprobar que las placas recubiertas con safranal fueron las que mejor resultados lograron respecto al resto de formulaciones para ambos hongos. Los cultivos con extracto de azafrán mostraron un color anaranjado debido a la coloración proporcionada por la crocina durante la extracción. Se observa en algunas placas crecimiento de otros microorganismos debido a contaminación y también se puede ver crecimiento de *Penicillium* en otros puntos fuera del inóculo, ya que durante la incubación de las placas saltaron esporas, ocupando más espacio de la placa. Cabe destacar que *P. discolor* tardó más en proliferar pero creció más rápido que *P. roqueforti*.

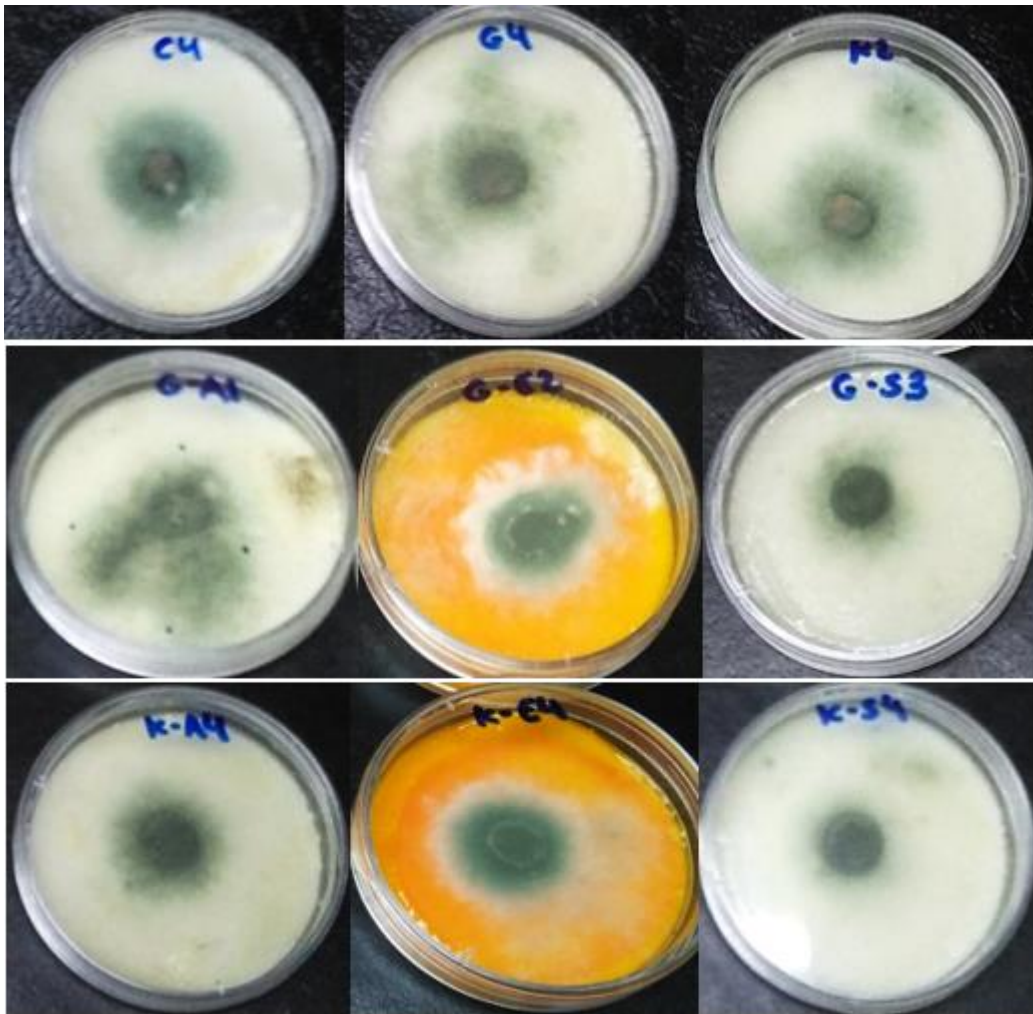


FIGURA 7. Cultivos de *Penicillium roqueforti* a los 4 días de incubación. De izquierda a derecha, primera fila: control, gelano, k-carragenato; segunda fila: gelano con aloe vera, extracto de azafrán, safranil; tercera fila: k-carragenato con aloe vera, extracto de azafrán, safranil.

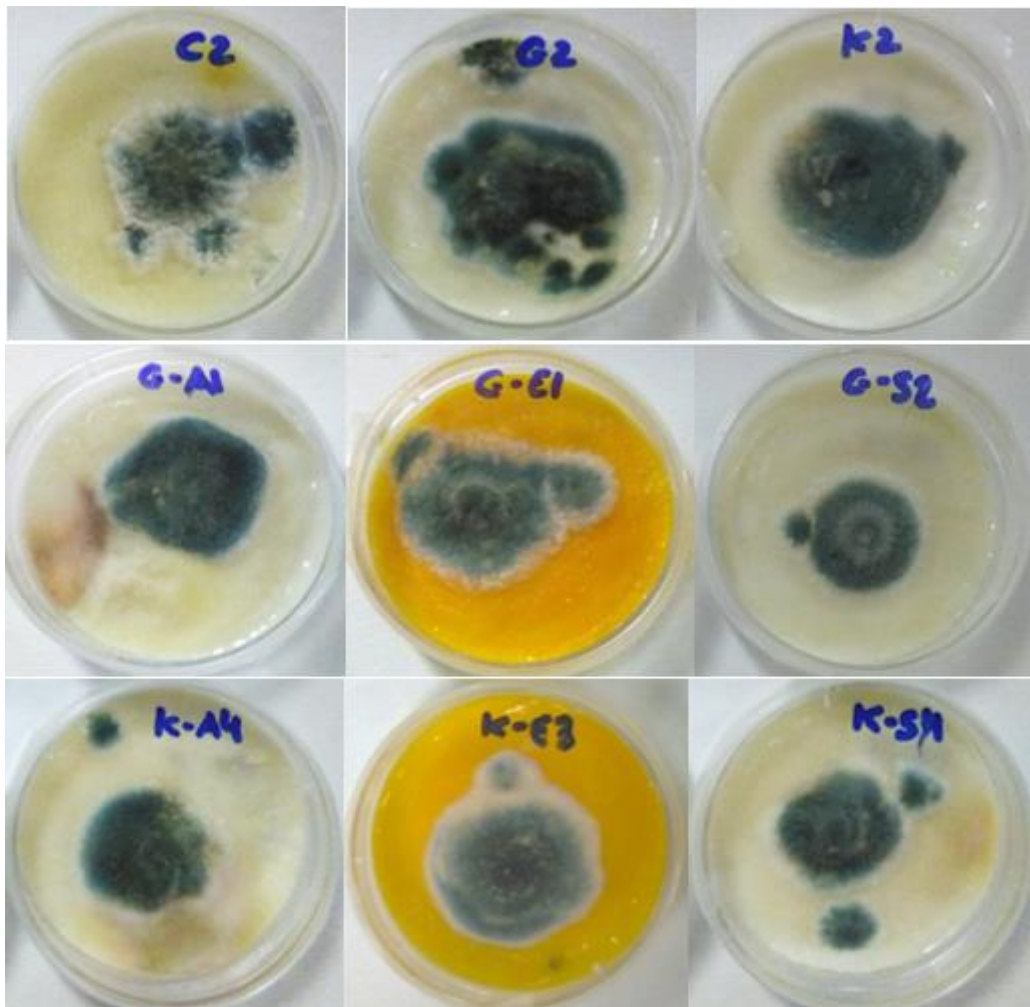


FIGURA 8. Cultivos de *Penicillium discolor* a los 5 días de incubación. De izquierda a derecha, primera fila: control, gelano, k-carragenato; segunda fila: gelano con aloe vera, extracto de azafrán, safranal; tercera fila: k-carragenato con aloe vera, extracto de azafrán, safranal.

4. CONCLUSIONES

Entre todas las formulaciones estudiadas, aquellos recubrimientos con safranal fueron los más efectivos tanto para prevenir la pérdida de humedad del queso durante el almacenamiento, como para prevenir el crecimiento fúngico superficial del mismo. Dicho compuesto incluso mejoró la capacidad de retención de agua del k-carragenato, el cual mostró una menor eficacia en el control de la pérdida de peso en comparación con las formulaciones que contenían gelano.

Por otro lado, el empleo de un extracto acuoso de azafrán no mostró resultados positivos en ninguno de los dos objetivos estudiados, lo que puede deberse a la pérdida de los compuestos potencialmente activos durante la extracción. Finalmente, se pudo comprobar que la adición del gel de aloe vera

en mezcla con polímero, en una cantidad menor al 50%, tampoco fue efectiva en el control fúngico superficial en el queso o como barrera frente a la pérdida de humedad durante el almacenamiento. Sería interesante comprobar en futuros estudios si se puede mejorar las propiedades de estos recubrimientos con un aumento de la concentración de los antifúngicos empleados.

5. REFERENCIAS

- Ahmed, J., Hiremath N., Jacob Harsha (2017). Antimicrobial efficacies of essential oils/nanoparticles incorporated polylactide films against *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* on contaminated cheese. *International Journal of Food Properties*, 20, 53-67.
- Castillo, S., Navarro, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., Martínez-Romero, D. (2010). Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and Technology*, 57, pp. 183–188.
- Costa, M., Maciel, L., Teixeira, J., Vicente, A., Cerqueira M. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, 107, 84-92.
- Galus S., Kadzinska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science and Technology*, 45, 273-283.
- Librán, C., Licón C., Serrano-Díaz, J., Carmona M., Berruga, M. (2014). Safranal transference from ewe's milk to cheese and whey and antifungal properties of fortified whey. *Dairy Science and Technology*, 94, 83-89.
- Martín G. (2014). Azafrán I (*Crocus sativus* L.). *Reduca (Biología)*. *Serie Botánica*, 7, 71-83.
- Medellín, M., Castañeda J., Martínez, V., Cervantes, A. (2019). Medicinal plant extracts and their use as wound closure inducing agents. *Journal of Medicinal Food*, 22, 435-443.
- Monzón, K., Salvador M., Gálvez, D., Rosas, R., Ovando, I., Vázquez A. (2018). Characterization of *Aloe vera*-chitosan composite films and their use for reducing the disease caused by fungi in papaya Maradol. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 4747-4757.
- Ordoñez, R. (2018). Aplicación de recubrimientos en quesos para el control del crecimiento fúngico superficial. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ozcakmak, S., Dervisoglu M., Yilmaz, A. (2012). Antifungal activity of lemon balm and sage essential oils on the growth of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum*. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 3079-3084.
- Ramos, O., Pereira, R., Silva, S., Fernandes, J., Franco, M., Lopes-da-Silva, J., et al. (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95, 6282-6292.
- Rehan, M., El-Naggar, M., Mashaly, H., Wilken, R. (2018). Nanocomposites based on chitosan/silver/clay for durable multi-functional properties of cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, 182, 29–41.

- Sani, A.M. y Mohseni, S. (2014). Effect of type and concentration of solvent on chemical properties of saffron edible extract. *Nutrition & Food Science*, 44, 2-5.
- Var, I., Erginkaya, Z., Guven, M., Kabak, B. (2006). Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period. *Food Control*, 17, 132-136.