

Evaluación antimicrobiana, antioxidante y composición nutricia de subproductos bioprocesados de *Carica papaya* L.

Flores J.D²., Niño Medina G²., Báez J.G¹., García-Alanís K¹., Gallardo Rivera C¹., Castillo S.L^{1*}

1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencia de Alimentos. Av. Pedro de Alba s/n Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza N.L. México. 2. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Campus Ciencias Agropecuarias. Francisco Villa s/n, Ex Hacienda El Canadá, Escobedo N.L. Autor de contacto: *sandra.castilloh@uanl.mx, campy9995@gmail.com.

RESUMEN:

En esta investigación se evaluaron las características antimicrobianas, antioxidantes y nutricias de subproductos de papaya (*Carica papaya* L.) sometidos a bioprocesos sencillos que nos permitan un aprovechamiento sustentable de estos productos. En este trabajo se muestran los resultados del bioproceso 1*, el cual fue estandarizado para su aplicación en los subproductos aquí presentados. La actividad antimicrobiana se determinó para *Staphylococcus aureus*, y en general, se incrementó hasta en un 50% en los subproductos bioprocesados; Se estableció la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), las cuales variaron de acuerdo al tipo de subproducto, siendo menores los valores de CMI y CMB en la cáscara de papaya bioprocesada. La semilla de papaya aumentó su actividad antimicrobiana después del bioproceso, aunque presentó una actividad menor que la cáscara. En el caso de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH/TEAC, disminuyó en los subproductos bioprocesados, mientras que los polifenoles totales aumentaron significativamente en la cáscara bioprocesada. En el caso del contenido nutricional la fibra, proteína y grasa aumentaron en la cáscara bioprocesada mientras que en la semilla los valores se mantuvieron constantes en ambos casos.

Palabras clave: antimicrobiano, antioxidante, subproducto.

ABSTRACT:

This research evaluated the antimicrobial, antioxidant and nutritional characteristics of papaya byproducts (*Carica papaya* L.) subjected to simple bioprocesses that allow us to use these products in a sustainable way. In this work the results of only one bioprocess* are shown, which was standardized for its application in the byproducts presented here. The antimicrobial activity was determined for *Staphylococcus aureus*. In general, the antimicrobial activity was increased up to 50% in the bioprocessed byproducts; The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were established, and varied according to the byproduct type, with lower MIC and MBC values in the bioprocessed papaya peel. The papaya seed increased its antimicrobial activity after the bioprocess, although it showed less activity than the peel. In the case of antioxidant activity using the DPPH / TEAC technique, it decreased in the bioprocessed byproducts, while the total polyphenols increased significantly in the bioprocessed peel. In the case of nutrient content, fiber, protein and fat increased in the bioprocessed peel while in the seed the values remained constant in both cases.

INTRODUCCIÓN

Debido a las nuevas tendencias en cuidado de la salud, el consumo de frutas exóticas se ha incrementado dramáticamente en los últimos años (Parniakov et al 2015). La industria alimentaria, ha creado alimentos funcionales enfocados a lo “natural y saludable” utilizando diversas pulpas y jugos de frutas. Este tipo de productos, ya sean procesados o no, utilizan una parte de la fruta, dejando de lado algunos subproductos como las cáscaras (Dorta et al 2011). La papaya, forma parte de los frutos económicamente más importantes a nivel mundial, del cual se separan las semillas y la cáscara, considerándose esta última, un problema de eliminación grave incluso en México (Ajila et al 2010) ya que contribuye a la contaminación orgánica (Koubala et al 2014). De acuerdo a las tendencias de evitar en lo más posible pérdidas y desperdicios de alimentos que contribuyan a la contaminación, las nuevas investigaciones se han dirigido al estudio de las propiedades de los subproductos de frutas, tales como actividad antimicrobiana, capacidad antioxidante y contenido nutricional, con el fin de lograr un aprovechamiento de éstos, que nos permitan una producción agrícola e industrial económicamente sustentable (Andrews y Andrews 2008). Según estudios realizados, los desechos generados durante la comercialización o procesamiento, son una fuente muy importante de compuestos bioactivos de alto valor agregado, en particular fibra dietaria, micronutrientes, polifenoles, carotenoides, entre muchos otros (Ajila et al 2007). Estas características poco exploradas pueden aprovecharse a través de trabajos multidisciplinarios de investigación que nos permitan utilizar estos subproductos y de esta manera responder ante las demandas industriales de sustentabilidad. En algunas ocasiones las estrategias de utilización de estos subproductos radican en el aislamiento de moléculas bioactivas, requiriendo procesos caros y que además contribuyen a generar residuos químicos (Ayala-Zavala et al 2011). Se tiene conocimiento que la aplicación de bioprocesos en algunas materias primas, mejoran la calidad del producto además de incrementar algunas características funcionales (Ugwuanyi et al 2008; Correia et al 2007). Es por ello que en esta investigación las propiedades se evaluarán las propiedades antimicrobianas, nutricias y antioxidantes de subproductos de papaya bioprocesados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo. La cepa que se utilizó fue *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 donada por el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Esta se cultivó en medio Müller Hinton estéril (121 °C /15min) (MRS, Difco, BD Sparks MD, USA.), en una atmósfera aerobia y se incubó a una temperatura de 37 °C / 24h.

2. Obtención de los subproductos de papaya. Las papaya se compró en mercados del área metropolitana de Monterrey, N.L. Se separó la cáscara y la semilla para su posterior utilización. Las cáscaras y las semillas se secaron en un secador tipo túnel a una temperatura de 45°C con circulación de aire constante. El material deshidratado, se molió en un molino mecánico de grano. Las harinas obtenidas se guardaron en bolsas cerradas herméticamente en ausencia de luz, para su posterior utilización.

Para la aplicación de los bioprocesos* la cáscara y la semilla de papaya se utilizaron en fase húmeda, y posterior a la aplicación de cada bioproceso* se obtuvieron harinas de la misma, de la manera arriba mencionada.

Los bioprocesos* fueron llevados a cabo en condiciones controladas de temperatura y en esterilidad. En esta investigación se presentan únicamente los resultados de las harinas obtenidas mediante el bioproceso 1.

*Las condiciones del bioproceso están siendo evaluadas por lo que no podrán ser revelados los detalles del mismo.

3. Evaluación antimicrobiana de los subproductos. Para la evaluación antimicrobiana de los subproductos de papaya obtenidos, se realizaron extractos etanólicos a partir de las harinas obtenidas. 25 g de muestra, se colocaron en 100mL de etanol al 96% como solvente de extracción; Se dejó macerando por 48h a temperatura ambiente, se filtraron utilizando papel Whatman #1 y se dejaron secar en platos de vidrio a temperatura ambiente; una vez evaporado totalmente el solvente, los extractos fueron suspendidos en 10 mL de etanol (Castillo et al., 2014) y se guardaron en condiciones de oscuridad. Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se utilizó el método propuesto por Sánchez et al., (2016) con algunas modificaciones. Tubos con 5mL de caldo MH estériles, fueron inoculados con diferentes cantidades de extracto (mg/mL). Posteriormente se le agregó a cada tubo 1% de cultivo activado y ajustado a una concentración aproximada de $5-7 \times 10^6$ células/ml (OD_{600} 0.5). Los tubos se incubaron a 37°C/24h en condiciones aerobias. Transcurrido este tiempo, se tomaron 20 μ l de cada cultivo y se realizó una siembra por goteo en placas de agar Muller Hinton, según el método mencionado por Lee et al (2009). Las placas se incubaron a las mismas condiciones arriba mencionadas. Pasado el tiempo de incubación se determinó la CMI, definida como aquella concentración capaz de disminuir el crecimiento en un 90%, así mismo se determinó la CMB la cual se definió como la concentración más baja del extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

4. Capacidad Antioxidante. La actividad Antioxidante fue determinada utilizando el método de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) y Trolox-(Capacidad Antioxidante equivalente, TEAC). La Técnica de DPPH• se realizó de acuerdo al método mencionado por Castillo et al 2017, con algunas modificaciones. Una solución stock de DPPH se preparó mezclando 2.5mg con 100mL de metanol absoluto y ajustada a A515 nm de 0.7 ± 0.02 . Alícuotas de 3.9mL de DPPH se colocaron en tubos y fueron mezcladas en vortex, con 100 μ L de cada extracto. Estas se mantuvieron en la oscuridad por 30 min. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 515nm. La capacidad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición del DPPH. (%RSA). La capacidad antioxidante fue determinada por el contenido de ABTS•+ (2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic acid]) utilizando TEAC. Se preparó una solución de trabajo (1mL de 7.4mM ABTS con 1mL of 2.6mM $K_2S_2O_8$ ajustada a A734 0.7) para posteriormente, mezclar una alícuota de ésta (2.97mL) con 30 μ L de los extractos o Trolox. Los resultados se expresaron como TEAC (μ mol of TE/L de peso seco).

5. Polifenoles totales. El contenido de fenoles totales, fue determinado utilizando el método basado en la reacción de Folin-Ciocalteu propuesto por Niño-Medina *et al.* (2016) con algunas modificaciones. 0.1 mL extracto fue mezclado con 2.6 mL de agua destilada, seguido de 0.1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y finalmente con 1 mL de solución de Na_2CO_3 al 7%. LA reacción se llevó a cabo durante 90 min en completa oscuridad y la absorbancia final de las muestras fue medida a 750 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar (0- 200 mg/L) y los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de muestra (mg GAE/L)

6. Evaluación Nutricia. Para evaluar algunos componentes nutricios, se realizó un análisis químico proximal. A las harinas de papaya obtenidas con y sin el bioproceso 1, se les determinó el contenido de humedad, cenizas, proteínas, grasa, fibra y carbohidratos de acuerdo a los métodos estandarizados internacionales aprobados por la AOAC (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Actividad antimicrobiana. Los resultados de la actividad antimicrobiana se muestran en la Tabla I. La cáscara de papaya bioprocesada, fue la más efectiva contra *S. aureus* presentando una CMI y CMB muy por debajo de la CMI y CMB obtenida de la cáscara de papaya sin bioproceso, ya que esta última presentó una CMI de 10mg/mL mientras que la CMB no pudo ser determinada, siendo mayor a 13mg/mL. La semilla de papaya bioprocesada, presentó la misma tendencia que en la cáscara siendo menores tanto la CMI y la CMB en comparación con las las determinadas para la semilla sin bioproceso. De acuerdo a varios estudios realizados (Di Cagnio et al 2013), los bioprocesos pueden ser aplicados como herramientas para aumentar la calidad, sabor o funcionalidad de un producto. Derivado de estos bioprocesos se pueden producir diversos compuestos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, compuestos antifúngicos o antimicrobianos como las bacteriocinas, las cuales han captado la

atención debido a que pueden ser utilizados como preservativos naturales en los alimentos. El riesgo de una falla durante la aplicación del bioproceso que conlleve a un riesgo alimentario, debe ser evaluado, mediante el control de todos los factores involucrados en el mismo, por lo que estudios de toxicidad, y caracterización de la materia prima obtenida serán llevados a cabo en nuestras futuras investigaciones. Por otra parte, la resistencia bacteriana a antibióticos sigue siendo un problema a nivel mundial. Los resultados de estas futuras investigaciones podrán proporcionar datos importantes, que nos permitan analizar y establecer usos alternativos de estos productos como ingredientes activos para el control bacteriano.

Tabla I. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) en mg/mL de los subproductos de papaya contra *S. aureus*.

Subproducto	CMI	CMB
	mg/mL	
Cáscara de papaya	10±2.0	> 13
Cáscara de papaya bioproceso1	3±1.0	5.5±0.5
Semilla de papaya	11±1.0	> 13
<u>Semilla de papaya bioproceso1</u>	<u>10±0.5</u>	<u>11±1.0</u>

2. Capacidad antioxidante y fenoles totales. La capacidad antioxidante (DPPH) y fenoles totales de los extractos de papaya obtenidos, se presenta en la Tabla II. Como se puede observar en los resultados, la capacidad antioxidante de la cáscara de papaya bioprocesada (31.67±5.82) disminuyó significativamente con respecto a la cáscara sin bioproceso (64.63±3.28), mientras que los fenoles totales aumentaron significativamente en la cáscara bioprocesada (1135.6±34.1) con respecto a la cáscara sin bioproceso (941.6±57). Para el caso de la semilla de papaya bioprocesada, no hubo un aumento significativo en la capacidad antioxidante (93.844±1.56^a) con respecto a la semilla sin tratamiento (90.20±2.78) mientras que los fenoles totales presentaron una disminución significativa en la semilla con bioproceso (552.4±54.5) con respecto a la semilla sin tratamiento (1046.3±43.6). Esto pudiera indicar que la actividad antioxidante que presentó la cáscara bioprocesada no está asociada directamente a la presencia de fenoles totales en la muestra, por lo que podría estar influenciada por otros compuestos como carotenoides, ácido ascórbico entre otros (Podsdek, 2007) que pudieron presentar un aumento después del bioproceso. Por otra parte, se ha asociado la presencia de algunos compuestos como los polifenoles totales con la actividad antimicrobiana (Daglia 2012) coincidiendo con nuestros resultados en donde se puede observar que la cáscara bioprocesada, aumentó significativamente la cantidad de fenoles después de la aplicación del bioproceso, aumentando su actividad antimicrobiana significativamente con respecto a la cáscara no bioprocesada.

3. Composición Nutricia. Los resultados en base húmeda de la evaluación nutrimental se muestran en la Tabla III. Se puede observar que la cáscara de papaya bioprocesada presentó cambios en su contenido nutrimental con respecto a la cáscara sin bioproceso. El contenido fibra se incrementó de forma considerable debido en parte a la disminución de los carbohidratos disponibles que son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos durante la fermentación. En el caso de la proteína y grasa se observó un incremento moderado y estos cambios podrían estar influenciados por las transformaciones de algunas moléculas que tienen lugar durante los bioprocesos, generándose nuevos compuestos a partir de otros (Di Cagno et al. 2013).

Tabla II. Capacidad antioxidante y fenoles totales de los subproductos de Papaya obtenidas con y sin bioproceso.

Tratamiento	Fenoles	DPPH	
	totales (mg/L)	% de Inhibición	($\mu\text{mol ET/L}$)
Cáscara de papaya	941.6 \pm 57.8 ^b	64.63 \pm 3.28 ^c	548.4 \pm 27.6 ^c
Cáscara de papaya bioproceso 1	1135.6 \pm 34.1 ^a	31.67 \pm 5.82 ^d	270.6 \pm 49.1 ^d
Semilla de papaya	1046.3 \pm 43.6 ^{ab}	90.20 \pm 2.78 ^{ab}	764.00 \pm 23.4 ^{ab}
Semilla de papaya bioproceso 1	552.4 \pm 54.5 ^c	93.844 \pm 1.56 ^a	794.71 \pm 13.17 ^a

Algunos otros estudios reportan un aumento de proteína al aplicar bioprocesos a residuos de maíz (Ugwuanyi et al 2008) o en la piña (Correia et al 2007), coincidiendo con los resultados aquí presentados. En el caso de la semilla no hubo cambios importantes en su composición nutrimental. Estudios futuros, deben ir dirigidos hacia una caracterización química-nutricia completa y mejora de los subproductos, haciéndolos aptos para consumo o considerando las nuevas características nutricionales para la aplicación de los mismos como aditivos que puedan alargar la vida de anaquel por su poder antimicrobiano, y que a su vez provean beneficios adicionales para la salud.

Tabla III. Contenido nutrimental de las harinas obtenidas a partir de subproductos de papaya*.

	CP	CPB1	SP	SPB1
Humedad	4.72	6.95	4.18	5.87
Ceniza	7.65	7.98	7.97	6.69
Grasa	1.62	3.87	26.14	25.15
Proteína	15.1	16.64	22.03	22.69
Fibra	7.47	20.58	26.40	24.83
Carbohidratos	63.44	43.98	13.28	14.77

CP Cáscara de papaya, CPB1 Cáscara de papaya bioproceso 1, SP Semilla de papaya
SPB1 Semilla de papaya bioproceso 1.

* Media de dos determinaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajila CM, Aalami M, Leelavathi K, Prasada R. 2010. Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 219–224
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washigton: Association of Official Analytical Chemists.
- Andrews D, Andrews K. 2008. Nutraceutical Moringa composition. USA. Patent No. US 2006/0222682 A1. Published In: Google Patent.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., ... González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.021

- Castillo, S., Heredia, N., Arechiga-Carvajal, E., & García, S. (2014). Citrus Extracts as Inhibitors of Quorum Sensing, Biofilm Formation and Motility of *Campylobacter jejuni*. *Food Biotechnology*, 28(2), 106–122. doi:10.1080/08905436.2014.895947
- Castillo, S., Dávila-Aviña, J., Heredia, N., & Garcia, S. (2017). Antioxidant activity and influence of Citrus byproduct extracts on adherence and invasion of *Campylobacter jejuni* and on the relative expression of cadF and ciaB. *Food Science and Biotechnology*, 26(2), 453–459. doi:10.1007/s10068-017-0062-x
- Correia, R., Magalhes, M., & Macdo, G. (2007). Protein enrichment of pineapple waste with *Saccharomyces cerevisiae* by solid state bioprocessing. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66(3), 259–262.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.007
- Di Cagno, R., Filannino, P., & Gobbetti, M. (2015). Vegetable and Fruit Fermentation by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 11, 216–230. doi:10.1002/9781118868386.ch14
- Dorta E, Lobo G, González M. 2011. Reutilization of Mango Byproducts: Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*. 71: C80-C88
- Koubala, B. B., Christiaens, S., Kansci, G., Van Loey, A.M., & Hendrickx, M. E. (2014). Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin. *Food Research International*, 55, 215–221
- Lee, K.-M., Kim, W.-S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S.-W., ... Park, S. (2009). Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 72(2), 325–331.
- Niño-Medina, G., Muy-Rangel, D., & Urías-Orona, V. (2016). Chickpea (*Cicer arietinum*) and Soybean (*Glycine max*) Hulls: Byproducts with Potential Use as a Source of High Value-Added Food Products. *Waste and Biomass Valorization*, 1-5.
- Parniakov, O., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015). New approaches for the effective valorization of papaya seeds: Extraction of proteins, phenolic compounds, carbohydrates, and isothiocyanates assisted by pulsed electric energy. *Food Research International*, 77, 711–717. doi:10.1016/j.foodres.2015.03.031.
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11. doi:10.1016/j.lwt.2005.07.02.3
- Sánchez, E., Morales, C. R., Castillo, S., Leos-rivas, C., Misael, D., & Martínez, O. (2016). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms, 2016.
- Ugwuanyi, j. o.; Harvey, l. M.; Mcneil, b. (2008) .Protein enrichment of corn cob heteroxylan waste slurry by thermophilic aerobic digestion using *Bacillus stearothermophilus*. *Bioresource Technology*, Trivandrum. 99(15), 6974–6985.