

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
VEGETAL DE SEMILLAS DE PAPAYA (*Carica papaya*) FRENTE A MICROBIOTA  
BACTERIANA DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

**ESTEBAN HERNAN ARTEAGA CABRERA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
SAN JUAN DE PASTO**

**2018**

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
VEGETAL DE SEMILLAS DE PAPAYA (*Carica papaya*) FRENTE A MICROBIOTA  
BACTERIANA DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

**ESTEBAN HERNAN ARTEAGA CABRERA**

**Trabajo de Grado bajo modalidad de Investigación presentado como requisito parcial para  
optar el título de Ingeniero Agroindustrial**

**Asesor:**

**Esp. MSc. FRANCISCO EMILIO ARGOTE VEGA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
SAN JUAN DE PASTO**

**2018**

**NOTA DE RESPONSABILIDAD**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**HOJA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

**Esp M.Sc Francisco Emilio Argote Vega**

Asesor

---

**M.Sc. Zully Ximena Suárez Montenegro**

Jurado

---

**Ph.D. Andrés Mauricio Hurtado Benavides**

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera intención doy gracias a Dios.

Gracias a mis formadores en esta investigación que me brindaron las herramientas académicas y morales M.Sc Francisco Emilio Argote Vega, M.Sc Zully Ximena Suárez Montenegro y Ph.D. Andrés Mauricio Hurtado Benavides para hacer de este proyecto una realidad.

A la Universidad de Nariño y la Facultad de Ingeniería Agroindustrial por convertirme en un profesional apasionado, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación.

Al Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria y sus integrantes, por ser parte de este maravilloso grupo, brindándome gratos conocimientos, experiencias y oportunidades.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos de clase ya que gracias al compañerismo, amistad han aportado a mi propósito profesional.

Muy importante doy gracias a toda mi familia por todo el apoyo y cariño incondicional.

Finalmente, a todas las personas que con su apoyo desinteresado aportaron sus conocimientos a esta investigación.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de investigación lo dedico con todo mi amor y cariño a mi familia, especialmente a mi Madre Roció Cabrera por su sacrificio y esfuerzo, por brindarme el camino correcto hacia la superación.

A mi Abuelita por todos esos principios inculcados, enseñándome a ser una mejor persona.

A mi Hermana Salomé por ser la fuente de motivación e inspiración para poder crecer cada día y así luchar para que la vida nos depare un excelente futuro.

Gracias a todos.

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son originadas por microorganismos patógenos perjudiciales para la salud de los consumidores, para mitigar este problema la tendencia actual es hacer uso de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite vegetal a partir de semillas de papaya obtenido mediante la tecnología de fluidos supercríticos, frente a las bacterias (*Listeria monocinogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) identificadas dentro de la microbiota de trucha arcoiris. Para el efecto se estandarizó una microemulsión cuyos parámetros fueron: 60°C de calentamiento, relación 1:1 de aceite vegetal con Tween 20 como agente emulsificante y 33,73 minutos de agitación. Se evaluaron diferentes concentraciones de aceites vegetal (1, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 µl de aceite vegetal/mL de emulsión). La actividad antibacteriana se determinó con la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) utilizando el método de microdilución en caldo colorimétrico en caja de Elisa. El aceite de semillas de papaya no presentó efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereu*, pero existió inhibición de *Listeria monocytogenes*; el aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente tiene una CMI de 64 µL/mL y una CMB de 72 µL/mL; con el aceite de semillas de papaya extraído con agua como co-solvente tiene una CMI de 40 µL/mL y una CMB de 46 µL/mL. Este estudio demuestra que el aprovechamiento de residuos agroindustriales es una fuente alternativa para la obtención y aplicación de ingredientes naturales en la industria alimentaria.

**Palabras clave:** *Aceite vegetal, actividad antibacteriana, emulsión, semillas de papaya (Carica papaya).*

**ABSTRACT**

Foodborne illness are caused by pathogenic microorganisms harmful to the health of consumers and to mitigate this problem the current trend is the use of natural substances with antimicrobial properties. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of vegetable oil of papaya seeds obtained through supercritical fluid technology, against bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*) identified within the microbiota of rainbow trout. For this purpose, a microemulsion was standardized whose parameters were: 60°C, 1: 1 ratio of vegetable oil with Tween 20 as emulsifying and 33.73 minutes of agitation. Different concentrations of vegetable oils were evaluated (1, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72  $\mu\text{L}$  of vegetable oil/mL of emulsion). The antimicrobial activity was determined with the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using the microdilution method in colorimetric broth on Elisa box. The papaya seed oil showed no inhibitory effect against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. The papaya seed oil showed no inhibitory effect against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*; but there was inhibition of *Listeria monocytogenes*, the papaya seed oil extracted without co-solvent has a MIC of 64  $\mu\text{L}$  / mL and a MBC of 72  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , with the oil of papaya seeds extracted with water as co-solvent has a MIC is 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  and a MBC of 46  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . This study shows that the use of agroindustrial waste is an alternative source for obtaining and applying natural ingredients in the food industry.

**Keywords:** Vegetable oil, antimicrobial activity, emulsion, papaya seeds (*Carica papaya*), minimum inhibitory concentration (MIC).



**CONTENIDO**

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
2. JUSTIFICACION.....	24
3. HIPOTESIS .....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo General.....	28
4.2 Objetivos Específicos .....	28
5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE .....	29
5.1 Generalidades de la papaya ( <i>Carica Papaya</i> ) .....	29
5.2 Tecnología de fluidos supercríticos .....	29
5.3 Los aceites vegetales .....	32
5.3.1 Características físico-químicas de los aceites vegetales.....	34
5.3.1.1 <i>Densidad o gravedad específica</i> .....	34
5.3.1.2 <i>Índice de acidez</i> .....	34
5.3.1.3 <i>Índice de saponificación</i> .....	35
5.3.2 Índice De Yodo.....	36
5.3.2.1 <i>Índice de peróxidos</i> .....	38
5.3.2.2 <i>Cuantificación de polifenoles</i> .....	39
5.3.3 <i>Aceite vegetal de semillas de papaya</i> .....	41
5.4 Emulsión.....	42
5.4.1 Fenómenos involucrados en la estabilización de una emulsión .....	43

5.5 Agentes antimicrobianos .....	43
5.6 Bacterias patógenas en alimentos .....	45
5.7 Métodos de evaluación antimicrobiana .....	45
5.7.1 Métodos de dilución .....	46
5.7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....	47
5.8 Actividad Acuicola .....	48
5.9 Trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	49
5.9.1 Flora bacteriana de la trucha arco iris .....	50
5.9.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
5.9.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	52
5.9.1.3 <i>Bacillus cereus</i> .....	53
5.10 Antedecentes .....	53
6. METODOLOGÍA .....	56
6.1 Localización .....	56
6.2 Determinación de características fisicoquímicas del aceite vegetal de semillas de papaya extraído mediante la tecnología de fluidos supercríticos .....	56
6.2.1 Obtención del material vegetal .....	56
6.2.2 Adecuación del material vegetal .....	56
6.2.3 Extracción de aceite de semillas de papaya mediante fluidos supercríticos .....	58
6.2.4 Evaluación físico-química del aceite de semillas de papaya .....	60
6.3 Determinación de los parámetros de formación de la microemulsión .....	66
6.4 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana del aceite vegetal de semillas de papaya frente a las tres bacterias aisladas de la trucha arco iris. ....	70

6.4.1 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de microdilucion en caldo colorimetrico en caja de elisa. ....	71
6.4.2 Aplicación de la prueba confirmatoria .....	72
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
7.1 Adecuación de materia prima.....	73
7.2 Extracción de aceites vegetales mediante $\text{CO}_2$ supercrítico.....	73
7.3 Evaluación del aceite de semillas de papaya en función de sus características fisicoquímicas .....	74
8. CONCLUSIONES .....	116
9. RECOMENDACIONES .....	118
REFERENCIAS .....	119
ANEXOS.....	136

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Diagrama de temperatura frente a presión de una sustancia para conocer las condiciones de punto triple y punto crítico.....	30
Figura 2. Estructura química de los ácidos grasos: a. Palmítico; b. Oleico .....	33
Figura 3. Reacción de saponificación de una molécula de grasa. ....	36
Figura 4. Obtención de semillas de papaya.....	56
Figura 5. Secado de semillas de papaya en secador de bandejas .....	57
Figura 6. Determinación de humedad de semillas de papaya .....	57
Figura 7. Diagrama del proceso de extracción de aceite de semillas de papaya con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	59
Figura 8. Equipo de extracción de aceite vegetal de semillas de papaya con SFE-500 (marca Waters, USA).....	59
Figura 9. Determinación de Índice de refracción de aceite de semillas de papaya.....	60
Figura 10. Curva de calibración para determinación de polifenoles totales.....	65
Figura 11. Cuantificación de polifenoles del aceite de semillas de papaya. ....	66
Figura 12. Preparación y evaluación microscópica de una microemulsión de aceite de semillas de papaya.....	69
Figura 13. Determinación de pH en las microemulsiones de aceite de semillas de papaya.....	70
Figura 14. Evaluación antimicrobiana del aceite de semillas de papaya. ....	72
Figura 15. Seguimiento microscópico de la microemulsión del aceite de semillas de papaya. .	89
Figura 16. Superficie de respuesta del diámetro del glóbulo de aceite a la hora 0. ....	91
Figura 17. Microemulsiones de aceite de semillas de papaya.....	92

Figura 18.	Seguimiento microscópico de la microemulsión del aceite de semillas de papaya hora 48.....	94
Figura 19.	Diagrama de Pareto estandarizada para diámetro del glóbulo a la hora 48. ....	97
Figura 20.	Superficie de respuesta del glóbulo de aceite a la hora 48.....	97
Figura 21.	Gráfica de efectos principales para el diámetro del glóbulo de aceite a la hora 48. .	98
Figura 22.	Contornos de la superficie de respuesta estimada.....	100
Figura 23.	Representación gráfica de la variación del potencial Z en función del pH.....	103
Figura 24.	Gráfico de dispersión del pH de las emulsiones de aceite de semillas de papaya. .	104
Figura 25.	Micro emulsiones de aceite de semillas de papaya.....	104
Figura 26.	Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente frente a <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	108
Figura 27.	Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente frente a <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	108
Figura 28.	Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	109
Figura 29.	Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	109
Figura 30.	Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente frente a <i>Bacillus cereus</i> . ....	110
Figura 31.	Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente frente a <i>Bacillus cereus</i> . ....	110
Figura 32.	Prueba confirmatoria para <i>Listeria monocytogenes</i> a CMI 40 $\mu$ L de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión. ....	113

Figura 33.	Prueba confirmatoria para <i>Listeria monocytogenes</i> a concentración 48 $\mu$ L de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión. ....	113
Figura 34.	Prueba confirmatoria para <i>Listeria monocytogenes</i> a CMI de 64 $\mu$ L de aceite extraído sin co-solvente/mL de emulsión .....	114
Figura 35.	Prueba confirmatoria para <i>Listeria monocytogenes</i> a concentración de 72 $\mu$ L de aceite extraído sin co-solvente/mL de emulsión .....	114

**LISTA DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de aceite de semillas de <i>Carica papaya</i> . .....	41
Tabla 2. Concentraciones de la curva calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles. ....	64
Tabla 3. Resultados de soluciones patrones de ácido gálico para la prueba Folin Ciocalteu.....	64
Tabla 4. Diseño factorial 3 <sup>3</sup> para la determinación de parámetros de la microemulsión con el aceite de semillas de papaya. ....	68
Tabla 5. Extracción de aceite de semillas de papaya.....	73
Tabla 6. Densidad del aceite de semillas de papaya.....	75
Tabla 7. Índice de Refracción del aceite de semillas de papaya. ....	76
Tabla 8. pH aceite de semillas de papaya.....	77
Tabla 9. Índice de acidez del aceite de semillas de papaya.....	77
Tabla 10. Índice de peróxidos del aceite de semillas de papaya. ....	79
Tabla 11. Índice de saponificación del aceite de semillas de papaya.....	80
Tabla 12. Índice de Yodo del aceite de semillas de papaya. ....	81
Tabla 13. Resumen de resultados de las propiedades fisicoquímicas evaluadas en este estudio. ....	83
Tabla 14. Cuantificación de polifenoles totales presentes en el aceite de semillas de papaya.....	84
Tabla 15. Evaluación microscópica de la microemulsión de aceite de semillas de papaya a la hora 0.....	88

Tabla 16.	Análisis de varianza del diámetro de glóbulo de aceite a la hora 0.....	90
Tabla 17.	Evaluación microscópica de la microemulsión de aceite de semillas de papaya a la hora 48 .....	93
Tabla 18.	Análisis de varianza del diámetro de glóbulos de aceite de semillas de papaya a la hora 48.....	96
Tabla 19.	Optimización de variable de respuesta del diámetro del glóbulo del aceite a la hora 48.....	100
Tabla 20.	Resultados del pH de las microemulsiones de aceite de semillas de papaya. ....	101
Tabla 21.	Evaluación de la actividad antibacteriana con las muestras de aceite de semillas de papaya.....	106



## INTRODUCCIÓN

En general la industrialización de frutas, como toda industria de alimentos implica la generación de una cantidad considerable de residuos que pueden ser aprovechados de diversas formas, como en alimentación animal, abonos, obtención de biogás, en la extracción de aceites, pectinas, flavonoides, entre otros. Para la elección adecuada de alguna tecnología para el aprovechamiento de residuos se deben realizar evaluaciones tecnológicas, comerciales y de riesgos (Yepes et al., 2008). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el destino de los residuos generados del procesamiento de frutas se arroja en las basuras generando un impacto negativo al medio ambiente.

En Nariño el manejo de los residuos de frutas (semillas y cáscara), no tienen un destino que le imprima valor, debido principalmente a que las estrategias de aprovechamiento de residuos agroindustriales de este tipo se limitan simplemente a procesos de compostaje para luego ser usado como abono, actividad que es insuficiente para la generación de un mayor valor agregado para los residuos como las semillas de frutas, que de acuerdo a estudios previos pueden ser una fuente promisoría de aceites con destino a la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica (Peralta et al., 2008; Ocampo et al., 2007; Belén, et al., 2004; Amaya et al., 2007).

El aprovechamiento de residuos agroindustriales de frutas son una alternativa para mitigar el impacto ambiental dejado por el procesamiento y consumo, por lo tanto, este proyecto busca valorizar las semillas de frutas por medio de la extracción de su aceite utilizando una tecnología amigable con el ambiente como es la de fluidos supercríticos.

Desde tiempos muy remotos la materia vegetal ha cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas

analíticas que permitan la separación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales.

Los aceites vegetales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen por medio de diferentes métodos de extracción a partir de material vegetal especialmente semillas (Kiritsakis, 1992). Algunos de estos y otros extractos de plantas poseen características antibacterianas y antifúngicas que han sido evaluadas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos, como alternativas para la preservación de alimentos y para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Solorzano et al., 2011). Estos aceites tienen un amplio potencial de aprovechamiento que debe ser empleado de manera eficiente, dentro de ello esta su utilización como agentes que permitan reducir y limitar la presencia de patógenos en alimentos (Viuda et., al 2008).

Las semillas de diferentes frutas contienen componentes activos de interés como ácidos grasos libres y algunos componentes minoritarios como tocoferoles, esteroles y escualeno (Hurtado et al., 2013). Los principales ácidos grasos que se han encontrado en semillas de frutas son palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico (Pantoja, Hurtado, and Martínez, 2017; Dorado, Hurtado and Martínez, 2016; Cerón, Osorio, and Hurtado, 2012) los cuales tienen un gran potencial en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, de esta manera con el manejo adecuado de los residuos de frutas mitigaría en parte el impacto ambiental y dando un valor agregado a un residuo alimenticio (Yepes et al., 2008).

Por otra parte, tanto en Colombia como en el Departamento de Nariño, la actividad piscícola se presenta no solamente como una alternativa de gran importancia a nivel socioeconómico sino también por su contribución a la soberanía alimentaria de muchas familias, en especial en el entorno rural. No obstante, el tema de procesamiento y conservación de esta proteína cárnica

involucra el uso de aditivos químicos que prolongan su vida útil pero va en contravía con las actuales tendencias de consumo de productos naturales.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) entre las fuentes más comunes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) se incluyen productos lácteos y jugos no pasteurizados, carne elaborada y cocida de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas, además de un manejo y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados (FAO, 2015).

Las ETA's se pueden definir como el síndrome originado por la ingesta de alimentos, incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de población; de acuerdo a lo anterior es importante considerar la presencia de microorganismos de carácter patógeno que son los responsables de dichas enfermedades y la aparición de graves intoxicaciones alimentarias (FAO, 2015).

Algunos microorganismos asociados a las ETA's tales como *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* entre otros, se encuentran principalmente en alimentos contaminados o que no han pasado por un proceso adecuado de producción o conservación.

Los métodos de conservación de alimentos que estén exentos de productos químicos pero que contengan compuestos antimicrobianos seguros y eficaces abren paso a numerosos estudios con productos naturales como es el caso de los aceites esenciales o vegetales de plantas ya que los conservantes químicos aunque son usados como control microbiano, generan gran debate por los efectos secundarios sobre la salud humana. En este contexto en los últimos años los aceites naturales se han convertido en un tema de investigación en beneficio de la industria alimentaria puesto que el deterioro de los alimentos causada por microorganismos durante el procesamiento y

almacenamiento podría ser manejado con este tipo de procedimientos por aportar agentes antimicrobianos (Prakash et al., 2015).

El uso de productos antimicrobianos naturales es cada vez mayor en la industria alimentaria, considerada como una de las alternativas debido a sus bajos impactos negativos en el medio ambiente y en la salud de los consumidores. Los metabolitos secundarios de las plantas, frutas o derivados juegan un importante papel en su resistencia contra las plagas y enfermedades, por lo que las investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites permiten descubrir nuevos agentes para el control de patógenos; por eso la razón de esta investigación es evaluar el potencial antibacteriano que puede tener el aceite vegetal de semillas de papaya extraídos con fluidos supercríticos, mediante técnicas *in vitro* con la posibilidad de ser incorporado en filetes de pescado para contribuir al incremento de su inocuidad.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los productos alimenticios están frecuentemente propensos a la contaminación causada por agentes patógenos algunos de ellos generados durante el almacenamiento, el transporte o el procesamiento después de la cosecha lo que trae consigo pérdidas significativas en la calidad, cantidad, composición de nutrientes, y finalmente se reduce inocuidad y valor en el mercado. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación en 2011 los casos registrados de pérdidas de alimentos en mal estado en los que se incluye cereales, granos, nueces, frutas, verduras, carnes y especias se reportan en cifras equivalentes a toneladas métricas de alimentos cada año; para Colombia la pérdida y desperdicio de alimentos equivale a 9.76 millones de toneladas al año de los cuales 6.2 millones se pierden y 3.54 millones de toneladas se desperdician.

La Organización Mundial de la Salud afirma que las enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos presentan un problema creciente y generalizado de salud pública, se estima que afecta a 1 de cada 3 personas al año en todo el mundo, y da lugar a 2,2 millones de muertes afectando mayoritariamente a la población infantil y desencadenando así el problema de salud pública más extendido mundialmente. En Colombia para el año 2015 según datos del Instituto Nacional de Salud se reportaron 795 brotes de ETA y 32 brotes en el departamento de Nariño (Instituto Nacional de Salud, 2016).

Gran cantidad de bacterias patógenas se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en reservorios acuáticos y animales. Estas bacterias están asociadas a enfermedades gastrointestinales producto del consumo de alimentos contaminados tanto en origen como en proceso por falta de higiene e inadecuadas prácticas de procesamiento y conservación. Las infecciones vienen acompañadas de fiebre e inflamación intestinal con diarrea acuosa y en ocasiones con sangre, además de las manifestaciones después de la infección, se han presentado

lesiones cutáneas, infecciones de las vías respiratorias inclusive neumonía e infección del tracto urinario (Park, 2008).

Para disminuir el riesgo de contraer alguna ETA's y buscando la extensión de la vida útil de los alimentos, se han utilizado algunos métodos de conservación y prácticas de almacenamiento, sin embargo la contaminación y el deterioro de los mismos sigue siendo un problema importante a la hora de evaluar la inocuidad alimentaria ya que se conoce que el empleo diferentes productos químicos han contribuido de manera significativa como conservantes en el control de los alimentos, pero así mismo la mayoría de estos presentan efectos secundarios en la salud humana (Angiolillo et al., 2013). De esta manera el consumo de alimentos que han sido conservados mediante métodos químicos ha generado de alguna manera cierta inconformidad por parte de los consumidores y las industrias alimentarias los cuales actualmente tienen tendencias de consumo más saludables que contribuyen a mejorar su calidad de vida y por lo tanto los alimentos frescos, mínimamente procesados o conservados sin aditivos químicos han creado una necesidad de gran importancia dentro del mercado.

Es de mencionar la resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse, es por esta razón que se pretende buscar nuevas alternativas de antimicrobianos naturales, logrando ser un aporte innovador en este campo (Clavijo Cardona, Osorio Salazar, and Jiménez González, 2012), para combatir las infecciones y superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles actualmente (Maguna et al., 2006).

Si bien la tendencia es estudiar nuevos extractos naturales para buscar solución a industrias alimentarias, los aceites vegetales han sido muy poco investigados en comparación a los aceites esenciales sin determinar las actividades biológicas que podrían llegar a tener.

Por otra parte, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, reporta que a escala mundial se procesan casi 70 millones de toneladas de pescado por fileteado, congelación, enlatado o curado (FAO, 2001). El departamento de Nariño se destaca por ser uno de los mayores productores de trucha arcoíris en Colombia, focalizado principalmente en el corregimiento de El Encano donde esta actividad se desarrolla en su mayoría de manera artesanal, con poca tecnología lo que influye de alguna manera en la inocuidad y calidad del producto obtenido afectando así la salud pública (Moreno, 2014).

En consecuencia, si bien el renglón piscícola representa una importante fuente de ingresos para los productores de la región, su competitividad se ve disminuida por las rudimentarias prácticas de producción y conservación de este alimento.

De acuerdo a lo anterior el presente estudio plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿el aceite vegetal de semillas de papaya (*Carica papaya*) tiene actividad antimicrobiana *in vitro* ante la flora bacteriana de trucha arco iris (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*).

## 2. JUSTIFICACION

El crecimiento del sector frutícola en Nariño ha permitido que el procesamiento de frutas adquiera una importancia económica y social en la región, siendo el lulo, maracuyá, tomate de árbol, mora, mango, guanábana, papaya y guayaba, las frutas más utilizadas en esta actividad agroindustrial. De estas, el tomate de árbol es la fruta con mayor producción anual en el departamento con 4477,5 Ton, le sigue la papaya con 2862,5 Ton, mora con 2674,9 Ton. (Consolidado Agropecuario, 2010).

Dentro de la producción de papaya, se espera un aumento de producción de esta actividad al pasar de 168.783 Toneladas de producto en fresco en el año 2015 a 186.892 para el 2020 y a 251.843 para 2030, donde la mayoría estaría destinada al consumo interno (Asohofrucol, 2013).

Con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, existe la necesidad de contar con medidas de control eficaces como conservantes antimicrobianos que generen inocuidad en los alimentos y que de la misma manera no traigan efectos secundarios negativos debido a su consumo. En la actualidad se evidencia una demanda importante de alimentos que no contienen productos químicos artificiales perjudiciales, y en cuanto a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos ha crecido el interés de investigación relacionado con la búsqueda de alternativas a los antibióticos como son los antimicrobianos naturales para extender la vida útil y detener el deterioro de los alimentos a causa de agentes patógenos (Varona et al., 2013).

Desde tiempos muy remotos la materia vegetal ha cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ella posee. La medicina tradicional está siendo complementada por la medicina natural tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la separación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales. Por ejemplo, aunque los extractos vegetales están en el grupo de aditivos clasificados como sustancias aromáticas y saborizantes, en el que se



incluyen diversos productos naturales, pueden utilizarse como medicamentos alternativos en todas las especies animales sin restricción alguna de su edad pero sí en la dosis del producto (Shiva Ramayoni, 2007).

De esta manera los productos de origen natural como los aceites han sido estudiados como inhibidores potenciales de crecimiento bacteriano en la conservación de los alimentos demostrando eficacia bactericida, antioxidante y antifúngica (Varona et al., 2013). Por lo tanto es evidente que en cuanto a seguridad alimentaria hoy en día se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan eliminar o reducir la presencia de patógenos en los alimentos y para esto se plantea la posibilidad de utilizar aceites de plantas y subproductos de la industria alimentaria como una opción de conservación de alimentos. Además los compuestos fenólicos que contienen los aceites vegetales por sus propiedades además de antioxidantes y por sus atributos sensoriales brindan estabilidad por la resistencia a la oxidación lipídica, son excelentes conservadores naturales, brindando estabilidad al alimento, desplazando a otros conservadores sintéticos (Muñoz et al., 2013).

En la actualidad, el gran desafío para los países ricos en biodiversidad es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad (Lizcano and Vergara, 2008). Nariño cuenta con un gran potencial económico gracias a biodiversidad vegetal pero no lo ha sabido aprovechar para generar valor agregado. Es entonces cuando se presenta una nueva oportunidad para el departamento, a través de la investigación en ingredientes naturales y el desarrollo de productos innovadores que se convierten en una alternativa para trazar una ruta exitosa hacia el progreso científico y económico del departamento.

Es así como se busca aprovechar un residuo del procesamiento de las frutas, como son las semillas para generar un valor agregado, lo cual puede conllevar que en el futuro, estos subproductos sean una fuente adicional de ingresos tanto para el productor como para el industrial. Además, los posibles residuos generados de este proceso se podrán destinar a la elaboración de abonos o para alimentación animal, mitigando así el impacto ambiental que estos pueden generar si no se les da un tratamiento adecuado. Por otra parte, el uso de una tecnología limpia como lo es la extracción con fluidos supercríticos permite un aprovechamiento de estos residuos agroindustriales de manera sostenible y amigable con el medio ambiente, logrando un uso integral de los productos frutícolas en el departamento (Yepes et al., 2008).

La extracción de aceites vegetales con fluidos supercríticos se puede considerar como una tecnología selectiva, que requiere menor tiempo de extracción, consume menos energía y coincide con las exigencias actuales del mercado en el sentido de promover el uso de procesos de nulo impacto ambiental (Silva, et al., 2017). Por lo tanto, la extracción con fluidos supercríticos, específicamente con dióxido de carbono, resulta una alternativa interesante para la extracción de aceites vegetales por cuanto no posee los inconvenientes de los disolventes químicos tradicionales.

El desarrollo de esta investigación permitió generar un aporte científico importante para aquellas investigaciones relacionadas con aceites vegetales que van enfocadas hacia la aplicación y evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos bioactivos de los aceites de semillas de frutas sobre matrices alimentarias, con el fin de garantizar la calidad y la inocuidad de uno de los alimentos más representativos de la economía del departamento de Nariño como es la trucha arco iris. Con los resultados obtenidos se pretende contribuir, de manera indirecta con la calidad y la inocuidad de una proteína cárnica altamente nutritiva y a incrementar la competitividad de la industria de la pesca y la acuicultura.

### **3. HIPOTESIS**

El aceite vegetal de semillas de papaya (*Carica papaya*) extraído con fluidos supercríticos tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a tres bacterias (*Listeria monocynogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) presentes en la microbiota de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Estudiar mediante técnica *in vitro* la actividad antibacteriana del aceite de semillas de papaya (*Carica papaya*) frente a la microbiota de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar las características fisicoquímicas del aceite vegetal de semillas de papaya extraído mediante la tecnología de fluidos supercríticos.
- Determinar los parámetros de formación de la microemulsión a partir de aceite de semillas de papaya requerida para la evaluación de la actividad antibacteriana.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite de semillas de papaya frente a las bacterias: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, identificadas como parte de la microbiota de la trucha arcoíris.

## 5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE

### 5.1 Generalidades de la papaya (*Carica Papaya*)

La papaya pertenece a la familia *Caricaceae* de género *carica*. Papayas *Caricaceae* son originarias de zonas tropicales y subtropicales de América y África. Generalmente las papayas son bayas elipsoides a esféricas, tornándose de verdes a un color amarillo atractivo en su madurez, de pulpa blanda y jugo lechoso que es de amplio consumo. La papaya posee semillas que constituyen entre el 15 y el 20% de la fruta aproximadamente 200 semillas, dependiendo de la variedad las semillas miden de 3,7 a 4,5 mm de largo por 2 a 2.8 mm de ancho y 2 a 2.5 mm de grueso, esféricas, cubiertas por una capa mucilaginosa (sarcotesta); las cuales hacen parte de los residuos de biomasa en las unidades de procesamiento de frutas. La fruta se consume de forma directa como también en jugos y dulces, y tiene unas magníficas propiedades para facilitar la digestión de alimentos de difícil asimilación, debido a su alto contenido de papaína (Calderón et al., 1993).

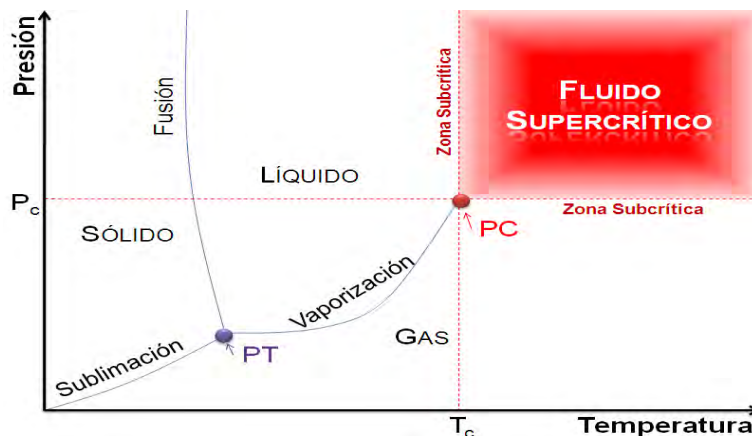
### 5.2 Tecnología de fluidos supercríticos

En la actualidad existen muchos métodos para la extracción de aceites vegetales, entre los más comunes están el prensado, la extracción con solventes, la destilación y métodos con tecnología más avanzada como la extracción asistida con ultrasonido (Vinatoru, 2001), la extracción asistida con microondas (Kaufmann & Christen, 2002) y la extracción con fluidos supercríticos (Hurtado, 2002).

La extracción con fluidos supercríticos, específicamente con dióxido de carbono, resulta una alternativa interesante para la extracción y fraccionamiento de aceites vegetales por cuanto no posee los inconvenientes de los disolventes orgánicos tradicionales.

Cuando los valores de una determinada sustancia son superiores a los de su punto crítico se le conoce como fluido supercrítico, en este punto la sustancia no puede considerarse ni gas ni líquido, por consiguiente, la fase líquida es indistinguible de la fase vapor. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver los materiales como un líquido (Hurtado, 2016). Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Velasco, Villada, and Carrera, 2007; Velásquez Valderrama, 2008).

Este proceso usa las propiedades de los gases por encima de sus puntos críticos para extraer en forma selectiva los componentes solubles de una materia prima (Cavero et al., 2006). Tal como lo muestra la Figura 1, un fluido supercrítico se define como una sustancia que se encuentra por encima de su presión Crítica ( $P_c$ ) y la temperatura Crítica ( $T_c$ ).



**Figura 1. Diagrama de temperatura frente a presión de una sustancia para conocer las condiciones de punto triple y punto crítico.**

Fuente: (Vásquez, 2008)

La Figura 1 muestra la relación entre los estados sólido, líquido y gaseoso en función de la temperatura y la presión. En el Punto Triple (PT) coexisten las tres fases. Por sobre el Punto Crítico (PC) la sustancia no es ni un líquido ni un gas, sin embargo posee propiedades de ambos: se comporta como un gas al llenar y tomar la forma de su contenedor y tiene la densidad de un líquido, además de su poder disolvente.

Los fluidos supercríticos poseen interesantes propiedades que los hacen convenientes en procesos de extracción, separación y en cromatografía, como por ejemplo: poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos, ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea, la selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de operación tales como la temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico, la extracción con fluidos supercríticos no deja residuos de disolventes, la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje. El CO<sub>2</sub> supercrítico también ha sido usado en innumerables aplicaciones industriales que incluyen diferentes campos como: alimentos, agricultura, acuicultura, pesticidas, procesos microbianos, petroquímico y farmacéutico (Brunner, 2005; Sánchez et al., 2005; Tonthubthimthong et al., 2001; Vagi et al., 2005).

El CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, se consigue con diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles, y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos cuando son extraídos (Brunner, 2005; Rosa & Meireles, 2005).

Entre las aplicaciones comerciales de los fluidos supercríticos en la industria alimentaria se encuentran: la extracción de aceites vegetales, ácidos grasos omega-3, aceites esenciales,

alcaloides, antioxidantes naturales, aromas, saborizantes colorantes, obtención de compuestos minoritarios de alto valor agregado como escualeno, tocoferoles y fitosteroles (Hurtado, Martín, Vázquez, Reglero, Señorans, & Ibañez, 2014; Hurtado, 2002; Tilly & Col, 1990).

Una limitación que presenta el dióxido de carbono como fluido supercrítico es su carácter apolar, que lo hace un disolvente poco adecuado para la extracción de compuestos polares. Sin embargo, esta característica puede no ser una desventaja, puesto que confiere una mayor selectividad en la extracción de compuestos y más posibilidades en el fraccionamiento de los mismos (Vásquez, 2008). No obstante existe una alternativa que consiste en adicionar pequeñas cantidades de modificadores o co-solventes, que son sustancias polares que varían enormemente la polaridad del fluido si son añadidas en conjunto durante la extracción (Vásquez, 2008). El co-solvente puede ser seleccionado para interactuar fuertemente con los solutos de interés para facilitar su extracción; el agua, el metanol y el etanol son capaces de formar interacciones de puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo con los fenoles, lo que indica que son buenos co-solventes del dióxido de carbono (Murga et al., 2000), para la extracción de componentes polares.

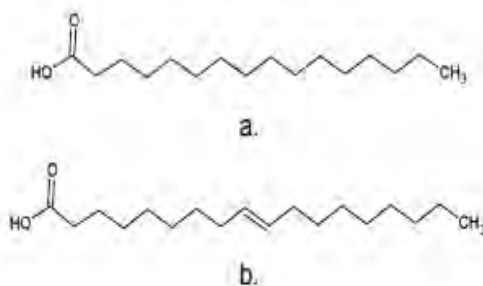
### **5.3 Los aceites vegetales**

Los aceites vegetales se caracterizan por ser compuestos orgánicos que se obtienen a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía, pertenecen a la familia de compuestos denominados lípidos, están formados básicamente por triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y otros constituyentes minoritarios como tocoferoles y esteroides (Hurtado, 2002; Bueno Ferrer 2012).

Los principales ácidos grasos que se han encontrado en semillas de frutas son palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico (Górnas & Rudzinska, 2016; Pantoja, Hurtado, and Martínez, 2017; Dorado, Hurtado and Martínez, 2016; Cerón, Osorio, and Hurtado, 2012).



Existen ácidos grasos monoinsaturados, es decir que poseen solamente un doble enlace en su cadena hidrocarbonada, como el ácido oleico (Figura 2). Por otra parte, los ácidos linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquidónico (C20:0) son ácidos grasos poliinsaturados, debido a que poseen más de un doble enlace. El ácido palmítico (C16:0) (Figura 4-1b.) y el ácido esteárico (C18:0) son los ácidos grasos saturados más abundantes en la naturaleza, mientras que los insaturados más abundantes son el ácido oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) (Kiritsakis, 1992).



**Figura 2. Estructura química de los ácidos grasos: a. Palmítico; b. Oleico**

Fuente. Este estudio

En los aceites vegetales existen compuestos minoritarios como los esteroides, también conocidos como fitoesteroides; estos se caracterizan por tener una alta demanda en la industria farmacéutica para la elaboración de hormonas semi-sintéticas y se ha difundido su uso como aditivo de algunos alimentos, debido principalmente a que disminuyen las concentraciones sanguíneas de colesterol (Palou et al., 2005). Los tocoferoles, por su parte, son compuestos poliprenoides precursores de la vitamina E, la cual actúa como inhibidor de la oxidación lipídica en sistemas biológicos y en alimentos. Los tocoferoles ejercen el efecto antioxidante por numerosos mecanismos biofísicos y bioquímicos y tienen función de inhibición de la síntesis del colesterol (Pramparo et al., 2005).

Estos aceites presentan grandes ventajas tanto a nivel alimentario como cosmético por su aporte en ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles como A, D, E y K, por lo cual se requiere estudiar las bondades de su aplicación en estos renglones. La producción de aceites, son muy demandados por su alto consumo, sobre todo en las mismas industrias de alimentos que buscan constantemente fuentes naturales de sustancias aromatizantes, para no recurrir a las sintetizadas en laboratorio.

### **5.3.1 Características físico-químicas de los aceites vegetales**

La determinación de las constantes analíticas de los aceites se hace por medio de las pruebas físicas y químicas que dan valores característicos para las distintas sustancias grasas. Estos valores sirven como parámetro de comparación entre los reportados por el ICONTEC para la clasificación de los aceites (Días & Amaya, 2005). Sobre la naturaleza y la calidad de un aceite se puede juzgar a partir de sus constantes físicas y químicas o sus números (índices). Entre las propiedades físicas más importantes de un aceite se encuentran la densidad y la temperatura de fusión; entre las químicas se destacan el número ácido (índice de acidez), el índice de yodo, el índice de peróxidos y el número o índice de saponificación (Ramírez L. , 2008).

#### ***5.3.1.1 Densidad o gravedad específica***

Esta es una constante que no varía mucho para un aceite determinado cuando esta puro y fresco, pero es afectado por la edad, rancidez y cualquier tratamiento especial que se le haga.

Según la NTC 336, la densidad es igual a la masa por una unidad devolumen convencional a una temperatura dada.

#### ***5.3.1.2 Índice de acidez***

Se entiende por índice de acidez o valor ácido, los miligramos (mg) de hidróxido de sodio NaOH o hidróxido de potasio KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presenten

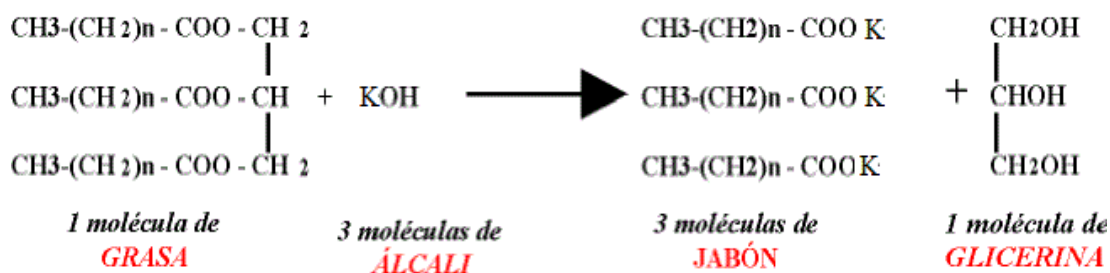
en 1 g de grasa; la acidez por su parte, es el contenido de ácidos grasos libres determinados de acuerdo con procedimientos analíticos (NTC 218, 1999).

Las grasas y aceites en contacto con el aire, humedad y a cierta temperatura sufren cambios con el tiempo, en su naturaleza química y en sus caracteres organolépticos. Estas alteraciones reciben el nombre de rancidez o enranciamiento, el cual puede ser causado por oxidación o por hidrólisis; el enranciamiento hidrolítico consiste en que en presencia de lipasas o microorganismos, los triglicéridos (grasa o aceite) producen ácidos grasos y glicerina, mientras que el enranciamiento oxidativo se debe a la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con formación de peróxidos o hidroperóxidos que posteriormente se polimerizan y descomponen dando origen a la formación de aldehídos, cetonas y ácidos (Bolaños et al., 2003).

#### ***5.3.1.3 Índice de saponificación***

El índice de saponificación es el número de miligramos de hidróxido de potasio o sodio que se requieren para saponificar 1 gramo de grasa o aceite (NTC 335, 1998), este índice determina el tipo de triglicéridos y la cantidad que se encuentra en el extracto.

El índice de saponificación es una medida de ácidos grasos libres y combinados que existen en las grasas y es directamente proporcional a su masa molecular media: cuanto menor sea la proporción de los ácidos grasos de cadena corta, tanto mayor será el índice de saponificación.



**Figura 3. Reacción de saponificación de una molécula de grasa.**

Fuente. Este estudio

Si el índice de saponificación es alto, indica que el peso molecular de los ácidos grasos es menor, así pues las grasas que contiene ácidos grasos de cadena corta consumen más KOH para saponificar un gramo, y por tanto van a tener un índice de saponificación superior o más alto. El índice de saponificación orienta sobre la proporción total de glicéridos que contiene la muestra; para calcular el Índice de saponificación se parte de una cantidad conocida de grasa, se añade un volumen medio y en exceso de KOH en solución alcohólica y se valora con HCl (Sanz I. , 2011).

### 5.3.2 Índice De Yodo

El índice de yodo se define como la determinación del grado de insaturación de una grasa expresada como el número de gramos de yodo absorbidos por 100 gramos de muestra (NTC 283, 1998). La determinación del índice de yodo, consiste en someter una cantidad exactamente pesada de la muestra a la acción del reactivo de Wijs (Solución con aproximadamente 0.2N de monoclóruo de yodo en ácido acético glacial) luego de un tiempo determinado se valora el yodo en exceso, mediante el empleo de solución de Tiosulfato de Sodio y se expresa como el número de gramos de yodo absorbidos por 100 gramos de muestra.

El ácido graso puede ser de 2 tipos: saturados (sin dobles enlaces) o insaturados (con un doble enlace por lo menos). Los ácidos grasos insaturados son muy reactivos debido a la presencia de

dobles enlaces y por tanto reaccionan a la adición de  $H_2$  cambiando el comportamiento a la fusión, el  $O_2$  provoca oxidación y  $I_2$  permite determinar el número de dobles enlaces de la grasa analíticamente, el índice de yodo mide la saturación de los ácidos grasos y esteres que es función del grado de insaturación. Se determina añadiendo a la muestra un exceso de reactivo halogenado que reacciona con los dobles enlaces (adición electrofílica); posteriormente se valora por retroceso el exceso de halógeno que no ha reaccionado (valoración redox) (Sanz I. , 2011).

Según Los valores del índice de yodo los aceites se pueden clasificar de la siguiente manera:

- *ACEITES SECANTES*: son aceites que tienen índices de yodo muy elevados que pasan de 120, como los de linaza y los de pescado. Son los que al exponerse a la acción del aire absorben el oxígeno de este y forman películas transparentes semejantes a la goma elástica.
- *ACEITES NO SECANTES*: son aceites que tienen índices de yodo inferiores a 100 como los de oliva, maní o almendras. Son los que al exponerse a la acción del aire se mantienen líquidos y se espesan un poco.
- *ACEITES SEMISECANTES*: son aceites que tienen índices de yodo intermedios como los de algodón, ajonjolí o maíz. Estos aceites desecan menos que los aceites secantes y su índice de yodo está comprendido entre 100 y 120.

El índice de yodo puede variar ligeramente con la edad y la forma de conservación de las materias grasas. Generalmente los materiales viejos y mal conservados tienen un valor inferior al mismo material fresco y bien conservado. Esta variación es más crítica para los aceites secantes que absorben fácilmente el oxígeno del aire.

### ***5.3.2.1 Índice de peróxidos***

Esta prueba es empleada para cuantificar la alteración del aceite causada por el ranciamiento, en el cual se determinan todas las sustancias presentes que oxidan el yoduro de potasio (KI) bajo las condiciones del método. Este valor se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de muestra y es aplicable a todas las sustancias grasas y se determina según la norma NTC 336 de 2002.

La causa de la alteración de los aceites y las grasas puede ser el resultado de una reacción tanto química como bioquímica pero la oxidación de las grasas es más frecuente por efecto de degeneraciones químicas. Lo esencial es que los dobles enlaces de sus ácidos grasos constituyentes, reaccionan con el oxígeno del aire formando compuestos que al descomponerse originan otros, a los cuales se les atribuye el olor y sabor desagradables característicos de las grasas oxidadas, y es esto lo que se conoce con el nombre de rancidez. Al principio de la oxidación de las grasas es posible que, en su mayoría, el producto de la reacción no sea más que un hidroperóxido. Al aumentar la cantidad de peróxidos y aparecer el olor y el sabor característicos de la rancidez, se demuestra la presencia de otros productos resultantes de la descomposición de los hidroperóxidos. El agudo y desagradable olor a rancio se cree que es debido principalmente a la presencia de aldehídos con átomos de carbono.

El sabor y olor a rancio aparecerán sólo cuando la concentración de estos compuestos sea tal que puedan ser detectados por nuestros órganos sensoriales. La correlación entre el olor y el sabor de grasas rancias y la cantidad de peróxidos, expresada como índice de peróxido, depende de muchos factores, como de su grado de insaturación y de la longitud de la cadena del ácido, entre otros. No es posible generalizar cuál es el índice de peróxido correspondiente a la aparición de la rancidez; se hace necesario, en la mayoría de los casos, determinar el índice de peróxido y hacer las correspondientes pruebas organolépticas; no obstante, si existen grasas que tienen una

composición similar, se puede generalizar y decir, más o menos, qué índice de peróxido corresponderá a la aparición de la rancidez.

### ***5.3.2.2 Cuantificación de polifenoles***

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Los compuestos fenólicos son sustancias que se encuentran en compuestos orgánicos, éstos presentan anillos aromáticos sustituidos por grupo hidroxilo y derivados funcionales de ésteres, metilésteres, entre otros. Existe una gran variedad que va desde moléculas simples hasta la formación de polímeros (Jimenez & Villareal, 2008).

Se trata de compuestos que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Tradicionalmente se han considerado como sustancias antinutritivas debido al efecto adverso de uno de sus componentes principales, los taninos, en la digestibilidad de proteínas. Sin embargo, actualmente existe gran interés en estos compuestos debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan, considerándose uno de los compuestos fitoquímicos alimentarios más importantes por su contribución al mantenimiento de la salud humana.

Los compuestos fenólicos tienen efectos beneficiosos sobre la salud y sobre la calidad de los alimentos que contienen, siendo responsables de algunas propiedades sensoriales como color y sabor (García, Fernández, & Fuentes, 2015). Las frutas y verduras contienen micronutrientes esenciales tales como minerales, fibras y vitaminas, estos aportan varios componentes metabólicos secundarios de naturaleza. Estos presentan gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, justificando muchos de sus beneficios previniendo la generación de enfermedades crónicas degenerativas (Kuskoski, Asuero, & Troncoso, 2005).

El procedimiento para la determinación de fenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu se utiliza para medir compuestos fenólicos totales en materiales vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, determinándola espectrofotométricamente a 765 nm siendo este un máximo de absorción, cuando se reduce por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que mide para evaluar el contenido en polifenoles. Las lecturas de este ensayo se cuantifican en base a una curva de calibración con un patrón de ácido gálico (Isaza, Veloza, Guevara, Ávila & Díaz, 2005).

Este método puede padecer numerosas variaciones, principalmente en los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción.

La cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado, condiciones de almacenamiento, etc (Muñoz et al., 2013).

Los compuestos fenólicos presentes en los aceites juegan un papel fundamental como antioxidantes y agentes antimicrobianos, se encuentran presentes en aceitunas, romero y cacao entre otros vegetales, entre sus funciones además de inhibir la peroxidación lipídica, controlan y protegen a los organismos vivos del daño por radicales libres (Wollgast y Anklam, 2000; Del Campo, Amiot, y Guyen, 2000; Bisignano et al., 1999).

Nieto Calvache y colaboradores en 2016, detectaron en los residuos de pulpa y cascara de papaya componente fenólicos, carotenoides y ácido ascórbico. El análisis cromatográfico les permitió la identificación de cinco compuestos fenólicos: ácido hexacósico protocatecúico, manghaslina, 3-O-rutinósido de quercetina, hexaósido de cafeoil y ácido ferúlico. Del mismo modo, la luteína, la zeaxantina, el  $\beta$ -caroteno y la  $\beta$ -criptoxantina.



Según Ghosh, Bandyopadhyay and Janna en 2017, en un estudio sobre la extracción y caracterización de compuestos bioactivos del extracto de cloroformo de las semillas de papaya encontraron alrededor de catorce componentes, en donde los principales determinados fueron: ácido oleico, ácido esteárico, éster metílico, dibenzoil-l-ácido tartárico, ácido palmítico y fenol, 2-metoxi-5-propilino entre otros.

### 5.3.3 *Aceite vegetal de semillas de papaya*

El perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de papaya reportados en la Tabla 1 por Dorado A, en 2016 fue obtenido con CO<sub>2</sub>-SC, en el que se destacan como ácidos grasos mayoritarios el ácido oleico y reporta una concentración promedio a 57,45 mg/mL (C18:1, 59,89%) y el ácido palmítico con 28,68 mg/mL (C16:0, 27,67%). En menor proporción se encontraron los ácidos: linoleico (C18:2, 7,58%), esteárico (C18:0, 3,30%), palmitoleico (C16:1, 1,03%), láurico (C12:0, 0,62%), linolénico (C18:3, 0,54%) y mirístico (C14:0, 0,52%).

**Tabla 1.**

***Perfil de ácidos grasos de aceite de semillas de Carica papaya.***

<b>Perfil de ácidos grasos</b>	
<b>Ácidos grasos identificados</b>	<b>Cantidad relativa en porcentaje (%)</b>
<b>Palmítico</b>	27,67
<b>Esteárico</b>	3,30
<b>Linolénico</b>	7,58
<b>Oleico</b>	59,89
<b>Láurico</b>	0,62
<b>Mirístico</b>	0,52
<b>Linoleico (C18:2)</b>	0,54

<b>SFA</b>	30,97
<b>MUFA</b>	60,91
<b>PUFA</b>	8,12

**SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados.**

---

Fuente: (Dorado A et al., 2016)

#### **5.4 Emulsión**

La definición de una emulsión se refiere a una dispersión coloidal de gotas de un líquido en otra fase líquida. Estos sistemas de dispersión están constituidos por dos líquidos inmiscibles en los que la fase dispersa se encuentra en pequeñas gotas distribuidas en la fase continua o dispersante.

Por lo general las emulsiones son sustancias cuyas moléculas contienen una parte no polar y otra polar, por lo que es posible que se disuelvan tanto en agua como en disolventes orgánicos y aceites. Dependiendo del dominio de una de las partes de la molécula sobre la otra, el emulgente tendrá un carácter lipofílico o lipofóbico y por consiguiente, presentara una mayor afinidad por el agua o por los aceites. (Mc Clements, 2012).

La acción del emulgente o tensoactivo es disminuir la tensión superficial hasta que empiecen a formarse agregados moleculares “micelas” (Moulik y Paul 1998).

Varios sistemas coloidales se pueden utilizar para incorporar compuestos hidrófobos en sistemas acuosos donde se incluyen las emulsiones la cuales son termodinámicamente estables y generalmente las mezclas isotrópicas de agua, aceite y los tensoactivos se utilizan para mejorar la carga de fase dispersa. Las emulsiones se han estudiado para disolver compuestos hidrófobos en sistemas de carácter alimentario, la industria farmacéutica, cosmética y las aplicaciones de recuperación de petróleo (Rao & McClements, 2011) de donde estudios recientes han demostrado

la potencial aplicación de emulsiones formadas con aceites como conservantes antimicrobianos para mejorar la seguridad microbiológica, la calidad de los productos frescos y como antioxidantes para mejorar la alimentación (Wang et al., 2014).

#### **5.4.1 Fenómenos involucrados en la estabilización de una emulsión**

Cuando ocurre la colisión entre gotas de una emulsión, pueden ocurrir varios comportamientos dependiendo de las propiedades de los componentes de la emulsión.

##### **SEDIMENTACIÓN**

Se produce cuando parte de la emulsión se separa en sentido descendente por la acción de la gravedad formando una fase líquida en la parte inferior, en este fenómeno las gotas más grandes se mueven a mayor velocidad hacia la superficie si la densidad de la fase dispersa es menor que la de la continua. En los casos extremos, las gotas se concentran en la superficie, las gotas no pierden su individualidad y el proceso es reversible.

##### **FLOCULACIÓN**

Es la adhesión de las gotas sin fusionarse, no existe una variación en la distribución de tamaño de gotas, es un proceso de agregación de gotas sin que éstas cambien el diámetro promedio de las mismas.

##### **COALESCENCIA**

Este proceso implica la unión de varias gotas para formar otras más grandes, lo que finalmente conduce a la separación de las fases. Para que se produzca la coalescencia, es necesario que la película interfacial que rodea las gotas, así como el surfactante sufra un completo deterioro (Danielsson & Lindman., 1981).

#### **5.5 Agentes antimicrobianos**

El término antimicrobiano se refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el

daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos.

Las sustancias con propiedades antibacterianas se pueden clasificar en dos tipos según la acción que ejerce sobre las bacterias, estos son, bactericidas y bacteriostáticos. Los bactericidas son aquellos que eliminan a las bacterias, mientras que los antibacterianos bacteriostáticos impiden el crecimiento de estas. Los antibacterianos pueden actuar de varias formas en las bacterias, en la pared celular para evitar su crecimiento, sobre la membrana celular para que sea permeable y que el principio tenga acceso al interior, en el ADN de la bacteria para dañar su estructura o sobre los ribosomas para que no sea capaz de sintetizar las proteínas que la mantienen con vida (Cavaliere et al., 2009).

Las opciones de agentes antimicrobianos utilizadas en las terapias para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias con resistencia múltiple están por lo tanto seriamente limitadas. Las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico. Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Aunque se han identificado algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas, terpenoides, alcaloides lectinas y polipéptidos haciendo esto posible que los extractos pueden inhibir el crecimiento de cepas con resistencia múltiple que ha llevado a muchos autores a investigar la actividad antibacteriana en plantas (Lou et al., 2001).

## **5.6 Bacterias patógenas en alimentos**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) se originan por consumir alimentos contaminados con toxinas microbianas o con una o varias bacterias patógenas. Esta contaminación usualmente se presenta por la incorrecta manipulación de los alimentos en el medio que está en contacto directo con ellos, sin embargo las enfermedades transmitidas por alimentos no solo se adquieren de esta manera, sino que la gravedad del problema se pone en evidencia al considerar que los agentes patógenos potenciales se encuentran en diversos ambientes, incluyendo la presión osmótica elevada y la humedad reducida, lo que explica por qué pueden sobrevivir y desarrollarse en las secreciones nasales del portador. Además, la contaminación del alimento puede ser endógena o de lo contrario el alimento se contaminó en algún punto de su transformación (Mercado et., al 2012).

Cualquier microorganismo con potencial para causar enfermedad se conoce como patógeno. Esta definición no sólo incluye a los microorganismos que causan enfermedad si ingresan en el cuerpo sino también a los que pueden colonizarlo sin producir enfermedad durante la mayor parte del tiempo pero que causan enfermedad si las defensas corporales se debilitan o si el microorganismo accede al lugar equivocado (Parham, 2005).

## **5.7 Métodos de evaluación antimicrobiana**

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (Ramirez and Castaño, 2009).

Es importante mencionar que no existe una reglamentación o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas *in vivo* sobre bacterias y hongos como se establece para los antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en aquellos que son utilizados para evaluar la resistencia o susceptibilidad a antibióticos, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación (Miranda-cruz et al., 2012)

La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas.

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticosa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo (Ramirez and Castaño, 2009).

### **5.7.1 Métodos de dilución**

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) definida como la concentración más baja del agente antimicrobiano necesaria para matar el 99% del inóculo inicial después de incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas; y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas (Andrews, 2001).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado

en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación.

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Ramirez and Castaño, 2009).

### **5.7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

Se puede realizar en microdilución para lo cual se escogen pocillos en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, antimicrobianos y diluciones. Los pocillos de microdilución deben sellarse para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica (Moriarty, Elborn, and Tunney, 2005).

### **ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE INHIBICIÓN (CMI)**

Para las pruebas de actividad antimicrobiana en microplaca de 96 pozos, se preparan diferentes concentraciones de los aceites y /o extractos a ensayar, los cuales se mezclan con el medio de cultivo, el cual ha sido inoculado previamente con el microorganismo de prueba , se deja incubar y posteriormente se determina por turbidez o por cambio de color con MTT el crecimiento o no del microorganismo, el pozo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la MIC. (Ramirez and Castaño, 2009).

Como prueba confirmatoria para determinar Concentración Mínima Bactericida (CMB) se siembra por superficie en caja de petri con agar nutritivo 10  $\mu$ L del contenido del pozo, dejando incubar por 24 horas a 37 °C; para posteriormente realizar la lectura determinando el número de UFC (Unidades formadoras de colonias/mL), el método estandarizado se encuentra en el protocolo del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS).

### **5.8 Actividad Acuicola**

Una de las actividades de mayor impacto en las últimas décadas ha sido la acuicultura, debido a su permanente crecimiento en producción, la alta productividad por unidad de área, los bajos costos, la calidad nutricional de los alimentos entre otras características. La FAO definió a la acuicultura como el cultivo de diferentes organismos hidrobiológicos, utilizando sistemas de producción desde los menos complejos hasta los más sofisticados; su objetivo es la obtención de alimentos de alta calidad nutricional para cubrir la demanda global que requiere la humanidad (FAO, 2013).

La producción acuícola utiliza diferentes sistemas y tecnologías de producción de carne de pescado; que permanentemente se están mejorando a través de la investigación para alcanzar mejores resultados y eficiencia productiva (Poleo *et al.*, 2011).

La Revisión Regional sobre la situación y tendencias en el desarrollo de la acuicultura en América Latina y el Caribe (2010) informó que la disponibilidad de agua dulce puede convertirse en una limitante para la producción acuícola; por lo tanto, es necesario dar un mejor uso a este recurso utilizando diferentes tecnologías y sistemas. La eficiencia de la piscicultura depende de factores que son controlados y otros que son aleatorios o difíciles de controlar como son las condiciones climáticas, por lo tanto, para lograr una alta calidad y la eficiencia del sistema se requiere un manejo adecuado de los factores controlables (FAO, 2010).



La acuicultura, desde hace mucho tiempo, es una de las esperanzas del mundo en su misión por producir proteína de altísima calidad a precios bajos y se constituye en una fuente alternativa para la seguridad alimentaria mundial y a su vez, como una actividad generadora de empleo e ingresos, la cual ayuda a la sustitución de cultivos ilícitos. Actualmente es una de las apuestas productivas del país y que se está potencializando en el Departamento de Nariño con miras hacia un futuro signado por la globalización de los mercados que generen crecimiento sostenido en el largo plazo.

### **5.9 Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez eurihalino de agua dulce de la familia de los salmónidos, cuerpo de forma alargada, fusiforme con 60-66 vértebras, 3-4 espinas dorsales, 10-12 rayos dorsales blandos, 3-4 espinas anales, 8-12 rayos anales blandos, 19 rayos caudales. Aleta adiposa presente, usualmente con borde negro. Sin tubérculos nupciales, pero ocurren cambios menores en la cabeza, boca y color de los machos. Coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella. Lomo, costados, cabeza y aletas cubiertas con pequeños puntos negros. La coloración varía con el hábitat, tamaño, y condición sexual. Tendencia de los residentes en corrientes y de los desovantes a ser más oscuros con color más intenso, mientras que los residentes de lagos son más brillantes y más plateados (Gall et al., 1992).

Según la información recolectada por la Secretaria de Agricultura y Medio Ambiente del Departamento de Nariño, a través de reuniones con los productores efectuadas en el segundo semestre de 2.009 y el diagnóstico piscícola semestre A de 2010 apoyado en trabajo de campo e información recopilada por las UMATA(s) de cada Municipio la piscicultura, particularmente ha registrado un crecimiento notorio, gracias al impulso que se ha dado mediante la organización de

los eslabones bajo el lineamiento del encadenamiento piscícola, garantizando seguridad alimentaria con las especies como la trucha por tener una gran demanda debido a su coloración.

El Departamento de Nariño se destaca como uno de los mayores productores de Trucha en el país, sin embargo, muestra un bajo nivel de industrialización, auspiciado por el mercado regional que no exige mayores técnicas de manejo y conservación.

### **5.9.1 Flora bacteriana de la trucha arco iris**

Los organismos acuáticos como los peces, moluscos y crustáceos son susceptibles a una amplia variedad de patógenos bacterianos, dentro de los cuales están los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Pseudomonas*, que son componentes de la flora normal del agua que les rodea y se muestran virulentos como respuesta a situaciones de estrés, a un fallo en el funcionamiento fisiológico de los organismos o a una mala calidad del agua (Balcazar et al., 2006; El Haroun et al., 2006; Lara Flores et al., 2010).

Por lo tanto, estos patógenos constituyen un factor limitante en el desarrollo de la acuicultura en el mundo, al ocasionar grandes pérdidas en la producción (Nikoskelainen et al., 2003; Avella et al., 2010), por lo que en años recientes las investigaciones científicas se han enfocado a la búsqueda de herramientas para el control de patologías infecciosas.

Tradicionalmente, el único método practicado para el manejo de poblaciones bacterianas indeseables era la aplicación de quimioterapéuticos, pero el uso inadecuado de estos, causó resistencia bacteriana y con ello enfermedades infecciosas incontrolables (Gullian et al., 2004; Venkant et al., 2004; Rodgers y Furones, 2009).

Diversos estudios señalan que la microflora de peces se encuentra caracterizada por miembros de los géneros *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, y *Vibrio*, mientras que para peces de agua dulce

dominan los generos *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, y *Pseudomonas* (Veschuere et al., 2000; Burr y Gatlin, 2005).

Dentro de esta investigación se evaluaron tres bacterias aisladas de la trucha arcoíris:

#### **5.9.1.1 *Staphylococcus aureus***

Es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, de enterotoxinas termoestables ampliamente distribuida en el medio ambiente es inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella.

*Staphylococcus aureus* es una bacteria muy resistente en el medio ambiente y ampliamente distribuida en la naturaleza que puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos, encontrándose en la piel, cabello, fosas nasales y garganta. En consecuencia, pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, principalmente alimentos derivados de animales leche, carne, huevos o los productos derivados y alimentos consumidos en crudo frutas, verduras, etc. (EFSA, 2013). El responsable del problema es una toxina de carácter termoestable, lo que permite que en alimentos cocinados se mantenga la toxina, aún cuando no esté presente el microorganismo.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina secretada por la bacteria. (Brooks et al, 2011). La intoxicación alimentaria estafilocócica se caracteriza por un inicio repentino de los síntomas, con vómitos, dolor abdominal y calambres en el estómago siendo este el más común (Murray, 2005). Típicamente, una intoxicación alimentaria se produce

después de la ingestión de alimentos que están contaminados con *S. aureus* por un manejo inadecuado y el posterior almacenamiento a temperaturas no óptimas (Argudin et al., 2010, Hennekinne & Col., 2012).

### **5.9.1.2 *Listeria monocytogenes***

El género *Listeria* está compuesto por bacterias gram positivas, Son bacilos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, no capsulados, catalasa positiva, móviles entre 10 y 25°C (Collins et al., 1991).

*Listeria* ha sido aislada de diferentes sitios ambientales, como; suelo, agua, efluentes, de una gran variedad de alimentos y de heces humanas y animales. El hábitat natural de estos microorganismos es probablemente la materia orgánica vegetal en descomposición y los rumiantes domésticos contribuyen al mantenimiento de *Listeria* spp. en el ambiente rural a través de un ciclo continuo de enriquecimiento oral-fecal (Fenlon, 1999). La amplia distribución de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en diferentes medios.

Por lo general, esta bacteria puede causar gastroenteritis con fiebre, dolor de cabeza, malestar estomacal y vómitos, pero sin mayor repercusión en adultos sanos. Cualquier persona puede contraer la enfermedad pero afecta de forma más severa a personas con el sistema inmunológico debilitado.

Esta bacteria puede presentarse tanto en alimentos vegetales como animales, aunque la *Listeria* se suele asociar mayormente a quesos poco curados y otros derivados lácteos elaborados con leche cruda o sin pasteurizar, frutas y verduras crudas, patés y pescados crudos o ahumados en frío, carne de rumiantes y aves, y embutidos cocidos y curados. También puede encontrarse en comidas preparadas listas para su consumo de origen vegetal, lácteo, marino o cárnico (Benadof D, 2008).

### 5.9.1.3 *Bacillus cereus*

Bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, móvil. La espora es ovoidea, central y no deformante, hidroliza la lecitina de la yema del huevo y no fermenta el manitol. Temperatura óptima 30°C a 37°C, su temperatura de crecimiento 5°C a 55°C y temperatura de germinación 5°C a 8°C. Su pH óptimo 4.5 a 9.3, Aw 0.95 y su concentración de sal 7.5%. Produce dos tipos de toxiinfecciones alimentarias: la forma diarreica y la forma emética (Kotiranta et al., 2000). La forma diarreica tiene periodo de incubación de 8 a 16 horas, causa diarrea, dolor abdominal. El proceso dura 24 horas y pueden producir dos tipos de enterotoxinas: toxinas termoestables y termolábiles lo que permite el crecimiento a temperaturas extremas y las variaciones de la mismas sin ocasionar desnaturalización de la bacteria (Gonzales et al., 1996).

## 5.10 Antedecentes

Los extractos de *Organum majorana* obtenidos por CO<sub>2</sub> supercrítico y extracción Soxhlet alcohólica presentan potencial aplicación como ingrediente natural como aromatizante, saborizante o antibacteriano. Los extractos examinados podrían tener un papel en la preservación contra hongos y bacterias filamentosas, especialmente los extractos a partir de fluidos supercríticos que son capaces de suprimir el crecimiento bacteriano en un alimento (Vági et al. 2005).

A partir de residuos de frutas se han reportado actividades antibacterianas como por ejemplo, el polvo de las semillas de aguacates Haas inhibieron el crecimiento de cepas microbianas (*Salmonella spp*, *P. aeruginosa* ATCC 27853), observándose resultados positivos a la menor concentración del aditivo (48 mg/L) (Henríquez, Patiño, and García, 2013); el extracto etanólico producido a partir de las semillas de maracuyá exhibió el mayor potencial antibacteriano sobre las cepas de *S. aureus* y *E. coli*. Con un efecto bactericida a concentraciones de 11,7 y 9,4 mg/mL para *S. aureus* y *E. coli* respectivamente (Noguera, Ojeda, Jiménez and Kremisisky, 2017).

*Carica papaya* es una de las plantas medicinales más importantes ya que posee propiedades analgésicas, amebicidas, antibacterianas, cardiotónicas, digestivas, hipotensoras, laxantes, estomáquicas y vermífugas (Afolavan, 2003). Las semillas de papaya es una fuente rica de nutrientes antioxidantes como carotenos, vitamina C y flavonoides; las vitaminas B, ácido fólico, ácido oleico y ácido pantoténico; y los minerales, potasio y magnesio; y fibra (Suleiman, 2011).

Las semillas de papaya parecen tener valores medicinales más potentes que la carne. Las semillas son efectivas para controlar la diabetes mellitus, la hipertensión y la hipercolesterolemia, que también son beneficiosas para curar trastornos hepáticos y renales. Las semillas de papaya tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas y son efectivas contra las infecciones por *E. coli*, *Salmonella*, *Rhizopus nigricans* y *Mucor circinelloides*. Las semillas tienen actividad bacteriostática de organismos gram positivos y negativos que podrían ser útiles en el tratamiento de la úlcera crónica de la piel (Ghosh, Bandyopadhyay and Janna, 2017).

Las semillas de papaya contienen un aceite fijo compuesto de ácidos grasos mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, oleico y fosfolípidos. Durante las últimas décadas, se ha logrado un progreso considerable con respecto a las propiedades terapéuticas de la papaya (Ghosh, Bandyopadhyay and Janna, 2017).

Una investigación llevada a cabo por Debnath y otros (2011) mostró que el extracto obtenido de la semilla de papaya tuvo acción tanto contra cepas de *Candida albicans*, *Aspergila niger*, y *P. Aeruginosa*, pero su mejor desempeño fue como antifúngico.

De acuerdo a Bhattacharjee et al. (2003), las semillas de papaya son comestibles y se han empleado como adulterantes de la pimienta negra debido a su apariencia y sabor picante (Lee et al., 2011). Además, poseen compuestos con propiedades quimiopreventivas del cáncer (Lee et al., 2011), propiedades anticonceptivas en perros (Ortega et al., 2011), son efectivas en el tratamiento contra parásitos intestinales en humanos y animales (Wilson et al., 2001) y para el control de

plagas que atacan el maíz (Franco et al., 2006). Por otra parte, algunos estudios han reportado que las semillas de papaya son una fuente importante de aceite vegetal (30%) (Puangsri et al., 2005; Dorado, Hurtado, and Martínez 2017).

Ghosh et al., (2017) informa que el ácido oleico extraído de extracto de cloroformo de las semillas de papaya puede inhibir el efecto patógeno de *Klebsiella in vivo*. A demás observaciones anteriores para otros ácidos grasos contra la bacteria, incluyen el ácido caprílico, ácido láurico y ácido sapiénico. Dicha muerte celular rápida causada por el ácido sugiere un mecanismo de acción lítico de la membrana celular contra *Klebsiella*, que está en línea con estudios previos sobre especies Gram-positivas.

En una anterior investigación realizada en el grupo de Tecnologías Emergentes en Agroindustria TEA se determinó que el aceite vegetal extraído de semillas de papaya tiene actividad antimicrobiana en cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 en condiciones *in vitro*, concentración de 16  $\mu$ L de aceite/mL de emulsión es la concentración mínima inhibitoria CMI.

Si bien hay estudios que reportan el efecto antimicrobiano y bactericida de aceites esenciales, existe poca literatura frente a la acción antibacteriana de aceite de semillas de frutas especialmente de papaya.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Fluidos Supercríticos e Ingredientes Naturales del Grupo de Investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria-TEA y en el Laboratorio de Microbiología de Ingeniería Acuícola de la Universidad de Nariño, Sede Torobajo, en la ciudad de San Juan de Pasto

6.2 Determinación de características fisicoquímicas del aceite vegetal de semillas de papaya extraído mediante la tecnología de fluidos supercríticos.

#### 6.2.1 Obtención del material vegetal

Las semillas de papaya evaluadas fueron suministradas por la empresa Mas Fruta S.A.S dedicada a la obtención de pulpas de frutas, ubicada en la ciudad de San Juan de Pasto.

Se obtuvieron alrededor de 2 kg de semillas que fueron empacadas en bolsas de polietileno y trasladadas hacia las instalaciones de la Universidad de Nariño, donde se realizó el proceso de extracción del aceite.



**Figura 4. Obtención de semillas de papaya**

Fuente. Este estudio

#### 6.2.2 Adecuación del material vegetal

Se realizó un proceso de adecuación que consistió en retirar el exceso de pulpa adherido a las semillas haciendo un lavado con agua y se procedió a secarlas en un secador de bandejas (FIQ



Ltda, Colombia) a 50°C por 12 horas. Posteriormente se realizó una molienda por impacto en un Molino IKA A11 Basic para reducir el tamaño de la partícula.



**Figura 5. Secado de semillas de papaya en secador de bandejas**

Fuente. Este estudio

Se determinó el porcentaje de humedad de 5 g de semillas de papaya por triplicado según la Norma Internacional AOAC 1990: Official Methods of Analysis 15 ed. en una balanza gravimétrica RASWAG PMR-50 a una temperatura de 103°C, con el fin de alcanzar una humedad menor al 10%, condición favorable para un proceso de extracción óptimo.



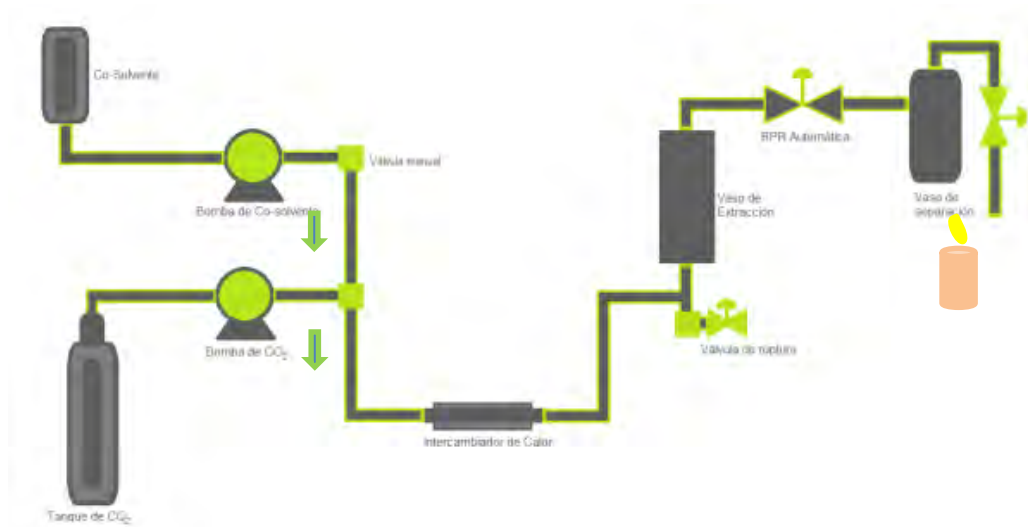
**Figura 6. Determinación de humedad de semillas de papaya**

Fuente. Este estudio

### **6.2.3 Extracción de aceite de semillas de papaya mediante fluidos supercríticos**

La extracción del aceite vegetal se realizó utilizando la tecnología de fluidos supercríticos, empleando el equipo SFE 500 marca Waters (USA), usando dióxido de carbono como disolvente para la extracción. El equipo posee una celda de extracción 500 de mL, una bomba de alta presión y un separador. Además, el equipo cuenta con sistemas de control de presión, de temperatura y de flujo de CO<sub>2</sub>. El diagrama de proceso se indica en la Figura 4.

Se adicionó aproximadamente 166 g de semillas de papaya molidas en la columna de extracción. Seguidamente se hizo pasar el CO<sub>2</sub> a través de un serpentín sumergido en líquido refrigerante (etilenglicol) mantenido a una temperatura de 2 °C con el objetivo de evitar su gasificación y mantenerlo líquido. Empleando una bomba de alta presión se bombeó el CO<sub>2</sub> hasta alcanzar 381 bares. La temperatura dentro del recipiente extractor fue elevada a 50°C. Una vez alcanzadas las condiciones de operación (presión y temperatura) en la columna de extracción, se inicia el proceso ajustando el flujo de CO<sub>2</sub> a 30 g/min por un tiempo de 120 minutos a través de la celda de extracción. El CO<sub>2</sub> pasa por la columna y extrae el aceite presente en las semillas. Finalmente se despresurizara el equipo, el CO<sub>2</sub> en estado gaseoso circuló hasta el escape y el aceite extraído se recogió en un vial ámbar (Dorado A 2016).



**Figura 7. Diagrama del proceso de extracción de aceite de semillas de papaya con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

Fuente. Este estudio

Este mismo proceso se hizo para la obtención de aceite vegetal pero con la adición de agua como co-solvente a un porcentaje de 5% del flujo total o sea 1,5 mL/min, esto con el fin de extraer los componentes polifenólicos que el CO<sub>2</sub> no puede extraer debido a su carácter apolar. Se utilizaron 194 g de semillas de papaya molida en la columna de extracción.



**Figura 8. Equipo de extracción de aceite vegetal de semillas de papaya con SFE-500 (marca Waters, USA)**

Fuente. Este estudio

#### 6.2.4 Evaluación físico-química del aceite de semillas de papaya

Se llevó a cabo la caracterización físicoquímica del aceite de semillas de papaya (*Carica papaya*) de acuerdo a la normatividad vigente en Colombia para la determinación de aceites.

Densidad: Se determinó con el procedimiento descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 336 PARA GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES, MÉTODO DE LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD (MASA POR VOLUMEN CONVENCIONAL) utilizando un picnómetro Gay-Lussac de 5 mL a una temperatura de 20°C. La densidad se midió en g/mL.

Índice de refracción: Se determinó según NTC 289 GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN en un refractómetro de mesa tipo Abbe de 1,300 -1,700 (0,0001 Nd) (Boeco, Alemania) a una temperatura de 20°C.



**Figura 9. Determinación de Índice de refracción de aceite de semillas de papaya**

Fuente. Este estudio

Índice de acidez: Para la evaluación de la acidez se utilizó la NTC 218 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ, con el método numero 4: Método con etanol caliente usando indicador. Se tomaron 7 g de muestra y se preparó la solución álcali (hidróxido de potasio); en un segundo beaker se preparó el etanol neutralizado, para esto se calentó a ebullición 150 mL de etanol al 95 % y 1,5 mL de fenolftaleína, mientras la temperatura esta aun sobre 70°C se neutralizó cuidadosamente con KOH de 0,1 mol/L, el punto

final de la titulación se alcanzó cuando la adición de una gota del álcali produjo un cambio de color, ligero pero definitivo (rosa tenue).

En el beaker que contiene la porción de ensayo se agregó 50 mL de solución etanólica neutralizada, se llevó a ebullición y se tituló en caliente con la solución de hidróxido de potasio a 0,1 mol/L; se agitó el contenido del matraz vigorosamente durante la titulación

Para la determinación de este Índice no se realizaron repeticiones por utilizar una cantidad de aceite considerable.

Índice de saponificación: Se determinó siguiendo la metodología de la NTC 335 GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

En un balón se pesaron 2 g de porción de aceite vegetal de papaya, se añadió 25 mL de la solución etanólica de hidróxido de potasio y se dejó ebullicir ligeramente y con agitación esporádica por espacio de 1 hora, evitando la evaporación del etanol se añadió a la solución caliente 0,5 mL de solución de fenolftaleína y se tituló con la solución de HCl, hasta desaparecer el color rosa del indicador.

Se preparó el blanco omitiendo la porción de ensayo y la hora de ebullición y agitación. Se realizaron dos determinaciones y el blanco en simultáneo.

Índice de peróxidos: Se determinó el índice de peróxido siguiente el protocolo de la NTC 236 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PEROXIDO.

Se pesó en un beaker 2 gramos de muestra aproximadamente, se añadió 30 mL de solución ácido acético/cloroformo, se añadió 0,5 mL de solución de yoduro de potasio, se mantuvo en reposo por 1 minuto a temperatura ambiente, al minuto de reposo inmediatamente se adicionó 30 mL de agua. Se tituló con una solución de Tiosulfato de sodio 0.1 N agitando vigorosamente

hasta que el color amarillo desapareció, a continuación, se adicionaron 0,5 mL de solución de almidón, se continuó la titulación hasta que el color azul desapareció totalmente, en este punto fue de vital importancia cuidar el punto de titulación.

El índice de peróxido, expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de muestra,

Índice de yodo: Para la determinación del índice de yodo se utilizó la NTC 283 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO con modificando las cantidades utilizadas por la falta de disposición de reactivos.

Se pesó 0.2084 g de aceite de semillas de papaya en un erlenmeyer, se adicionó 8.2 mL de cloroformo para disolver el aceite, inmediatamente se agregó 10 mL de reactivo de Wijs y se dejó en la oscuridad por 30 minutos por lo que se espera un índice menor a 150. Al finalizar los 30 minutos se adicionó 8.2 mL de yoduro de potasio KI y 40 mL de agua, se tituló con la solución normalizada de 0.1 N de Tiosulfato de sodio, cuando apareció un color amarillento por la desaparición del yodo se agregó una gota de solución de almidón, se continuó la titulación hasta la desaparición completa del color azul. Se realizó un blanco simultáneo con las mismas condiciones omitiendo la porción de ensayo.

Cuantificación de Polifenoles Totales: Se determinó con el método de Folin-Ciocalteu que se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin- Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm .

Este método realiza la cuantificación total de los fenoles presentes en la muestra. Los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Cicalteu (mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico), lo que da una coloración azul; medida en un espectrofotómetro

GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, USA) a una longitud de onda de 765 nm, permitiendo cuantificar los polifenoles presentes (Borden y Scarpa, 2000).

Para cuantificar los compuestos fenólicos del aceite vegetal de semillas de papaya se siguió la metodología propuesta por Aparicio R, Roda L, Albi M.A, Gutierrez F.J. en 2001 con algunas modificaciones.

Se tomaron 500  $\mu$ L del aceite vegetal y se adicionó 900  $\mu$ L de Folin-Ciocalteu, la mezcla se agitó en vortex durante 5 minutos, después de este tiempo se adicionó 1 mL de carbonato de sodio al 7.5% (P/V) más 4 mL de agua para diluir la solución. La reacción fue desarrollada durante 2 horas en oscuridad con agitación constante. La absorbancia fue medida por triplicado a 765 nm. Este procedimiento también se realizó con el aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente.

Antes de cuantificar los compuestos fenólicos en el aceite de semillas de papaya, se realizó la preparación de curva de calibración con ácido gálico, para ello Benavides & Revelo en 2016 prepararon disoluciones patrón de ácido gálico, realizaron una disolución de 1000 ppm (1000 mg/L disolución concentrada o madre), a partir de esta disolución prepararon 10 mL de disoluciones diluidas en concentraciones de ácido gálico entre 0 y 500 ppm, según se detalla en la Tabla 2. Para ello, se añadió a cada tubo de ensayo la cantidad correspondiente de agua destilada (Tabla 2) y se agregó a cada tubo la cantidad correspondiente de la disolución madre de ácido gálico, se prosiguió agitando en Vortex V-1 plus a máxima revolución, se mantuvo en oscuridad y en refrigeración hasta la medición espectrofotométrica a una longitud de onda de 765 nm.

**Tabla 2.****Concentraciones de la curva calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles.**

Reactivos	Concentración (mg/L) de la curva patrón de ácido gálico						
	0	25	50	100	150	250	500
Ácido gálico (mL)	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.5	5
Agua (mL)	10	9.75	9.5	9.0	8.5	7.5	5

Fuente: Benavides &amp; Revelo, 2016

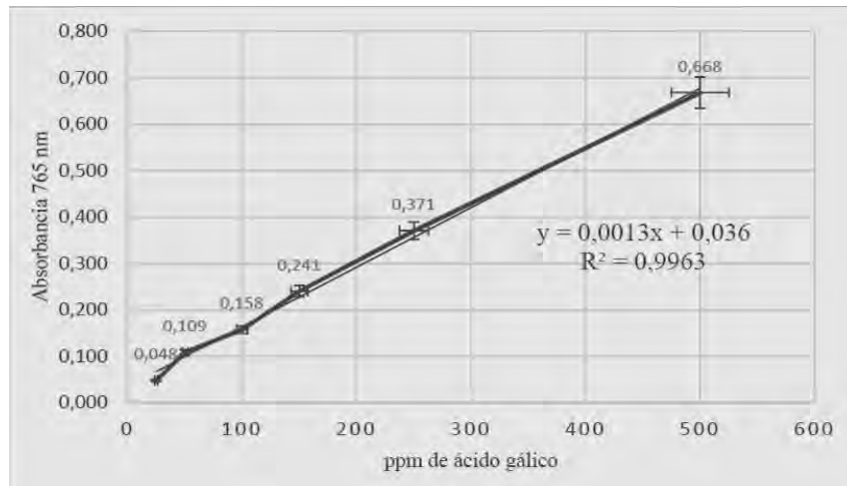
Los resultados de la curva patrón fueron los siguientes

**Tabla 3.****Resultados de soluciones patrones de ácido gálico para la prueba Folin Ciocalteu.**

A. gálico ppm	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0	0	0	0	0,0000	0,000	0
25	0,048	0,049	0,048	0,0483	0,001	1,195
50	0,111	0,108	0,109	0,1093	0,002	1,397
100	0,158	0,156	0,16	0,1580	0,002	1,266
150	0,243	0,239	0,24	0,2407	0,002	0,865
250	0,373	0,369	0,371	0,3710	0,002	0,539
500	0,667	0,669	0,669	0,6683	0,001	0,173

Fuente: Benavides &amp; Revelo, 2016





**Figura 10. Curva de calibración para determinación de polifenoles totales.**

Fuente: Benavides & Revelo, 2016

A partir de la curva de calibración de las soluciones patrones se determina la ecuación de la recta.

$$Y=0,0013x + 0,036$$

Donde:

Y=Absorbancia de la muestra

X= ppm de ácido gálico

0,0013= pendiente

0,036= intercepto

La ecuación de tendencia lineal presenta un excelente coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 0,9963 validando su utilización de esta para la cuantificación de polifenoles.



**Figura 11. Cuantificación de polifenoles del aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

### **6.3 Determinación de los parámetros de formación de la microemulsión**

Debido a que las bacterias crecen en un caldo de cultivo que tiene un carácter hidrofóbico y el aceite vegetal es de carácter lipofílico, se requirió formar una emulsión para mantener la estabilidad del medio.

Para tal fin se realizaron microemulsiones con el aceite de las semillas de papaya, monolaurato de sorbitán y polioxietilen (Tween 20) como surfactante; la misma se complementó con el caldo de cultivo infusión cerebro corazón BHI previamente esterilizado. La formación de las microemulsiones se realizó mezclando una sustancia en fase polar (caldo de cultivo) con la fase no polar (aceite vegetal) y un tensoactivo, aplicando energía externa al sistema, tales como agitación y calentamiento (McClements, 2012).

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la formulación de la micremulsión fueron los siguiente: la temperatura de calentamiento a 40, 50 y 60°C, el tiempo de agitación a 20, 30 y 40 min, la velocidad de agitación se fijó de manera constante a 2000 rpm, la proporción entre aceite de semillas de papaya y tween 20 a evaluar fueron 1:1, 1:1,5 y 1:2 respectivamente. La variable de respuesta estudiadas fueron el tamaño del glóbulo del aceite de semillas de papaya en la microemulsión a la hora 0 y a la hora 48. Se utilizó un diseño experimental de tipo factorial 3<sup>3</sup> (de

3 niveles), utilizando la metodología de superficie de respuesta para determinar la influencia de la temperatura, el tiempo de agitación y la relación aceite- Tween 20 (A-T) sobre el diámetro en las partículas de aceite, con un nivel de significancia del 5 %. Además, se determinaron las condiciones óptimas que minimizan la variable respuesta teniendo en cuenta que un menor diámetro del glóbulo de aceite genera mayor estabilidad de la emulsión (Kosegarten-Conde and Jiménez, 2012) y se obtiene el respectivo modelo estadístico; sin repeticiones en los puntos centrales y sin puntos estrella.

Para dicha prueba y determinar las condiciones óptimas para la evaluación del aceite de semillas de papaya en la microemulsión, se realizaron microdiluciones de 2 mL de volumen total dentro de los cuales se adicionó 10  $\mu$ L de aceite vegetal a cada prueba.

**Tabla 4.**

**Diseño factorial  $3^3$  para la determinación de parámetros de la microemulsión con el aceite de semillas de papaya.**

Experimento	Condiciones de proceso			Variables respuestas	
	Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (min)	Relación aceite vegetal: Tween 20	Diámetro partícula de aceite hora 0	Diámetro partícula de aceite hora 48
1	40 (-1)	20(-1)	1:1(-1)	X	X
2	40(-1)	20(-1)	1:1,5(0)	X	X
3	40(-1)	20(-1)	1:2(+1)	X	X
4	40(-1)	30(0)	1:1(-1)	X	X
5	40(-1)	30(0)	1:1,5(0)	X	X
6	40(-1)	30(0)	1:2(+1)	X	X
7	40(-1)	40(+1)	1:1(-1)	X	X
8	40(-1)	40(+1)	1:1,5(0)	X	X
9	40(-1)	40(+1)	1:2(+1)	X	X
10	50(0)	20(-1)	1:1(-1)	X	X
11	50(0)	20(-1)	1:1,5(0)	X	X
12	50(0)	20(-1)	1:2(+1)	X	X
13	50(0)	30(0)	1:2(+1)	X	X
14	50(0)	30(0)	1:1,5(0)	X	X
15	50(0)	30(0)	1:2(+1)	X	X
16	50(0)	40(+1)	1:1(-1)	X	X
17	50(0)	40(+1)	1:1,5(0)	X	X
18	50(0)	40(+1)	1:2(+1)	X	X
19	601:2(+1)	20(-1)	1:1(-1)	X	X
20	601:2(+1)	20(-1)	1:1,5(0)	X	X
21	601:2(+1)	20(-1)	1:2(+1)	X	X
22	601:2(+1)	30(0)	1:1(-1)	X	X
23	601:2(+1)	30(0)	1:1,5(0)	X	X
24	601:2(+1)	30(0)	1:2(+1)	X	X
25	601:2(+1)	40(+1)	1:1(-1)	X	X
26	601:2(+1)	40(+1)	1:1,5(0)	X	X
27	601:2(+1)	40(+1)	1:2(+1)	X	X

Fuente. Este estudio

La preparación de las microemulsiones se realizó adicionando el medio de cultivo y el Tween 20 en tubos de ensayo esterilizados, se agitó por cinco minutos en un Vortex V1-plus a velocidad máxima (2000 rpm); se prosiguió calentando a baño maría a 60°C por un minuto, se agitó en vortex a velocidad máxima por dos minutos, después se adicionó el aceite vegetal calculado para volver a calentar en baño maría 5 minutos a la temperatura indica el tratamiento experimental y por último se agitó en vortex durante el tiempo indicado en cada tratamiento para dejar reposar y evaluar la microemulsión.

Para verificar la estabilidad de la microemulsión se realizó un seguimiento visual y un seguimiento micro-fotográfico con el programa ToupView evaluándola a 40x en el microscopio a la hora 0 y a la hora 48 con el fin de observar el tamaño del glóbulo más pequeño del aceite y evidenciar cuando esta se ve desestabilizada por mecanismos tales como la dispersión de Ostwald, la coalescencia y la agregación lo que resulta en alteraciones de la distribución del tamaño del glóbulo y posiblemente en la formación de sedimentaciones y separación de fases durante el almacenamiento (Mc Clements, 2012) .



**Figura 12. Preparación y evaluación microscópica de una microemulsión de aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

Adicionalmente a las microemulsiones se les determinó el pH usando un potenciómetro 3510 pH marca Meter calibrado con el fin de observar la variabilidad de las interacciones electroestáticas y la estabilidad de las microemulsiones.



**Figura 13. Determinación de pH en las microemulsiones de aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

La matriz del diseño de experimentos (Tabla No. 5) y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion XV (Statgraphics Technologies Inc., USA). La interpretación estadística de los datos se realizó mediante el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%. Los resultados se expresaron mediante las tablas de varianza ANOVA, el modelo matemático de 2° orden y los gráficos de efectos principales, superficie de respuesta y la tabla de respuesta óptima.

6.4 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del aceite vegetal de semillas de papaya frente a las tres bacterias aisladas de la trucha arco iris.

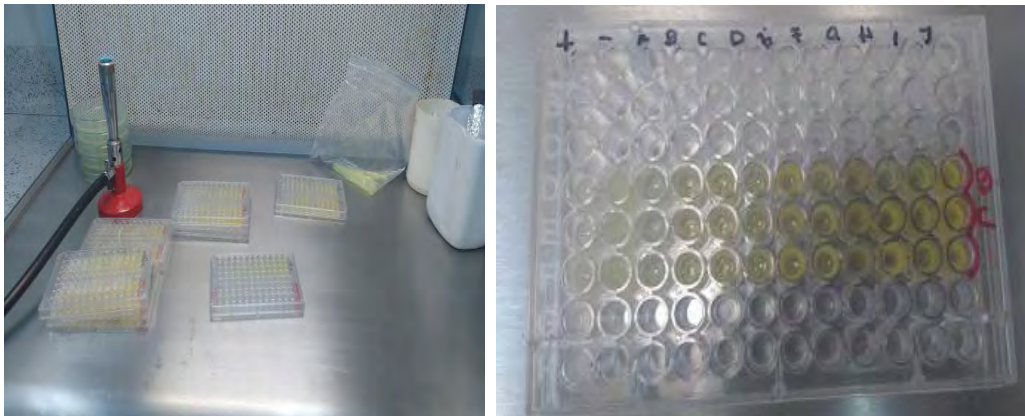
Las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* fueron suministradas por el Grupo de Tecnologías Emergente de Agroindustria-TEA las cuales habían sido aisladas e identificadas en investigaciones previas a partir de la trucha arco iris capturada de los criaderos localizados en el corregimiento de El Encano (Municipio de Pasto).

#### **6.4.1 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de microdilucion en caldo colorimetrico en caja de elisa.**

Antes de hacer la evaluación antimicrobiana se preparó el inóculo de las bacterias aisladas de la trucha arco iris en medio líquido, haciendo un preinóculo en 10 mL de medio de cultivo a 36°C por 18 horas de incubación, para después suspender 10 µL en un nuevo tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo BHI, para incubar durante 18 horas a 36°C y se estandarizó a una población de Mc Farland de 0,5 que equivale a  $1,5 \times 10^8$  UFC.

Las microemulsiones se realizaron con los parámetros óptimos preliminares, se evaluaron los aceites de semillas de papaya extraído con y sin co-solvente a concentraciones de 1, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 µL de aceite vegetal/mL de emulsión, estas se prepararon utilizando 2 mL de emulsión haciendo un escalonamiento con un mínimo de 2 µL, hasta 144 µL de aceite de semillas de papaya. La evaluación antimicrobiana y la determinación de la concentración mínima inhibitoria para el aceite se realizó en caja de Elisa esterilizada con rayos UV dentro de una cabina de flujo laminar. El procedimiento se realizó con 3 repeticiones, adicionando en cada pocillo 10 µL del inóculo de las bacterias aisladas de la trucha arco iris ajustado a una población de  $1,5 \times 10^8$  UFC, excepto al pocillo de control positivo al que solo se adiciono 100 µL de medio de BHI, también se obtuvo un control negativo constituido por caldo BHI y la bacteria a evaluar. Se prosiguió adicionando 100 µL de la emulsión con la concentración correspondiente en cada pocillo. Las muestras en la Caja de Elisa se incubaron durante 24 horas a 36°C y finalizada la incubación se adicionó a cada pozo 10 µL del indicador colorimétrico Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide MTT, anteriormente preparado adicionando 1 mg por cada mililitro de agua estéril. El cambio de color a rojo-marrón indica crecimiento de microorganismos es decir bacterias viables, si por el contrario no hay cambio de color o cambio tenue de color a amarillo

indica inhibición por consiguiente se puede establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Taraco et al., 2011), a partir de las concentraciones de aceite adicionadas.



**Figura 14. Evaluación antimicrobiana del aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

El diseño experimental en la investigación de la actividad antibacteriana tiene un factor que es el aceite vegetal de semillas de papaya extraído con y sin co-solvente, con 10 niveles 1, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72  $\mu\text{L}$  de aceite /mL de emulsión. El intervalo de concentraciones evaluado para cada aceite se determinó mediante ensayos previos, utilizando dos testigos o controles uno positivo y uno negativo. Los tratamientos se realizaron con tres repeticiones donde la variable respuesta es la inhibición para cada una de las bacterias investigadas, medida de carácter cualitativa por el cambio de color.

#### 6.4.2 Aplicación de la prueba confirmatoria

Del primer pozo donde hubo inhibición se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución y se inocularon en una caja Petri con agar Muller Hilton, se incubaron a 36°C durante 24 horas para confirmar la ausencia de bacterias viables; lo mismo se realizó con el pozo siguiente con mayor concentración, si no presenta crecimiento de bacterias viables se establece éste valor como la concentración mínima bactericida (CMB).



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Adecuación de materia prima

El porcentaje de humedad de las semillas de papaya después del secado fue  $4,05 \pm 0,2$ , el cual es inferior al límite recomendado del 10% de humedad para obtener un mayor rendimiento durante la extracción con fluidos supercríticos (Reverchon & de Marco, 2006).

### 7.2 Extracción de aceites vegetales mediante $\text{CO}_2$ supercrítico

Los resultados de la extracción del aceite de semillas de papaya se presentan en la Tabla 5, al igual que el formato de control de la extracción supercrítica (Ver Anexo 1 formato control de extracción con fluidos supercríticos).

**Tabla 5.**

#### *Extracción de aceite de semillas de papaya*

<b>Presión (bar)</b>	<b>Temperatura (°T)</b>	<b>Flujo <math>\text{CO}_2</math> (mL/min)</b>	<b>Flujo co- solvente (mL/min)</b>	<b>Materia prima (g)</b>	<b>Aceite vegetal (g)</b>	<b>Rendimiento (% p/p)</b>
381	50	30	0	166	32,23	19,41
381	50	28,5	1,5	194	34,64	17,85

Fuente. Este estudio

El mayor rendimiento obtenido a nivel experimental fue de 19,41% a 381 bar, con 50 °C y sin co-solvente, pero el resultado con un 5% de agua como co-solvente fue muy cercano con un 17,85% para una diferencia de 1,56%, que se explica por lo expuesto por Velasquez en 2008 donde menciona que cambios pequeños de presión, temperatura, porcentaje de co-solvente, puede cambiar rápidamente la densidad del  $\text{CO}_2$  súper crítico y por lo tanto el rendimiento de la extracción. Adicionalmente, el agua como co-solvente cambia en alguna medida la afinidad

apolar del CO<sub>2</sub> súper crítico variando su capacidad disolvente, así como su selectividad y difusividad (Vásquez, 2008) y por lo tanto la eficiencia de la extracción.

Según lo reportado por Dorado A. en 2016, el rendimiento utilizando las mismas condiciones de extracción fue de 21,96%, esta diferencia radica en el tiempo de extracción de 180 min para la investigación citada en cambio en el presente estudio el tiempo de extracción se redujo a 150 min que justifican la diferencia los dos puntos porcentuales de diferencia.

Un rendimiento mayor en aceite de semillas de papaya superior fue obtenido por otros autores utilizando CO<sub>2</sub>-SC a 270 bar y 54 °C, durante 3 h con un valor del 30% (Chujin et al., 2012). Sin embargo, un rendimiento similar al obtenido en el presente estudio se alcanzó mediante la utilización de extracción asistida por ultrasonido (22,3%) (Samaram et al., 2013), mientras que por extrusión se han reportado rendimientos entre el 13,9 y 15,2% (Lee et al., 2011). Empleando extracción soxhlet se ha llegado a obtener valores de rendimiento en aceite de semillas de papaya de 30,7% (Puangsri et al., 2005), 28,5% (Lee et al., 2011) y 27% (Manaf et al, 2009). En general, las diferencias en los rendimientos pueden estar relacionadas con el origen de la materia prima, variedad, el tipo de solvente y el método de extracción empleado (Bouanga et al., 2011).

### 7.3 Evaluación del aceite de semillas de papaya en función de sus características fisicoquímicas

Debido a que los aceites de semillas de frutas no se encuentran regulados por una norma específica, se compararon con los datos establecidos con el Codex Alimentarius y las Normas Técnicas Colombianas (NTC's) colombiana para aceites. Los índices de acidez, yodo, peróxido y saponificación son considerados como los principales parámetros de caracterización de la calidad fisicoquímica de un aceite (Ni et al., 2015), por tal motivo estos parámetros se tuvieron en cuenta en la evaluación del aceite de semillas de papaya con CO<sub>2</sub>-SC a 381 bar, 50°C, sin co-solvente (condiciones donde se obtuvo el mayor rendimiento) cuyos datos se muestran a continuación.

Densidad

La densidad se determinó por triplicado utilizando un picnómetro Gay-Lussac de 5 mL a una temperatura de 20°C. La densidad se midió en g/mL como lo muestra la tabla 6.

**Tabla 6.**

***Densidad del aceite de semillas de papaya***

Valor determinado			Valores literatura			
Densidad (g/mL)	Desviación estándar	Coficiente de variación %	1	2	3	4
				(Soxhlet)	(Solventes)	(CO <sub>2</sub> -SC)
0,919	0,00087	0,095	0,910-0,920	0,920	0,918	0,9464

Fuente: Esta investigación. 1. (Rodríguez et al., 2011), 2. (TEA 2016), 3.(Afolabi and Ofovbrukweta 2011), 4.

(Dorado A 2016)

Los resultados obtenidos están en el rango reportado en la investigación de Rodríguez en 2011 empleando extracción con fluidos súpercríticos, al igual que por el grupo de investigación TEA (2016) y Afolabi & Ofovbrukweta (2011) que hicieron la extracción del aceite vegetal con ayuda de solventes. La densidad del aceite de la presente investigación arrojó un resultado similar a otros aceites como maní 0.915-0.909, oliva 0.915-0.909 y palmiste 0.913-0.900 (Arturo & Muñoz, 2009). Sin embargo, presenta una diferencia con lo expuesto por Dorado (2016) empleando las mismas condiciones de extracción, que pudo ser afectado por el tiempo de almacenamiento del aceite (edad), rancidez y cualquier tratamiento especial que se le haga.

### ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Este parámetro relaciona la velocidad de la luz de una longitud de onda definida, con su velocidad en el medio. Sirve para identificar un tipo de aceite o determinar adulteraciones en el mismo. La medición del índice de refracción del aceite se realizó a una temperatura de 20°C en

un refractómetro de mesa tipo Abbe de 1,300 -1,700 (0,0001 Nd) (Boeco, Alemania) de acuerdo a la metodología planteada por la NTC 289, y los resultados se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.**

***Índice de Refracción del aceite de semillas de papaya.***

Valor determinado			Valores literatura			
Índice de refracción	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	1	2 (Soxhlet)	3 (Aceite de cartamo)	4 (CO <sub>2</sub> -SC)
1,4736	0,00109	0,074	1,469	1,469	1,467-1,470	1,470

Fuente: Esta investigación. 1. Bouanga et al, 2011, 2. Afolabi & Ofovbrukweta, 2011, 3. Codex Alimentarius, 2005, 4. Dorado A, 2016.

Se obtuvo un índice de refracción muy cercano al reportado por Bouanga et al., en 2011 y por Afolabi & Ofovbrukweta en 2011 a pesar de emplear metodologías de extracción diferentes. El índice de refracción obtenido por Dorado A, en 2016 es similar al obtenido utilizando la tecnología con fluidos supercríticos; todos los anteriores valores de referencia y el de esta investigación pueden identificarse como el de un mismo tipo de aceite y sin ninguna modificación debido a sus tan cercanos. Además, según Codex Alimentarius en 2005 para el aceite de cártamo se reporta un índice de refracción 1,467-1,470 siendo el más cercano al índice de aceite de semillas de papaya.

#### pH

Los resultados de pH coinciden con lo expresado con otros autores que están entre 5.5 y 5.9 (Mendes dos Santos et al. 2014), que junto con los valores de literatura se expresan en la siguiente tabla 8. Estos indican un pH ligeramente bajo que corresponde a una tenue acidez natural de los aceites vegetales.

**Tabla 8.*****pH* aceite de semillas de papaya.**

pH	Valor determinado		Valores literatura		
	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	1	2	3 Soxhlet
5,54	0,0208	0,375	5,9	5,56	5,55

Fuente: Esta investigación. 1. Mendes dos Santos et al., 2014, papaya variedad Havai.

2. Mendes dos Santos et al., 2014, papaya variedad Calimosa. 3. Afolabi & Ofovbrukweta, 2011.

**ÍNDICE DE ACIDEZ**

Se entiende por índice de acidez o valor ácido, los miligramos (mg) de hidróxido de potasio KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presenten en 1 g de grasa o aceite. Se determinó utilizando la norma NTC 218 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ Y DE LA ACIDEZ, con el método numero 4: Método con etanol caliente usando indicador; se tomaron 7 g aproximadamente y el resultado se expresa en mg KOH/ g de aceite, como lo muestra la tabla 9.

**Tabla 9.*****Índice de acidez del aceite de semillas de papaya.***

Índice de acidez (mg KOH /g de aceite)	Valores literatura		
	1	2	3
5,82	(CO <sub>2</sub> -SC)		Soxhlet
	5,54	4,4-5,9	34

Fuente: Esta investigación. 1.(Dorado A, 2016), 2. (Lee, Lee, and Su 2011), 3. ( GI. TEA, 2016)

El aceite de semillas de papaya obtenido con CO<sub>2</sub>-SC presentó un índice de acidez de 5,82 mg KOH/g de aceite, el cual se encuentra dentro del rango reportado por Lee et al., (2011) para el aceite de semillas de papaya extraído por prensado (4,4-5,9 mg/g), con semillas que fueron sometidas a un prensado de tornillo con el calor; afirman que está variación podría atribuirse a la

hidrólisis por la lipasa de *C. papaya* durante el secado de las semillas y al calor generado por la fricción del prensado de tornillo que alcanzo temperaturas entre 85-90 °C. Por lo tanto, el resultado de la presente investigación evidencia que el aceite extraído manifestó un incremento en el índice de acidez por el efecto de hidrólisis de los triglicéridos presentes y a las condiciones bajo las cuales se realizó la extracción.

Según lo reportado por Dorado (2011) hay una gran diferencia en el índice de acidez del aceite obtenido con la extracción Soxhelt, lo cual demuestra que no es apto para consumo humano, ni para aplicación cosmética, el origen de este valor se asocia probablemente al hecho de que existe humedad en el aceite, provocando una reacción de hidrólisis de los triglicéridos formando ácidos grasos libres, lo que indica que es un aceite muy inestable. Esto no ocurre en la extracción con CO<sub>2</sub>-SC brindando bondades al aceite.

El valor determinado está por encima de lo sugerido por el Codex para aceites prensados en frío y vírgenes (4 mg/g) y por debajo de lo estipulado para aceites de palma vírgenes (10 mg/g). También en el Codex 19-1981, para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales permite valores para el índice de acidez de hasta de 4.0 mg KOH/g aceite, por lo tanto, se requiere un proceso de neutralización previo a su uso o evaluar en condiciones controladas de secado de semillas para poder encontrarse en el rango permitido por las normas Codex.

### ÍNDICE DE PERÓXIDOS

El índice de peróxido se determinó con protocolo de la NTC 236 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACION DEL INDICE DE PEROXIDO con 2 gramos de aceite aproximadamente. El resultado para el índice de peróxidos se expresa en meq O<sub>2</sub>/kg de aceite como lo indica la siguiente Tabla 10.

**Tabla 10.*****Índice de peróxidos del aceite de semillas de papaya.***

Índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /kg de aceite)			Valores literatura		
IP	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	1 (CO <sub>2</sub> -SC)	2	3 Soxhlet
2,095	0,0212	1,01	0	0,05 -2,20	5,37

Fuente: Esta investigación, 1. Dorado A, 2016, 2. Bouanga et al., 2011, 3. Malacrida, Kimura, & Neuza, 2011.

El índice de peróxidos, indica la degradación oxidativa que durante el proceso de extracción y almacenamiento sufre un aceite, esta prueba permite detectar la oxidación antes de que se note organolépticamente, lo cual confirma si las condiciones aplicadas en el manejo de la materia prima, extracción y almacenamiento fueron adecuadas. El bajo índice de peróxidos obtenido pone en manifiesto una alta resistencia de los aceites a la oxidación.

El resultado para el índice de peróxidos fue de 2,095 meq O<sub>2</sub>/kg, lo cual indica que existe una pequeña concentración de peróxidos e hidroperóxidos formados en las etapas iniciales de la oxidación de lípidos propensa a rancidez y no cumple con lo permitido para aceites refinados (1 meq O<sub>2</sub>/kg) (Resolución Colombiana 2154, 2012). Pese a esto, para este estudio se observa que el aceite de semillas de papaya está por debajo del límite máximo permitido para la industria alimenticia, los aceites cumplen con las normas CODEX las cuales consideran para los aceites vírgenes valores máximos de 15 meq O<sub>2</sub> /kg.

Un estudio previo también reportó un bajo índice de peróxidos (0,05 -2,20 meq O<sub>2</sub>/kg) para aceite de semillas de papaya (Bouanga et al., 2011) encontrándose dentro de este rango. Por otro lado lo reportado por Daniela A (2016) demuestra la nula presencia de peróxidos utilizando CO<sub>2</sub>-SC; al comparar con un índice de peróxidos alto (5,37) encontrado por Malacrida, Kimura, &

Neuza en 2011 utilizando Soxhlet como método de extracción del aceite indica alto grado de oxidación, que puede ser producto del extenso tiempo de extracción y la temperatura empleada en el proceso.

### ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

La Tabla No 11 presenta los resultados del índice de saponificación en meq KOH/g de aceite; el índice de saponificación es el número de miligramos de hidróxido de potasio que se requieren para saponificar 1 kilogramo de grasa o aceite basándose en la NTC 335, 1998.

**Tabla 11.**

*Índice de saponificación del aceite de semillas de papaya.*

Índice de saponificación del aceite de semillas de papaya					
IS	Índice de saponificación (meq KOH/g)		Valores literatura		
	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	1 (CO <sub>2</sub> -SC)	2 Soxhlet	3
112,63	0.9899	0,87	177	154,7	183-185

Fuente: Esta investigación. 1. Dorado A, 2016, 2. Puangri, Abdulkarim, & Ghazali, 2005, 3. Lee et al., 2011.

El índice de saponificación es una medida de ácidos grasos libres y combinados que existen en las grasas y es directamente proporcional a su masa molecular media: cuanto menor sea la proporción de los ácidos grasos de cadena corta, mayor será el índice de saponificación.

Según esta tabla podemos observar un índice de saponificación bajo esto puede indicar mayor presencia de ácidos grasos medio peso molecular, porque los esteres de estos ácidos grasos requieren menor cantidad de álcali para la saponificación, lo cual indica un mayor contenido de triacilgliceroles de bajo peso molecular en su composición en comparación con reportado por



Dorado (2016) que utilizó CO<sub>2</sub>-SC; aunque los valores de literatura cambian mucho según las condiciones de cada estudio, este trabajo no está dentro del rango establecido por Lee et al. 2011 (183-185 mg KOH/g) para aceite de semillas de papaya.

Según este índice el aceite de semillas de papaya no puede ser utilizado en la industria alimentaria ya que el rango según la ISO 3657:2013 está ente 185 a 205 meq KOH/Kg, ni tampoco en la industria cosmética, pues los aceites utilizados en esta industria deben poseer un valor mínimo de 185 meq KOH/g. Este índice es de importancia para determinar la aptitud de un aceite para la obtención de jabones, donde se exige un valor de 185 mgKOH/g (Lafont et al., 2011). Además, es útil para estimar la cantidad de NaOH o KOH a utilizar en la reacción de saponificación para la obtención del jabón.

### ÍNDICE DE YODO

Para la determinación del índice de yodo se utilizó la NTC 283 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACION DEL INDICE DE YODO como lo muestra la siguiente tabla expresando su resultado en g de I/ 100 g de aceite.

**Tabla 12.**

***Índice de Yodo del aceite de semillas de papaya.***

Índice de Yodo g de I/ 100 g de aceite	Valores literatura			
	1	2	3	4
77,42	(CO <sub>2</sub> -SC)	Soxhlet	Soxhlet	
	68,4	66	116,32	64,1

Fuente: Este estudio,1. Dorado A, 2016, 2. Puangsri, Abdulkarim, & Ghazali, 2005,3. TEA, 2016,4. Lee et al. 2011

El resultado (77,42 g/100g) muestra que el aceite de semillas de papaya posee una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en comparación con los ácidos grasos saturados, pero

presenta una relación baja en ácidos grasos insaturados comparada con otros aceites de semillas de frutas como el de mora. Resultados cercanos fueron reportado por otros autores: 68,4 (Dorado A, 2016), 64,1 g/100g (Lee et al. 2011), 66 g/100g (Puangsri et al., 2005) y el mayor índice de Yodo fue de 116,32 en un estudio previo por G.I. TEA en 2016. Sin embargo, es inferior al índice de yodo reportado para el aceite de oliva (75-94 g/100g), probablemente debido a una mayor proporción de ácidos grasos saturados en el aceite de semillas de papaya (Lee et al., 2011). Este aceite se puede clasificar como un aceite vegetal no-secante (< 100), como los aceites de oliva, maní y almendras (Jurado y Muñoz, 2009), razón por la cual puede ser utilizado en la elaboración de cremas y jabones líquidos (Lafont et al., 2011).

Comparando el resultado del aceite extraído con CO<sub>2</sub>-SC y por soxhlet del G.I. TEA en 2016, se aprecian diferencias. Al parecer, el aceite obtenido mediante extracción soxhlet presenta un mayor grado de insaturaciones que el aceite obtenido con CO<sub>2</sub>-SC, donde posee una concentración en ácidos grasos insaturados superior en el aceite extraído por soxhlet que en el aceite extraído con fluidos supercríticos (Dorado A, 2016).

**Tabla 13.****Resumen de resultados de las propiedades fisicoquímicas evaluadas en este estudio.**

<b>Aceite de semillas de papaya</b>		<b>Propiedades fisicoquímicas</b>
<b>Densidad g/ml</b>		0,9195
<b>pH</b>		5,5366
<b>Índice de refracción</b>		1,4736
<b>Índice de acidez mg KOH/g</b>	Este estudio	5,82
	Industria alimentaria 4 mg KOH/g	No
<b>Índice de yodo g l/g</b>	Este estudio	77,42
	Clasificación	No secante
	Industria alimentaria 75 a 94 g l/g	Si
<b>Índice de saponificación mg KOH/Kg</b>	Este estudio	112,63
	Industria alimentos 184 a 196 mg KOH/Kg	No
	Industria cosmética mayor a 185 mg KOH/Kg	No
<b>Índice de Peróxidos meq/kg</b>	Este estudio	1,48
	Industria alimentaria máxima 15 meq/kg	Si

Fuente: Este estudio.

**CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

La cuantificación de polifenoles se realizó por el método de Folin- Ciocalteu de acuerdo a lo que indica la metodología del ítem 8.2.4. Para la cuantificación de polifenoles totales del aceite de semillas de papaya se utilizó la ecuación obtenida de la recta de calibración:

$$Y=0,0013x + 0,036$$

Para ello se sustituyó el valor de absorbancia obtenida para la muestra de aceite en la ecuación de la recta (valor de la ordenada, “y”) y se despeja “x” que corresponde a la concentración de ácido gálico en el aceite. Para poder expresar los resultados en mg de ácido gálico por 100 g de aceite, se tiene en cuenta la cantidad de disolvente empleado, la cantidad de muestra aplicada en la reacción y la densidad del aceite (García Martínez, Fernández Segovia, and Fuentes López, 2012) como se puede observar el Anexo 2. Los resultados expresados en mg de ácido gálico sobre 100 g de aceite de muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.**

***Cuantificación de polifenoles totales presentes en el aceite de semillas de papaya.***

<b>Extracción de aceite sin co-solvente</b>				
Absorbancia	mg GAE/ 100 g	Promedio PT mg GAE/ 100 g	Desviación estándar (σ)	Coefficiente de variación (%CV)
0,639	409,3			
0,635	400,2	416,6	21,023	5,04
0,694	440,3			
<b>Extracción de aceite con co-solvente</b>				
Absorbancia	mg GAE/ 100 g	Promedio PT mg GAE/ 100 g	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
2,220	1461,66			
2,293	1509,51	1493,23	27,34	1,83
2,290	1508,51			

Fuente: Este estudio.

El aceite vegetal extraído con ayuda de co-solvente (agua) tiene una mayor cantidad de polifenoles (1493,23 mg GAE/ 100 g) con una diferencia del 72% aproximadamente en comparación con el resultado obtenido de la extracción del aceite sin co-solvente (416,6 mg GAE/ 100 g); esto es debido al carácter apolar que presenta el dióxido de carbono como solvente, lo cual lo hace poco adecuado para la extracción de compuestos polares tales como los polifenoles (Vásquez, 2008). En este estudio se utilizó un 5% de co-solvente; al adicionar pequeñas cantidades de modificadores o co-solventes (en este caso agua) al flujo total del solvente, se manifiesta una variación de la polaridad promoviendo la extracción de polifenoles solutos de interés (Vásquez, 2008).

El agua, el metanol, el etanol y el cloroformo entre otros compuestos químicos polares son capaces de formar puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo con los fenoles, lo cual justifica su utilización como solventes o co-solvente para este tipo de sustancias polares (Murga et al., 2000), como lo demuestra la investigación de Vuong y colaboradores en 2013 donde evaluaron el efecto de varios solventes orgánicos en la extracción de polifenoles de hojas de papaya encontrando una diferencia significativa en la cantidad de polifenoles debido al efecto de la polaridad como una variable en la extracción. Al usar etanol obtuvieron 943 mg GAE/100 g de extracto seco, con acetona 1071 mg GAE/ 100 g, con metanol 1053 mg GAE/ 100 g y por ultimo usando agua se reporta 2306 mg GAE/ 100g.

Un estudio similar donde se evaluó la extracción de semillas de *Carica papaya* asistida con microondas y mediante el uso de diferentes solventes, reportó los siguientes resultados: con hexano 156,53 mg GAE/100 g de extracto; acetona 23,51 mg GAE/100 g; cloroformo-metanol 528,29 mg GAE/100 g; etanol 307,32 mg GAE/100 g y agua 211,31 mg GAE/100 g, evidenciando la diferencia en el contenido de polifenoles totales cuando hay variación en la polaridad del solvente (Kothari & Seshadri, 2010).

Los autores Delgado y otros en 2013, explican los resultados del contenido de polifenoles en la extracción de extracto de *Pleurotus sp.* con solventes de diferente polaridad, donde obtuvieron el siguiente orden del rendimiento: agua > etanol > acetona > acetato de etilo > n-hexano. El agua y el etanol son solventes polares en los que son solubles diferentes solutos polares e iónicos, como proteínas, carbohidratos y sales minerales. Por otra parte, solventes no polares como el n-hexano solo disuelven compuestos apolares, como los lípidos.

Una investigación acerca de polifenoles totales en extractos metanólicos de cáscara, pulpa y semillas de *Carica papaya* expresaron los siguientes resultados: pulpa 325,97 mg GAE/100 g, semillas 67,95 mg GAE/100 g, cáscara cruda 753,96 mg GAE/100 g, cáscara seca 315,45 mg GAE/100 g, cáscara liofilizada 344,47 mg GAE/100 g, presentando diferencias en cada parte del fruto (Morais et al., 2015).

Un estudio mostró que las partes seleccionadas de la planta *Carica papaya* presentan diferencias significativas en el contenido de polifenoles, oscilando entre 424,49 mg GAE/100 g peso seco. El mayor rendimiento en el contenido de polifenoles totales se obtuvo en hojas jóvenes (424,49), seguida de pulpa madura y no madura (399,91 y 272,66 respectivamente) y por último las semillas (30,32). El resultado indica que las hojas jóvenes contienen mayor cantidad de polifenoles que puede proporcionar una buena fuente de antioxidantes (Maisarah et al. 2013).

Entre los resultados más altos encontrados para extractos de semillas de frutas de origen colombiano se encuentran los siguientes: cacao blanco con 497 mg GAE/ 100 g de peso seco, sapote costero con 1660 mg GAE/ 100 g, arazá con 1624 mg GAE/ 100 g, algarrobo con 2013 mg GAE/ 100 g y marañón con 4851 mg GAE/ 100 g (Contreras Calderón et al., 2011).

Muchos trabajos relacionan de manera directa la actividad antioxidante con el contenido de fenoles totales, aunque cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente (Kuskoski et al., 2005).

7.4 Determinación de los parámetros de formación de la microemulsión a partir de aceite de semillas de papaya

#### EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LA EMULSIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE PAPAYA A LA HORA 0

Debido a la necesidad de evaluar la estabilidad de la emulsión a lo largo del tiempo, se realizó una medición del diámetro promedio de las gotas de aceite en la emulsión, el resultado del diámetro (nm) de los glóbulos después de haber formado la emulsión a la hora 0 fue de 4676,11 nm, con una desviación estándar de 703,972 y un coeficiente de variación de 15,05%, con un mínimo de 3598,27 nm y un máximo de 6989,34 nm. Estos valores se encuentran entre los rangos encontrados por Serrano (2015), que van de 2245 nm a 7022 nm; los diámetros más bajos fueron el resultado de una agitación de la emulsión con un homogeneizador de altas presiones.

En la tabla 15 se presentan el diseño experimental 3<sup>3</sup> con los resultados de los diámetros de glóbulos de aceite en la emulsión.

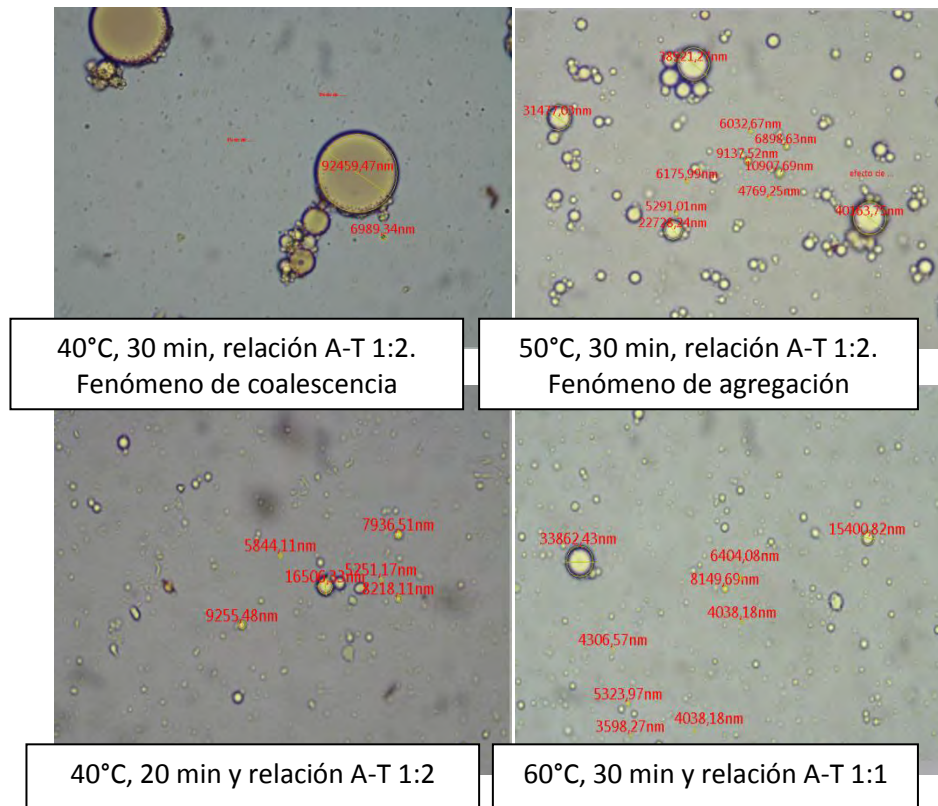
**Tabla 15.*****Evaluación microscópica de la microemulsión de aceite de semillas de papaya a la hora 0.***

<b>Temperatura de calentamiento (°C)</b>	<b>Tiempo de agitación (min)</b>	<b>Relación (Aceite-Tween)</b>	<b>Diámetro hora 0 (nm)</b>
40(-1)	20(-1)	1:1(-1)	4489,57
50(0)	20 (-1)	1:1 (-1)	5031,44
60(1)	20 (-1)	1:1 (-1)	3598,27
40 (-1)	30(0)	1:1 (-1)	5251,17
50 (0)	30 (0)	1:1 (-1)	3759,97
60 (1)	30 (0)	1:1 (-1)	4566,85
40 (-1)	40 (1)	1:1 (-1)	5580,69
50 (0)	40 (1)	1:1 (-1)	4046,84
60 (1)	40 (1)	1:1 (-1)	4434,67
40 (-1)	20 (-1)	1:1,5(0)	4769,25
50 (0)	20 (-1)	1:1,5 (0)	4241,06
60 (1)	20 (-1)	1:1,5 (0)	4827,59
40 (-1)	30(0)	1:1,5 (0)	4627,74
50 (0)	30(0)	1:1,5 (0)	4769,25
60 (1)	30(0)	1:1,5 (0)	4856,5
40 (-1)	40 (1)	1:1,5 (0)	5561,85*
50 (0)	40 (1)	1:1,5 (0)	4132,41
60 (1)	40 (1)	1:1,5 (0)	4710,18
40 (-1)	20 (-1)	1:2(1)	4439,15
50 (0)	20 (-1)	1:2 (1)	4140,87
60 (1)	20 (-1)	1:2 (1)	4991,52
40 (-1)	30(0)	1:2 (1)	6989,34*
50 (0)	30(0)	1:2 (1)	4379,09
60 (1)	30(0)	1:2 (1)	4970,45
40 (-1)	40 (1)	1:2 (1)	4265,74*
50 (0)	40 (1)	1:2 (1)	4769,25
60 (1)	40 (1)	1:2 (1)	5054,23

Fuente: Este estudio

Los resultados presentes en la tabla 15 con (\*) indicaron problemas asociados a fenómenos de las emulsiones caracterizándolas como inestables en el tiempo.





**Figura 15. Seguimiento microscópico de la microemulsión del aceite de semillas de papaya.**

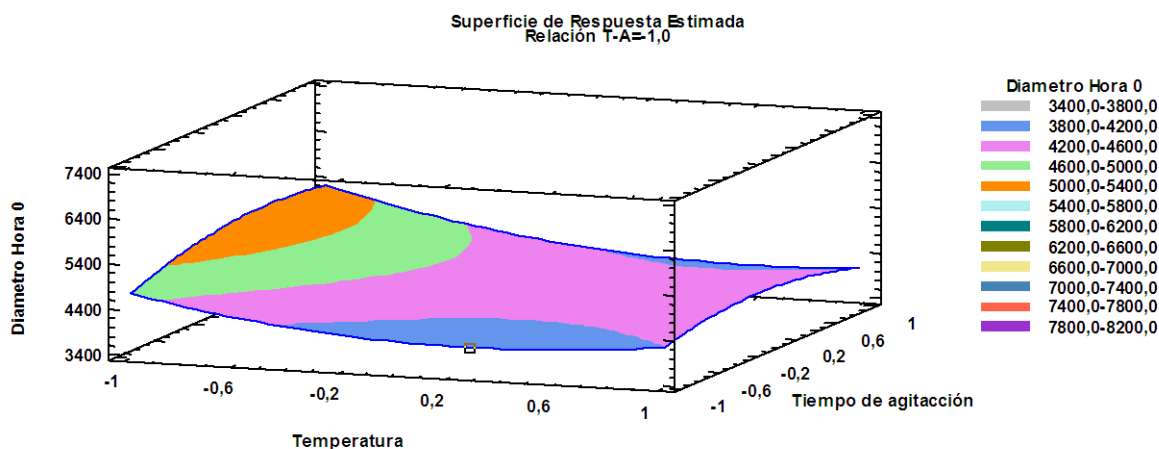
Fuente. Este estudio

La significancia estadística de los factores (temperatura, tiempo de agitación, relación Aceite-Tween) y sus interacciones sobre el tamaño del glóbulo de aceite a la hora 0, se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual indica en la Tabla 16 que ninguna de las variables estudiadas tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el diámetro del glóbulo de aceite.

**Tabla 16.****Análisis de varianza del diámetro de glóbulo de aceite a la hora 0.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:Temperatura	488151	1	488151	0,98	0,3349
B:Tiempo de agitación	509088	1	509088	1,03	0,325
C:Relación A-T	278798	1	278798	0,56	0,4635
AA	1,32E+06	1	1,32E+06	2,66	0,121
AB	309961	1	309961	0,63	0,44
AC	771963	1	771963	1,56	0,229
BB	724802	1	724802	1,46	0,2431
BC	27529,1	1	27529,1	0,06	0,8165
CC	28133	1	28133	0,06	0,8145
Error total	8,43E+06	17	495651		
Total (corr.)	1,29E+07	26			

Fuente: Este estudio



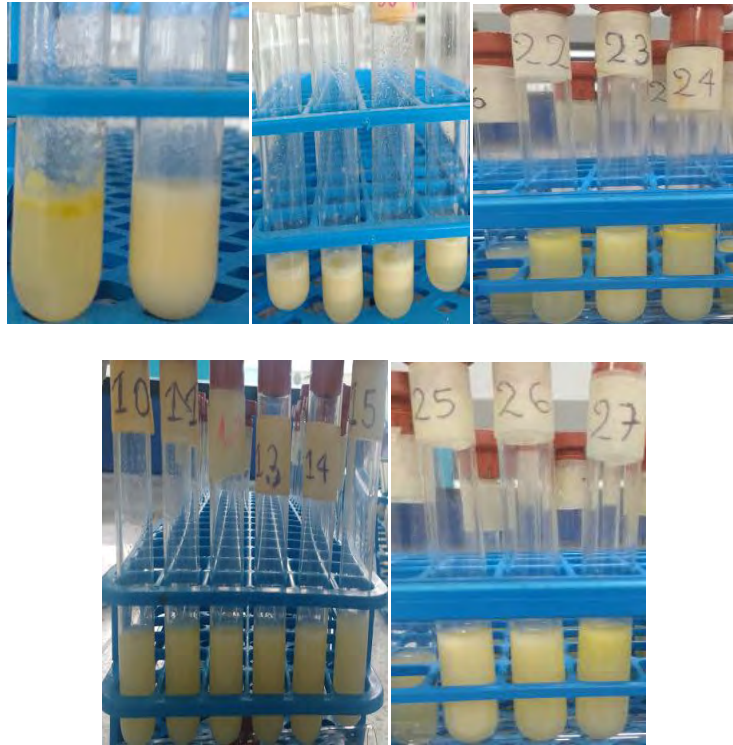
**Figura 16. Superficie de respuesta del diámetro del glóbulo de aceite a la hora 0.**

Fuente. Este estudio

En la figura 17 superficie de respuesta hora 0 se evidencia gráficamente lo dicho anteriormente, en el sentido de que no hay un efecto significativo de las variables; pero se observa que a temperaturas superiores a 50°C (0) se encuentran los diámetros de glóbulo de aceite más pequeñas, como con la relación A-T 1:2 (1) los diámetros se hacen más pequeños. Según la figura 18 se puede identificar que el tiempo de agitación debería ser de 20 minutos para conseguir diámetros de glóbulos más pequeñas.

Con estos resultados no se puede emitir una conclusión sobre las condiciones óptimas ya que las emulsiones se presentan estables a la hora 0, por lo tanto se debe realizar un seguimiento a través del tiempo para así identificar las mejores condiciones de formación de la emulsión.

### **Seguimiento visual de las emulsiones de aceite de semillas papaya a la hora 0**



**Figura 17. Microemulsiones de aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

En el seguimiento visual de las emulsiones se observó que los tratamientos a 40°C a 0 horas eran microemulsiones inestables ya que los glóbulos del aceite flotaban en la superficie, este fenómeno es conocido como creaming, lo cual coincide con la revisión microscópica donde estos tratamientos sufrieron efectos de coalescencia y agregación. Los tratamientos a 50°C y 60°C con las demás variables de agitación y relación A-T formaron una solución lechosa homogénea sin fenómenos de separación de fases.

#### EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LA EMULSIÓN DE ACEITE DE PAPAYA A LA HORA 48

Transcurridas las 48 horas se evaluó la estabilidad de las emulsiones en el microscopio a 40X y los resultados se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.*****Evaluación microscópica de la microemulsión de aceite de semillas de papaya a la hora 48***

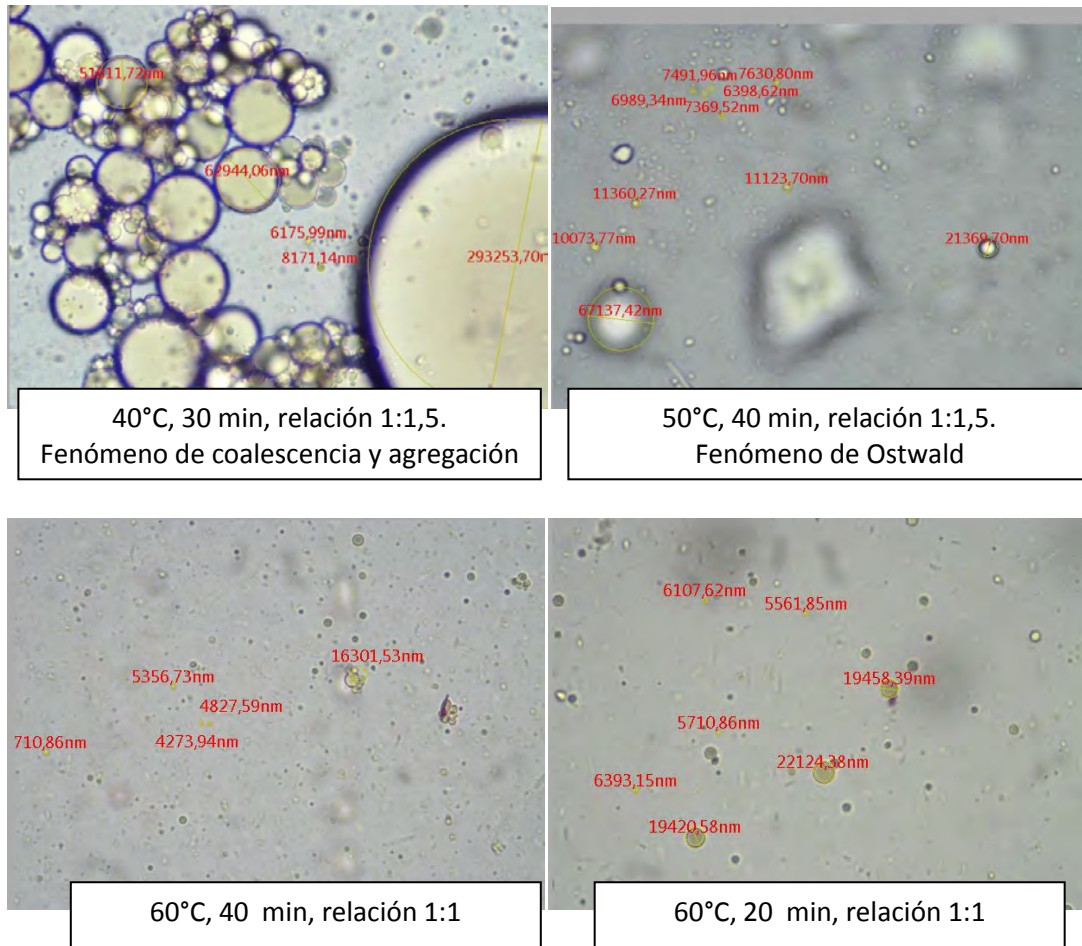
Temperatura de calentamiento (°C)	Tiempo de agitación (min)	Relación A-T	Diámetro hora 48 (nm)
<b>40(-1)</b>	20(-1)	1:1(-1)	5624,42
<b>50(0)</b>	20 (-1)	1:1 (-1)	5081,84
<b>60(1)</b>	20 (-1)	1:1 (-1)	4680,37
<b>40 (-1)</b>	30(0)	1:1 (-1)	5271,13
<b>50 (0)</b>	30 (0)	1:1 (-1)	4769,25*
<b>60 (1)</b>	30 (0)	1:1 (-1)	4182,91
<b>40 (-1)</b>	40 (1)	1:1 (-1)	5997,77*
<b>50 (0)</b>	40 (1)	1:1 (-1)	4106,92
<b>60 (1)</b>	40 (1)	1:1 (-1)	4273,94
<b>40 (-1)</b>	20 (-1)	1:1,5(0)	5661,62*
<b>50 (0)</b>	20 (-1)	1:1,5 (0)	4528,37*
<b>60 (1)</b>	20 (-1)	1:1,5 (0)	5561,85
<b>40 (-1)</b>	30(0)	1:1,5 (0)	6175,99*
<b>50 (0)</b>	30(0)	1:1,5 (0)	5026,46*
<b>60 (1)</b>	30(0)	1:1,5 (0)	4489,57
<b>40 (-1)</b>	40 (1)	1:1,5 (0)	6959,23*
<b>50 (0)</b>	40 (1)	1:1,5 (0)	6398,62*
<b>60 (1)</b>	40 (1)	1:1,5 (0)	5453,84*
<b>40 (-1)</b>	20 (-1)	1:2(1)	5447,42*
<b>50 (0)</b>	20 (-1)	1:2 (1)	5820,11
<b>60 (1)</b>	20 (-1)	1:2 (1)	4338,95
<b>40 (-1)</b>	30(0)	1:2 (1)	6107,62
<b>50 (0)</b>	30(0)	1:2 (1)	4920,92*
<b>60 (1)</b>	30(0)	1:2 (1)	4497,35*
<b>40 (-1)</b>	40 (1)	1:2 (1)	6226,77*
<b>50 (0)</b>	40 (1)	1:2 (1)	5723,10*
<b>60 (1)</b>	40 (1)	1:2 (1)	4489,57*

Fuente: Este estudio

\*: Fenómenos en la emulsión.

El diámetro promedio del glóbulo de aceite encontrado a la hora 48 fue de 5252,44 nm con una desviación estándar de 774,533, un coeficiente de variación de 14,74%, con un mínimo de 4106,92 nm y un máximo de 6959,23 nm. Este promedio en comparación con la hora 0 fue

mayor en 576 nm debido a que en el transcurso del tiempo algunas emulsiones empiezan a desestabilizarse y por lo tanto aumentan el tamaño del glóbulo de aceite; la desviación estándar y el coeficiente de variación fueron similares al resumen estadístico para el diámetro en el tiempo 0.



**Figura 18. Seguimiento microscópico de la microemulsión del aceite de semillas de papaya hora 48.**

Fuente. Este estudio

Aún con el aumento de tamaño promedio y del valor mínimo se encuentran entre los rangos reportados por Serrano (2015), que van de 2245 nm a 7022 nm. Los diámetros más bajos fueron el resultado de la formación de la microemulsión con un homogeneizador de altas presiones. En

otro estudio de estabilización de emulsiones para evaluar una actividad antibacteriana se reportaron diámetros de glóbulos de aceite entre 30 y 60 micras que corresponden a 30000 y 60000 nm (Tobar, 2016), siendo un valor bastante alto comparado con el presente estudio.

Los resultados enunciados en la tabla 17 con (\*) indican problemas o fenómenos de las emulsiones, identificándose rápidamente como inestables en el tiempo. La inestabilidad de las emulsiones se da a través de diferentes mecanismos que ocurren simultáneamente. Estos mecanismo dependen de la composición y microestructura de la emulsiones y están relacionadas fundamentalmente con fenómenos de transferencia de masa, gradientes en la presión osmótica y propiedades como la temperatura y el pH (Peredo and Jiménez 2012).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente desfavorables que tienden a romperse con el tiempo, mediante una variedad de mecanismos fisicoquímicos, incluyendo la separación gravitacional (formación de crema o sedimentación), la agregación de gotas (floculación y/o coalescencia) y el crecimiento de las mismas (maduración de Ostwald) (Friberg *et al.*, 2004; McClements, 2005).

**Tabla 18.****Análisis de varianza del diámetro de glóbulos de aceite de semillas de papaya a la hora 48.**

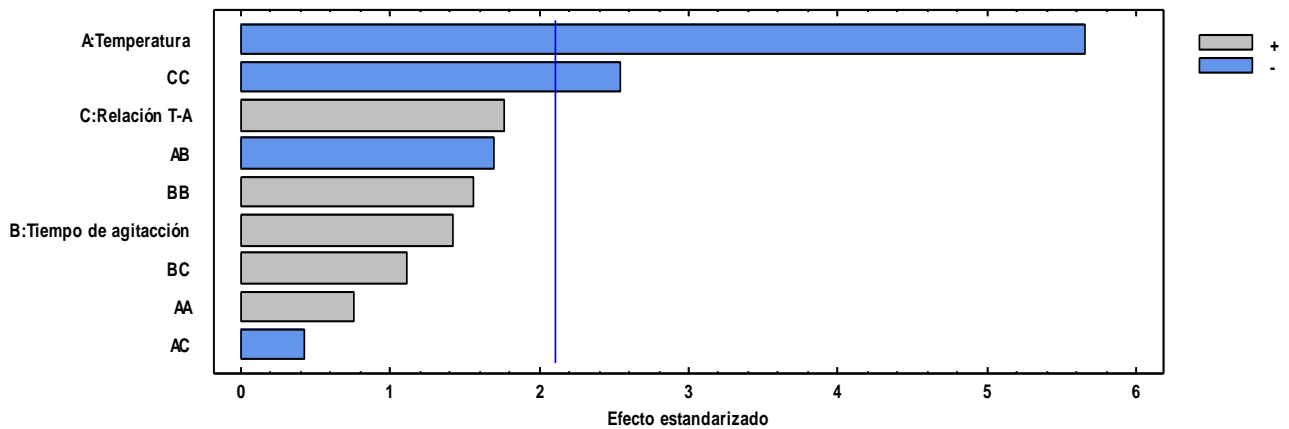
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	7,35E+06	1	7,35E+06	31,96	0,000
B:Tiempo de agitación	462340	1	462340	2,01	0,1743
C:Relación A-T	713320	1	713320	3,1	0,0962
AA	133916	1	133916	0,58	0,4559
AB	659944	1	659944	2,87	0,1085
AC	40814,7	1	40814,7	0,18	0,6789
BB	558620	1	558620	2,43	0,1376
BC	282428	1	282428	1,23	0,2833
CC	1,48E+06	1	1,48E+06	6,45	0,0212
Error total	3,91E+06	17	230034		
Total (corr.)	1,56E+07	26			

Fuente: Este estudio.

La significancia estadística de los factores (temperatura, tiempo de agitación, relación Aceite-Tween) y sus interacciones sobre el tamaño del glóbulo de aceite a la hora 48, se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual se indica en la tabla 18 y la figura 21. La Temperatura (A) y el término cuadrático de la relación A-T tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el diámetro del glóbulo de aceite a la hora 48.

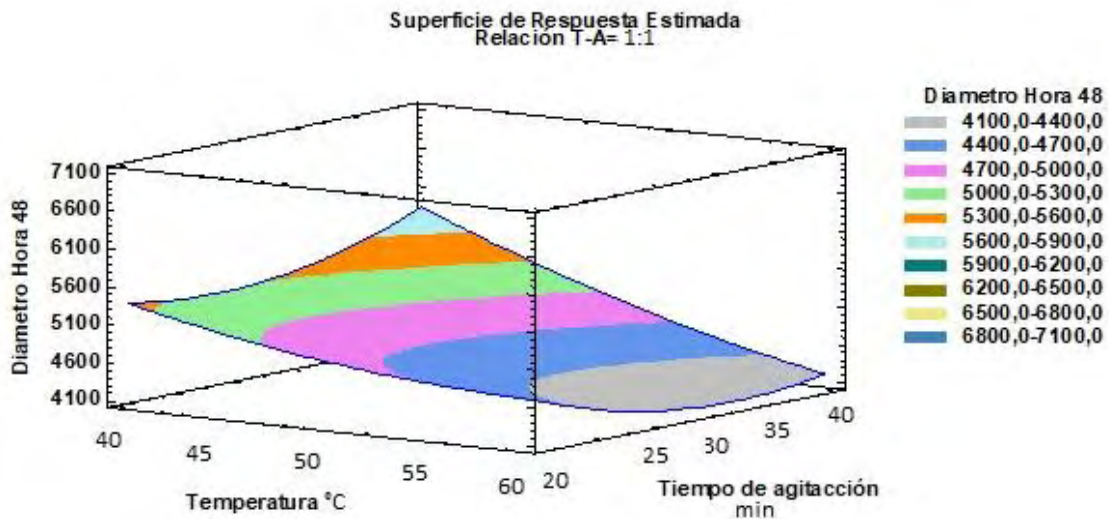
Los factores temperatura y el efecto cuadrático de la relación A-T tuvieron un efecto significativo sobre el diámetro del glóbulo de aceite en la emulsión, De acuerdo a lo observado en la figuras 21 y 22 al aumentar la temperatura se obtuvo un menor diámetro de aceite, favoreciendo la estabilidad de la emulsión.





**Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizada para diámetro del glóbulo a la hora 48.**

Fuente. Este estudio



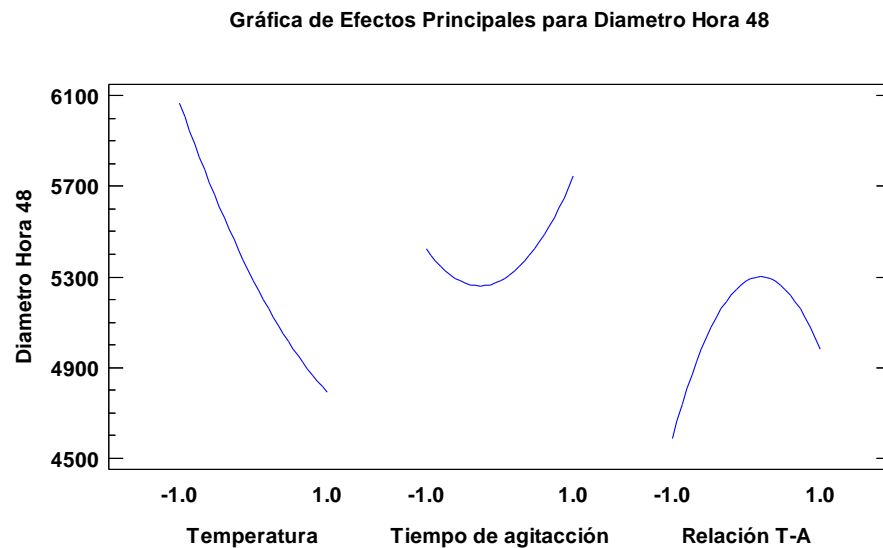
**Figura 20. Superficie de respuesta del glóbulo de aceite a la hora 48.**

Fuente. Este estudio

En la Figura 22, se muestra el efecto de la interacción de la temperatura de calentamiento y la relación de A-T sobre el diámetro del glóbulo de aceite a las 48 horas, se observa una diferencia bastante notoria en comparación con los resultados a las 0 horas debido a que a la hora 0 la mayoría de las emulsiones permanecen estables, pero transcurrido el tiempo los glóbulos de

aceite empiezan a desestabilizarse o aumentar de tamaño. El efecto de la temperatura para la formación y estabilidad de las emulsiones es importante; de ésta depende el tipo de interacciones entre las moléculas presentes. La temperatura tiene acción directa en la solubilidad de todos los compuestos presentes (aceites, proteínas, polisacáridos, emulgentes) (Kosegarten-Conde and Jiménez-Munguía, 2012).

Shinoda y Saito (1999) presentaron estudios con la siguiente conclusión: los tamaños de gotas en la emulsión cambian sustancialmente con la variación de la temperatura y el tipo de emulgente; como sucedió en el presente estudio disminuyendo el diámetro de los glóbulos de aceite.



**Figura 18. Gráfica de efectos principales para el diámetro del glóbulo de aceite a la hora 48.**

Fuente. Este estudio

Con la figura 23 del gráfico de efectos principales se observa que la temperatura afecta de forma considerable al diámetro, en el punto de 60°C (1) se obtiene un menor diámetro, con la variable relación A-T el diámetro más bajo se encuentra en el nivel más bajo relación A-T 1 a 1 (-

1) y en el tiempo de agitación el valor más bajo del diámetro está cercano al punto medio. Con la tabla 19 de optimización de variable de respuesta de llega mínimo indicado. En comparación con lo encontrado a la hora 0 la temperatura y la relación de A-T afectan mucho más en la variable respuesta.

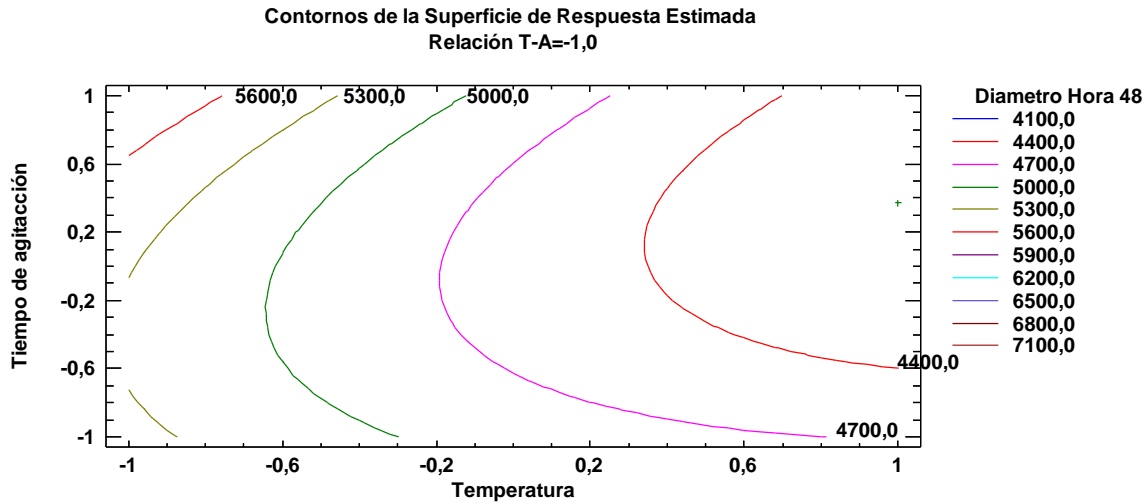
El modelo matemático ajustado de segundo orden con todos los factores expresa un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 74,92% de los resultados obtenidos con un 95% de nivel de confianza. La ecuación es la siguiente:

$$\text{Diámetro Hora 48} = 5280,93 - 639,09 * T^{\circ} + 160,267 * \text{Tiempo de agitación} + 199,07 * \text{Relación A-T} + (149,397 * T^{\circ})^2 - 234,511 * T^{\circ} * \text{Tiempo de agitación} - 58,32 * T^{\circ} * \text{Relación A-T} + 305,128 * (\text{Tiempo de agitación})^2 + 153,413 * \text{Tiempo de agitación} * \text{Relación A-T} - 497,263 * (\text{Relación A-T})^2.$$

Aunque no se pudo determinar la prueba de Falta de ajuste por la falta de réplicas en puntos centrales según el diseño experimental utilizado, en el gráfico 24 de contorno de la superficie de respuesta es acerca al punto óptimo estacionario.

El modelo matemático simplificado teniendo en cuenta únicamente los factores significativos es:

$$\text{Diámetro Hora 48} = 5280,93 - 639,09 * T^{\circ} - 497,263 * (\text{Relación A-T})^2$$



**Figura 22. Contornos de la superficie de respuesta estimada.**

Fuente. Este estudio

**Tabla 19.**

**Optimización de variable de respuesta del diámetro del glóbulo del aceite a la hora 48.**

Meta: minimizar Diámetro Hora 48			
Valor óptimo = 4110,77			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	-1	1	1
Tiempo de agitación	-1	1	0,373194
Relación T-A	-1	1	-0,999993

Fuente. Este estudio

Según la tabla de optimización de variable respuesta, la temperatura se encontró un óptimo de 1 que representa 60°C para formar la microemulsión, el factor tiempo de agitación encontró un óptimo de 0,373 que representa 33,73 minutos o 33 minutos con 43 segundos, y el factor de Relación A-T encontró un óptimo de -0.9999 que representa una relación de 1:1 aceite de semillas de papaya con Tween 20. La reducción en el tamaño del glóbulo de aceite no sólo

mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas, sino que además aumenta la relación de superficie área/volumen, lo que conduce a una funcionalidad mejorada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

#### EVALUACIÓN DEL pH DE LA EMULSIÓN DE ACEITE DE PAPAYA A LA HORA 48

El pH juega un papel importante a considerar en una emulsión, debido a diferentes interacciones electrostáticas que se tiene al variarlo y la manera en que afecta a la estructura de componentes presentes, misma que modificara las interacciones entre ellos y la estabilidad de la emulsión (McClements *et al.*, 2009).

Las emulsiones se comportan como cualquier coloide y sus partículas (fase dispersa) en suspensión (en la fase continua) están cargadas en mayor o menor medida, lo cual las hace repelerse unas a otras y evitar acoplamiento o aglomeramientos que se darán mas fácilmente entre menos carga exista.

Los resultados de la determinación del pH a las emulsiones con el pH-metro calibrado se indican en la Tabla 20.

**Tabla 20.**

#### **Resultados del pH de las microemulsiones de aceite de semillas de papaya.**

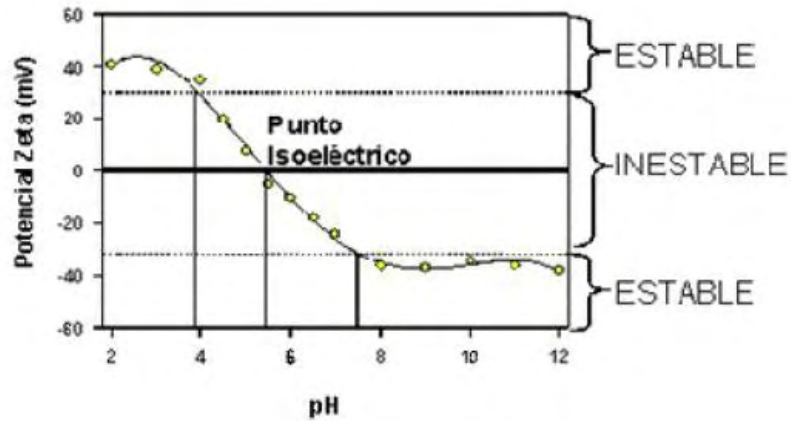
Temperatura de calentamiento (°C)	Tiempo de agitación (min)	Relación A-T	pH
<b>40(-1)</b>	20(-1)	1:1(-1)	7,56
<b>50(0)</b>	20 (-1)	1:1 (-1)	7,22
<b>60(1)</b>	20 (-1)	1:1 (-1)	7,21
<b>40 (-1)</b>	30(0)	1:1 (-1)	7,57
<b>50 (0)</b>	30 (0)	1:1 (-1)	7,28
<b>60 (1)</b>	30 (0)	1:1 (-1)	7,4

<b>40 (-1)</b>	40 (1)	1:1 (-1)	7,38
<b>50 (0)</b>	40 (1)	1:1 (-1)	7,27
<b>60 (1)</b>	40 (1)	1:1 (-1)	6,8*
<b>40 (-1)</b>	20 (-1)	1:1,5(0)	7,59
<b>50 (0)</b>	20 (-1)	1:1,5 (0)	7,29
<b>60 (1)</b>	20 (-1)	1:1,5 (0)	7,34
<b>40 (-1)</b>	30(0)	1:1,5 (0)	7,61
<b>50 (0)</b>	30(0)	1:1,5 (0)	7,23
<b>60 (1)</b>	30(0)	1:1,5 (0)	6,45*
<b>40 (-1)</b>	40 (1)	1:1,5 (0)	7,37
<b>50 (0)</b>	40 (1)	1:1,5 (0)	7,2
<b>60 (1)</b>	40 (1)	1:1,5 (0)	6,6*
<b>40 (-1)</b>	20 (-1)	1:2(1)	7,58
<b>50 (0)</b>	20 (-1)	1:2 (1)	7,4
<b>60 (1)</b>	20 (-1)	1:2 (1)	6,37*
<b>40 (-1)</b>	30(0)	1:2 (1)	7,61
<b>50 (0)</b>	30(0)	1:2 (1)	7,21
<b>60 (1)</b>	30(0)	1:2 (1)	6,32*
<b>40 (-1)</b>	40 (1)	1:2 (1)	7,47
<b>50 (0)</b>	40 (1)	1:2 (1)	7,28
<b>60 (1)</b>	40 (1)	1:2 (1)	6,91*

Fuente: Este estudio; (\*), denota inestabilidad.

El potencial Z, es una medida del potencial electrico en la superficie interfacial de las particulas suspendidas. Como se puede ver en la figura 25 puede observarse su variacion respecto al pH. El valor del potencial Z se ve marcadamente afectado por el pH de la emulsion, por el

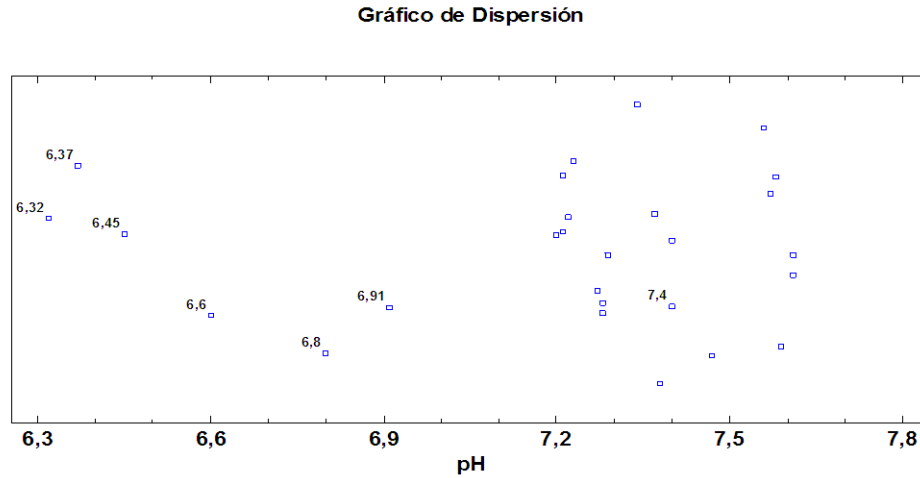
efecto de este en la carga de las partículas, Así, las variaciones en el pH resultaran en variaciones en el potencial Z y por lo tanto, en la estabilidad de la emulsion (Maldonado *et al.*, 2011).



**Figura 23. Representación gráfica de la variación del potencial Z en función del pH.**

Fuente: Zeta- Meter, 2012

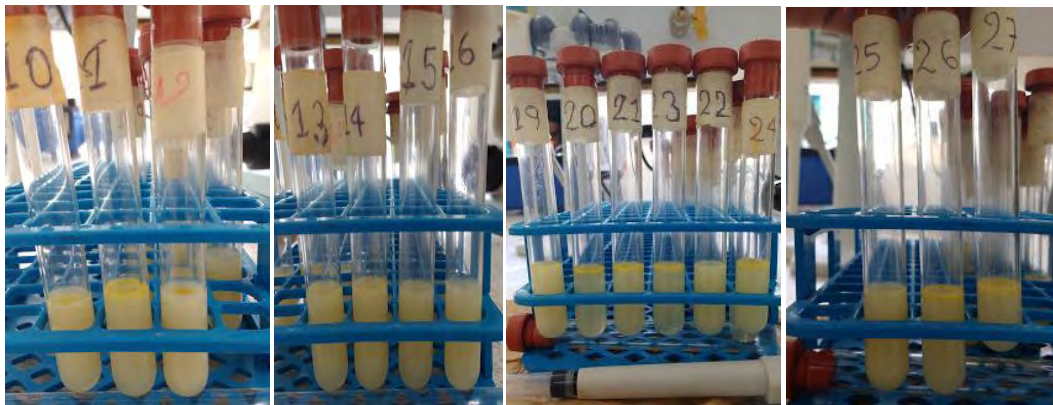
De aquí lo importante de determinar el pH de la microemulsión, observando los valores de pH inferiores a 7,2 y comparándolos con la Tabla 17: Evaluación microscópica del diámetro a 48 horas, son los mismos tratamientos que presentan fenómenos de inestabilidad de las microemulsiones y, además, coinciden con los anteriores autores quienes mencionan los valores que se encuentran en una región inestable para las emulsiones, en cambio entre más alejado esté el valor del pH de la microemulsión del punto isoeléctrico, éstas serán mucho más estables como ocurre con el punto de pH 7,4 que es el experimento más cercano del punto óptimo para formar la microemulsión con diámetro de partícula más pequeño y por lo tanto estable.



**Figura 24. Gráfico de dispersión del pH de las emulsiones de aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

#### SEGUIMIENTO VISUAL DE LAS MICROEMULSIONES DE ACEITE DE PAPAYA A LA HORA 48



**Figura 19. Micro emulsiones de aceite de semillas de papaya.**

Fuente. Este estudio

En el seguimiento visual de las microemulsiones se observó que existe una mayor inestabilidad de las emulsiones a medida que aumenta el tiempo, además los tratamientos a 40°C a 48 horas eran microemulsiones inestables ocurriendo floculación, coincidiendo con los resultados de la revisión microscópica donde estos tratamientos sufrieron efectos de coalescencia



y agregación. Los tratamientos de 50°C y 60°C con la relación más baja de aceite-Tween fueron las más estables, concordando estos resultados en el diagrama de superficie de respuesta al medir el diámetro de partícula. El experimento 6 (60°C, relación A-T 1:1 y tiempo de agitación 30 min) que es el valor más cercano al óptimo presentó una emulsión estable en el tiempo, las demás relaciones de Aceite-Tween tuvieron en cierto grado desestabilización de la emulsión como se puede ver en la figura 27.

Con los resultados de la revisión microscópica midiendo el diámetro del glóbulo graso a las horas 0 y 48, determinación del pH y el seguimiento visual se determinó que para tener una microemulsión estable para la evaluación antibacteriana el mejor tratamiento debe tener las siguientes condiciones: 60°C de temperatura para formar la emulsión, tiempo de agitación de 33 minutos con 43 segundos, y Relación A-T de 1:1 aceite de semillas de papaya con Tween 20.

7.5 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del aceite de semillas de papaya frente a las tres bacterias aisladas de la trucha arco iris.

Para cada muestra de aceite semillas de papaya se evaluaron concentraciones de 1, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72  $\mu\text{L}$  de aceite vegetal/mL de emulsión, rotuladas en orden ascendente de concentración desde letra A hasta la letra J. Las muestras en Caja de Elisa se incubaron durante 24 horas a 36°C y posteriormente se adicionó a cada pozo el indicador colorimétrico Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide MTT, que permite determinar de forma colorimétrica *in vitro* la actividad antibacteriana mediante un método simple, económico y rápido (Moriarty, Elborn, and Tunney 2005) para revelar por medio del cambio de color los resultados de inhibición de las bacterias aisladas de trucha arco iris. Los resultados fueron los mismos en las tres repeticiones y se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21.

Evaluación de la actividad antibacteriana con las muestras de aceite de semillas de papaya.

Evaluación actividad antibacteriana con aceites de semillas de papaya											
Aceite extraído sin co-solvente											
Concentración μL/mL	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	
Bacteria											
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I (CMI)	I
Aceite extraído con co-solvente											
Concentración μL/mL	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	
Bacteria											
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	R	R	R	R	I (CMI)	I	I	I	I	I
Aceite extraído sin co-solvente											
Concentración μL/mL	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	
Bacteria											
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aceite extraído con co-solvente											
Concentración	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	

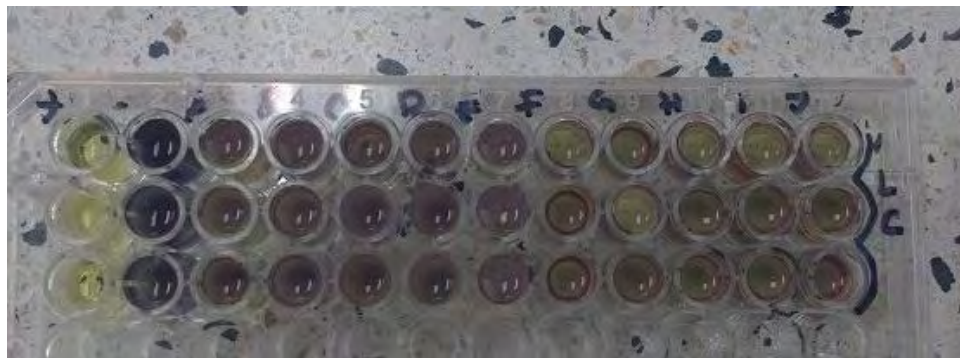
$\mu\text{L/mL}$											
Bacteria											
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Aceite extraído sin co-solvente											
Concentración											
$\mu\text{L/mL}$	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	
Bacteria											
<i>Bacillus cereus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Aceite extraído con co-solvente											
Concentración											
$\mu\text{L/mL}$	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	
Bacteria											
<i>Bacillus cereus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

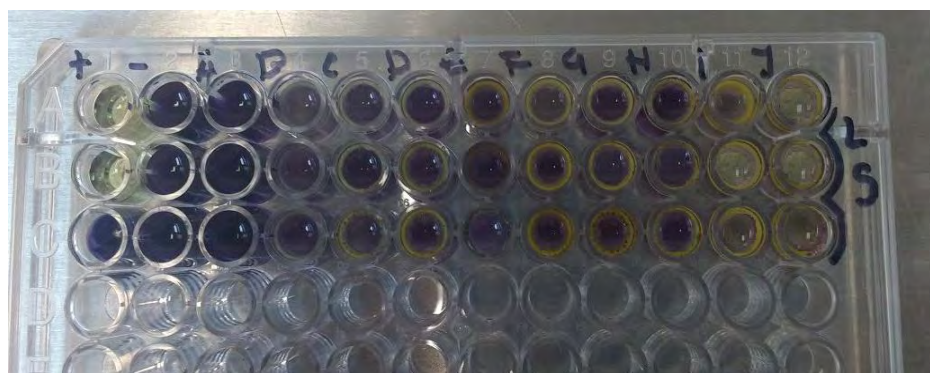
**R: resistente; I: Inhibición; CMI: concentración mínima inhibitoria.**

Fuente: Este estudio.



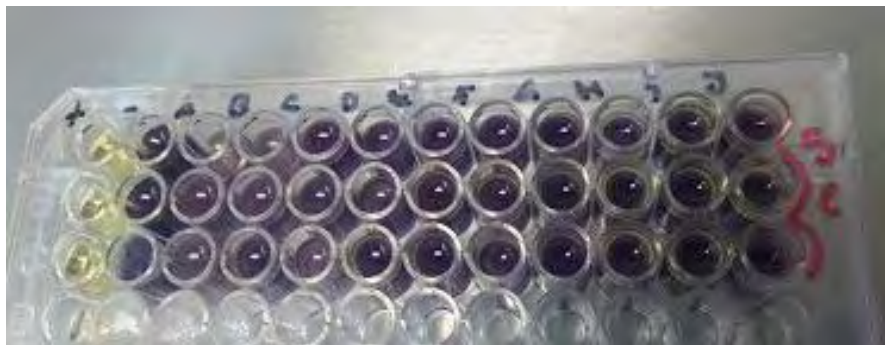
**Figura 26. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente frente a *Listeria monocytogenes*.**

Fuente. Este estudio



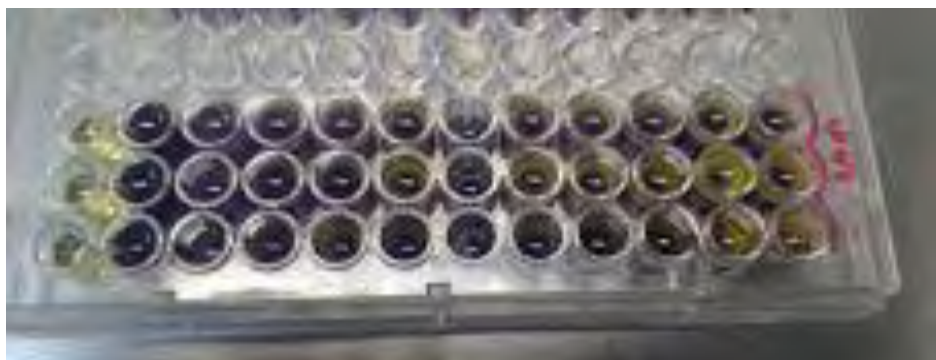
**Figura 27. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente frente a *Listeria monocytogenes*.**

Fuente. Este estudio



**Figura 28.** Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente frente a *Staphylococcus aureus*.

Fuente. Este estudio



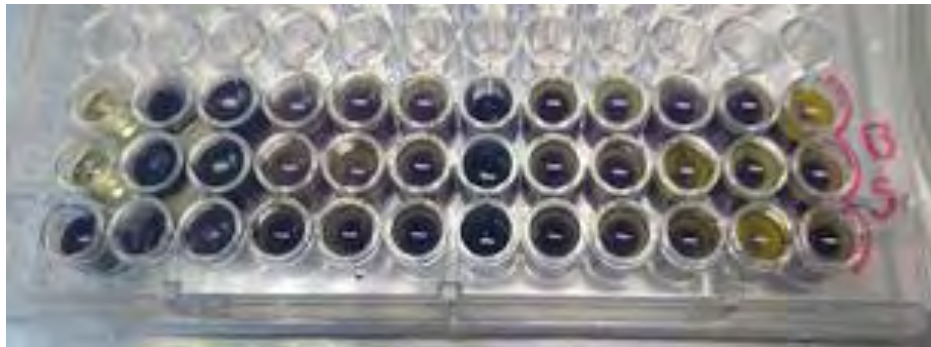
**Figura 29.** Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente frente a *Staphylococcus aureus*.

Fuente. Este estudio



**Figura 30. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente frente a *Bacillus cereus*.**

Fuente. Este estudio



**Figura 31. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente frente a *Bacillus cereus*.**

Fuente. Este estudio

En las figuras 28 a la 33 se muestran los resultados de las pruebas de inhibición bacteriana a través de microdilución en caja de Elisa donde L, representa la bacteria *Listeria monocytogenes*, S representa *Staphylococcus aureus*, B representa *Bacillus cereu*, la letra S significa que el aceite a evaluar fue extraído sin co-solvente y la letra C significa que el aceite a evaluar fue extraído con co-solvente.

Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica (Gil et al., 1999).

En la evaluación del aceite de semillas de papaya frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en todas las concentraciones formaron un color violeta evidenciando la actividad metabólica de estas bacterias, por lo tanto, el aceite estudiado no tiene actividad antibacteriana en ninguna de las concentraciones y no se puede determinar una concentración mínima inhibitoria.

Existe una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos; la bacteria produce enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco; la pared celular se vuelve impermeable al agente antimicrobiano; el sitio de ataque es alterado por mutación de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano; la bacteria posee una bomba de reflujos que expulsa al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco (Cavaliere et al., 2009).

En cambio se identificó un color amarillo frente a *Listeria monocytogenes* en la concentración de 64 y 72  $\mu\text{L}$  de aceite extraído sin co-solvente/mL de emulsión y en la concentración de 40, 48, 56, 64 y 72  $\mu\text{L}$  de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión, demostrando actividad antibacteriana del aceite vegetal de semillas de papaya con *Listeria monocytogenes*, para el aceite extraído con co-solvente y sin co-solvente la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue 40 y 64  $\mu\text{L}$  aceite/mL de emulsión respectivamente, esto por la acción del ácido oleico (Ghosh et al., 2017), y componentes minoritarios como 5-dehidro-avenasterol, 7-dehidro-avenasterol (Castro et al., 2007), y puede ser a causa de la interacción polifenoles, escualeno, esteroides y tocoferoles presentes en el aceite vegetal (Dorado et al., 2016),

La diferencia de los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre los aceites extraídos con fluidos supercríticos con y sin co-solvente se debe a que en la extracción utilizando agua como co-solvente se obtiene un aceite con mayor cantidad de polifenoles explicado en el número 9.3 (cuantificación de polifenoles); muchos autores atribuyen la actividad antimicrobiana a los compuestos fenólicos presentes en los aceites, los cuales penetran a través de

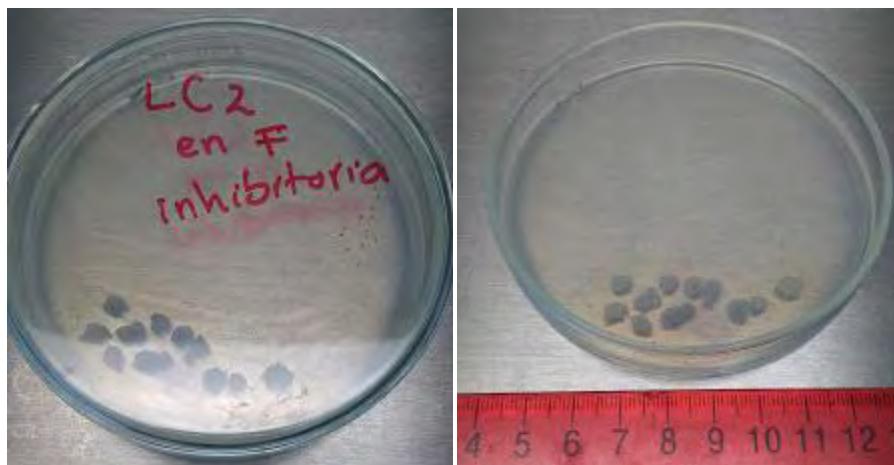
las membranas de las células microbianas, causando fuga del contenido del interior de la célula (iones y contenido citoplasmático) (Burt, 2004; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015; Bajpai *et al.*, 2012, Friedly *et al.*, 2009 y Li *et al.*, 2011). Estos compuestos tienen la habilidad de alterar la permeabilidad de la célula entrando por los canales porínicos de la membrana externa produciendo paredes celulares debilitadas o defectuosas, dañar las membranas citoplasmáticas, bloquear la síntesis de proteínas e interferir en el sistema de generación de energía celular (ATP), y finalmente puede llevar a la muerte celular (Rivera *et al.*, 2015; Cavalieri *et al.*, 2009), a pesar de esto no hay una relación estricta entre la cantidad de polifenoles en un aceite con la actividad antibacteriana ya que esto depende de los componentes fenólicos específicos que tenga cada material vegetal.

Las bacterias *Bacillus cereus* y *Staphylococcus* poseen una morfología consistente en una cápsula que es una capa con borde definido formado por una serie de polímeros orgánicos que la bacteria deposita en el exterior de su pared celular. Generalmente se utiliza como almacenamiento de glicoproteínas y aminoazúcares y sirve como una cubierta protectora a condiciones adversas (Tauro *et al.*, 1986), convirtiéndolas resistentes ante el aceite vegetal de papaya a diferencia de *Listeria monocytogenes* que no presenta esta cápsula protectora dando una mayor permeabilidad del aceite al interior de la bacteria.

#### APLICACIÓN DE LA PRUEBA CONFIRMATORIA

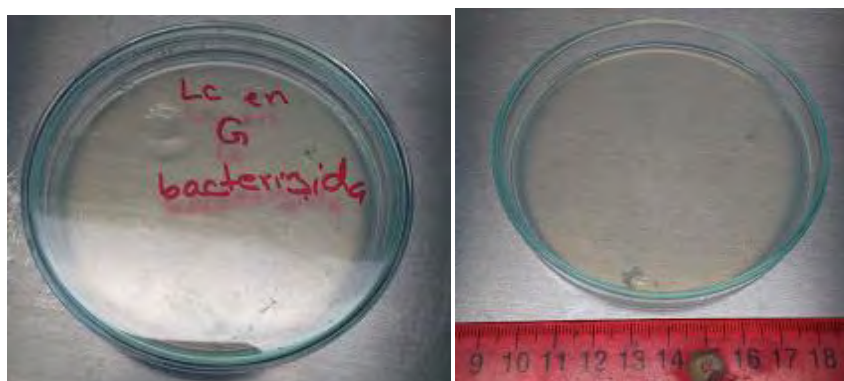
En aquellos pozos donde se encontró la CMI y del pozo con la concentración inmediatamente superior, se tomaron 10  $\mu$ L de la solución y se inocularon en una caja Petri con agar Muller Hilton; se incubó a 36°C durante 24 horas para verificar si había crecimiento bacteriano o por el contrario para confirmar la ausencia de bacterias viables. Los resultados se ilustran las siguientes figuras.





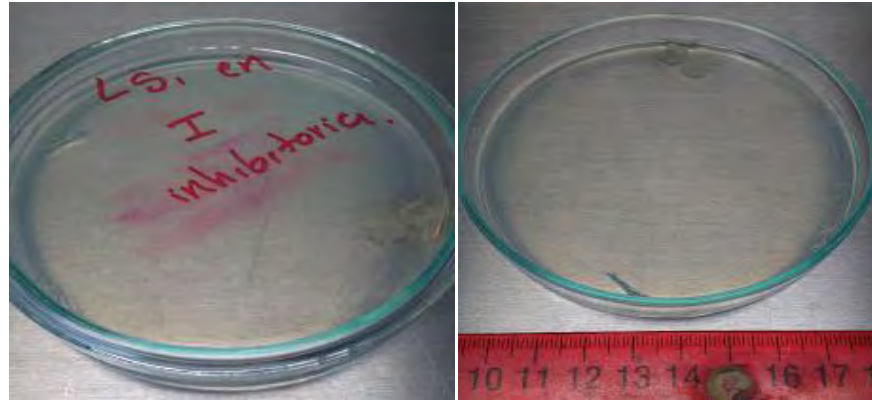
**Figura 32. Prueba confirmatoria para *Listeria monocytogenes* a CMI 40  $\mu$ L de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión.**

Fuente. Este estudio



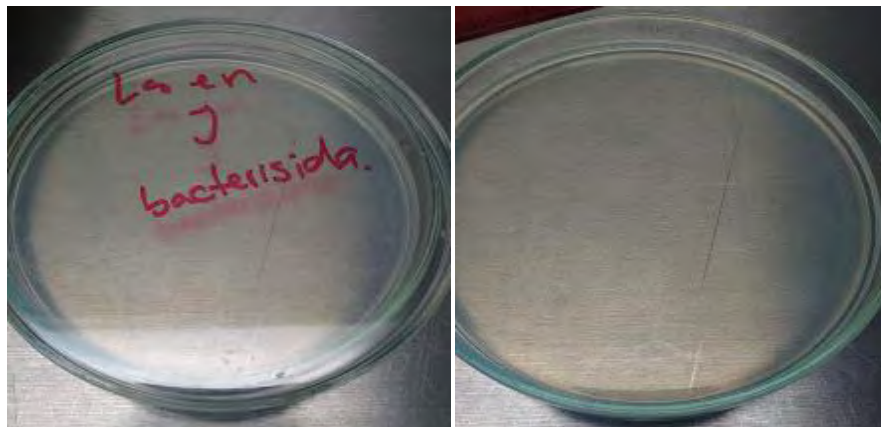
**Figura 33. Prueba confirmatoria para *Listeria monocytogenes* a concentración 48  $\mu$ L de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión.**

Fuente. Este estudio



**Figura 20. Prueba confirmatoria para *Listeria monocytogenes* a CMI de 64  $\mu$ L de aceite extraído sin co-solvente/mL de emulsión**

Fuente. Este estudio



**Figura 21. Prueba confirmatoria para *Listeria monocytogenes* a concentración de 72  $\mu$ L de aceite extraído sin co-solvente/mL de emulsión**

Fuente. Este estudio

Las colonias de *Listeria monocytogenes* son suaves, ligeramente convexas, con bordes ligeramente irregulares, de diámetro aproximadamente 3 mm, halos de color blanco (Chromagar, 2006), al igual que las colonias que se identificaron en esta investigación.

Como lo indica la figura 34, en el caso de la prueba confirmatoria a 40  $\mu$ L de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión se presentaron alrededor de 12 colonias entre 3 y 5 mm, para la

concentración de 48  $\mu\text{L}$  de aceite extraído con co-solvente/mL de emulsión (como lo indica la figura 35) no se encontraron colonias de la bacteria, solo se observaron algunos residuos de Tween 20 en el agar, por lo tanto se determinó que la concentración mínima inhibitoria es diferente que la concentración mínima bactericida. Con el aceite vegetal de semillas de papaya extraído con co-solvente la CMI es 40  $\mu\text{L}$  /mL de emulsión, y la CMB es a 46  $\mu\text{L}$  /mL de emulsión.

Las pruebas confirmatorias *Listeria monocytogenes* a 64  $\mu\text{L}$  aceite extraído sin co-solvente/mL de emulsión presentaron dos colonias blancas de aproximadamente 4mm, como lo indica la figura 36. En la prueba confirmatoria con la concentración superior o sea 72  $\mu\text{L}$  aceite extraído sin co-solvente/mL no se evidencian colonias de *Listeria monocytogenes*. Por lo tanto, con el aceite vegetal de semillas de papaya extraído sin co-solvente tiene un CMI de 64  $\mu\text{L}$ /mL y un CMB de 72  $\mu\text{L}$ /mL.

Según Cavalieri et al. (2009), si los agentes antimicrobianos se unen a la membrana citoplásmica, la alteran y desestabilizan causando el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula o si se interfiere en las moléculas de ADN dan como resultado en muerte celular. Los agentes antibacterianos que interfieren con la membrana citoplásmica son bactericidas, lo que puede indicar que a mayor concentración del aceite puede interferir con mayor protagonismo en la membrana citoplasmática.

## 8. CONCLUSIONES

La extracción con fluidos supercríticos permite el aprovechamiento de residuos agroindustriales, en este caso la extracción de aceite vegetal de semillas de papaya obtuvo un buen rendimiento alrededor del 19 y 17% con y sin agua como co-solvente respectivamente, generando unas sustancias de potencial para la industria alimentaria y cosmética.

El aceite obtenido de las semillas de papaya del presente estudio no cumple por completo con los requisitos mínimos en cuanto a las diferentes propiedades fisicoquímicas requeridas para su utilización en la industria alimentaria. Es necesario evaluar algún proceso de refinamiento para que el aceite logre cumplir con los requerimientos necesarios estipulados en la normatividad.

El aceite de semillas de papaya extraído con ayuda de agua como co-solvente tiene un mayor contenido de compuestos fenolicos en comparación con el resultado obtenido de la extracción del aceite sin co-solvente.

Según la revisión microscópica del diámetro de los glóbulos grasos en la microemulsión a las 0 y 48 horas, el seguimiento al pH y el análisis visual se determinó que el mejor tratamiento para tener una microemulsión estable para las pruebas de inhibición es a 60°C de temperatura de calentamiento para formar la emulsión, tiempo de agitación de 33 minutos con 43 segundos, y relación Aceite- Tween de 1:1.

El aceite de semillas de papaya no tuvo actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, y *Bacillus cereus* dentro las concentraciones evaluadas a nivel *in vitro*.

El aceite estudiado presentó actividad antibacteriana a nivel *in vitro* en cepa *Listeria monocytogenes*, siendo más determinante esta inhibición para el aceite de semillas de papaya extraído con co-solvente con una CMI de 40  $\mu\text{L}$  /mL de emulsión, y una CMB de 46  $\mu\text{L}$  /mL de emulsión, debido a la presencia de compuestos fenolicos dentro del extracto. El aceite de semillas de papaya extraído sin co-solvente obtuvo una CMI es 64  $\mu\text{L}$  /mL de emulsión, y la

concentración mínima bactericida es a 72  $\mu\text{L}$  /mL de emulsión para la bacteria estudiada. Este aceite vegetal podría ser incorporado para el manejo de inhibición microbiana de estas cepas con el fin de reducir la aplicación de antibióticos sintéticos.

El aceite de semillas de papaya puede constituirse en una alternativa de conservante natural para la industria alimentaria y como agente antimicrobiano contra bacterias patógenas de la trucha arcoíris. De esta manera, y se aprovecha de manera eficiente los residuos generados por la industria del procesamiento de frutas y se mitiga el impacto ambiental de los mismos.

## 9. RECOMENDACIONES

Los resultados del presente trabajo muestran que los aceites de semillas de papaya tienen un gran potencial para la industria alimentaria, por lo tanto, es necesario seguir realizando estudios relacionados con actividades biológicas de este aceite con aplicaciones en diferentes áreas.

Para la determinación de los parámetros para la formación de la microemulsión se recomienda determinar el potencial Z.

Se recomienda complementar el estudio cualitativo de la actividad antimicrobiana *in vitro* y la metodología de microdilución por caja de Elisa con técnicas cuantitativas para determinar la reducción de la población bacteriana y a la vez avanzar con pruebas *in situ*.

**REFERENCIAS**

- Afolabi, I, and K Ofovbrukweta. (2011). Physicochemical and Nutritional Qualities of Carica Papaya Seed Products. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(14): 3113–17.
- Afolayan, AJ., (2003). Extracts from the shoots of *Arctotis artotoides* inhibit the growth of bacteria and fungi. *Pharm. Biol* 41: 22-25.
- Asohofrucol. (2013). *Plan de Negocios de Papaya: Programa de Transformación Productiva*.
- Angiolillo L., Conte A., and Del Nobile M.A. (2013). Food Additives: Natural Preservatives. *Encyclopedia of Food Safety*, 474–476.
- Amaya, L.; Diaz, F.; García, N.; Moncada, M.; and Guerrero, G. (2007). Obtención del aceite de las semillas de *Luffa cylindricay* evaluación de su potencial uso en la industria cosmética. *Scientia et Technica*, 33, 287-289.
- AOAC International (2000): “Official Methods of Analysis”. 17<sup>a</sup>ed. Gaithersburg, USA.
- Argudin. M.A, Mendoza. M.C, Rodicio. M.R. (2010), *Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins* *Toxins* pp. 1751–1773.
- Bajpai V.K.,Kwang-Hyun B., Kang S.C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45, 722-734.
- Benadof, Dona. (2008). *Listeria monocytogenes*. *Revista chilena de infectología*, 25(5), 350.
- Belén, D.; Sánchez, E.; García D.; Moreno, M.; and Linares, O. (2004). Características fisicoquímicas y composición en ácidos grasos del aceite extraído de semillas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) variedades roja y amarilla. *Grasas y Aceites*, 55 (4), 428-433.
- Bhattacharjee, P., Singhal, R., & Gholap, A. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction for identification of adulteration of black pepper with papaya seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*(83), 783–786.

- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., and Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering*, 67. 21-33.
- Bueno Ferrer, Carmen. (2012). Bio-Compuestos Termoplásticos Basados En Aceites Vegetales, Estudio de Su Aplicabilidad Al Envasado de Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante.
- Bouanga Kalo, G., Matos, L., Nzikou, J., Ganongo-Po, F., Malela , K., Tchicaillat-Landou, M., Desobry, S. (2011). Physico-chemical properties of seed oil from papaya (*Carica papaya*) and the kinetics of degradation of the oil during heating. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(1), 45-49.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223 – 253.
- Calderón de Rzedowski, G. & J. A. Lomeli Sención. (1993). Caricaceae. Bajío. Instituto de Ecología A.C., Pátzcuaro. 17: 1–13.
- Castro Mejía Germán, Castro Barrera Thalía, Arredondo Figueroa José Luis, Castro, Mejía Jorge, De Lara Andrade Ramón. (2007). Antibiotics incorporation in *Artemia franciscana* nauplii, metanauplii, juveniles and adults, and their inhibitory action on *Aeromonas hydrophila* bacteria. *Hidrobiológica* ; 17( 1 ): 53-60
- Cavero, Sofía & R. García-Risco, Mónica & Marin Martin, Francisco & Jaime, Laura & Santoyo, Susana & Señoráns, Francisco & Reglero, Guillermo & Ibáñez, Elena. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. *The Journal of Supercritical*



*Fluids*. 38. 62-69.

Stephen J. Cavalieri.; Marie B. Coyle. (2009). Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiano. Series de Normas Técnicas N° 30. Lima.

Cerón., Osorio., and Hurtado B., (2012). Identificación de Ácidos Grasos Contenidos En Los Aceites Extraídos a Partir de Semillas de Tres Diferentes Especies de Frutas. *Acta agronómica* 61: 126–32.

CHROMagar. (2006). “CHROMagar Listeria.” In *Food and Water Industry CH*, Paris,.

Chujin, D., Qiang, D., Changsong, Z., Liang, Z., & Shucheng, L. (2012). Optimization of extraction Process of Papaya Seed Oil by Supercritical Carbon Dioxide Based on neural network. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2, 17-21.

Clavijo Cardona, Natalia, Melina Osorio Salazar, and Francisco Jiménez González. (2012). “Actividad alelopática y antibacteriana de fracciones polares F1-C, F1-D Y F1-F obtenidas de *Henriettella Trachyphylla* Triana (Melastomatacae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(157), 621-628.

Codex Alimentarius. (2015). Norma para aceites vegetales especificados- Codex stan 210. *Normas internacionales de los alimentos*, 1-14.

Contreras Calderón, José, Lilia Calderón, Eduardo Guerra Hernández, and Belén García Villanova. (2011). Antioxidant Capacity , Phenolic Content and Vitamin C in Pulp , Peel and Seed from 24 Exotic Fruits from Colombia. *Food Research International journal* 44(7): 2047–53.

Debnath, S., Rahman, H., Deshmukh, G., Duganath, N., Pranitha, C., & Chiranjeevi, A. (2011). Antimicrobial Screening of Various Fruit Seed Extracts. *Pharmacognosy Journal*, 83-86.

Danielsson and Lindman B (1981). The definition of microemulsion Colloids and Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science* 3 (4), pp. 391–392.

- Del Campo, J., Amiot, M. J., & Guyen, N. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63(10), 1359–1368.
- Delgado, Yaixa Beltrán, Bjorn Lindman, Peter Stilbs, Michael E Moseley. (2013). Contenido de Fenoles Totales En Extractos de Pleurotus Obtenidos Con Solventes de Diferente Polaridad Content of Total Phenols in Pleurotus Sp . Extracts Obtained with Solvents of Different Polarity. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 32(2): 121–29.
- Dorado A, Daniela J. (2016). Efecto de las condiciones de la extracción supercrítica de aceites obtenidos de semillas de frutas sobre el rendimiento, composición y actividad antioxidante. Universidad Nacional de Colombia.
- Dorado, Daniela J, Hurtado-Benavides, Andrés M, & Martínez-Correa, Hugo A. (2016). Extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles. *Información tecnológica*, 27(5), 37-48.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA. (2013). Staphylococcus Aureus. *Elika*: 1–4. [http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf).
- Emilia, Albado Plaus, Saez Flores Gloria, and Grabiél Ataucusi Sandra. (2001). Composición Química Y Actividad Antibacteriana Del Aceite Esencial Del Origanum Vulgare (Orégano). *Rev Med Hered* 12(1): 16–19.
- Espinoza Silva, Clara, Gamarra Quezada, Flor, Ramos Filio, Marianela, Quispe Solano, Miguel, & Flores Ramos, Omar. (2017). Efecto de presión y temperatura en la extracción de isotiocianato de bencilo por fluidos supercríticos a partir de hojas de *Tropaeolum majus* L. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(spe), 389-396.
- Esquivel, M. y M. G. Bernardo-Gil. (1993). El uso de fluidos supercríticos en la industria de aceites alimentarios. *Grasas y Aceites*, 44 (1), 1-5.

- FAO., Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015).  
Prevencción de La E.coli en los alimentos. *Marco de Gestión de Crisis para la Cadena Alimentaria.*: 0–15. [www.fao.org/foodchain/es](http://www.fao.org/foodchain/es).
- Franco, C., Jiménez, A., Luna, C., & Figueroa, R. (2006). Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de carica papaya (*Caricaceae*) en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Etomol. Mex*, 45(2), 171-177.
- Friberg, s.; Larsson, k.; Sjoblom, J. (2004). Orthokinetic Stability of Food Emulsions, en: *Food emulsions*. 4<sup>a</sup> Edición. New York, Marcel Dekker: 327 – 352.
- Friedly. E.C, Crandall- P.G, Ricke. S.C. (2009). Roman.M, O'Bryan. C, Chalova. V. In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science*, 74 pp. 67–72.
- Gall, G.A.E. y P.A. Crandell, (1992). The rainbow trout. *Aquaculture* 100:1-10.
- García, N.; Moncada, M. (2006). Estudio microbiológico del aceite de *Luffa cylindrica* para su potencial uso en la industria cosmética. Pereira. Universidad tecnológica de Pereira.
- Garcia, E.- Fernández,I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin. Cioalceu, Universidad Politécnica de Valencia.
- García Martínez, Eva, Isabel Fernández Segovia, and Ana Fuentes López. (2011). *Determinación de Polifenoles Totales Por El Método de Folin- Cioalceu*.
- Ghosh, Subarna & Saha, Mandira & Bandyopadhyay, Probir & Jana, Monoranjan. (2017). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from chloroform extract of *Carica papaya* seed and it's in vivo antibacterial potentiality in *Channa punctatus* against *Klebsiella* PKBSG14. *Microbial Pathogenesis*, Vol: 11 (1),508-518.

- Gonzalez I, López M, Mazas M, Bernardo A, Martín R. (2003) . Effect of pH of the recovery on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 31, Issues 1–3, 341-345
- Hameed, B. H. (2009). Evaluation of papaya seeds as a novel non-conventional low-cost adsorbent for removal of methylene blue. *Journal of Hazardous Materials*, 162, 939-944.
- Hennekinne. J.A., Buysen M.L (2012). Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* pp. 815–836
- Henríquez, Luis & H Patiño, Jairo & García, Mario. (2013). Estimación de la actividad antimicrobiana del polvo de semillas de aguacates. *Ciencia y Tecn. de Alimentos* 23, 16-20.
- Hurtado, A. (2002). *Estudio del proceso de extracción de componentes minoritarios de aceite de oliva con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Ingeniería Química, Madrid (España).
- Hurtado-Benavides, A. M., Dorado, D., & Sánchez-Camargo, A. (2016). Study of the fatty acid profile and the aroma composition of oil obtained from roasted Colombian coffee beans by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 113, 44–52.
- Hurtado, A., Martín, P., Vázquez, L., Reglero, G., Señorans, F., & Ibañez, E. (2014). Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction of minor components from olive oil. *Current Analytical Chemistry*, 10, 78-85.
- Irondi, A. E., Anokam, K. K., & Ndidi, U. S. (2013). Effect of drying methods on the phytochemical composition and antioxidant activities of *Carica papaya* seed. *Int J Biosci*, 3, 154-163.

- Isaza, J., Veloza, L., Guevara, C., Ávila, Y., & Díaz, O. (2005). Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia melastomataceae. *Actualidades Biológicas*, 75-79.
- ISO 3657:2013. Animal and vegetable fats and oils -- Determination of saponification value.
- Jurado, J., & Muñoz, L. (2009). Caracterización del aceite de las semillas de *Solanum quitoense* variedad la selva y evaluación de su actividad antioxidante. Universidad de Pereira.
- Kaufmann, B. and Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13, 105-113.
- Kosegarten-Conde, C E, and M T Jiménez-Munguía. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos Vol. 6 (2): 1–18.*
- Kotiranta A, Lounatmaa K, M H (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection.*;2:189.
- Kothari, Vijay, and Sriram Seshadri. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of *annona squamosa* and *carica papaya*. *Nutrition & Food Science* 40(4): 403–8.
- Kuskoski, E. Marta, Asuero, Agustín G., Troncoso, Ana M., Mancini-Filho, Jorge, & Fett, Roseane. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.
- Lafont, J. J., Páez, M. S., & Portacio, A. A. (2011). Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (almendra) del marañón (*anacardium occidentale* l). *Información Tecnológica*, 22(1), 51-58.
- Lee, Wei-ju, Min-hsiung Lee, and Nan-wei Su. (2011). Characteristics of papaya seed oils obtained by extrusion – expelling processes. *J Sci Food Agric* 91, 2348–54.

- Lee, W.-J., Lee, M.-H., & Sua, N.-W. (2011). Characteristics of papaya seed oils obtained by extrusion–expelling processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2348–2354.
- Li.M, Muthaiyan. A, O'Bryan C.A, Gustafson. J.E, Li. Y, Crandall P.G. (2011), *Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of Staphylococcus aureus*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 12 pp. 1240–1254
- Lizcano, Andrea J, and Jenny L Vergara. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales. Pontificia Universidad Javeriana.
- Lou, Z., Wang, H., Lv, W., Ma, C., Wang, Z., Chen, S. (2001). Assessment of antibacterial activity of fractions from burdock leaf against food-related bacteria. 21(9), 1272-1278.
- Luján, C. G. (2006). Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de “*Staphylococcus aureus*” con resistencia múltiple. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, España.
- Martini, M. (2005). Introducción a la dermofarmacia y a la cosmetología., Ed. ACRIBIA. S.A., Zaragoza (España).
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., & Okulik, N. B. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides . Facultad de Agroindustria UNNE, 1(E - 057), 1 – 4.
- M. Vinatoru (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* Jul; 8(3): 303–313.
- McClements. (2012). D,J Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, pp. 1719–1729.

- Mc Clements, DJ., Decker, EA., Park Y. y Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49:577-606.
- McClements, DJ. (2005). *Food Emulsions Principles Practice and Techniques* 2ed. CRC Press. Florida, USA.
- Maguna, Fabiana P, Ana M Romero, Oscar A Garro, and Nora B Okulik. (2006). Actividad Antimicrobiana de Un Grupo de Terpenoides . *Facultad de Agroindustria UNNE* 1(E-057): 1-4.
- Maisarah, A, Amira Nurul, R Asmah, and O Fauziah. (2013). Antioxidant Analysis of Different Parts of Carica Papaya. *International Food Research Journal* 20(3): 1043-48.
- Malacrida, C., Kimura, M., & Neuza, J. (2011). Characterization of a high oleic oil extracted from papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos ISSN 0101-2061*, 929-934,.
- Maldonado, L., Latorre, K., Rocha, P., Medrano, A., Abirache, C y Panazzolo, LA. (2011). Influencia del Ph en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*. 6: 28-31.
- Manaf, N. A., Nazrim, J. M., Nusantoro, B., Long, K., & Ghazali, H. M. (2009). Physico-chemical Characteristics of Papaya (*Carica papaya* L.) Seed Oil of the Hong Kong/Sekaki Variety. *Journal of Oleo Science*, 9, 885-892.
- Mendes, Cláudia dos, Abreu, Celeste Maria Patto de, Freire, Juliana Mesquita, Queiroz, Estela de Rezende, & Mendonça, Marcelle Mendes. (2014). Chemical characterization of the flour of peel and seed from two papaya cultivars. *Food Science and Technology*, 34(2), 353-357.

- Mercado M, Ávila J, Rey M, Montoya M, Gamboa A, Carrascal AK, Correa DX. (2012). *Brotos por Salmonella spp., Staphylococcus aureus y Listeria monocytogenes asociados al consumo de pollo*. Biomedica. 32(3):375-85.
- Miranda-Cruz, Edith & Espinosa-Moreno, Judith & Centurion, Dora & Velázquez-Martínez, José & de Jesus Alor-Chavez, Maricela. (2012). Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Psidium Friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus Hayesii* L., *Tynanthus Guatemalensis* L. Y *Spondias Purpurea* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(4): 354–61.
- Moulik, B. Paul (1998). Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78 (2) pp. 99–195
- Morais, Damila & Rotta, Eliza & Sargi, Sheisa & M. Schmidt, Eduardo & Guntendorfer Bonafe, Elton & N. Eberlin, Marcos (2015). Antioxidant Activity, Phenolics and UPLC MS of Extracts from Different Tropical Fruits Parts and Processed Peels. *Food Research International*. 77.
- Moreno, Leonardo I. (2014). Perfil de Ácidos Grasos En Algunas Especies Dulceacuícolas de Interés Comercial En Colombia, Estado de Conocimiento Y Perspectivas. UNIVERSIDAD DE LA SALLE.
- Moriarty, Fintan, Stuart Elborn, and Michael Tunney. (2005). Development of a Rapid Colorimetric Time-Kill Assay for Determining the in Vitro Activity of Ceftazidime and Tobramycin in Combination against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* 61(2): 171–79.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Alvarado-Ortíz, C., Ramos Escudero, F., Castañeda Castañeda, B., Barnett Mendoza, E., Cárdenas Lucero (2013). Estudio de Polifenoles, Taninos Y Métodos Químicos Para Determinar La Actividad Antioxidante de La Semilla de Sacha



- Inchi (*Plukenetia Volubilis* L). Sistema de Información Científica Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal 13: 11–18.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltran. S ., Cabezas, J.L., (2000). Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric, Food Chem.* 48, 3408-3412.
- Noguera M, Ojeda O, Jiménez and Kremisisky. (2017). Evaluación del potencial antibacteriano de extractos de semillas de cinco frutas tropicales. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 8 (1): 033-044.
- Ni, Q., Gao, Q., Yu, W., Liu, X., Xu, G., & Zhang, Y. (2015). Supercritical carbon dioxide extraction of oils from two *Torreya grandis* varieties seeds and their physicochemical and antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology* 60(2): 1226-1234.
- Nieto, Jhon & Cueto, Mario & Farroni, Abel & de Escalada Pla, Marina & Gerschenson, Noemi. (2016). Antioxidant characterization of new dietary fiber concentrates from papaya pulp and peel (*Carica papaya* L.). *Journal of Functional Foods.* 27. 319-328.
- Niño, J., Narváez, D. M., Mosquera, O. M., Correa, Y.M. (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight asteraceae and two rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology* (37), 566-570.
- NTC 218:1999 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES.DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ Y DE LA ACIDEZ , Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)
- NTC 283: 1998 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACION DEL INDICE DE YODO. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).

NTC 236: 2011 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PEROXIDO (ISO 3960:2007) Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).

NTC 289: 2002 GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN (ISO 6320: 2000). Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).

NTC 335 (1998) GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES. DETERMINACION DEL INICE DE SAPONIFICACION (ISO 3657). Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).

NTC 336: 2002 GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES. MÉTODO DE LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD (MASA POR VOLUMEN CONVENCIONAL) (ISO 6883:2000). Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).

Ocampo, D.; Betancur, L.; Ortiz, A.; Ocampo, R.(2007). Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L. *Vector*, 2, 103 -112. 2007

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2001) Acuicultura tópicos and activities. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma.

Ortega, A., Jimenez, M., Acosta, K., Guzman, E., Gutierrez, E., Luna, W., Pérez, M. (2011). Effects of papaya seeds extract on the sperm characteristics of dogs. *Animal Reproduction Science*, 129, 82-88.

Palou, A., Picó, C., Bonet, M., Oliver, P., Serra, F., Rodríguez, A., & Ribot, J. (2005). *El libro blanco de los esteroides vegetales* (Segunda ed.). (I. F. Sana, Ed.) España.

- Pantoja Chamorro, A., Hurtado Benavides, A., & Martínez Correa, H. (2017). Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims.) procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico. *Acta Agronómica*, 66(2), 178 - 185.
- Park, S. (2008). *Pathogenicity of Vibrio harveyi to cultured marine fishes in Korea Aquaculture*, 285. 8–13.
- Peralta, A.; Reyes, A.; Rangel, J.; Nivia, A.; Mendoza, A.; Rodríguez, L.; Parada, A. (2008). Diseño y construcción de equipos de extracción con fluidos supercríticos (EFS) y algunas aplicaciones en análisis de alimentos. *Alimentos Hoy*, 13.
- Pramparo, M., Prizzon, S., & Martinello, M. (2005). Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización. *Grasas y Aceites*, 56(3), 228-234.
- Prakash, B., Media, A., Mishra, P., Dubey, N. (2015) *Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – potentials and challenges* Food Control, 47, 381–39.
- Peredo, Luna, and Munguía Jiménez. (2012). Mecanismos de inestabilidad y métodos de estabilización de emulsiones múltiples. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 2(6): 122–30.
- POLEO, Germán; ARANBARRIO, José; MENDOZA, Lismen; ROMERO, Oneida. (2011). Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. Brasília, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2011. 429-432.
- Puangri, T, S M Abdulkarim, and H M Ghazali. (2005). “Properties of carica papaya l . (papaya) seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods.” *Journal of Food Lipids* 12(0): 62–76.

- P. Tauro, K.K. Kapoor, K. S. (1986). *An Introduction to Microbiology*, New Age Publishers,
- Ramirez, Luz S, and Darwin M Castaño. (2009). "Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal methodologies for evaluating the in vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin." *Scienti et Technica* (42): 263–68.
- Rao. J , McClements .D.J (2011) *Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (9) (2011), 5026–5035.
- Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146–166.
- Revisión Regional sobre la Situación y Tendencias en el Desarrollo de la Acuicultura en América Latina y el Caribe – 2010. Fisheries and Aquaculture N° 1061. Roma, 2011. p. 159. Disponible en Internet: URL: <http://www.fao.org/docrep/014/i2142b/i2142b.pdf>
- Rivera Calo, J.; Crandall, P. G.; O'bryan, C.A.; Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54: 111 – 119.
- Rosa, P. T. V. y M. A. A. Meireles,. (2005). Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction, *J. Food Eng*, 67, 235-240.
- Sánchez, M. D. M., C. Mantell., M. Rodríguez., E. Martínez de la Ossa., L. M. Lubian. y O. Montero, (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Nannochloropsis gaditana*, *J. Food Eng*, 66. 245-251.
- Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Graü, A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43: 547 – 556.

- Samaram, S., Mirhosseini, H., Ping Tan, C., & Mohd, H. (2013). Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and solvent extraction of papaya seed oil: yield, fatty acid composition and triacylglycerol profile. *Molecules*, 18, 12474-12487.
- Secretaría de Agricultura y Medio Ambiente de Nariño. Consolidado Agropecuario de Nariño, 2010.
- Serrano B, Paula. (2015). Emulsiones como sistemas de liberación de antimicrobianos naturales en alimentos. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA.
- Shinoda, K y Saito, H (1999), The stability of O/W type emulsions as functions of temperatura and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *Journal of Collid and Interface Science*, 30: 258-263.
- Shiva Ramayoni, Carlos Martín. (2007). Estudio de La Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales Y Ácidos Orgánicos . Posible Alternativa a Los Antibióticos Promotores de Crecimiento. Universidad Autonoma de Barcelona.
- Solorzano F, Miranda MG. (2011). Essential oils from aromatic herbs as a antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 16.
- Suleiman MN., (2011). The in vitro phytochemical investigation on five medicinal plants in Anyigba and its environs. *Kogi state Der Pharma* 2: 108-111.
- Tauro P., (1986). An Introduction to Mricrobiology, Wiley Eastern Limited. John Wiley and Sons
- Taroco .R, Seija. V, Vignoli. R,( 2011). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. Temas de Bacteriología y Virología Médica, Oficina del libro FEFMUR,665-668
- TEA, Grupo Tecnologías Emergentes en Agroindustria-. (2016). Aprovechamiento de residuos agroindustriales de frutas para la obtención de aceites con potencialidad en la industria cosmética, utilizando la tecnología de extracción con fluidos supercríticos.


- Tilly, K. D., R. P. Chaplin y N. R. Foster, (1990). Supercritical fluid extraction of the triglycerides present in vegetable oils. *Separ. Sci. Technol*, 25.(4),357-367.
- Tobar D, Magali E. (2016). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales de eucalipto (*eucalyptus*), cascara de limón (*citrus limón*) y mandarina (*citrus reticulata*) en dos tipos de bacterias patogenas. Universidad de Nariño.
- Tonthubthimthong, P., S. Chuaprasert., P, Douglas. y W, Luewisutthicha,. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of nimbin from neem seeds an experimental study. *J. Food Eng*, 47, 289-293.
- Varona S, Rodríguez Rojo S, Martín Á, Cocero MJ, Serra AT, Crespo T,. (2013). *Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria*. *Industrial Crops and Products* 3;42:243-250.
- Vági, E., B. Simándi, Suhajda, and Héthelyi. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *origanum majorana* l. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* 38(1): 51–57.
- Vázquez, L. (2008). Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid.
- Velasco, Reinaldo J, Héctor S Villada, and Jorge E Carrera. (2007). Aplicaciones de Los Fluidos Supercríticos En La Agroindustria. *Informción Tecnológica* 18(1): 53–65.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas,; Fernández-López,; Pérez-Álvarez. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19: 1130 – 1138.
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of


- Carica papaya leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111.
- Yepes, Sandra Milena, Lina Johana, Montoya Naranjo, and Fernando Orozco Sánchez. (2008). valorización de residuos agroindustriales frutas en Medellín y el sur del Valle del Aburrá, Colombia. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellin* 61(1): 4422–31.
- Wang Y, Zhao. R, Yu. L, Zhang Y, He Y, Yao. J (2014), Evaluation of cinnamon essential oil microemulsion and its vapor phase for controlling postharvest gray mold of pears (*Pyrus pyrifolia*) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (5) pp. 1000–1004
- Wilson, R. K., Kwan, T. K., Kwan , C.-Y., & Sorger, G. J. (2001). Effects of papaya seed extract and benzyl isothiocyanate on vascular contraction. *Life Sciences*, 71, 497–501
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6). 423–447.
- Wootton, M. (2013). *BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing* 44, 87-91.
- Zeta-Meter, Inc. (2012). Curso sobre potencial zeta. Disponible en: <http://www.seta-meter.com>

## **ANEXOS**



**ANEXOS A. FORMTO CONTROL DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS****SUPERCRITICOS**

	<b>SECCIÓN DE LABORATORIOS</b>				Código:
					Página: 1 de 1
	<b>FORMATO DE CONTROL DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA</b>				Versión: 1
Vigente a partir de: Julio de 2014					
<b>RESPONSABLE:</b>					
Esteban Arteaga Cabrera		Firma:			
<b>MUESTRA:</b>					
Semillas de papaya con co-solvente		Fecha: 28 de junio de 2017			
<b>TEMPERATURA (°C)</b>					
T° Operación:	50	T° Intercambiador:	49	T° Chaqueta Extractor:	50
T° Interna:	49	T° Separador:	49		
<b>PRESIÓN (bar)</b>					
P. Bomba:	384	P. Válvula:	381	P. Manómetro Extractor:	380
P. Manómetro Separador:	9				
<b>FLUJO (g CO<sub>2</sub>/min)</b>					
Flujo de Operación:	28				
<b>TIEMPO</b>					
Hora Inicio Presurización:		10:40 a.m.	Hora Inicio Rinse:		10:56 a.m.
Hora Inicio Extracción:		12:56 p.m.	Hora Final Extracción:		01:00 a.m.
T. Purga:	0	T. de Rinse:	0 min	T. de Extracción:	120 min
<b>MUESTRA (g)</b>					
Cantidad de Muestra Molida:	194				
Peso Inicial (Vial):	25,107	Peso Final:	59,743		
Cantidad de Aceite:	34,636	Rendimiento:	17,853		
<b>CILINDRO CO<sub>2</sub></b>					
No. Cilindro:	2	No. Extracción:	5		
<b>Observaciones:</b>					
5% de agua destilada como co-solvente.					

 Universidad de <b>Nariño</b>	<b>SECCIÓN DE LABORATORIOS</b>				Código:
					Página: 1 de 1
<b>FORMATO DE CONTROL DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA</b>				Versión: 1	
				Vigente a partir de: Julio de 2014	
RESPONSABLE:	Esteban Arteaga		Firma:		
MUESTRA:	semillas de mora		Fecha: 1 DE DICIEMBRE de 2016		
<b>TEMPERATURA (°C)</b>					
T° Operación:	60	T° Intercambiador:	63	T° Chaqueta Extractor:	59
T° Interna:	66	T° Separador:	59		
<b>PRESIÓN (bar)</b>					
P. Bomba:	35 2	P. Válvula:	349	P. Manómetro Extractor:	350
P. Manómetro Separador:	5				
<b>FLUJO (g CO<sub>2</sub>/min)</b>					
Flujo de Operación:	30				
<b>TIEMPO</b>					
Hora Inicio Presurización:		02:19 p.m.	Hora Inicio Rinse:		
Hora Inicio Extracción:		02:41 p.m.	Hora Final Extracción:		04:41 a.m.
T. Purga:	0	T. de Rinse:	0	T. de Extracción:	120 min
<b>MUESTRA (g)</b>					
Cantidad de Muestra Molida:	232				
Peso Inicial (Vial):	49,502	Peso Final:	82,154		
Cantidad de Aceite:	32,653	Rendimiento:	14,074		
<b>CILINDRO CO<sub>2</sub></b>					
No. Cilindro:	2	No. Extracción:	3		
Elaborado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Ana Lucia Pantoja Chamorro		Andres Mauricio Hurtado B		Andres Mauricio Hurtado B	
Investigadora		Coordinador Proyecto		Coordinador Proyecto	

**ANEXO B. ECUACIONES PARA DETERMINAR POLIFENOLES TOTALTES DEL  
ACEITE VEGETAL DE SEMILLAS DE PAPAYA.**

Ecuación curva patron

$$Y=0,0013x + 0,036$$

Donde:

Y=Absorbancia de la muestra

X= ppm de ácido gálico

0,0013=m= valore de la pendiente

0,036=b=valor del intercepto

Despejando X:

$$X = \frac{Y-0,036}{0,0013}$$

Aceite extraído sin co-solvente

**Abs 1= 0,639**

$$X = \frac{0,639-0,036}{0,0013} = 463,84 \frac{mg}{L}$$

$$\frac{463,84 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{\text{ml de disolvente}}{\text{ml de aceite}} = \frac{463,84 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{4 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 3,71 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{3,71 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} * \text{volumen específico} = \frac{3,71 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ ml}}{0,9195 \text{ g}} = 4,093 \text{ mg/g}$$

409.3 mg ácido gálico/ 100 g de aceite

**Abs 2= 0,635**

$$X = \frac{0,635-0,036}{0,0013} = 460,76 \frac{mg}{L}$$

$$\frac{460,76 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{\text{ml de disolvente}}{\text{ml de aceite}} = \frac{460,76 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{4 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 3,68 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{3,68 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} * \text{volumen específico} = \frac{3,68 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ ml}}{0,9195 \text{ g}} = 4,002 \text{ mg/g}$$

400.2 mg ácido gálico/ 100 g de aceite

**Abs 3= 0,694**

$$X = \frac{0,694 - 0,036}{0,0013} = 506,15 \frac{mg}{L}$$

$$\frac{506,15 mg}{1000 ml} * \frac{ml de disolvente}{ml de aceite} = \frac{506,15 mg}{1000 ml} * \frac{4 ml}{0,5 ml} = 4,04 mg/ml$$

$$\frac{4,04 mg}{1 ml} * volumen específico = \frac{4,04 mg}{1 ml} * \frac{1 ml}{0,9195 g} = 4,403 mg/g$$

440.3 mg ácido gálico/ 100 g de aceite

## ACEITE EXTRAÍDO CON CO-SOLVENTE

**Abs 1= 2,220**

$$X = \frac{2,220 - 0,036}{0,0013} = 1680 \frac{mg}{L}$$

$$\frac{1680 mg}{1000 ml} * \frac{ml de disolvente}{ml de aceite} = \frac{1680 mg}{1000 ml} * \frac{4 ml}{0,5 ml} = 13,44 mg/ml$$

$$\frac{13,44 mg}{1 ml} * volumen específico = \frac{13,44 mg}{1 ml} * \frac{1 ml}{0,9195 g} = 14,616 mg/g$$

1461,66 mg ácido gálico/ 100 g de aceite

**Abs 2= 2,293**

$$X = \frac{2,293 - 0,036}{0,0013} = 1736,15 \frac{mg}{L}$$

$$\frac{1736,15 mg}{1000 ml} * \frac{ml de disolvente}{ml de aceite} = \frac{1736,15 mg}{1000 ml} * \frac{4 ml}{0,5 ml} = 13,88 mg/ml$$

$$\frac{13,88 mg}{1 ml} * volumen específico = \frac{13,88 mg}{1 ml} * \frac{1 ml}{0,9195 g} = 15,095 mg/g$$

1509,51 mg ácido gálico/ 100 g de aceite

**Abs 3= 2,290**

$$X = \frac{2,290 - 0,036}{0,0013} = 1733,84 \frac{mg}{L}$$

$$\frac{1733,84 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{\text{ml de disolvente}}{\text{ml de aceite}} = \frac{1733,84 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{4 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 13,870 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{13,870 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} * \text{volumen específico} = \frac{13,870 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ ml}}{0,9195 \text{ g}} = 15,085 \text{ mg/g}$$

1508,51 mg ácido gálico/ 100 g de aceite