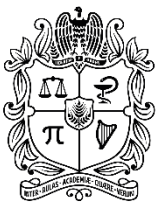


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Extracción de compuestos bioactivos de residuos de piña (*Ananas comosus*) usando fermentación en estado sólido

Extraction of bioactive compounds from pineapple (*Anana comosus)* residues using solid-state fermentation

Sarah Lucia Paz Arteaga

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2022

Extracción de compuestos bioactivos de residuos de piña (*Anana comosus*) usando fermentación en estado sólido

Sarah Lucia Paz Arteaga

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias – Biotecnología

Director externo:
Dr. Cristian Torres León

Codirectora:
Dra. Edith Marleny Cadena Chamorro

Asesora:
Dra. Liliana Serna Cock

Asesor externo:
Dr. Cristóbal Noé Aguilar Gonzáles

Línea de investigación:
Procesos biotecnológicos

Grupo de investigación
Biofibras y derivados vegetales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Área Curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2022

Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación a mis padres, **Gloria Arteaga y Edgardo Paz**, por ser mi mayor motor. Por esforzarse cada día en que mi hermano y yo fuéramos mejores personas. Esta pasión por la ciencia que he ido construyendo y que siento en ese momento, gran parte es por mi mamá, desde que este camino comenzó es ella la que ha estado impulsándome día tras día a seguir adelante. Mis padres han estado presentes en cada paso de mi vida, han estado en cada una de mis decisiones y me han apoyado tanto económicamente como emocionalmente en cada una de ellas. También quiero agradecer a mis abuelos, **Rosalba Benjumea y Ernesto Arteaga**, por llevarme al jardín todos los días, por cuidarme a diario en la primera etapa de mi vida, por esforzarse en enseñarme las vocales y los números, aunque ellos solo hayan tenido la oportunidad de cursar algunos años de la primaria y por darme su amor incondicional. Finalmente, quiero agradecer a la memoria de mi tía **Olga Lucia Arteaga** por darme todo su amor y por impulsarme a seguir todos los días.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre

Fecha: 26/11/2022

Agradecimientos Institucionales

Sarah Lucia Paz Arteaga agradece a la facultad de Ingeniería y administración de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por la beca grado de honor (resolución 012 de 2020) otorgada para la realización de la maestría en Biotecnología.

A la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por el apoyo económico (Resolución F.C 0349 de 2022) otorgado para la realización de la estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Coahuila.

A la Universidad Autónoma de Coahuila por brindarme sus instalaciones y por toda su ayuda en parte mi tesis de maestría.

Agradecimientos

Al doctor **Cristian Torres León** por brindarme todo su apoyo y confianza en estos 2 años de trabajo. Por hacer posible la estancia en la Universidad Autónoma de Coahuila, que fue primordial para lograr escribir esta tesis. Por mostrarme parte del hermoso estado de Coahuila y presentarme a las personas que fueron claves para culminar con mucha satisfacción la estancia de investigación. Por el acompañamiento constante en todo este proceso de formación. Por todas sus enseñanzas, no solo en el campo de la ciencia y la investigación, sino también en el campo humano, me enseñó por medio de su humildad y entereza que el esfuerzo siempre es recompensado.

A la Dra. **Edith Cadena Chamorro** por brindarme su acompañamiento en todas las etapas de la tesis.

A la Dra. **Liliana Serna Cock** por mostrarme el mundo de la investigación. Por darme la primera oportunidad de demostrar mis capacidades en el área de la investigación. Por su esfuerzo inagotable de mostrarle a los estudiantes que la educación es el mejor camino para salir adelante. Por brindarme su acompañamiento y conocimientos desde el momento en que la conocí

Al Dr. **Cristóbal Noé Aguilar Gonzáles** por compartir su conocimiento en el área de la biotecnología y por enseñarme con su humildad lo linda que es la investigación.

Al Dr. **Juan Alberto Ascacio Valdés** y la Dra. **Kare N. Ramirez** por su acompañamiento durante mi estancia en la Universidad Autónoma de Coahuila. Por su esfuerzo por hacerme sentir acogida en México y por compartir con tanta pasión su conocimiento.

A la química farmacobiologa **Laihsa Rodríguez Gonzales** por compartir conmigo todos sus conocimientos y por hacerme sentir como en casa durante mi estancia de investigación.

Al M.Sc. **Omar Vladimir Pabón** y Dr. **Harlen Torres** por su acompañamiento en toda mi etapa como estudiante universitaria y por compartir sus conocimientos y destrezas conmigo.

A **Mauricio Cedillo, Pedro De la fuente, Neder Balam, Salvador Saldaña Mendoza, Gloria Martínez Medina, Orlando De la Rosa**, y a todos mis compañeros en México por compartir conmigo momentos inolvidables y por su apoyo durante la estancia de investigación.

A mis padres **Gloria Arteaga y Edgardo Paz** y a mi hermano **Jorge Enrique Paz** por cuidarme en todo momento y por hacer posible este logro.

A mi novio **Alejandro Gómez García** por vivir toda esta experiencia conmigo y alentarme en cada momento.

Resumen

Extracción de compuestos bioactivos de residuos de piña (*Ananas comosus*) usando fermentación en estado sólido

La elaboración de productos a base de piña genera altas cantidades de residuos orgánicos, y la contaminación que causa la inadecuada disposición final de estos residuos motiva a que se investiguen alternativas tecnológicas para su aprovechamiento. El objetivo de esta investigación fue la liberación de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido (FES) del corazón y cáscara de piña MD2, con el fin de obtener agentes antioxidantes y antimicrobianos. Se evaluaron los residuos de piña como soporte de FES y el tiempo de fermentación necesario para obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos. Estos resultados se relacionaron con la capacidad antioxidante y las enzimas producidas. Igualmente, se identificaron los compuestos bioactivos presentes en la fermentación por HPLC-MS. Finalmente, se determinó la actividad antibacteriana por el método de microdilución. Los resultados del crecimiento radial y SEM evidencian que los residuos de piña cumplen con las características para ser un buen soporte de FES con *A. niger* GH1. La FES aumentó en un 73% la cantidad de compuestos fenólicos a 32 horas de fermentación y este resultado se correlaciona positivamente con la capacidad antioxidante y la actividad enzimática de β-glucosidasa y celulasas. El extracto obtenido a este tiempo inhibió el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En conclusión, la FES es un proceso biotecnológico con potencial para la valorización sostenible de los residuos de piña para obtener compuestos bioactivos de alto valor y múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Palabras clave: Residuos de piña, Compuestos bioactivos, Compuestos fenólicos, Propiedades biológicas, Capacidad antioxidante, Capacidad antimicrobiana.

Abstract

Extraction of bioactive compounds from pineapple waste (*Ananas comosus*) using solid fermentation

The production of pineapple-based products generates high amounts of organic waste, the pollution caused by the inadequate final disposal of this waste motivates the investigation of technological alternatives for its use. The objective of this research was the release of bioactive compounds by solid-state fermentation (SSF) from MD2 pineapple heart and skin in order to obtain antioxidant and antimicrobial agents. Pineapple residues were evaluated as a support for SSF and the fermentation time necessary to obtain the highest amount of phenolic compounds. These results were related to the antioxidant capacity and the enzymes produced. Likewise, the bioactive compounds present in the fermentation were identified by HPLC-MS. Finally, the antibacterial activity was determined by the microdilution method. The results of radial growth and SEM show that pineapple residues meet the characteristics to be a good support for SSF with A. niger GH1. The FES increased the amount of phenolic compounds by 73% at 32 hours of fermentation and this result correlates positively with the antioxidant capacity and the enzymatic activity of β-glucosidase and cellulases. The extract obtained at this time inhibited the bacterial growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. In conclusion, SSF is a biotechnological process with potential for the sustainable recovery of pineapple residues to obtain high-value bioactive compounds and multiple applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

Keywords: Pineapple by-products, bioactive compounds, phenolic compounds, biological properties, antioxidant activity, antimicrobial capacity.

Contenido

Pág.

Resumen **I**

Lista de figuras

Lista de tablas

Lista de anexos **II**

Introducción

Objetivos **6**

1. 71.1 71.2 71.3 91.4 101.4.1 131.4.2 131.4.3 131.4.4
141.5 141.5.1 141.5.2 151.5.3 181.6 181.6.1 181.6.2
201.6.3 211.6.4 211.6.5 221.7 221.7.1 221.7.2
261.7.3 261.8 271.9 271.10 28**2.** 392.1 392.2 402.3 412.3.1
412.3.2 422.3.3 432.3.4 442.3.5 442.3.6 452.3.7
452.3.8 472.3.9 472.3.10 492.4 492.4.1 492.4.2
522.4.3 532.4.4 552.4.5 572.4.6 572.5 592.6 60**3.**
693.1 693.2 703.3 713.3.1 713.3.2 713.3.3 713.3.4
723.3.5 723.3.6 733.3.7 743.3.8 743.3.9 753.4
753.4.1 753.4.2 783.4.3 823.4.4 823.4.5 843.5
873.6 88**4.** 924.1 924.2 93**5.** 94

Lista de figuras

Figura 1.1. Cadena de generación de subproductos (corona, corazón y cáscara) y biomasa residual (tallo y hojas) de la piña. 10
Figura 1.2. Productos de proceso de fermentación con residuos de piña 23
Figura 2.1. Medición de actividad de celulasa y β-glucosidasa a las 32 horas de fermentación en estado sólido de residuos de piña con *A. nige*r GH1. 46
Figura 2.2. Esquema descriptivo de la obtención de las fracciones fenólicas (libre y ligada). 47
Figura 2.3. Comparación de color de cáscara y corazón entre la norma NTC 729-1 y los frutos utilizados en este estudio. 49
Figura 2.4. Contenido polifenólico y actividad antioxidante durante la fermentación de residuos de piña. 54
Figura 2.5. La actividad de β-glucosidasa y celulasa durante el tiempo de fermentación. 55
Figura 2.6. Micrografías de cáscara y corazón de piña sin fermentar y fermentada. Escala de imagen: 500X – 50 µm. 57
Figura 3.1. Efecto sobre el contenido fenólico de tres factores de extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido. 77
Figura 3.2. Superficies de respuesta correspondiente a la interacción entre los tres factores evaluados (concentración de etanol, cantidad de material fermentado y número de pasos). 81
Figura 3.3. Identificación de compuestos de extracto optimizado por cromatografía de alta resolución (RP-HPLC-ESI-MS) 83
Figura 3.4. Comprobación de concentración mínima inhibitoria de residuos de piña MD2 fermentados contra tres microorganismos patógenos 85
Figura 3.5. Curva de crecimiento bacteriano en caldo nutritivo a diferentes concentraciones de extracto optimizado. 86

Lista de tablas

Tabla 1.1. Composición proximal de los residuos de diferentes variedades de piña en base seca. 11
Tabla 1.2. Contenido de fibra y sus constituyentes de los residuos de piña. 12
Tabla 1.3. Compuestos fenólicos y otros metabolitos identificados en subproductos de piña MD2 (*Ananas comosus*) con la técnica HPLC-DAD-ESI-MS. 16
Tabla 1.4. Compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante en subproductos de piña. 19
Tabla 1.5. Productos de la fermentación en estado sólido y sumergida de los subproductos de la piña 24
Tabla 2.1. Caracterización proximal de la cáscara y corazón de piña secos. 51
Tabla 2.2. Ensayos de soporte de cáscara y corazón de piña (70:30) 52
Tabla 2.3. Compuestos fenólicos identificados de cáscara y corazón de piña MD2 fermentados con *A. niger* GH1 con la técnica RP-HPLC-ESI-MS. 58
Tabla 3.1. Valores no codificados y codificados de los factores estudiados en el diseño estadístico Box- Behnken. 73
Tabla 3.2. Valores experimentales y predichos obtenidos para el contenido de FT de extractos de residuos de piña fermentado 80
Tabla 3.3. Resultados ANOVA de la ecuación polinomial de segundo orden 80

Lista de anexos

Anexos 1. Curva de calibración de azúcares reductores con glucosa 95
Anexos 2. Curva de calibración de contenido fenólico con ácido gálico 95
Anexos 3. Curva de calibración de capacidad antioxidante con trolox 96
Anexos 4. Curva de calibración de actividad de β-glucosidasa con p-nitrofenol 96
Anexos 5. Curva de calibración de actividad de celulasa con dextrosa 96
Anexos 6. Extracción de compuestos fenólicos vs tiempo de extracción sólido: líquido en ultrasonido 97
Anexos 7. Reconocimientos 97

Introducción

Entre India, Filipinas, China y los Estados Unidos de América se producen cerca de 55 millones de toneladas de desechos de frutas y verduras debido al procesamiento, envasado, distribución y consumo de estas. La agroindustrialización de frutas y hortalizas es una de las prácticas industriales que más desechos sólidos orgánicos genera en el mundo. En general, per cápita, se desperdicia mucho más en los países industrializados que en los países en vía de desarrollo, en Europa y Estados Unidos el desperdicio de alimentos per cápita se encuentra entre 95-115 kg /año y en los países de África subsahariana y Asia meridional y sudoriental es de solo 6-11 kg/año (FAO 2011).

No obstante, los residuos de frutas y hortalizas debido a su naturaleza son una amplia fuente de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se encuentran en gran cantidad en cáscaras, semillas y demás residuos de estructuras vegetales, del total de estos compuestos, el 24% se encuentran ligados a otros compuestos químicos presentes en la matriz biológica (Adom y Liu 2002, Yang, Liu, y Halim 2009).

Una de las técnicas más usadas para la recuperación y liberación de fenoles ligados es la fermentación en estado sólido (FES), esta técnica es amigable con el medio ambiente, de fácil escalamiento y mediante la producción de enzimas de forma natural por parte de los microorganismos permite la extracción de estos biocompuestos (Cano y Postigo et al. 2021). Pandey (2003) demuestra que una baja cantidad de agua en la FES ofrece ventajas, como fácil recuperación del producto, disminución del costo de producción, representado en costo de energía, ya que el proceso no requiere alta agitación y es posible trabajar en un fermentador pequeño (Martins et al. 2011). Por lo tanto, la FES es una tecnología atractiva para regiones con baja tecnificación y personal no calificado, como muchas de las zonas vulnerables de Colombia, comparado con tecnologías como ultrasonido, altas presiones o pulsos eléctricos, que requieren equipos costosos y alto consumo energético. Con la FES se podrían obtener compuestos de alto valor comercial, con materias primas

que se consideran residuos no aprovechables, como los residuos de piña, con baja inversión, y con microrganismos de fácil adaptación y rápido crecimiento.

La piña es una de las frutas más producidas en los países tropicales y subtropicales, el mayor productor de piña en el mundo es Costa rica, con una producción de 3´328 100 toneladas y 40 000 hectáreas sembradas en el 2019, seguido de Filipinas con 2´747 856 toneladas y Brasil con 2´426 526 toneladas. Colombia ocupa el puesto onceavo con una producción de 1´008 687 y 23 378 hectáreas sembradas en el 2019. En Colombia, los departamentos con mayor participación en el cultivo de este fruto son: Santander con un 43%, el Valle del cauca con un 15% y el Meta con el 12% (FAOSTAT 2019). Colombia exporta piña a Italia, Estados Unidos, Chile, España, Reino Unido y Portugal, los TLC han abierto las puertas de las exportaciones de estos productos, sin embargo, la alta producción también ha ocasionado el aumento de los residuos de estos frutos (Cardona Ruiz & Castaño Giraldo, 2019).

En departamentos como el Cauca, el cultivo de piña ha dado a más de 336 familias la posibilidad de mejorar su calidad de vida. En este departamento, las autoridades buscan cambiar los cultivos ilícitos por cultivos orgánicos, que inducen al desarrollo departamental y dejar atrás todo el daño que ha ocasionado la violencia (El Tiempo, 2022). El departamento del Cauca actualmente está en búsqueda de alternativas de generación de empleo por medio de cultivos orgánicos, y aprovechar los residuos de la piña podría ayudar en este objetivo al generar un aumento en los ingresos de más familias.

De este modo, mediante el uso de la tecnología FES en los residuos de la piña, se ha reportado en el incremento de fenoles totales (FT) entre un 6.6% y un 74% (Rashad et al. 2015, Correia et al. 2004), así como el aumento de 3 veces el contenido de proteína cruda (Aruna, 2019) y del 60% el contenido de polihidroxialcanoatos (Vega-Castro et al. 2016). El aumento de diversos compuestos en los residuos agroindustriales mediante la aplicación de la tecnología FES, se debe especialmente al proceso de liberación por parte del trabajo de las enzimas. Es por esto que en los estudios relacionados con la FES es conveniente la evaluación de la actividad enzimática según el compuesto que se desea obtener, en las investigaciones relacionadas con el aumento del contenido de estructuras fenólicas como elagitaninos, ácido gálico, catequina, epicatequina, entre otros, se han

asociado directamente a la presencia de xilasas, tanasas, celulasas, β-glucosidasa (Yepes-Betancur et al. 2021; Correia et al. 2004; Ascacio-Valdés et al. 2014).

Por otro lado, además de la capacidad antioxidante ampliamente estudiada de los compuestos fenólicos, estas estructuras tienen la capacidad de trabajar como agentes antimicrobianos, impidiendo el equilibrio entre el medio interno y externo de los microorganismos patógenos. Algunas de las estructuras fenólicas presentes en los residuos de la piña son linalol, el α-terpineol y el furfural, estudiadas por su efecto inhibitorio contra *Escherichia coli, Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Brito et al. 2021).

En 2015, las Naciones Unidas adoptaron los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). El duodécimo ODS aborda la "producción y consumo responsable" y establece la gestión eficiente de los residuos. Debido a todo lo anterior y en aporte al duodécimo ODS, el objetivo de esta investigación fue evaluar por primera vez los compuestos fenólicos ligados y libres durante el proceso de FES con *A. niger* GH1 y evaluar su capacidad antioxidante y antimicrobiana contra *Escherichia coli, Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Figura 1).

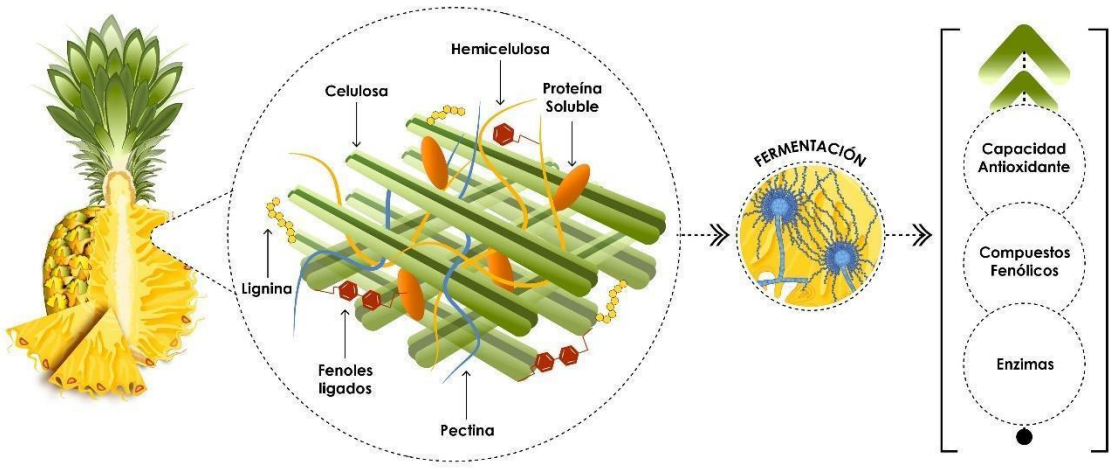


Figura resumen. FES de residuos de piña para la obtención de compuestos de alto valor comercial

Referencias

Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21), 6182–6187. https://doi.org/10.1021/jf0205099

Aruna, T. E. (2019). Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 57, 102193. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193

Ascacio-Valdés, J. A., Buenrostro, J. J., De la Cruz, R., Sepúlveda, L., Aguilera, A. F., Prado, A., Contreras, J. C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2014). Fungal biodegradation of pomegranate ellagitannins. Journal of Basic Microbiology, 54(1), 28–34. https://doi.org/10.1002/jobm.201200278

Brito, T. B. N., R.S. Lima, L., B. Santos, M. C., A. Moreira, R. F., Cameron, L. C., C. Fai, A. E., & S.L. Ferreira, M. (2021). Antimicrobial, antioxidant, volatile and phenolic profiles of cabbage-stalk and pineapple-crown flour revealed by GC-MS and UPLC-MSE. Food Chemistry, 339, 127882. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127882

Cano y Postigo, L. O., Jacobo-Velázquez, D. A., Guajardo-Flores, D., Garcia Amezquita, L. E., & García-Cayuela, T. (2021). Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. Food Bioscience, 41. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100926

Cardona Ruiz, J. N., & Castaño Giraldo, M. A. (2019). Oportunidades de los productores de piña en el norte del valle del cauca en el tratado de libre comercio con chile. Universidad Libre, 7.

Correia, R. T. P., McCue, P., Magalhães, M. M. A., Macêdo, G. R., & Shetty, K. (2004). Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. Process Biochemistry, 39(12), 2167–2172. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.034

El Tiempo. (2022). Piña orgánica como sustitución de cultivos ilícitos en Cauca. https://www.eltiempo.com/colombia/otras-ciudades/pina-organica-como-sustitucion-de-cultivos-ilicitos-en-cauca-671366

FAO. (2011). Food loss and food waste: Causes and solutions. In Food Loss and Food Waste: Causes and Solutions. https://doi.org/10.4337/9781788975391

FAOSTAT. (2019). Cultivos. http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize.%0A

Martins, Silvia et al. 2011. “Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by Solid-State Fermentation. A Review.” Biotechnology Advances 29(3): 365–73. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008.

Pandey, Ashok. 2003. “Solid-State Fermentation.” Biochemical Engineering Journal 13(2–3): 81–84.

Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Ali, M. M., Nooman, M. U., & Al-Kashef, A. S. (2015). Antioxidant and anticancer agents produced from pineapple waste by solid state fermentation. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research, 7(6), 287–296.

Sharma, H. B., Panigrahi, S., Sarmah, A. K., & Dubey, B. K. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. Science of the Total Environment, 135907. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011

Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. Lwt, 112, 108236. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.003

Vega-Castro, O., Contreras-Calderon, J., León, E., Segura, A., Arias, M., Pérez, L., & Sobral, P. J. A. (2016). Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralsthonia eutropha*. Journal of Biotechnology, 231, 232–238. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018

Yang, J., Liu, R. H., & Halim, L. (2009). Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. LWT - Food Science and Technology, 42(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.007

Yepes-Betancur, D. P., Márquez-Cardozo, C. J., Cadena-Chamorro, E. M., Martinez-Saldarriaga, J., Torres-León, C., Ascacio-Valdes, A., & Aguilar, C. N. (2021). Solid-state fermentation – assisted extraction of bioactive compounds from hass avocado seeds. Food and Bioproducts Processing, 126, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.012

Objetivos

Objetivo general

Evaluar procesos de fermentación en estado sólido con *Aspergillus niger* para la obtención de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana a partir de residuos de la piña *(Ananas comosus*).

Objetivos específicos

- Evaluar el potencial de los residuos de la piña MD2 para su inclusión en un proceso de FES.

- Evaluar el efecto de la FES con *Aspergillus niger GH1* sobre la liberación de compuestos bioactivos a partir de residuos de piña.

- Evaluar el potencial antimicrobiano del extracto de residuos de piña fermentados, contra bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus.*

1. Capítulo 1:
Perspectiva para la valorización de los residuos de piña: usos funcionales y biotecnológicos

1.1 Resumen

La piña (*Ananas comosus)* es una de las frutas tropicales más comercializadas a nivel mundial. El alto procesamiento y consumo de esta fruta genera enormes cantidades de desechos orgánicos, que son serios problemas de contaminación. En este capítulo, describimos críticamente los desechos de piña, desde su composición química hasta sus propiedades funcionales y biológicas, así como los últimos avances en tecnologías de valorización. Investigaciones revelarán que los desechos de piña se caracterizan principalmente por la presencia de fibra dietética soluble e insoluble. En particular, este capítulo destaca la posibilidad de que los desechos de la piña sean procesados para obtener compuestos bioactivos como la bromelina y compuestos fenólicos con importantes propiedades biológicas como capacidad antioxidante, anticancerígena y antimicrobiana. Los residuos de piña se pueden valorizar utilizando tecnologías ecológicas y biotecnológicas como la fermentación para lograr el enfoque de cero residuos. Sin embargo, es necesario profundizar en el análisis de las moléculas de los residuos de las diferentes variedades, sus efectos en la salud y desarrollar procesos tecnológicos para obtener productos alimenticios funcionales con estos.

1.2 Introducción

La piña (*Ananas comosus*) pertenece a la familia Bromeliaceae. Es una planta monocotiledónea con 46 géneros y 2 000 especies aproximadamente. Su fruto se considera una infrutescencia y termina en un conjunto de hojas; es carnoso, fibroso y amarillo; su tonalidad depende de la variedad (Kavuthodi & Sebastian, 2018).

La piña es una de las frutas tropicales más importantes a nivel mundial, y las principales zonas productoras son América del Sur, América Central y el Sudeste Asiático. Se produce en más de 80 países, siendo Costa Rica el mayor productor, con una partición del 11 % equivalente a 3´328 100 t, con una superficie de 40 000 ha sembradas en 2021. En segundo lugar se encuentra Indonesia, en tercer Filipinas y cuarto Brasil, con una participación de 9.3%, 9.2% y 7.5% , respectivamente (FAOSTAT, 2019). Gran parte de la piña producida en estos países se exporta a los Estados Unidos y la Unión Europea. En Costa Rica, esta actividad económica genera ingresos totales de $ 941.5 millones por año (Chen et al., 2020).

La producción agrícola y el procesamiento de la piña generan muchos desechos. En los países en desarrollo, los residuos son llevados a incineradoras o vertederos, en su mayoría ubicados en zonas vulnerables, generando problemas de salud (Castañeda Torres & Rodriguez Miranda, 2017). Adicionalmente, los residuos generan descomposición bacteriana, volatilización y reacciones químicas, provocando altas tasas de metano y dióxido de carbono; además, se producen fuertes olores debido a la formación de ésteres, sulfuro de hidrógeno, organosulfuros, alquilbencenos, limoneno y otros hidrocarburos. Además de afectar la salud de las personas, estos gases contribuyen al calentamiento global (Ferronato et al., 2021).

En este sentido, la gestión integral de los residuos contribuye al desarrollo de negocios sostenibles y del medio ambiente (Rojas et al., 2018). Los desechos de la piña están compuestos por importantes componentes nutricionales y funcionales, entre los que se destacan los carbohidratos, la fibra dietética insoluble, la fibra dietética soluble (pectina, gomas y oligosacáridos) (Rico et al., 2020). Por su composición química, los residuos y subproductos de los alimentos pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica en la producción de compuestos de alto valor añadido como los fenólicos (Rashad et al., 2015), fibras (Fernandes Pereira et al., 2021) y enzimas (Rojas et al., 2018). También en biotecnología, en la síntesis de ácidos orgánicos (Zain et al., 2021) y polihidroxialcanoatos (PHA) (Vega-Castro et al., 2016), industria energética (Mund et al., 2021) y ambiental (biorremediación) (Astuti et al., 2019). En adición, los residuos de piña presentan alta actividad biológica; compuestos fenólicos y proteasas específicas extraídas de los subproductos de la piña se han utilizado como agentes antioxidantes,

antimicrobianos (Brito et al., 2021), anticancerígenos (Chen et al., 2019), antidiabéticos (Hu et al., 2011) y anti- inflamatorio (Şehirli et al., 2020).

Aún se carece de información reciente sobre la composición química, la actividad biológica y las aplicaciones biotecnológicas de los residuos de la piña de las diversas variedades cultivadas en el mundo. Laftah y Wan Abdul Rahman (2016), Dungani et al. (2016), Asim et al. (2015), Silva et al. (2020) y Verma (2015) sólo destacan los diferentes usos de la fibra obtenida de las hojas de las plantaciones de piña, Aditiya et al. (2016) muestran teóricamente la cantidad de biocombustible que se puede producir utilizando cáscara de piña; Kringel et al. (2020), Roda y Lambri (2019), Moreno-González & Ottens (2021), Ong et al. (2018), Campos et al. (2020), Rico et al. (2020) y Banerjee et al. (2018) reportaron algunas aplicaciones y métodos de extracción de compuestos de valor agregado utilizando subproductos de la piña como materia prima. Por tanto, el objetivo de esta revisión es presentar una descripción detallada de la biomasa residual y subproductos de la piña, donde se incluye la composición química, las propiedades biológicas y los principales usos biotecnológicos reportados.

1.3 Residuos de piña

En la cadena productiva de la piña, las etapas de cosecha y postcosecha generan grandes cantidades de desechos de piña (Banerjee et al., 2018). La replantación de la piña es un proceso que depende de las prácticas culturales y agrícolas, se puede renovar cada ciclo de fruto o cada dos años (Chen et al., 2020). En este contexto, los subproductos corresponden a tallos y hojas, en una planta de piña gold honey o también conocida como MD2, estos residuos son de aproximadamente 3.2 Kg (René et al., 2016). En Costa Rica, el cultivo de la piña produce cada dos años alrededor de cuatro millones de toneladas de biomasa residual, principalmente hojas (Chen et al., 2020). Los residuos generados se eliminan para preparar el suelo para la nueva siembra; la práctica de disposición más común corresponde a secado solar y posterior incineración (Zhuang et al., 2020).

En las etapas de postcosecha, los frutos se comercializan frescos o se llevan a las industrias para su transformación. Las frutas frescas comercializadas deben cumplir con ciertos estándares de calidad, según el país donde se comercializan las frutas. Si estas frutas no cumplen con estos estándares, se suman al porcentaje de pérdidas de alimentos.

Además, muchos organismos patógenos pueden atacar los cultivos de piña e impedir que se consuman los frutos; por ejemplo, *Phytophthora* (Oculi et al., 2020), los nemátodos *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* (Kiriga et al., 2018), la cochinilla (Mealybug) (Hernandez-Rodriguez et al., 2014), el gusano barrenador (*Strymon basilides)*, el *Elaphria nucicolora* y el gorgojo de la piña (*Metamasius dimidiatipennis)* (Monge, 2018).

En la agroindustrialización de la piña, los subproductos dependen de la variedad de piña y del producto final. Durante el procesamiento, primero se extrae la corona, luego la cáscara y finalmente el núcleo (Banerjee et al., 2019). Estos subproductos representan aproximadamente entre el 50-60% del total del fruto, compuestos en su mayoría por cáscara (29-42%), corazón (9.4-20%) y en menor cantidad por corona (2.7-5.9%) (Rico et al., 2020). Todos los residuos de la cadena de suministro de alimentos para la piña se muestran en la Figura 1.1, con los términos utilizados en esta revisión. La biomasa residual en el campo, los desperdicios de las industrias y los desperdicios en los hogares.

Figura 1.1. Cadena de generación de subproductos (corona, corazón y cáscara) y biomasa residual (tallo y hojas) de la piña.

1.4 Composición nutricional de los residuos de piña

Las Tablas 1.1 y 1.2 muestran que los principales subproductos de la piña, cáscara y corazón tienen altas cantidades de fibra dietética, celulosa, hemicelulosa y lignina y una

baja cantidad de proteínas y minerales. Sin embargo, el contenido nutricional de la biomasa residual y subproductos, depende principalmente de diferentes variables como condiciones agronómicas, condiciones ambientales y de factores genéticos (Burton-Freeman, 2000).

Tabla 1.1. Composición proximal de los residuos de diferentes variedades de piña en base seca.

Fuente	Proteína (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos totales (%)	Cenizas (%)	Referencias
Cáscara					
Colombia (Gold MD2)	0.80		6.65		(Micanquer-Carlosama et al., 2020)
Colombia (Gold MD2)	0.63	0.21	27.08		(Vega-Castro et al., 2016)
India	3.13			3.88	(Rani & Nand, 2004)
India			35.00	10.60	(Bardiya et al., 1996)
India (Indian Kew)	3.90			5.90	(Banerjee et al., 2019)
India (Smooth Cayenne)	5.11	5.31	55.52	4.39	(Dibanda Romelle et al., 2016)
Nigeria (Smooth Cayenne)	2.85		74.08	6.80	(Aruna, 2019)
Sri lanka (Mauritius)	5.04	2.78	43.95		(Kodagoda & Marapana, 2017)
Brazil	8.80	1.10		1.50	(Morais et al., 2017)
México	0.75	2.00		1.50	(Sánchez Pardo et al., 2014)
Corazón					
Colombia (Gold MD2)	0.40		7.21		(Micanquer-Carlosama et al., 2020)
Sri lanka (Mauritius)	3.67	2.35	83.03		(Kodagoda & Marapana, 2017)
México	0.85	3.17		1.30	(Sánchez Pardo et al., 2014)
Corona					
México	0.70	3.50		7.37	(Sánchez Pardo et al., 2014)
Brazil				5.20	(Fernandes Pereira et al., 2021)
Orujo					
Costa Rica (Gold MD2)	4.71	0.61	43.46	2.24	(Selani et al., 2014)
Hojas					
Costa Rica	6.90	3.00		6.10	(Chen et al., 2020)
Malaysia				2.00	(Khalil et al., 2006)
India				0.90	(Saha et al., 1990)

Tabla 1.2. Contenido de fibra y sus constituyentes de los residuos de piña.

Fuente	Fibra total (%)	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Pectina (%)	Referencias
Cáscara						
India		11.52	7.00	11.20	6.70	(Rani & Nand, 2004)
India			11.70	19.80		(Bardiya et al., 1996)
India (Indian Kew)		10.4	31.80	20.90		(Banerjee et al., 2019)
India (Smooth Cayenne)	14.80					(Dibanda Romelle et al., 2016)
Nigeria (Smooth Cayenne)	13.96					(Aruna, 2019)
Sri lanka (Mauritius)	42.02					(Kodagoda & Marapana, 2017)
Brazil	16.30					(Morais et al., 2017)
Mexico	65.00	10.01	28.69	40.55	2.49	(Sánchez Pardo et al., 2014)
Corazón						
Sri lanka (Mauritius)	9.14					(Kodagoda & Marapana, 2017)
México	47.60	5.78	28.53	24.53	1.58	(Sánchez Pardo et al., 2014)
Corona						
México	62.50	13.88	21.88	43.53	2.32	(Sánchez Pardo et al., 2014)
Brazil		24.30	19.10	17.40		(Fernandes Pereira et al., 2021)
India (Giant Kew)			21.00	41.10		(Banerjee et al., 2017)
Hojas						
Costa Rica		7.30	26.10	22.60		(Chen et al., 2020)
Malaysia		10.50		73.40		(Khalil et al., 2006)
India		6.04		68.50	1.10	(Saha et al., 1990)

Los residuos de piña contienen un 10% de materia seca, de la cual el 96% es materia orgánica y el 4% restante es materia inorgánica (Abdullah, 2007). Estos residuos son materia prima para muchos procesos de extracción de compuestos nutricionales y funcionales porque contienen fibras insolubles, pectinas, proteínas, vitaminas, minerales, compuestos fenólicos, azúcares simples y carbohidratos complejos como celulosa y hemicelulosa, potencialmente hidrolizable en azúcares fermentables (Seguí y Fito Maupoey, 2018).

1.4.1 Proteína

El contenido de proteína fluctúa entre 0.63 y 6.9 % p/p. Esta variación depende de la variedad, la parte del fruto y las condiciones del área de cultivo (Tabla 1.1). El contenido de proteínas de los subproductos de la piña es bajo; por ello, se han utilizado mecanismos para aumentar este valor nutritivo. Los subproductos de la piña han sido ampliamente utilizados como suplemento proteico de bajo costo para la alimentación animal después de someterlo a procesos tecnológicos para aumentar el contenido (Aruna, 2019).

1.4.2 Lípidos

En los subproductos de piña, el contenido de lípidos es bajo con respecto a la totalidad del fruto, (0.21 y 3.50 % p/p) (Tabla 1-1). Sin embargo, es similar al contenido de lípido de otros residuos agroindustriales como el pepino y la lechuga, 1.4 ± 0.2 y 1.4 ± 0.4, respectivamente (Greses et al., 2020). Según Morais et al. (2017) los subproductos de piña contienen cantidades significativas de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (174.4 ± 17.5 mg/100 g) y esteárico (29.9 ± 3.4 mg/100 g); ácidos grasos monoinsaturados como omega-9 o ácido oleico (85.3 ± 14.8 mg/100 g) y ácidos grasos poliinsaturados como omega-6 o ácido linoleico (159.6 ± 14.5 mg/100 g) y omega-3 o ácido linolénico (130.8 ± 25 mg/100 g).

1.4.3 Carbohidratos

El contenido total de carbohidratos está entre 6.65 y 83.03 % p/p (Tabla 1.1). Los subproductos de piña frescos son una fuente importante de azúcares fermentables. Zain et al. (2021) y Abdullah & Mat (2008) informaron un contenido de glucosa, fructosa y sacarosa de 8.24-11.74 %, 9.70-12.17 % y 2.05 %, respectivamente. Además, estos desechos tienen largas cadenas de monómeros hidrolizables.

El almidón es un carbohidrato natural en forma granular, compuesto por dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. Nakthong et al. (2017) reportaron 9% de almidón en tallo de piña en base húmeda. Este polisacárido contiene 34.4% de amilosa. Las características de este polisacárido hacen del tallo de la piña una buena fuente de almidón termoplástico resistente para aplicaciones alimentarias y no alimentarias.

1.4.4 Minerales

Como se puede observar en la Tabla 1.1 el contenido de ceniza fluctúa entre 0.9 y 10.60 % p/p. Entre los principales minerales de la cáscara, corazón y hoja de piña se encuentran los macro-minerales como el calcio (57.00 mg/Kg) y el fósforo (49.00 mg/Kg) (Micanquer-Carlosama et al., 2020), y entre los principales micro-minerales son el potasio (26.09 mg/Kg) y el zinc (298.18 mg/Kg) (Vega-Castro et al., 2016). El calcio es esencial para los huesos y los dientes, y el fósforo funciona en la producción de energía, mientras que el potasio y el zinc regulan varios sistemas de órganos y funcionan como cofactor, respectivamente (Gharibzahedi & Jafari, 2017). Sin embargo, la cantidad de minerales en la biomasa residual y subproductos de la piña fluctúa según la variedad y la parte de la fruta. Según El-Demerdash et al. (2020), la cantidad de minerales también está influenciada por el estado de madurez y la condición agronómica.

1.5 Propiedades funcionales

1.5.1 Fibras

En la Tabla 1.2 se muestra el contenido lignocelulósico de cada uno de los subproductos de la piña y de las hojas de la planta de la piña, y se observa que estos materiales orgánicos tienen un alto potencial como fuente de fibra. Martínez et al. (2012) reportaron en cáscara y corazón de piña MD2 un contenido de fibra de 75.8% en base seca, correspondiente a fibra insoluble (75.2%) y soluble (0.6%), con una capacidad de retención de agua de 14.6 ± 0.25 g/g, superior a la reportada para residuos de mango, maracuyá y guayaba y una capacidad de retención de aceite de 0.7 ± 0.08 g/g.

Usos de la fibras: Las fibras de las hojas de piña sirven como refuerzo para materiales termoplásticos como el polietileno de baja densidad (LDPE), el polipropileno (PP) y el almidón/poli (ácido láctico) (PLA) (Singh et al., 2021; Jaramillo et al., 2016). Las hojas de piña cultivadas en Malasia y cultivadas en India (variedad Queen) se utilizan para la fabricación de papel Kraft (Laftah & Abdul Rahaman, 2015) e hilo de alta calidad (90 tex) (Hazarika et al., 2017).

Gnanasekaran et al. (2021) y Fernandes Pereira et al. (2021) utilizaron fibra de las hojas del cultivo de piña para la extracción y aislamiento de celulosa con alta resistencia y rigidez, y Putra et al. (2018) utilizaron fibra de hojas de piña para desarrollar aislamiento acústico.

Selani et al. (2016) utilizaron cáscara y orujo de piña con aceite de canola para reemplazar la grasa en hamburguesas de carne. Los resultados mostraron mejores características de cocción, mejor rendimiento y apariencia debido al contenido de fibra de estos subproductos. Rodsamran & Sothornvit (2019) extrajeron pectina de la cáscara de piña, con un rendimiento de 1.02 a 2.12 % y potencial para ser incorporado en una película eficaz o recubrimiento activo. Las fibras son un componente importante tanto por su aporte nutricional como por sus propiedades funcionales. En los productos que requieren mantenerse hidratados, las fibras son útiles para prevenir la sinéresis, mejorar el rendimiento, estabilizar las emulsiones y modificar la textura y la viscosidad. La prevención de la sinéresis mejora la capacidad de retención de agua y la capacidad de retención de aceite en el producto (Elleuch et al., 2011).

Anindya et al. (2019) aislaron xilano del tallo de la planta de piña para usarlo en conjugado con mesalamina y probar su eficacia como agente antiinflamatorio. El xilano es la hemicelulosa más abundante en estas estructuras. Es útil como biopelícula y empaque; puede actuar como barrera para grasas y aceites y tiene propiedades como alta transmisión de luz, baja permeabilidad al oxígeno y permeabilidad al aroma (Stevanic et al., 2011).

El contenido de hemicelulosa (Tabla 1.2) de la cáscara de la piña es superior al de otros subproductos como la paja de arroz, el trigo (Prasad et al., 2007) y el bagazo de caña de azúcar (Kim & Day, 2011). Banerjee et al. (2019) utilizaron el alto contenido de hemicelulosa de las cáscaras de piña para extraer xilooligosacáridos y xilosa. Este último producto puede convertirse en xilitol, muy utilizado en la industria alimentaria por su bajo contenido calórico y poder edulcorante.

1.5.2 Compuestos fenólicos

Los residuos de piña son una fuente importante de compuestos fenólicos, la metodología de extracción e identificación determina la clase de compuestos fenólicos. Steingass et al. (2015) identificaron compuestos fenólicos presentes en los subproductos de la piña MD2

cultivada en Ghana, utilizando la tecnología HPLC-DAD-ESI-MS (Tabla 1.3); los resultados coinciden con Brito et al. (2021) con reporte de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Los dos estudios detectaron que la corona de la piña se caracteriza por contener ésteres isoméricos del ácido *p*-cumárico o ferúlico con ácidos aldáricos. En cuanto a los compuestos fenólicos detectados en la cáscara, el estudio realizado por Steingass et al. (2015) coincide con lo informado por Li et al. (2014). La cáscara contiene principalmente ácido gálico, catequina, epicatequina y ácido ferúlico. El tipo y cantidad de compuestos fenólicos depende de diferentes factores; variedad, parte del fruto (Tabla 1.3), madurez del fruto; factores ambientales como el tipo de suelo y el clima; factores genéticos y métodos de procesamiento y extracción. La extracción y recuperación de fenoles en residuos de piña está influenciada por la afinidad con el solvente utilizado para este proceso (Correia et al., 2004). Hossain & Rahman (2011) utilizaron tres solventes diferentes para la extracción de fenoles y encontraron que el solvente con mejor rendimiento fue el metanol (21.50 %), seguido del acetato de etilo (4.90 %) y la extracción con agua (4.30 %).

Tabla 1.3. Compuestos fenólicos y otros metabolitos identificados en subproductos de piña MD2 (*Ananas comosus*) con la técnica HPLC-DAD-ESI-MS.

Rt (min)	N [b] (*m/z*)	Compuestos	Partes de la fruta	
			Cáscara	Corona
8.1	472	Glutathione derivative	●	
13.0	371	Caffeoyl aldarate	●	●
11.4	355	p-Coumaroyl aldaratec	●	●
12.2	289	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H) -furanone-hexoside	●	
14.6	385	Feruloyl aldarate	●	●
15.5	360	1-(1H-Pyrrole-2-carboxyl)-glucuronosylglycerol	●	●
16.1	341	Caffeoyl hexoside	●	
20.7	331	Galloyl hexoside	●	
22.5	353	5-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)		●
23.1	355	Feruloyl hexoside	●	●

Información tomada de Steingass et al. 2015

[b] m/z of $[M-H]^-$

Continuación de la Tabla 1.3

Rt (min)	N [b] (*m/z*)	Compuestos	Partes de la fruta	
			Cáscara	Corona
24.5	385	Sinapoyl hexoside	●	
24.6	253	Caffeoylglycerol	●	
33.9	441	N-L-γ-Glutamyl-S-sinapyl-L-cysteine	●	
34.0	367	Feruloylisocitrate or quinic acid	●	●
36.6	625	Quercetin dihexoside		●
37.6	579	Syringaresinol hexoside	●	
40.0	463	Quercetin hexoside		●
43.8	623	Isorhametin rhamosyl-hexoside	●	
44.8	415	Dicaffeoylglycerol	●	●
47.2	399	p-Coumaroyl-caffeoylglycerol	●	
47.4	429	Feruloyl-caffeoylglycerol	●	●
49.4	413	p-Coumaroyl-feruloylglycerol	●	●

Información tomada de Steingass et al. 2015

[b] m/z of $[M-H]^-$

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios y son uno de los fitoquímicos biológicamente activos más importantes. Han sido ampliamente estudiados por sus propiedades biológicas como la actividad antioxidante. En los últimos años se ha estudiado su extracción a partir de residuos agroindustriales (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017). Los compuestos fenólicos tienen otras propiedades biológicas importantes, como antialergénicas, antiaterogénicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, cardioprotectoras y vasodilatadoras (Rashad et al., 2015; Singh et al., 2020). Estos compuestos se encuentran en las plantas en dos formas, libres o unidos por enlaces covalentes a los constituyentes de las células vegetales (Zhang et al., 2020).

1.5.3 Enzimas

Se han utilizado diferentes partes de desechos de piña para la extracción de enzimas. Coelho Silvestre et al. (2012) evaluaron el extracto de cáscara de piña variedad Perola como fuente de enzimas proteolíticas. Los autores encontraron un contenido de 5.76 U/mg de proteína y una actividad óptima de estas enzimas entre pH 6-7 y 70 °C. Rojas et al. (2018) evaluaron el contenido enzimático de corazón y corona de piña y reportaron cantidades de 2 233.50 ± 78.86 U/mg y 36.11 ± 1.62, respectivamente. Aunque muchos autores están de acuerdo con estos datos, Ketnawa et al. (2012) recomiendan la extracción de enzimas de la cáscara de la piña porque es el mayor subproducto del procesamiento de la piña.

La bromelina es la enzima predominante en los residuos de piña. Se ha reportado la presencia de enzimas en el tallo, como bromelina de tallo (EC 3.4.22.32), ananaína (EC 3.4.22.31) y comosaína, y en el jugo de fruta, bromelina de fruta (EC 3.4.22.33). Proteasas similares con actividad proteolítica también están presentes en la cáscara, el corazón, la corona y las hojas de la piña. El contenido proteico más alto detectado ha sido en el extracto de corona de piña. Esta enzima tiene muchas propiedades y se ha utilizado para diversos fines; debido a esta amplia gama de aplicaciones, la bromelina tiene un alto valor comercial (2 400 USD/kg) (Ketnawa et al., 2012).

1.6 Propiedades biológicas

1.6.1 Capacidad antioxidante

Como se observa en la Tabla 1.4, la cantidad de compuestos fenólicos en los subproductos de la piña puede fluctuar entre 1.12 y 120.90 mg de equivalentes de ácido gálico/g. Se han realizado más estudios de actividad antioxidante en la cáscara y el corazón de la piña que en la corona; estos estudios muestran que la cuantificación de antioxidantes presentes en la cáscara y el corazón son más altos que los encontrados en la corona. Sin embargo, todos los reportes coinciden en que los residuos del procesamiento de la piña son una fuente importante de compuestos antioxidantes.

Tabla 1.4. Compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante en subproductos de piña.

Subproductos	Total de fenoles [a]	DPPH·	ABTS·+	Referencias
Pulpa, cáscara, corazón y corona	1.12	86.00 [b]		(Rashad et al., 2015)
Cáscara y corona	120.90	4.80 [c]	7.70 [c]	(Martínez et al., 2012)
Pulpa, cáscara, corazón y corona	3.00	86.90 [b]		(Correia et al., 2004)
Corona	5.80	0.05 [c]	0.10 [c]	(Brito et al., 2021)
Cáscara	4.30			(Morais et al., 2015)
Cáscara y corazón		27.40[b]	57.10 [b]	(Sepúlveda et al., 2018)
Cáscara	3.00	209.60[d]		(Campos et al., 2020)
Corazón	1.57	93.40 [d]		
Cáscara			69.00 [b]	(Diaz-Vela et al., 2013)
Cáscara	68.30	78.10 [b]		(Kuppusamy et al., 2020)

[a] Expresada como mg de ácido gálico/g sustrato seco
[b] expresada en porcentaje de inhibición
[c] Expresada como µM Trolox/g
[d] Expresada como mg ácido ascórbico equivalente/100 g
Todos los resultados están presentados en base seca

El DPPH· es un método que permite entender si el extracto enriquecido con antioxidantes puede bloquear la fase de inicio de la oxidación al neutralizar o inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por el contrario, el método ABTS·+ se basa en la capacidad de los antioxidantes para eliminar el catión radical de larga duración ABTS·+ (Shahidi & Zhong, 2015). El DPPH· y la actividad eliminadora de radicales ABTS·+ son muy variadas. Esto podría deberse a las diferencias de los compuestos fenólicos que dependen de su estructura química, del número y ubicación de los grupos hidroxilo (Staszowska-Karkut & Materska, 2020) (Tabla 1.4).

A través del consumo de oxígeno, el cuerpo humano produce ROS como el radical anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. En pequeñas proporciones, estos ROS pueden ser beneficiosos para la salud. Sin embargo, durante el estrés oxidativo se producen grandes cantidades de ROS, provocando enfermedades como mutagénesis, cardiopatía coronaria, entre otras enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas

(Poprac et al., 2017). El cuerpo necesita agentes antioxidantes capaces de equilibrar las ROS. Investigaciones recientes se han basado en la búsqueda de antioxidantes naturales para reemplazar los antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) que podrían ser cancerígenos e incluso tóxicos (Moure et al., 2001). Según Sepúlveda et al. (2018) los compuestos polifenólicos extraídos de los subproductos de la piña tienen una potente actividad antioxidante en comparación con los antioxidantes comerciales.

1.6.2 Capacidad antimicrobiana

Los desechos de piña son una fuente potencial de compuestos antimicrobianos (Gnanasaraswathi et al., 2014). Algunos autores han reportado la capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos extraídos de los desechos de piña. Upadhyay et al. (2010) reportaron la capacidad antimicrobiana del ácido ferúlico y el ácido siríngico. Brito et al. (2021) encontraron capacidad antimicrobiana en linalool, α-terpineol y furfural, extraídos del aceite esencial de corona de piña, contra *Escherichia coli, Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Las proteasas de la piña también se han estudiado ampliamente como agentes antimicrobianos (Bhattacharyya, 2008). La bromelina tiene efecto contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp*., *E. coli* y *S. aureus*, entre muchos otros microorganismos patógenos (Ghanbari y Ebrahimpour, 2018). Abbas et al. (2021) demostraron la eficacia de la bromelina, extraída del corazón, cáscara, corona y tallo contra el acné, debido a su capacidad inhibidora contra *Propionibacterium acnés*. Además, Dutta y Bhattacharyya (2013) demostraron que el extracto de corona de piña se puede utilizar para reparar tejidos, curar heridas y posiblemente prevenir infecciones secundarias de organismos microbianos debido a la acción de proteasas específicas.

En la identificación de compuestos de las diferentes partes del fruto de la piña también se han encontrado hidrazonas (Correia et al., 2004), compuestos reconocidos por su capacidad antimicrobiana (Rollas & Küçükgüzel, 2007).

1.6.3 Capacidad anticancerígena

El cáncer es uno de los problemas médicos que causa más muertes en el mundo. En los últimos años se han realizado investigaciones que buscan alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, que no traigan contraindicaciones (Pauzi et al., 2016). Por ello, Pauzi et al. (2016) investigaron *in vitro* la acción de la bromelina de forma independiente y en acción sinérgica con el cisplatino frente a células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, encontrando que la acción sinérgica de estos dos compuestos tiene un efecto de apoptosis sobre las células MDA-MB-231. Beuth y Braun (2005) evaluaron el efecto de la bromelina sobre la metástasis en células de sarcoma L-1 y encontraron resultados favorables.

También se ha evaluado el efecto de los compuestos polifenólicos presente en los desechos de piña como agente anticancerígeno. Rashad et al. (2015) demostraron *in vitro* el efecto positivo de extractos ricos en compuestos fenólicos de desechos de piña contra las líneas celulares de cáncer HepG2, MCF-7, A549, HL-60 y HCT116. Chen et al. (2019) demostraron el uso de extractos de hojas de piña como protector de rayos UV y eliminador de ROS, confirmando así su posible eficacia contra el cáncer de piel.

1.6.4 Capacidad antidiabética

La diabetes tipo 2 es un trastorno metabólico crónico que afecta a más del 5% de la población mundial. Sin embargo, los tratamientos orales actuales tienen efectos adversos graves (Hu et al., 2011). El mal manejo de la diabetes puede desencadenar otros problemas médicos, como enfermedades cardiovasculares y daño a órganos vitales. La dislipidemia es una anomalía metabólica asociada a la diabetes, caracterizada por cambios cuantitativos y cualitativos en los lípidos y lipoproteínas (Wu & Parhofer, 2014).

Las hojas de piña no solo se han utilizado para la regulación del azúcar en sangre (Xie et al., 2006) y la mejora significativa de la sensibilidad a la insulina exógena (Xie et al., 2005) sino que también se ha demostrado su efecto positivo como antidislipidémico (Hu et al., 2011), lo que la convierte en una opción prometedora para el tratamiento de la dislipemia diabética y la diabetes.

1.6.5 Capacidad antinflamatoria

Las inflamaciones pueden ser causadas por diferentes factores y pueden ocurrir en diversas partes del cuerpo. La acumulación y activación de células inflamatorias mediadas por citoquinas y quimioquinas pueden causar inflamación intestinal (Hale et al., 2005), quemaduras de lengua y esófago (Şehirli et al., 2020), así como lesiones de tejidos blandos (Mondal et al., 2011).

Los extractos de desechos de piña se han utilizado para tratar afecciones como la artritis reumatoide, quemaduras graves en la lengua y el esófago (Şehirli et al., 2020), inflamación del colon, dolor crónico y asma, debido a su potencial antiinflamatorio (Hale et al., 2005; Mondal et al., 2011). Mondal et al. (2011) evaluaron extractos metanólicos de hojas de piña para reducir la inflamación causada por edema en ratas, encontrando un porcentaje de inhibición de la inflamación de 84.93. Secor et al. (2005) demostraron el resultado positivo del uso de bromelina en la inflamación de las vías respiratorias causada por alergias.

1.7 Usos biotecnológicos

1.7.1 Fermentación en estado sólido y sumergida

A. Fermentación en estado sólido

Se ha estudiado el uso de subproductos de piña como soporte en la FES para sintetizar y romper enlaces covalentes para liberar compuestos de alto valor comercial de la matriz biológica (Figura 1.2). La FES es un proceso biotecnológico en el que los organismos crecen en sustratos sólidos no solubles, con baja humedad (Aruna, 2019). La Tabla 1.5 muestra que con este método biotecnológico se ha incrementado la recuperación de compuestos fenólicos y proteína bruta, y se ha sintetizado PHA y ácidos orgánicos.

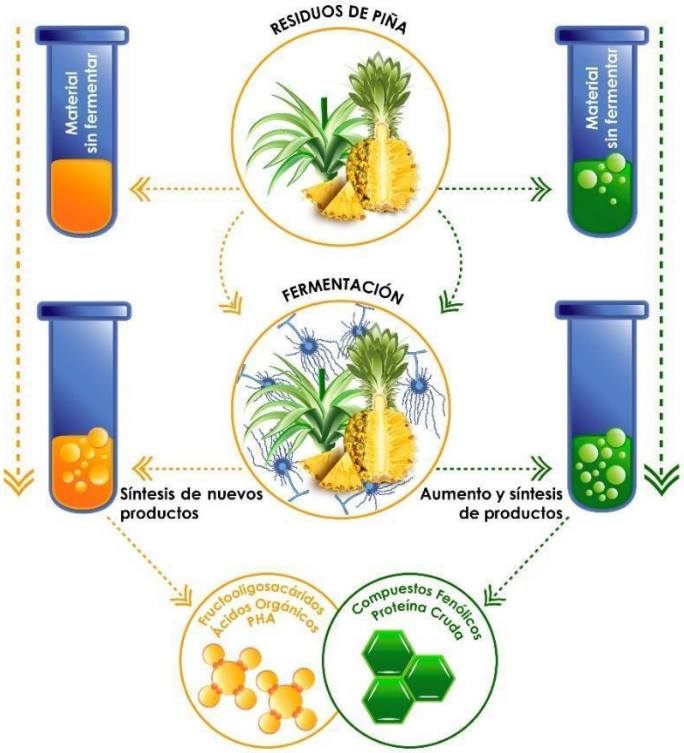


Figura 1.2. Productos de proceso de fermentación con residuos de piña.

B. Fermentación sumergida

El uso de subproductos de piña como fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos en fermentación sumergida ha sido una práctica ampliamente utilizada en biotecnología para producir enzimas, biocombustibles, ácidos y colorantes orgánicos (Tabla 1.5).

En la fermentación sumergida se usa mucha agua,lo cual representa una desventaja respecto a la FES. Sin embargo, la fermentación sumergida permite un mejor sistema de cultivo homogéneo, y su producto crudo fermentado puede ser utilizado directamente como cócteles enzimáticos para otras industrias (Cano y Postigo et al., 2021).

Tabla 1.5. Productos de la fermentación sólida y sumergida de los subproductos de la piña

FES					
Subproductos	**Microorganismo**	**Productos**	**Material no fermentado**	**Material fermentado**	**Referencias**
Pulpa, corazón, cáscara y corona	*Kluyveromyces marxianus*	Compuestos fenólicos (mg EAG / g)	1.12	1.20	(Rashad et al., 2015)
Pulpa, corazón, cáscara y corona	*Rhizopus oligosporus*	Compuestos fenólicos (mg EAG/g)	3.00	5.20	(Correia et al., 2004)
Cáscara	*Trichoderma viride ATCC 36316*	proteína cruda (%)	4.53	14.89	(Aruna, 2019)
Cáscara	*Ralsthonia eutropha*	Polihidroxialkanoatos (mg/100 g)		44	(Vega-Castro et al., 2016)
Pulpa, corazón, cáscara y corona	*Rhizopus oryzae NRRL 395*	Ácido láctico (mg/g)		103.69	(Zain et al., 2021)
Cáscara	*Aspergillus oryzae*	Fructoligosacaridos (g / L)		4.15	(de la Rosa et al., 2020)
Fermentación sumergida					
Tallo	*Bacillus subtilis BKDS1*	Pectinasa (U /mL)		1508.50	(Kavuthodi & Sebastian, 2018)
Hojas	*Saccharomyces cerevisiae (SA-1)*	Bioetanol (g /L)		15.24	(C. N. da Silva et al., 2020)
Cáscara	*Saccharomyces cerevisiae*	Bioetanol (g/L)		30.77	(Casabar et al., 2019)
Cáscara	*Lactobacillus rhamnosus GG*	Ácido láctico (g / L)		2.63	(Diaz-Vela et al., 2013)
	Pediococcus pentosaceus UAM22	Ácido acetico (g / L)		0.49	
		Ácido propionico (g / L)		0.15	
Pulpa, corazón, cáscara y corona	*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii ATCC 9649*	Ácido láctico (g/L)		13.10	(Abdullah, 2007)
Pulpa, corazón, cáscara y corona	Chromobacterium violaceum	Violaceína (mg/L)		5790	(Azlina Ahmad, Wan Kulandaisamy Venil & Arul Aruldass, 2015)
Cáscara y corazón	*Cupriavidus necator cepa A-04*	Polihidroxibutirato (g / L)		57.20	(Sukruansuwan & Napathorn, 2018)

EAG: Equivalentes de ácido gálico

C. Productos de fermentación

Durante el proceso de fermentación de la piña se producen enzimas importantes, como las enzimas pectinolíticas, encargadas de hidrolizar pectinas, principal polisacárido presente en la pared celular de las plantas (Kavuthodi & Sebastian, 2018). Las enzimas son esenciales en los procesos de fermentación; realizan la ruptura de los enlaces en el soporte de fermentación, dejando material fermentable disponible para el microorganismo que antes no lo estaba. Además, este mismo mecanismo de acción permite la liberación de compuestos con alta actividad biológica, como los compuestos fenólicos (Correia et al., 2004).

Otro de los productos que se obtienen de la fermentación de los subproductos de la piña es la violaceína. La violaceína es un pigmento bacteriano de color violeta, producido por *Chromobacterium violaceum*, ampliamente utilizado en la industria como una alternativa sustentable y amigable con el medio ambiente (Azlina Ahmad, Wan Kulandaisamy Venil y Arul Aruldass, 2015).

Ácidos orgánicos: La cantidad de ácido acético que se produce a partir de la fermentación de los subproductos de la piña es similar a la que se obtiene de la fermentación de la glucosa (Roda et al., 2014). El ácido acético tiene aplicaciones en la industria alimentaria como condimento o conservante y es útil en zonas rurales de países en vías de desarrollo para conservar alimentos.

El ácido cítrico y el ácido láctico se pueden producir por fermentación a partir de subproductos de la piña. Subramaniyan et al. (2019) y Abdullah (2007) demostraron que los subproductos de la piña son un buen soporte para sintetizar ácido cítrico y ácido láctico, respectivamente. El ácido cítrico es uno de los productos fermentados más utilizados en el mundo, se estima que anualmente se producen unas 10 000 toneladas para suplir la demanda del mismo, principalmente en las industrias alimenticia y farmacéutica (Jianlong, 2000), y el ácido láctico es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como potenciador del sabor, regulador de pH, conservante o agente amortiguador, y en la industria química se utiliza como disolvente, regulador de pH y como materia prima para polímeros biodegradables (Rattu y Krishna, 2022).

Polihidroxialcanoatos PHA: Los polihidroxialcanoatos (PHA) son poliésteres microbianos que se sintetizan y acumulan en una amplia variedad de microorganismos como fuente de

energía de almacenamiento interno. El mayor inconveniente es su alto costo de producción y purificación (Sangkharak et al. 2016).

El polihidroxibutirato (PHB) es un PHA que se ha sintetizado utilizando subproductos de la piña como fuente de carbono. Sukruansuwan & Napathorn (2018) hidrolizaron subproductos de piña con ácido fosfórico y sintetizaron PHB mediante la fermentación del corazón y la cáscara de piña, extrayendo hasta 57.2 ± 1.0 g/L y 28.6 ± 0.6 g/L, respectivamente. Vega-Castro et al. (2016) produjeron PHA a partir de cáscara de piña y obtuvieron una combinación de 40 % de PHB y 60 % de polihidroxivalerato (PHV) y Sangkharak et al. (2016) obtuvieron PHA purificado de bromelina.

1.7.2 Biorremediación

Diferentes tratamientos en los residuos de piña permiten la eliminación de compuestos químicos tóxicos de las aguas residuales de las industrias. Astuti et al. (2019) usaron coronas de piña en carbón activado magnetizado con el fin de eliminar el colorante violeta de metilo del agua contaminada. Dai et al. (2019) crearon hidrogeles mejorados a base de celulosa de cáscara de piña para la adsorción de azul de metileno. Rosales et al. (2019) utilizaron el corazón de la piña como biosorbente para la eliminación de Cr(VI) y Zhuang et al. (2020) utilizaron celulosa de piña modificada con permanganato de potasio como absorbente de iones de cobre.

1.7.3 Biocombustibles

El biogás y el bioetanol se han fabricado a partir de estructuras de polisacáridos altamente biodegradables como los desechos de la piña. Investigaciones recientes han demostrado el potencial de las hojas del cultivo de piña de diferentes variedades como Queen, Kew y Simanchal para la obtención de combustibles de segunda generación, utilizando tratamientos químicos y enzimáticos para incrementar los azúcares fermentables (Mund et al., 2021). Namsree et al. (2012) produjeron biogás mediante el uso de pulpa y cáscara de piña, con un rendimiento de 0.43 m^3/kg de demanda química de oxígeno. Chen et al. (2020) produjeron 2.1 t de bioetanol con 125 ton de peso fresco de hojas de piña, suficiente para reemplazar el 8.51 % del consumo de combustibles fósiles para el transporte en Costa

Rica y Casabar et al. (2019) produjeron bioetanol a partir de cáscaras de piña con un rendimiento de 5.98 ± 1.01 g/L.

1.8 Perspectivas tecnológicas

De la piña se pueden obtener moléculas esenciales para el óptimo funcionamiento del cuerpo humano y compuestos funcionales para la industria alimenticia y farmacéutica (Zain et al., 2021). FES y líquido (de la Rosa et al., 2020), uso de presión hidrostática (Santos et al., 2021), ultrasonido (Rathnakumar et al., 2017) y tratamientos térmicos (Rojas et al., 2018) son metodologías amigables con el medio ambiente, que brindan la oportunidad de aprovechar gran parte de estos biocompuestos presentes en los desechos orgánicos como los desechos de piña. Al final de la fermentación, utilizando subproductos de piña como material de soporte, se obtienen compuestos de alto valor biológico, como compuestos fenólicos y ácidos orgánicos (Rashad et al., 2015).

Los desechos de piña también son una buena fuente de fibras fuertes y económicas; se puede utilizar en alimentos como ingrediente funcional y para envases biodegradables y películas comestibles (Elleuch et al., 2011). Los últimos estudios para la recuperación de fibras de piña afirman que los tratamientos químicos con compuestos orgánicos son altamente efectivos en la obtención de fibra de alto valor económico y producen una baja cantidad de residuos contaminantes (Fernandes Pereira et al., 2021).

1.9 Conclusiones

Los residuos de piña son una fuente importante de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, fibras y enzimas. Su alto contenido en compuestos fenólicos y bromelina le confieren propiedades biológicas como capacidad antioxidante, anticancerígena y antimicrobiana. Dado que estudios recientes se enfocan principalmente en las proteínas y fenoles presentes en los residuos y subproductos de la piña, se recomienda continuar investigando y divulgando las propiedades de los demás compuestos en estos materiales biológicos.

1.10 Referencias

Abbas, S., Shanbhag, T., & Kothare, A. (2021). Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(1), 1001–1009. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.032

Abdullah, A. (2007). Solid And Liquid Pineapple Waste Utilization For Lactic Acid Fermentation. *Reaktor*, *11*(1), 50. https://doi.org/10.14710/reaktor.11.1.50-52

Abdullah, A., & Mat, H. (2008). Characterisation of Solid and Liquid Pineapple Waste. *Reaktor*, *12*(1), 48. https://doi.org/10.14710/reaktor.12.1.48-52

Aditiya, H. B., Chong, W. T., Mahlia, T. M. I., Sebayang, A. H., Berawi, M. A., & Nur, H. (2016). Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. Waste Management, *47*, 46–61. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.031

Anindya, A. L., Oktaviani, R. D., Praevina, B. R., Damayanti, S., Kurniati, N. F., Riani, C., & Rachmawati, H. (2019). Xylan from Pineapple Stem Waste: a Potential Biopolymer for Colonic Targeting of Anti-inflammatory Agent Mesalamine. *AAPS PharmSciTech*, *20*(3), 1–13. https://doi.org/10.1208/s12249-018-1205-y

Aruna, T. E. (2019). Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *57*, 102193. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193

Asim, M., Abdan, K., Jawaid, M., Nasir, M., Dashtizadeh, Z., Ishak, M. R., Hoque, M. E., & Deng, Y. (2015). A review on pineapple leaves fibre and its composites. *International Journal of Polymer Science*. https://doi.org/10.1155/2015/950567

Astuti, W., Sulistyaningsih, T., Kusumastuti, E., Thomas, G. Y. R. S., & Kusnadi, R. Y. (2019). Thermal conversion of pineapple crown leaf waste to magnetized activated carbon for dye removal. *Bioresource Technology*, *287.* 121426. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121426

Azlina Ahmad, Wan Kulandaisamy Venil, C., & Arul Aruldass, C. (2015). *Production of Violacein by Chromobacterium violaceum Grown in Liquid Pineapple Waste: Current Scenario*. 45–58. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23183-9

Banerjee, R., Chintagunta, A. D., & Ray, S. (2017). A cleaner and eco-friendly bioprocess for enhancing reducing sugar production from pineapple leaf waste. *Journal of Cleaner Production*, *149*, 387–395. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.088

Banerjee, S., Patti, A. F., Ranganathan, V., & Arora, A. (2019). Hemicellulose based biorefinery from pineapple peel waste: Xylan extraction and its conversion into xylooligosaccharides. *Food and Bioproducts Processing*, *117*, 38–50. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.012

Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., & Arora, A. (2018). Valorisation of pineapple wastes for food and therapeutic applications. *Trends in Food Science and Technology*,

*82,*60–70. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.024

Bardiya, N., Somayaji, D., & Khanna, S. (1996). Biomethanation of banana peel and pineapple waste. *Bioresource Technology*, *58*(1), 73–76. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00107-1

Beuth, J., & Braun, J. M. (2005). Modulation of murine tumor growth and colonization by bromelaine, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosum* L.). *In Vivo*, *19*(2), 483–486.

Bhattacharyya, B. K. (2008). Bromelain: An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *7*(4), 359–363.

Brito, T. B. N., R.S. Lima, L., B. Santos, M. C., A. Moreira, R. F., Cameron, L. C., C. Fai, A. E., & S.L. Ferreira, M. (2021). Antimicrobial, antioxidant, volatile and phenolic profiles of cabbage-stalk and pineapple-crown flour revealed by GC-MS and UPLC-MSE. *Food Chemistry*, *339,* 127882. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127882

Burton-Freeman, B. (2000). Dietary composition and obesity: Do we need to look beyond dietary fat? *Journal of Nutrition*, *130*, 272–275. https://doi.org/10.1093/jn/130.2.267s

Campos, D. A., Ribeiro, T. B., Teixeira, J. A., Pastrana, L., & Pintado, M. M. (2020). Integral valorization of pineapple (*Ananas comosus* L.) By-products through a green chemistry approach towards Added Value Ingredients. *Foods*, *9*(1). https://doi.org/10.3390/foods9010060

Campos, D. A., Ricardo, G., Vilas-boas, A. A., Madureira, A. R., & Pintado, M. M. (2020). Management of Fruit Industrial By-Products — A Case. *Mdpi*, *25*. https://doi:10.3390/molecules25020320

Cano y Postigo, L. O., Jacobo-Velázquez, D. A., Guajardo-Flores, D., Garcia Amezquita, L. E., & García-Cayuela, T. (2021). Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*, *41*. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100926

Casabar, J. T., Unpaprom, Y., & Ramaraj, R. (2019). Fermentation of pineapple fruit peel wastes for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *9*(4), 761–765. https://doi.org/10.1007/s13399-019-00436-y

Castañeda Torres, S., & Rodriguez Miranda, J. P. (2017). Modelo de aprovechamiento sustentable de residuos sólidos orgánicos en Cundinamarca, Colombia. *Universidad y Salud*, *19*(1), 116. https://doi.org/10.22267/rus.171901.75

Chen, A., Guan, Y. J., Bustamante, M., Uribe, L., Uribe-Lorío, L., Roos, M. M., & Liu, Y. (2020). Production of renewable fuel and value-added bioproducts using pineapple leaves in Costa Rica. *Biomass and Bioenergy*, *141,* 105675. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105675

Chen, Y. hung, Chen, Y. J., Chou, C. Y., Wen, C. C., & Cheng, C. C. (2019). UV-protective activities of pineapple leaf extract in zebrafish embryos. *Research on Chemical Intermediates*, *45*(1), 65–75. https://doi.org/10.1007/s11164-018-3632-5

Coelho Silvestre, M. P., Linhares Carreira, R., Ramalho Silva, M., Campos Corgosinho, F., Pereira Monteiro, M. R., & Aley Morais, H. (2012). Effect of pH and Temperature on the Activity of Enzymatic Extracts from Pineapple Peel. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(5), 1824–1831. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0616-5

Correia, R. T. P., McCue, P., Magalhães, M. M. A., Macêdo, G. R., & Shetty, K. (2004). Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, *39*(12), 2167–2172. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.034

Dai, H., Huang, Y., Zhang, Y., Zhang, H., & Huang, H. (2019). Green and facile fabrication of pineapple peel cellulose/magnetic diatomite hydrogels in ionic liquid for methylene blue adsorption. *Cellulose*, *26*(6), 3825–3844. https://doi.org/10.1007/s10570-019-02283-6

Daud, Z., Hatta, M. Z. M., Kassim, A. S. M., Awang, H., & Aripin, A. M. (2014). Exploring of agro waste (pineapple leaf, corn stalk, and napier grass) by chemical composition and morphological study. *BioResources*, *9*(1), 872–880. https://doi.org/10.15376/biores.9.1.872-880

de la Rosa, O., Múñiz-Marquez, D. B., Contreras-Esquivel, J. C., Wong-Paz, J. E., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2020). Improving the fructooligosaccharides production by solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *27*, 101704. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101704

Dibanda Romelle, F., Ashwini, R. P., & Manohar, R. S. (2016). Chemical composition of some selected fruit peels. *European Journal of Food Science and Technology*, *4*(4), 12–21.

Dungani, R., Karina, M., Subyakto, Sulaeman, A., Hermawan, D., & Hadiyane, A. (2016). Agricultural waste fibers towards sustainability and advanced utilization: A review. *Asian Journal of Plant Sciences*, *15*(1–2), 42–55. https://doi.org/10.3923/ajps.2016.42.55

Dutta, S., & Bhattacharyya, D. (2013). Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of Ananas comosus (pineapple) crown leaf. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*(2), 451–457. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.024

El-Demerdash, F. M., Baghdadi, H. H., Ghanem, N. F., & Mhanna, A. B. A. (2020). Nephroprotective role of bromelain against oxidative injury induced by aluminium in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *80*, 103509. https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103509

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, *124*(2), 411–421. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077

FAO. (2011). Food loss and food waste: Causes and solutions. In *Food Loss and Food Waste: Causes and Solutions*. https://doi.org/10.4337/9781788975391

FAOSTAT. (2019). *Cultivos*. http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize.%0A. Accessed June 6, 2021

Fernandes Pereira, P. H., Luiz Ornaghi, H., Arantes, V., & Hilário Cioffi, M. O. (2021). Effect of chemical treatment of pineapple crown fiber in the production, chemical composition, crystalline structure, thermal stability and thermal degradation kinetic properties of cellulosic materials. *Carbohydrate Research*, *499*. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108227

Ferronato, N., Moresco, L., Guisbert Lizarazu, G. E., Gorritty Portillo, M. A., Conti, F., & Torretta, V. (2021). Sensitivity analysis and improvements of the recycling rate in municipal solid waste life cycle assessment: Focus on a Latin American developing context. *Waste Management*, *128*, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.04.043

Ghanbari, R., & Ebrahimpour, A. (2018). Separation and identification of bromelain-generated antibacterial peptides from Actinopyga lecanora. *Food Science and Biotechnology*, *27*(2), 591–598. https://doi.org/10.1007/s10068-017-0267-z

Gnanasaraswathi, M., Lakshmipraba, S., Rajadurai, R. P., Abhinayashree, M., Fathima, B., Lakshmipriya, A., & Kamatchi, S. (2014). Potent anti-oxidant behaviour of citrus fruit peels and their bactericidal activity against multi drug resistant organism Pseudomonas aeruginosa. *J. Chem. Pharm. Sci.*, *2*(2), 139–144.

Gnanasekaran, S., Nordin, N. I. A. A., Jamari, S. S., & Shariffuddin, J. H. (2021). Effect of Steam-Alkaline coupled treatment on N36 cultivar pineapple leave fibre for isolation of cellulose. *Materials Today: Proceedings*. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.216

Greses, S., Tomás-pejó, E., & Gónzalez-fernández, C. (2020). Bioresource Technology Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, *297*, 122486. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122486

Hale, L. P., Greer, P. K., Trinh, C. T., & Gottfried, M. R. (2005). Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clinical Immunology*, *116*(2), 135–142. https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.04.011

Hazarika, D., Gogoi, N., Jose, S., Das, R., & Basu, G. (2017). Exploration of future prospects of Indian pineapple leaf, an agro waste for textile application. *Journal of Cleaner Production*, *141*, 580–586. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.092

Hernandez-Rodriguez, L., Ramos-Gonzalez, P. L., Garcia-Garcia, G., Zamora, V., Peralta-Martin, A. M., Peña, I., Perez, J. M., & Ferriol, X. (2014). Geographic distribution of mealybug wilt disease of pineapple and genetic diversity of viruses infecting pineapple in Cuba. *Crop Protection*, *65*, 43–50. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.003

Hossain, M. A., & Rahman, S. M. M. (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, *44*(3), 672–676. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.036

Hu, J., Lin, H., Shen, J., Lan, J., Ma, C., Zhao, Y., Lei, F., Xing, D., & Du, L. (2011). Developmental toxicity of orally administered pineapple leaf extract in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(6), 1455–1463. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.047

Jaramillo, N., Hoyos, D., & Santa, J. F. (2016). Composites with pineapple-leaf fibers manufactured by layered compression molding. *18*(2), 151–162.

Jianlong, W. (2000). Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC). Bioresource Technology, *75*(3), 245–247. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00053-5

Kavuthodi, B., & Sebastian, D. (2018). Biotechnological valorization of pineapple stem for pectinase production by Bacillus subtilis BKDS1: Media formulation and statistical optimization for submerged fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 715–722. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.003

Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(3), 385–391. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006

Khalil, H. P. S. A., Alwani, M. S., & Omar, A. K. M. (2006). Chemical composition, anatomy, lignin distribution, and cell wall structure of Malaysian plant waste fibers. *BioResources*, *1*(2), 220–232. https://doi.org/10.15376/biores.1.2.220-232

Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, *38*(7), 803–807. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0812-8

Kiriga, A. W., Haukeland, S., Kariuki, G. M., Coyne, D. L., & Beek, N. V. (2018). Effect of Trichoderma spp. and Purpureocillium lilacinum on Meloidogyne javanica in commercial pineapple production in Kenya. Biological Control, *119*, 27–32. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.005

Kodagoda, K., & Marapana, R. (2017). Development of non-alcoholic wines from the wastes of Mauritius pineapple variety and its physicochemical properties KHGK Kodagoda and RAUJ Marapana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(3), 492–497.

Kringel, D. H., Dias, A. R. G., Zavareze, E. da R., & Gandra, E. A. (2020). Fruit Wastes as Promising Sources of Starch: Extraction, Properties, and Applications. *Starch/Staerke*, *72*(3–4). https://doi.org/10.1002/star.201900200

Kuppusamy, S., Venkateswarlu, K., & Megharaj, M. (2020). Examining the polyphenol content, antioxidant activity and fatty acid composition of twenty-one different wastes of fruits, vegetables, oilseeds and beverages. *SN Applied Sciences*, *2*(4), 1–13. https://doi.org/10.1007/s42452-020-2441-9

Laftah, W. A., & Abdul Rahaman, W. A. W. (2015). Chemical pulping of waste pineapple leaves fiber for kraft paper production. *Journal of Materials Research and Technology*,

4(3), 254–261. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.12.006

Laftah, W. A., & Wan Abdul Rahman, W. A. (2016). Pulping Process and the Potential of Using Non-Wood Pineapple Leaves Fiber for Pulp and Paper Production: A Review. *Journal of Natural Fibers*, *13*(1), 85–102. https://doi.org/10.1080/15440478.2014.984060

Li, T., Shen, P., Liu, W., Liu, C., Liang, R., Yan, N., & Chen, J. (2014). Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. *International Journal of Food Properties*, *17*(8), 1805–1817. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.732168

Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, *7*(1). https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y

Micanquer-Carlosama, A., Cortés-Rodríguez, M., & Serna-Cock, L. (2020). Formulation of a fermentation substrate from pineapple and sacha inchi wastes to grow Weissella cibaria. *Heliyon*, *6*(4), 0–7. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03790

Mondal, S., Bhattacharya, S., Pandey, J., & Biswas, M. (2011). Evaluation of acute anti-inflammatory effect of ananas comosus leaf extracts in rats. *Pharmacologyonline*, *1315*, 1312–1315.

Monge, M. (2018). *Guía para la identificación de las principales plagas y enfermedades en el cultivo de piña*. 1–46.

Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Bonafe, E. G., Suzuki, R. M., Souza, N. E., Matsushita, M., & Visentainer, J. V. (2017). Proximate composition, mineral contents and fatty acid composition of the different parts and dried peels of tropical fruits cultivated in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *28*(2), 308–318. https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160178

Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Schmidt, E. M., Bonafe, E. G., Eberlin, M. N., Sawaya, A. C. H. F., & Visentainer, J. V. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*, *77*, 392–399. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036

Moreno-González, M., & Ottens, M. (2021). A Structured Approach to Recover Valuable Compounds from Agri-food Side Streams. *Food and Bioprocess Technology*, *14*(8), 1387–1406. https://doi.org/10.1007/s11947-021-02647-6

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Carlos Parajó, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, *72*(2), 145–171. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5

Mund, N. K., Dash, D., Mishra, P., & Nayak, N. R. (2021). Cellulose solvent–based pretreatment and enzymatic hydrolysis of pineapple leaf waste biomass for efficient release of glucose towards biofuel production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. https://doi.org/10.1007/s13399-020-01225-8

Nakthong, N., Wongsagonsup, R., & Amornsakchai, T. (2017). Characteristics and potential utilizations of starch from pineapple stem waste. *Industrial Crops and Products*, *105*, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.048

Namsree, P., Suvajittanont, W., Puttanlek, C., Uttapap, D., & Rungsardthong, V. (2012). Anaerobic digestion of pineapple pulp and peel in a plug-flow reactor. *Journal of Environmental Management*, *110*, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.017

Oculi, J., Bua, B., & Ocwa, A. (2020). Reactions of pineapple cultivars to pineapple heart rot disease in central Uganda. *Crop Protection*, *135*, 105213. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105213

Ong, K. L., Kaur, G., Pensupa, N., Uisan, K., & Lin, C. S. K. (2018). Trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels: Case study South and Southeast Asia. *Bioresource Technology*, *248*, 100–112. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.076

Pauzi, A. Z. M., Yeap, S. K., Abu, N., Lim, K. L., Omar, A. R., Aziz, S. A., Chow, A. L. T., Subramani, T., Tan, S. G., & Alitheen, N. B. (2016). Combination of cisplatin and bromelain exerts synergistic cytotoxic effects against breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, *11*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s13020-016-0118-5

Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, *38*(7), 592–607. https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005

Prasad, S., Singh, A., & Joshi, H. C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, *50*(1), 1–39. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.007

Putra, A., Or, K. H., Selamat, M. Z., Nor, M. J. M., Hassan, M. H., & Prasetiyo, I. (2018). Sound absorption of extracted pineapple-leaf fibres. *Applied Acoustics*, *136*, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2018.01.029

Rani, D. S., & Nand, K. (2004). Ensilage of pineapple processing waste for methane generation. *Waste Management*, *24*(5), 523–528. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2003.10.010

Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Ali, M. M., Nooman, M. U., & Al-Kashef, A. S. (2015). Antioxidant and anticancer agents produced from pineapple waste by solid state fermentation. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, *7*(6), 287–296.

Rathnakumar, K., Anal, A., & Lakshmi, K. (2017). Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Bioactive components from different Parts of Pineapple Waste. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. https://doi.org/10.5958/2230-732X.2017.00068.7

Rattu, G., & Krishna, M. (2022). Enzyme-free colorimetric nanosensor for the rapid detection of lactic acid in food quality analysis. *Journal of Agriculture and Food Research*, *6*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100268

René, C., Frutos, P. D. E., Ananas, D. E. P., Merr, L., Rodríguez, R., Becquer, R., Pino, Y., López, D., Rodríguez, R. C., González, G. Y. L., & Izquierdo, R. E. (2016). Fruits production of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) MD-2 from vitroplants. *Cultivos Tropicales*. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4732.3765

Rico, X., Gullón, B., Alonso, J. L., & Yáñez, R. (2020). Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview. *Food Research International*, *132*, 109086. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086

Roda, A., De Faveri, D. M., Dordoni, R., & Lambri, M. (2014). Vinegar production from pineapple wastes -preliminary saccharification trials. *Chemical Engineering Transactions*, *37*, 607–612. https://doi.org/10.3303/CET1437102

Roda, A., & Lambri, M. (2019). Food uses of pineapple waste and by-products: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(4), 1009–1017. https://doi.org/10.1111/ijfs.14128

Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2019). Preparation and characterization of pectin fraction from pineapple peel as a natural plasticizer and material for biopolymer film. *Food and Bioproducts Processing*, *118*, 198–206. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.010

Rojas, L. F., Cortés, C. F., Zapata, P., & Jiménez, C. (2018). Extraction and identification of endopeptidases in convection dried papaya and pineapple residues: A methodological approach for application to higher scale. *Waste Management*, *78*, 58–68. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.020

Rollas, S., & Küçükgüzel, Ş. G. (2007). Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, *12*(8), 1910–1939. https://doi.org/10.3390/12081910

Rosales, E., Escudero, S., Pazos, M., & Sanromán, M. A. (2019). Sustainable removal of Cr(VI) by lime peel and pineapple core wastes. *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(10). https://doi.org/10.3390/app9101967

Saha, S. C., Das, B. K., Ray, P. K., Pandey, S. N., & Goswami, K. (1990). SEM Studies of the Surface and Fracture Morphology of Pineapple Leaf Fibers. *Textile Research Journal*, *60*(12), 726–731. https://doi.org/10.1177/004051759006001205

Sánchez Pardo, M. E., Ramos Cassellis, M. E., Mora Escobedo, R., & Jiménez García, E. (2014). Chemical Characterisation of the Industrial Residues of the Pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, *03*(02), 53–56. https://doi.org/10.4236/jacen.2014.32b009

Sangkharak, K., Wangsirikul, P., Pichid, N., Yunu, T., & Prasertsan, P. (2016). Partitioning of bromelain from pineapple stem (*Smooth cayenne*) by aqueous two phase system and its application for recovery and purification of polyhydroxyalkanoate. *Chiang Mai Journal of Science*, *43*(4), 794–807.

Santos, D. I., Martins, C. F., Amaral, R. A., Saraiva, J. A., Vicente, A., & Mold, M. (2021). Pineapple (*Ananas comosus* L.) By-Products Valorization: Novel Bio Ingredients for Functional Foods. *Molecules*.

Secor, E. R., Carson IV, W. F., Cloutier, M. M., Guernsey, L. A., Schramm, C. M., Wu, C. A., & Thrall, R. S. (2005). Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cellular Immunology*, *237*(1), 68–75. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.10.002

Seguí, L., & Fito Maupoey, P. (2018). An integrated approach for pineapple waste valorisation. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues. *Journal of Cleaner Production*, *172*, 1224–1231. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.284

Şehirli, A. Ö., Sayiner, S., Savtekin, G., & Velioğlu-Öğünç, A. (2020). Protective effect of bromelain on corrosive burn in rats. *Burns*, 6–12. https://doi.org/10.1016/j.burns.2020.12.006

Selani, M. M., Brazaca, S. G. C., Dos Santos Dias, C. T., Ratnayake, W. S., Flores, R. A., & Bianchini, A. (2014). Characterisation and potential application of pineapple pomace in an extruded product for fibre enhancement. *Food Chemistry*, *163*, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.076

Selani, M., Shirado, G. A. N., Margiotta, G. B., Saldaña, E., Spada, F. P., Piedade, S. M. S., Contreras-Castillo, C. J., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2016). Effects of pineapple byproduct and canola oil as fat replacers on physicochemical and sensory qualities of low-fat beef burger. *Meat Science*, *112*, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.10.020

Sepúlveda, L., Romaní, A., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. (2018). Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *47*, 38–45. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.012

Silva, C. N. da, Bronzato, G. R. F., Cesarino, I., & Leão, A. L. (2020). Second-generation ethanol from pineapple leaf fibers. *Journal of Natural Fibers*, *17*(1), 113–121. https://doi.org/10.1080/15440478.2018.1469453

Silva, G., Kim, S., Aguilar, R., & Nakamatsu, J. (2020). Natural fibers as reinforcement additives for geopolymers – A review of potential eco-friendly applications to the construction industry. *Sustainable Materials and Technologies*, *23*, e00132. https://doi.org/10.1016/j.susmat.2019.e00132

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, *132*, 109114. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114

Singh, Y., Kumar, J., Pramod Naik, T., Pabla, B. S., & Singh, I. (2021). Processing and characterization of pineapple fiber reinforced recycled polyethylene composites. *Materials Today: Proceedings*, *44*, 2153–2157.

https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.278

Staszowska-Karkut, M., & Materska, M. (2020). Phenolic composition, mineral content, and beneficial bioactivities of leaf extracts from black currant (*Ribes nigrum* l.), raspberry *(Rubus idaeus*), and aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/nu12020463

Steingass, C. B., Glock, M. P., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2015). Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (Ananas comosus [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MSn and GC-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(21), 6463–6479. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8811-2

Stevanic, J. S., Joly, C., Mikkonen, K. S., Pirkkalainen, K., Serimaa, R., Re´mond, C., Toriz, G., Gatenholm, P., Tenkanen, M., & Salme´n, L. (2011). Bacterial Nanocellulose-Reinforced Arabinoxylan Films. *Journal of Applied Polymer Science*, *122*, 1030–1039. https://doi.org/10.1002/app.34217

Subramaniyan, S., Paramasivam, S., Kannaiyan, M., & Chinnaiyan, U. (2019). Utilization of Fruit Waste for the Production of Citric Acid by using *Aspergillus niger*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *9*, 9–14. https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-A.3487

Sukruansuwan, V., & Napathorn, S. C. (2018). Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production *by Cupriavidus necator* strain A-04. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1207-8

Upadhyay, A., Lama, J. P., & Tawata, S. (2010). Utilization of Pineapple Waste: A Review. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, *6*(0), 10–18. https://doi.org/10.3126/jfstn.v6i0.8255

Vega-Castro, O., Contreras-Calderon, J., León, E., Segura, A., Arias, M., Pérez, L., & Sobral, P. J. A. (2016). Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralsthonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, *231*, 232–238. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018

Verma, D. (2015). *Bagasse fiber composites : A Review Bagasse Fiber Composites-A Review*.

Wu, L., & Parhofer, K. G. (2014). Diabetic dyslipidemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *63*(12), 1469–1479. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.010

Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Pan, Y., & Du, L. (2006). Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *143*(4), 429–435. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.002

Xie, W., Xing, D., Sun, H., Wang, W., Ding, Y., & Du, L. (2005). The effects of *Ananas comosus* L. leaves on diabetic-dyslipidemic rats induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet. *American Journal of Chinese Medicine*, *33*(1), 95–105. https://doi.org/10.1142/S0192415X05002692

Zain, N. A. M., Aziman, S. N., Suhaimi, M. S., & Idris, A. (2021). Optimization of L(+) Lactic Acid Production from Solid Pineapple Waste (SPW) by *Rhizopus oryzae* NRRL 395. *Journal of Polymers and the Environment*, *29*(1), 230–249. https://doi.org/10.1007/s10924-020-01862-0

Zhang, B., Zhang, Y., Li, H., Deng, Z., & Tsao, R. (2020). A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, *105*, 347–362. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.029

Zhuang, Y., Liu, J., Chen, J., & Fei, P. (2020). Modified pineapple bran cellulose by potassium permanganate as a copper ion adsorbent and its adsorption kinetic and adsorption thermodynamic. *Food and Bioproducts Processing*, *122*, 82–88. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.008

2 Capítulo 2 : Aprovechamiento de residuos de piña MD2 (*Ananas comosus*) para la obtención de compuestos bioactivos mediante fermentación en estado sólido

2.1 Resumen

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la fermentación en estado sólido (FES) con *Aspergillus niger* GH1 sobre la liberación de compuestos bioactivos a partir de residuos agroindustriales de piña (*Ananas comosus*). Se evaluó el uso potencial de los residuos como soporte de FES mediante la determinación de la composición química, punto crítico de humedad y capacidad de invasión. Los resultados revelaron que la composición química de los residuos de piña es adecuada para su uso en FES. Este residuo con un tamaño de partícula entre <0.25 y 2.3 mm mostró los mejores resultados en las pruebas de soporte. Cabe destacar que al utilizar este tamaño de partícula se aprovechan todos los residuos disponibles. Durante el proceso de FES se evaluó la producción de polifenoles y enzimas, y se midió la actividad antioxidante (DPPH). Los resultados mostraron que durante las primeras 32 h de fermentación, la cantidad de fenoles libres aumentó en un 73% y se relaciona positivamente con la actividad antioxidante. La actividad de β-glucosidasa y celulasa aumentó con la FES y se asoció positivamente con la liberación de compuestos fenólicos. La invasión micelial fue confirmada por análisis SEM. El análisis de HPLC-MS de fenoles libres y ligados mostró compuestos bioactivos como el hexósido de cafeoilo, (+)-galocatequina y hexósido de galagilo. Los resultados indicaron que los residuos de piña fermentada son una fuente novedosa de compuestos bioactivos que pueden utilizarse como nuevos aditivos funcionales dentro del concepto de economía circular.

2.2 Introducción

Entre los principales compuestos bioactivos que han cobrado gran importancia económica en los últimos años se encuentran los compuestos polifenólicos extraídos de fuentes naturales. Estos compuestos orgánicos benefician significativamente la salud humana y tienen múltiples aplicaciones en la industria alimentaria. Los compuestos fenólicos tienen funciones biológicas, como actividad antimicrobiana (Brito et al., 2021), antioxidante (Sepúlveda et al., 2018), antidiabética (Xie et al., 2006), antiinflamatoria (Şehirli et al., 2020) y contra el cáncer (Chen et al., 2019). Estos compuestos pueden reemplazar la función de aditivos sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT), aditivos controvertidos debido a sus efectos adversos sobre la salud humana. Los fenoles son metabolitos secundarios en las plantas, por lo que se encuentran de forma natural en las semillas y cáscaras de muchas frutas. Sin embargo, el 24% de estos compuestos no se encuentran libres y no se pueden extraer fácilmente para ser valorizados; se encuentran ligados a otros compuestos químicos de la matriz vegetal (Acosta-Estrada et al., 2014).

Por lo tanto, la extracción de compuestos polifenólicos puede ser una alternativa para la valorización de los residuos de piña. No obstante, los métodos de extracción convencionales y no convencionales que utilizan altas temperaturas para la extracción no son muy rentables ni prácticos para este proceso. Estos métodos pueden causar daño a los compuestos fenólicos, además de toxicidad, baja especificidad y bajo rendimiento en la liberación de compuestos fenólicos ligados (Oroian & Escriche, 2015).

En este sentido, la FES utilizando residuos agroindustriales como sustrato es cada vez más común. La FES es una tecnología económica y respetuosa con el medio ambiente utilizada para recuperar compuestos bioactivos (Martins et al., 2011). Una de las variables esenciales en la FES es el microorganismo fermentador. Los hongos son los microorganismos más utilizados en FES. Se adaptan mejor para trabajar en matrices sólidas donde el micelio puede crecer y expandirse (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017). *Aspergillus niger* GH1 es un buen hongo para este tipo de tecnología. Tiene una gran capacidad para producir una gran variedad de enzimas y desarrollarse en un amplio rango de temperaturas y pH (Martínez-Medina et al., 2021).

La FES se ha utilizado recientemente para obtener compuestos fenólicos libres y ligados a partir de semilla de aguacate (Yepes-Betancur et al., 2021), semilla de mango (Torres-León et al., 2019) y cáscara de naranja (Xue et al., 2022) a través de la producción de enzimas por el microorganismo implicado en la fermentación. Algunos autores también han utilizado desechos de piña como material para FES. Rashad et al. (2015) evaluaron la actividad antioxidante y la capacidad de atacar las células cancerosas de los fenoles antes y después de la fermentación; Correia et al. (2004) utilizaron residuos de piña combinados con harina de soya como sustrato para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos y su relación con la producción de la enzima β-glucosidasa. Aunque hace años ya se utilizaban los residuos de piña en FES para extraer compuestos fenólicos, no hay reportes del uso de *A. niger* GH1 como microorganismo fermentador sobre este sustrato específico y tampoco se encontraron reportes de la identificación de los fenoles ligados liberados.

En este capítulo se evalúa el uso de residuos agroindustriales de piña como sustrato del microorganismo *A. niger* GH1 en una FES para obtener compuestos de alto valor comercial, como fenoles y enzimas.

2.3 Metodología

2.3.1 Obtención del material vegetal y subproductos

Las piñas variedad MD2 se obtuvieron del mercado cañaveral de la ciudad de Palmira, Valle del Cauca, Colombia. Las piñas se lavaron con agua potable y se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 200 pm durante 10 min. Las piñas se pelaron manualmente, se cortaron en trozos de aproximadamente 1*2cm y se separaron las cáscaras y los corazones para su posterior análisis proximal. Los residuos se secaron en horno convectivo (70°C) (Binder, Alemania) hasta alcanzar una humedad de 5%. Para medir la humedad final se utilizó una termobalanza a 120 °C (Ohaus MB 23, EE. UU.)

Después del secado los residuos se trituraron en un molino de martillos (IKA, Alemania), se tamizaron y se obtuvieron dos fracciones de partículas <0.25mm y 0.25- 2.3mm.

2.3.2 Caracterización fisicoquímica del material vegetal

A. Caracterización del fruto

Se identificó el índice de madurez de algunas de las frutas del mismo lote que fue procesado. Los sólidos solubles totales se midieron usando refractómetro digital (Atago, Japón) y se expresó como °Brix. El contenido de acidez se midió mediante el método de titulación (AOAC 942.15 2000), se tomó una muestra de jugo de piña de 5 mL en un matraz y se agregaron 2 gotas de fenolftaleína. La muestra se valoró con una solución de 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH) hasta pH igual a 8.1 con un potenciómetro (SI Analytics, Alemania), el porcentaje de acidez se expresó como % de ácido cítrico, de acuerdo a la Eq. 1.

Eq. (1). $$\%Acidez = \frac{Normalidad\ de\ NaOH * Volumen\ de\ NaOH\ en\ ml * 0.064}{peso\ de\ la\ muestra\ de\ piña\ en\ gramos} * 100$$

El rendimiento porcentual de los residuos de la piña se calculó mediante la Eq. 2, cuyo numerador corresponde al peso total de corazón y la cáscara y el denominador al total del fruto de la piña, excluyendo la corona. También se calculó la participación de la cáscara con respecto únicamente a la cáscara y el corazón en la eq. 3 y la participación del corazón cuantificando la diferencia en relación al 100%

Eq. (2). $$\%Rendimiento = \frac{Total\ del\ peso\ de\ los\ residuos\ (g)}{Total\ del\ peso\ del\ fruto\ (g)} * 100$$

Eq. (3) $$\%\ Participación\ de\ cáscara = \frac{peso\ de\ cáscara\ (g)}{peso\ de\ cáscara\ (g) + peso\ de\ corazón\ (g)} * 100$$

B. Caracterización de los residuos

Los residuos de piña de forma independiente (cáscara y corazón) se emplearon para determinar el contenido de cenizas (550°C durante 8 h), y el contenido de proteína bruta con el uso del método de Kjeldahl con un factor de conversión de 6.25. Los azúcares reductores se midieron usando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual reacciona con los azúcares reductores presentes en la muestra durante 10 min a 100°C, reduciendo el ácido a 3-amino-5 nitrosalicílico (Miller, 1959) (Anexo 1. Curva de calibración de glucosa). El extracto etéreo se obtuvo con un sistema soxhlet según AOAC 920.39, (1990) y la fibra de detergente neutra usando el método de Van Soest (AOAC 973.18 1990). EL contenido de minerales (Ca, P, Mg y K) mediante fluorescencia de rayos X (Epsilon 1, UK).

Los carbohidratos totales se calcularon utilizando la ecuación 4.:

Eq (4) TC= 100- %A + %CPAG + %L

Donde, TC representa el contenido de carbohidratos totales, %A contenido de cenizas, %CPAG contenido de proteína bruta y %L contenido de lípidos.

2.3.3 Ensayos de soporte en fermentación en estado sólido

Se usó una proporción de cáscara y corazón de piña de 70:30 (p/p) con tres tamaños de partículas diferentes (pequeño <0.25 mm, grande 0.25 mm-2.3 mm y todo el material <0.25 mm-2.3 mm) para probar el potencial uso de los residuos como soporte en un proceso de FES.

Para evaluar la capacidad de absorción de agua (CAA) de los residuos se tomaron 2.5 g de muestra y se disolvieron en 30 mL de agua destilada. Luego la mezcla se calentó en un baño termal (VWR, USA) a 70°C por 30 min. La pasta resultante se pesó y centrifugó a 3000 g durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y se pesó el sedimento (Du et al., 2014). El CAA se calculó utilizando la siguiente ecuación 5:

Eq (5) $$CAA = \frac{peso\ del\ sedimento\ (g)}{Peso\ de\ los\ residuos\ secos\ (g)}$$

El punto crítico de humedad (PCH) se midió utilizando el sedimento de la prueba de absorción de agua. Aproximadamente 1 g de muestra saturada se colocó en la termobalanza a 60 °C (Ohaus MB 23, EE. UU.), se pesó cada minuto hasta 10 minutos y luego cada cinco minutos hasta que alcanzó un valor de peso constante.

La actividad de agua (aw) se midió con un Aqualab a 25 ± 2 °C (Aqualab 4TEV, USA), y el pH se midió tomando una mezcla de 1 g de muestra con agua destilada en proporción 1:2 (m:v), se homogeneizó en un baño térmico a 30 °C durante 10 min y finalmente se llevó a un potenciómetro (SI Analytics, Alemania).

A. Microorganismo

En esta investigación se utilizó la cepa GH1 de *Aspergillus niger* del cepario del grupo de bioprocesos del Departamento de investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. El microorganismo se conservó en agar PDA a 4°C y se reactivó en agar PDA durante 7 días a 30°C.

B. Capacidad de invasión

La capacidad de invasión se evaluó, midiendo la cinética de crecimiento del *Aspergillus niger* GH1 en placas Petri, con una humedad del 65%, (superior al punto crítico de humedad e inferior a la humedad máxima). Se inoculó un fragmento de 8 mm de micelio en el centro de la caja de Petri, previamente activado en agar PDA. El fragmento se obtuvo usando un sacabocado estéril, y se midió su crecimiento radial cada 12 h. El valor se reportó como mm/h.

2.3.4 Ensayos de fermentación

En los ensayos de fermentación se utilizaron cajas Petri como reactores con las condiciones con mejor resultado evaluadas en el numeral anterior (2.3.3). Se utilizaron 8 g de material seco entre cáscara y corazón (70:30 (p/p)) con un tamaño de partícula entre <0.25mm-2.3mm y humedad del 65%. Se inocularon $2x10^7$ esporas de *A. niger* GH1 por gramo de soporte.

Se realizó un monitoreo del proceso fermentativo cada 8 h a 30°C, con el fin de determinar el tiempo necesario para una mayor extracción de fenoles.

2.3.5 Medición de compuestos fenólicos libres

A. Extracción de fracción fenólica libre

La extracción del contenido fenólico se realizó según la metodología descrita por Torres-León et al. (2019). Se disolvió 1 g de material fermentado en etanol al 90% en una proporción de 1:30 (p/v). A continuación, la mezcla se calentó en un baño de agua a 45 °C durante 1 hora. Los extractos se filtraron con papel Whatman No. 1 y una bomba de vacío (Helch 2534B-01, EE. UU.) y se almacenaron a -18 °C. El sedimento se guardó para la identificación de fenoles ligados (ver sección 2.3.9).

B. Determinación del contenido fenólico total (FT)

La determinación del contenido de FT se midió utilizando la metodología descrita por Makkar (2003). Se mezclaron 20 µL del extracto con 20 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu en un pozo. Después de 5 min de agitación manual, se añadieron 20 µL de carbonato de sodio (0.01 M) a cada muestra. Luego, la solución se agitó nuevamente durante 5 min, se

diluyó con 125 µL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 790 nm utilizando un lector espectrofotométrico de microplacas (Epoch, BioTek, Instruments, Inc.). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico/g de materia seca. La curva de calibración se realizó midiendo la absorbancia de concentraciones conocidas de ácido gálico para obtener el contenido fenólico del extracto de cada muestra (Anexo 2).

2.3.6 Ensayo de Actividad antioxidante

La actividad eliminadora de radicales DPPH de la muestra se analizó utilizando el método informado por Molyneux (2004). Se mezclaron 7 µL del extracto fenólico con 193 µL de solución de radical DPPH (60 µM). Las mezclas se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, se midió la absorbancia a 517 nm utilizando un lector de microplacas de espectrofotómetro (Epoch, BioTek, Instruments, Inc.). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de Trolox por gramo de extracto, utilizando una curva de calibración estándar de Trolox (Anexo 3).

2.3.7 Extracción y evaluación de actividad β-glucosidasa y celulasa

A. Extracción de compuestos enzimáticos

La extracción enzimática se realizó de acuerdo con la metodología modificada descrita por Idris et al. (2017). El material biológico fermentado se sumergió en tampón citrato (0.05 M, pH 4.9) en una proporción de 26:74. El material sólido se separó del líquido por compresión mecánica. Finalmente, los extractos se filtraron con papel Whatman No. 1 y una bomba de vacío (Helch 2534B-01, EE. UU.) y se almacenaron a –18 °C.

B. Ensayo de actividad de β-glucosidasa

La actividad de β-glucosidasa se midió con el método modificado descrito por Leite et al., (2019). La actividad de β-glucosidasa se determinó utilizando p-nitrofenil-β-d-glucopiranósido (PNG) como sustrato. La reacción se llevó a cabo con 40 µL de PNG y 40 µL de muestra. La reacción enzimática se llevó a cabo a 50°C durante 10 min, posteriormente, se adicionaron 200 µL de carbonato de sodio (0.1 M). Finalmente, se agregaron 200 µL de cada muestra a la microplaca y se leyó la absorbancia a 400 nm (Figura 2.1)

Se realizó una curva de calibración con p-nitrofenol con concentraciones entre 0 ppm y 500 ppm (Anexo 3). Una unidad internacional (UI) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de p-nitrofenol por minuto en condiciones de ensayo estándar. Los valores se expresaron en unidades por gramo de sustrato seco (U/g).

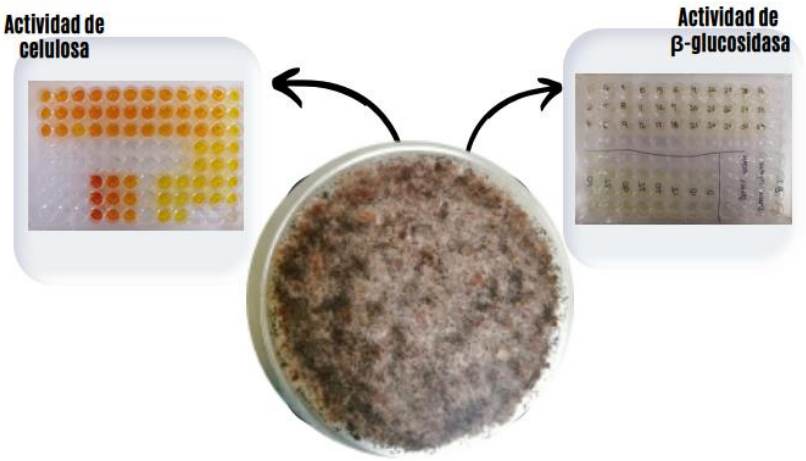


Figura 2.1. Medición de actividad de celulasa y β-glucosidasa a las 32 h de FES de residuos de piña con *A. nige*r GH1.

C. Ensayo de actividad de celulasas

La actividad celulosa se midió con el método modificado descrito por Leite et al. (2019), empleando papel de filtro Whatman No. 4 como sustrato. La reacción se llevó a cabo con 20 µL de muestra y un disco de papel filtro de 6 mm a 50°C. Después de 60 min de reacción, se agregaron 120 µL de DNS y se calentaron a 100°C. Una vez enfriada la muestra, se mezclaron 36 µL de cada muestra con 160 µL de agua destilada y se leyó a 540 nm en un lector de microplacas (Modelo).

Se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de glucosa en un rango de 0 a 1000 ppm (Anexo 5). Una unidad internacional (UI) de la actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de glucosa por minuto en

condiciones de ensayo estándar. Los valores se expresaron en unidades por gramo de sustrato seco (U/g).

2.3.8 Análisis microestructural

La visualización de la morfología de la superficie del material fermentado y no fermentado se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental (Philips XL30-ESEM). Las muestras se colocaron en un recipiente con nitrógeno líquido y se fracturaron, luego se dispusieron en un portamuestras con cinta de cobre perpendicular a los detectores del microscopio. Las películas se recubrieron con oro y paladio utilizando un spray iónico durante 30 s a 2 µA, generando una capa de aproximadamente 3 nm. En el microscopio electrónico, se utilizaron tres modos en las mismas condiciones (una distancia de trabajo de aproximadamente 5.5 mm, un voltaje de aceleración de 12 keV y un tamaño de espacio de 4 a 5 nm, y se observaron con un aumento de 500X) (Sáenz-Mendoza et al., 2020).

2.3.9 Análisis por RP-HPLC-ESI-MS de compuestos fenólicos

En la identificación de moléculas por RP-HPLC-ESI-MS se evaluaron las fracciones libres obtenidas en el apartado A de la sección 2.3.5 y también las fracciones ligadas obtenidas del sedimento de la fracción libre. Esto con el fin de identificar los fenoles ligados que son liberados en la FES.

La fracción ligada se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Torres-León et al. (2019) como se muestra en la Figura 2.2. La muestra del sedimento se mezcló con 50 mL de hidróxido de sodio (2M) a temperatura ambiente durante 4 h. Luego, a la mezcla se le agregó ácido clorhídrico hasta pH 2.0, se filtró con papel Whatman No. 1 y se realizó una extracción líquido-líquido en tres partes con 70 mL de acetato de etilo. Las fracciones se combinaron y se sometieron a evaporación rotatoria (40 cmHg, 60°C, 150 rpm) hasta que se eliminó por completo el acetato de etilo. Los fenoles ligados se constituyeron en 5 mL de agua.

Los extractos (fracción libre y fracción ligada) se prepurificaron con amberlita XAD 16, se liofilizaron (Labconco freezone 4.5, USA), se reconstituyeron en agua destilada y se filtraron a través de un filtro de naylon de 0.45 µm.

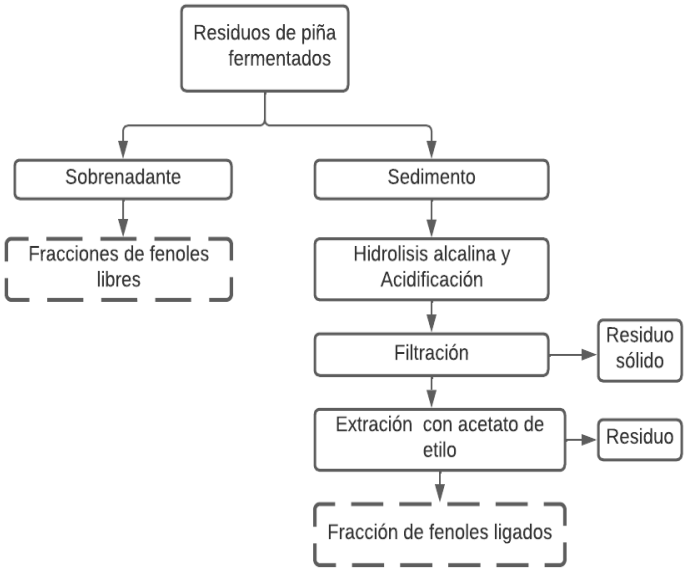


Figura 2.2. Esquema descriptivo de la obtención de las fracciones fenólicas (libre y ligada).

Las fracciones ligadas de los tiempos 0 y 32 h de fermentación y las fracciones libres de los tiempos 0, 8, 32 y 80 h de fermentación se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución/ionización por electropulverización/espectrometría de masas (HPLC/ESI/MS). En la analítica RP-HPLC-ESI-MS se tomaron 1.5 mL de cada extracto filtrado y se inyectaron en la HPLC (columna C18: 150 mm x 2.1 mm, 3 µm, Grace, USA). El sistema Varian HPLC consta de un muestreador automático (Varian Pro Star 410, EE. UU.), un detector PDA (Varian Pro Star 330, EE. UU.) (eluyentes: ácido fórmico y acetonitrilo) y una bomba ternaria (Varian Pro Star 230I, EE. UU.). El gradiente aplicado fue: inicial, 3% B; 0–5 min, 9% B lineal; 5-15 min, 16% B lineal; 15–45 min, 50% B lineal. El análisis LC-ESI-MS consiste en un espectrómetro de masas (Espectrómetro de masas IT Varian 500-MS, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) y operado en modo de iones negativos $[MH]^{-1}$. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de aspersión 5 kV, voltaje capilar 90 V y temperatura 350 °C (Ascacio-Valdés et al., 2016).

2.3.10 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado con muestras independientes. Todos los resultados se informaron mediante medias y desviaciones estándar. Los resultados fueron analizados por ANOVA, se utilizó la prueba de Tukey para analizar la diferencia significativa. Se realizó la correlación de Pearson para evaluar las correlaciones entre variables. El análisis estadístico se realizó utilizando el software RStudio Versión 1.4.1103 ® (Boston, EE. UU.).

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Composición química de la cáscara y el corazón de la piña

A. Caracterización del fruto

Debido a que el estado de maduración del fruto influye significativamente en el tipo y cantidad de FT presentes en los componentes de las frutas, se evaluaron dos de las características químicas que más se relacionan con el nivel de maduración de la piña, contenido de sólidos solubles y acidez. Las piñas utilizadas en este estudio presentan 14.83 ± 0.15 de °Bx y un valor de ácido cítrico de 0.92 ± 0.03 %. Según los criterios de la Norma Técnica Colombiana 729-1, (NTC 729-1) los frutos se encuentran en un nivel de maduración 6, último nivel de maduración permitido por la norma (Figura 2-3). Las industrias alimentarias utilizan los frutos entre los últimos 3 niveles de maduración para obtener productos como jugos y néctar, aprovechando el alto niveles de azúcares.

Sybron et al. (2019) y Briante et al. (2002) demostraron que los compuestos fenólicos tienden a aumentar en la cáscara y la semilla del fruto tropical ackee y dos clases de olivos, respectivamente, a medida que avanza la maduración. Esto demuestra que utilizar residuos de frutos en estados de madurez avanzados no solo se relaciona con lo que las industrias descartan por la elaboración de sus productos, sino que también se relaciona con altos niveles de compuestos fenólicos.

a **b**

Figura 2.3. Comparación de color de cáscara y corazón entre la norma NTC 729-1 y los frutos utilizados en este estudio.**a.** Niveles de maduración descritos en la NTC 729-1. **b.** Muestra de frutos utilizados en este estudio.

En cuanto a la proporción de residuos presente en la piña, este fruto tiene un porcentaje de 45±0.05 de residuos (cáscara y corazón). La cáscara dentro de ese porcentaje de residuos tiene una participación del 73±0.06 % y el corazón del 27±0.12 %. Estos resultados son similares a los descritos por Rico et al. al. (2020) en piña variedad Morris. La proporción 73:27 p/p de cáscara y corazón son útiles para un proceso fermentativo, debido a que una alta proporción de corazón traería consigo una alta actividad de proteasas, como la bromelina, presente en este componente del fruto. Las proteasas inhiben la acción de las otras enzimas como la tanasa, responsables de poner a disposición los nutrientes necesarios para que el microorganismo se desarrolle en óptimas condiciones (Aguilar et al. 2002). Además, según información aportada por la industria Bengala agrícola S.A.S, empresa dedicada a la producción de piña mínimamente procesada en el Valle del Cauca, una relación cercana a 70:30 cáscara-corazón es obtenida de los equipos de corte y despulpado. Finalmente, también se demostró que una proporción 70:30 p/p dio los mejores resultados en las pruebas preliminares de capacidad de invasión (análisis no presentados). Es por lo anterior que en este estudio se usó una proporción de 70:30 entre cáscara y corazón, como sustrato de fermentación.

B. Caracterización de los residuos

La caracterización proximal se muestra en la Tabla 2.1. La cáscara presentó mayor cantidad de materia seca, cenizas y proteína en comparación con el corazón, contrario al contenido de carbohidratos totales. El contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores, FDN y proteínas muestra que los residuos de piña son una buena fuente de

carbono y nitrógeno, elementos necesarios para el crecimiento de hongos y la producción de enzimas. Torres-León et al. (2019) y Yepes-Betancur et al. (2021) demostraron que los biomateriales con contenido proximal similar son adecuados para FES.

Aruna (2019), Dibanda Romelle et al. (2016), y Kodagoda & Marapana (2017) obtuvieron valores menores de carbohidratos totales para cáscara (55.52-74.08 % p/p) y corazón (83.03 % p/p), igualmente, Kumar et al. (2022) reportaron una cantidad menor de azúcares reductores en cáscara de piña (13.65 g/L). En cuanto al contenido de proteína de la cáscara y el corazón de la piña, Dibanda Romelle et al. (2016) y Kodagoda & Marapana (2017) reportaron valores similares (5.11-3.67 % p/p). El contenido de lípidos de la cáscara y el corazón de la piña es inferior al informado por Morais et al. (2015) y Kodagoda & Marapana (2017) (1.10-2.35 % p/p). La variación en el contenido proximal se atribuye a factores que incluyen variedad, etapa de madurez, suelo, prácticas agrícolas y condiciones climáticas (Difonzo et al., 2019).

Tabla 2.1. Caracterización proximal de la cáscara y corazón de piña secos.

Componentes	Cáscara	Corazón
Materia seca (% p/p)	84.5 ± 0.14	83.1 ± 0.52
Total de carbohidratos (% p/p)	88.4 ± 0.13	92.8 ± 0.12
Azúcares reductores (g/L)	29.8 ± 0.09	26.9 ± 0.12
Cenizas (% p/p)	5.2 ± 0.03	3.4 ± 0.03
Ca (% p/p)	0.6 ± 0.08	0.3 ± 0.01
P (% p/p)	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
Mg (% p/p)	0.9 ± 0.03	1.9 ± 0.11
K (% p/p)	2.6 ± 0.24	2.3± 0.01
Proteína (% p/p)	5.5 ± 3.87	3.3 ± 0.08
Extracto etéreo (% p/p)	0.8 ± 0.01	0.5 ± 0.06
FDN (% p/p)	31.9 ± 0.42	15.9 ± 0.83

FDN: Fibra Detergente Neutra

La cantidad de ceniza en la cáscara es menor a la reportada por Dibanda Romelle et al. (2016) (4.39 ± 0.14) y superior a lo informado por Kodagoda & Marapana (2017) (4.32 ± 0,09). Los valores de Ca y Mg son inferiores a los informados por Dibanda Romelle et al. (2016) (8.30±0.54 y 5.32±0.49), al igual que los informados para K por (Micanquer-Carlosama et al., 2020) (0,20). Los minerales Ca, P, Mg y K forman parte de los microelementos necesarios para el excelente desarrollo del microorganismo. Ca y Mg promueven notablemente la actividad enzimática (Cizeikiene et al., 2018). Particularmente el Ca favorece la actividad de las celulasas (Zeng et al., 2016).

2.4.2 Ensayos de soporte en FES

El CAA (Capacidad de Absorción de Agua) es la cantidad de agua que puede absorber el soporte y el PCH (Punto Crítico de Humedad) representa el agua ligada a la matriz vegetal como el agua que los microorganismos no pueden utilizar para sus funciones biológicas. El CAA depende de la capacidad de formación de gel de las macromoléculas y la disponibilidad de grupos hidrófilos que unen las moléculas de agua (Mussatto et al., 2009).

Los valores de CAA y PCH se muestran en la Tabla 2-2. Los valores altos de CAA benefician el proceso de fermentación porque el CAA podría cambiarse para beneficiar el crecimiento del hongo y los valores bajos de PCH benefician el crecimiento microbiano. Aunque los valores de CAA y PCH para los tres tamaños de material fermentable evaluados no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), estos valores demuestran que el material vegetal es útil para un proceso de FES. Los valores de CAA y PCH son similares a los informados en otros materiales utilizados para FES. Buenrostro-Figueroa et al. (2017) reportaron CAA de 3.74 ± 0.10 g/g para residuos agroindustriales de higos y valores de PCH de 58% para corteza de alcornoque, de la Rosa et al. (2020) reportaron un CAA de 7.83 g/g para bagazo de caña de azúcar y Torres-León et al. (2019), valores de PCH de 56.5% para semilla de mango.

Tabla 2.2. Ensayos de soporte de cáscara y corazón de piña (70:30 p/p).

Análisis	**Tamaño de partícula**		
	<0.25 (mm)	**0.25-2.3 (mm)**	**<0.25-2.3 (mm)**
PCH (g/g)	55.60 ± 3.88	60.53 ± 3.29	61.95 ± 6.14
CAA (%)	5.02 ± 0.42	5.21 ± 0.08	4.71 ± 0.12
pH	3.92 ± 0.04	3.92 ± 0.03	3.92 ± 0.06
a_w	0.60 ± 0.12	0.63 ± 0.11	0.55 ± 0.11
Humedad (%)	8.75 ± 1.48	3.45 ± 0.49	4.60 ± 0.57
Crecimiento radial (mm/h)	0.65 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.69 ± 0.05

El pH y la aw óptimos para el crecimiento de *A. niger* son 5.0 y 0.96 a 30 °C, respectivamente (Aguilar et al., 2007). Aunque el pH de la relación 70:30 de la cáscara y el corazón de la piña es de 3.92 y la aw está entre 0.55 y 0.60, la tasa de crecimiento radial muestra que el microorganismo crece en las condiciones evaluadas. La tasa de crecimiento radial no es significativamente diferente ($p>0.05$) entre los tres tamaños de

partículas estimados. Sin embargo, el crecimiento fue superior al reportado previamente para *A. niger* GH1 en residuos agroindustriales como semilla y cáscara de granada (0.2 y 0.4 mm/h, respectivamente) (Robledo et al., 2008).

El tamaño de partícula del material fermentable es importante debido al área superficial y la porosidad. Estas características determinan la transferencia de calor, oxígeno y nutrientes, determinando cómo se desarrollará el microorganismo sobre el soporte (Khanahmadi et al., 2018). Partículas muy pequeñas impedirán la correcta transferencia de masa y energía, mientras, partículas grandes permiten una aireación adecuada en el medio de fermentación, sin embargo, estas partículas pueden dificultar que los microorganismos consuman los nutrientes y se desarrollen (Pandey et al., 2009). En el caso de los residuos de piña, se obtuvo una mejor tasa de crecimiento cuando se utilizó todo el material disponible, la combinación de partículas pequeñas y grandes (<0.25 mm-2.3 mm). El uso de una proporción 70:30 y la combinación de tamaño de partícula pequeña y grande, está acorde con el concepto de economía circular, que no solo busca otrogar un uso a los residuos, sino que también busca que la elaboración de nuevos productos sea con bajo gasto energético y amigable con el medio ambiente, como la FES (Tollin, 2016).

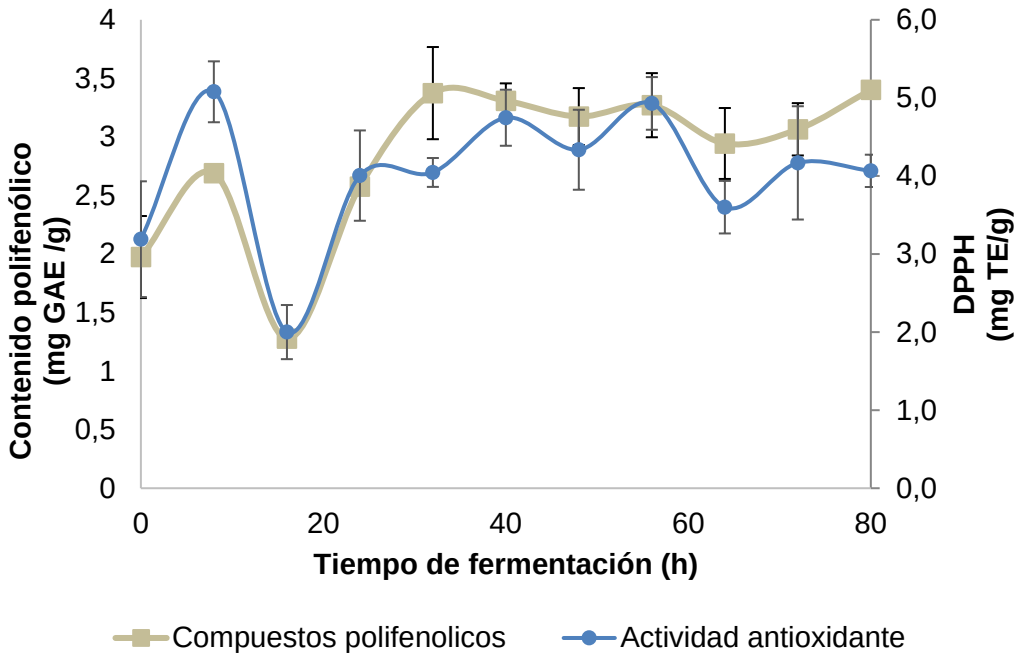
2.4.3 Fermentación en estado sólido (FES)

La Figura 2.4 muestra los FT y actividad antioxidante durante las primeras 80 h de FES de residuos de piña con *A. niger* GH1. El contenido de FT aumentó a medida que aumentó el tiempo de fermentación de residuos de piña. Aunque aumentó a las 8 h, el contenido de polifenoles se mantuvo sin diferencia significativa de la hora 32 (72.31% con respecto al valor del tiempo 0) hasta las 80 h. Este resultado es superior al contenido de FT de los residuos de piña extraídos por Soxhlet (30.2 %) (de Oliveira et al., 2009) y FES (72 h) con *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 (7.14 %) (Rashad et al., 2015). La diferencia entre los métodos convencionales, como la extracción Soxhlet y FES para la obtención de polifenoles, radica en la falta de especificidad y la imposibilidad de romper enlaces que permitan la liberación de compuestos (Gligor et al., 2019).

El aumento de los FT a las 8 h puede deberse al aumento de los compuestos liberados. *A. niger* GH1 es un microorganismo con potencial para obtener un alto contenido fenólico en un corto tiempo de fermentación (Torres-León et al., 2019). La disminución de los

compuestos a las 16 h puede deberse a la descomposición durante la fase exponencial. Los compuestos fenólicos como la galocatequina, el ácido protocatequial, el ácido siríngico y la quercetina tienden a disminuir durante la fermentación después de ser liberados durante la fase de latencia (Yeo et al., 2021). Estas alteraciones en los perfiles fenólicos prevalecen durante la FES. La discrepancia en el contenido fenólico se debe a la composición de la matriz biológica y al desarrollo de los microorganismos. Yeo et al. (2021) y Romero et al. (2004) demuestran un comportamiento similar en cáscara de lenteja y aceitunas negras, respectivamente.

Figura 2.4. Contenido polifenólico y actividad antioxidante durante la fermentación de residuos de piña.



El contenido de FT se correlacionó positivamente con la actividad antioxidante medida por el método DPPH ($r = 0.63$, $p<0.01$), lo que confirma que el aumento de la actividad antioxidante puede deberse al aumento del contenido fenólico durante la fermentación. Estos valores de correlación son similares a los reportados en la FES de residuos de tamarindo ($r = 0.72$) (Jericó Santos et al., 2020). El aumento de polifenoles se debe a la síntesis y liberación de estos compuestos durante el metabolismo de *A. niger*. El microorganismo rompe la pared celular del material vegetal mediante la producción de

enzimas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster responsables de la unión entre los compuestos fenólicos y la matriz de la pared celular y también son responsables de la degradación oxidativa de la lignina (Gligor et al., 2019).

2.4.4 Evaluación de actividad de β-glucosidasa y celulosa

La Figura 2.5 muestra el comportamiento de la actividad de la β-glucosidasa y la celulosa durante las primeras 56 h de FES de los residuos de piña (cáscara y corazón) con *A. niger* GH1. Los resultados evidenciaron que la actividad de la β-glucosidasa es mayor que la actividad de la celulasa durante todo el tiempo de fermentación. Se observa que la β-glucosidasa y la celulasa expresan la mayor actividad enzimática entre las 32 y las 40 h de fermentación, lo cual coincide con el pico máximo de la cantidad de fenoles libres; además se observa que la actividad de la celulasa desciende a la 24 h de fermentación y luego junto con la β-glucosidasa vuelve a descender después de la 40 h de fermentación.

El desarrollo de hongos en FES depende de la actividad enzimática. Las enzimas convierten el material celulósico de alto peso molecular en compuestos de bajo peso molecular. Estas moléculas de bajo peso molecular son los nutrientes que absorberá el micelio (Lu et al., 2022). La exocelulasa inicia la descomposición de la celulosa y produce celobiosa. La alta producción de celobiosa inhibe la actividad de la celulasa (dos Santos et al., 2019). La β-glucosidasa descompone la celobiosa y genera monómeros de glucosa que son fáciles de usar para el microorganismo (Behera et al., 2017). Además, la ruptura de la larga cadena de celulosa permite la liberación de biocompuestos unidos covalentemente a este polímero, lo que permite su fácil extracción y uso (Acosta-Estrada et al., 2014).

Además de lo anterior, la actividad de β-glucosidasa y la celulasa fueron medidas en este estudio debido a que estas enzimas se han relacionado con la liberación de compuestos de la matriz biológica y son producidas por *A. niger* (Ascacio-Valdés et al., 2014).

La actividad de la celulasa total o de papel filtro (FPasa) fue similar a la reportada por Prajapati et al. (2018) (3.8 FPU/g) usando sustrato harina de copra y *A. tubingensis NKBP-55* y a lo reportado por Crognale et al. (2019) (4 FPU/g) utilizando *Cynara cardunculus* y *A. tubingensis* NRRL4700. La actividad de β-glucosidasa reportada en esta investigación es más baja que en los estudios con *A. niger* por otros autores. Manfrin Dias et al. (2016)

reportaron una producción de 54.9 U/g utilizando biomasa de sorgo como sustrato y Aliyah et al. (2017) reportaron 91.67 U/g utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato. Según Chakraborty et al. (2016) la diferencia en la expresión de celulasas y β-glucosidasa se debe al metabolismo de cada microorganismo y la fuente de carbono y nitrógeno de un sustrato fermentado. Taherzadeh-Ghahfarokhi et al. (2019) afirman que una alta cantidad de FDN afecta positivamente la producción de celulosa. Además de β-glucosidasa y celulasa, *A. niger* GH1 puede producir otras enzimas como tanasas, xilanasas, elagitanasa y polifenol oxidasa (Cruz-Hernández et al., 2006; Ascacio-Valdés et al., 2014).

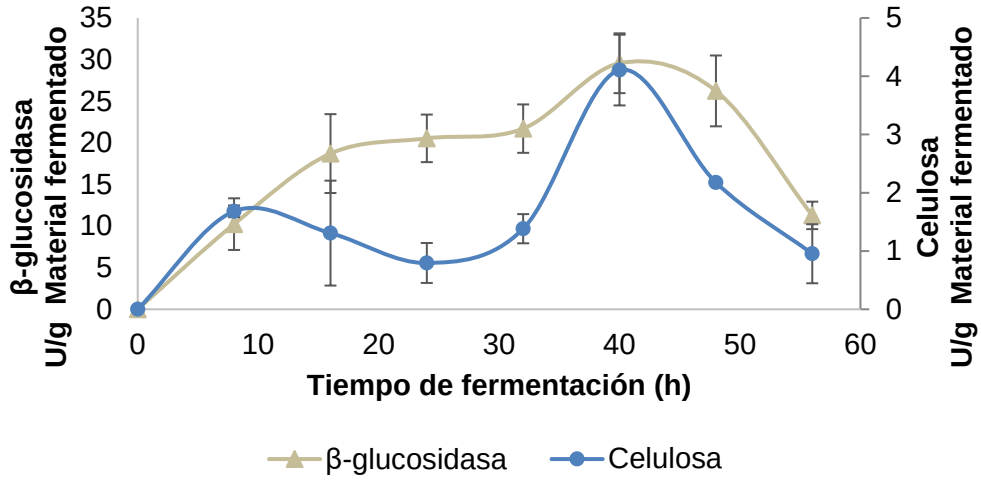


Figura 2.5. La actividad de β-glucosidasa y celulasa durante el tiempo de fermentación.

La actividad de la enzima celulasa se correlaciona positivamente con la cantidad de fenoles libres (Figura 2.4) ($r = 0.46$, $p<0.01$), al igual que la β-glucosidasa ($r = 0.42$, $p<0.01$). Estudios previos muestran que el uso de residuos agroindustriales para la obtención de compuestos fenólicos libres se relaciona positivamente con las enzimas generadas en el mismo proceso. Teles et al. (2021) y Correia et al. (2004) muestran que durante la FES utilizando *A. niger* 3T5B8 y *Rhizopus oligosporus*, respectivamente, se obtiene una alta actividad de celulasa y β-glucosidasa. Esta actividad está relacionada con el aumento de compuestos fenólicos como los taninos hidrolizables, el ácido protocatequiico y p-cumárico.

2.4.5 Análisis microestructural

Se utilizó microscopía electrónica para observar los cambios morfológicos de los desechos de piña fermentados y no fermentados. La Figura 2.6-a muestra la estructura de los residuos de piña sin fermentar. Se observa una estructura compacta, organizada y rugosa, debido a la presencia de fibra. La Figura 2.6-b muestra los residuos de piña fermentados con *A. niger* GH1. Se observa la ruptura de la matriz biológica vegetal y la invasión del micelio del hongo en los desechos biológicos.

Los cambios en la estructura de la matriz vegetal de los residuos de piña después de la fermentación pueden deberse al daño de las estructuras cristalinas de las cadenas de celulosa durante la fermentación. Además de la descomposición de otras estructuras como lignina, hemicelulosa y proteínas durante el metabolismo del hongo. Estos resultados son similares a los descritos por Selvam et al. (2014) y Nagao et al. (2003) donde revelan modificación de la morfología de los residuos orgánicos debido a la fermentación.

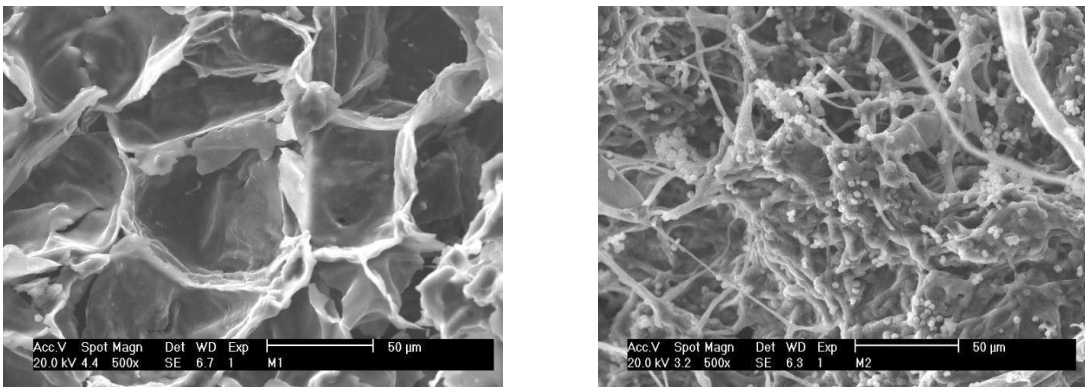


Figura 2.6. Micrografías de cáscara y corazón de piña sin fermentar y fermentada. Escala de imageesn: 500X – 50 µm **a.** Residuos de piña sin fermentar **b**. Residuos de piña a las 32 h de fermentación.

2.4.6 RP-HPLC-ESI-MS analítica

La Tabla 2.3 muestra los compuestos ligados y libres identificados en diferentes tiempos de fermentación de los desechos de piña. Las dos primeras muestras corresponden a los compuestos ligados en los tiempos 0 y 32 de la fermentación. Las cuatro muestras restantes corresponden a compuestos libres en los tiempos 0, 8, 32 y 80.

La identificación de estos compuestos se realizó con la ayuda de la base de datos del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila y la identificación de compuestos reportada para desechos de piña por Steingass et al. (2015). El hexósido de cafeoílo, el hexósido de p-cumaroílo, el hexósido de alcohol p-cumarílico, el aldarato de feruloílo y el ácido 5-cafeoilquínico se identificaron según lo escrito por Steingass et al. (2015).

Tabla 2.3. Compuestos fenólicos identificados de cáscara y corazón de piña MD2 fermentados con *A. niger* GH1 con la técnica RP-HPLC-ESI-MS.

RT (min)	[M-H]-	Compuestos bioactivos	Formula molecular	Familia	Compuestos ligados		Compuestos libres			
	m/z				0 h	32 h	0 h	8 h	32 h	80 h
5.989	340.9	hexósido de cafeoilo	$C_{15}H_{18}O_9$		X		X	X	X	X
6.162	353	5-Ácido cafeoilquínico	$C_{16}H_{18}O_9$	Ácido fenólico				X	X	
6.608	800.9	3-O-glucosil-(1->6)-[apiosil(1->2)]-glucósido de espinacetina	$C_{34}H_{42}O_{22}$	Flavonoides			X			
7.965	191	Éster etílico del ácido p-cumárico	$C_{11}H_{12}O_3$	Ácido fenólico				X		
11.154	121	Ácido benzoico	$C_7H_6O_2$	Ácido fenólico	X					
27.731	327	p-Cumaroyl tirosina	$C_{18}H_{17}NO_5$	Ácido fenólico	X	X				
32.083	357	p-Hexósido de alcohol cumarílico	$C_{15}H_{20}O_7$		X	X				
32.973	119	4-Vinilfenol	C_8H_8O	Alquifenoles	X	X				
33.633	222	Ácido p-cumaroil glicólico	$C_{11}H_{10}O_5$	Ácido fenólico				X		
34.755	351	no identificado						X		X
38.814	385	Feruloil aldarato			X	X				
39.877	796.7	no identificado							X	
40.752	185	Psoralen	$C_{11}H_6O_3$	Furanocoumarins				X		
41.387	341.1	Ácido cafeico 4-O-glucósido	$C_{15}H_{18}O_9$	Ácido fenólico		X				
44.056	325	hexósido de p-cumaroilo	$C_{15}H_{18}O_8$		X		X			
45.952	304.8	(+)-Galocatequina	$C_{15}H_{14}O_7$	Flavonoides	X			X	X	X
46.124	781	Gallagil-hexósido	$C_{34}H_{22}O_{22}$	Ácido fenólico			X			

La Tabla 2.3 muestra que los fenoles ligados (0 y 32 h), presentan una variabilidad de compuestos fenólicos mayor que las muestras de fenoles libres. Sin embargo, los compuestos ligados en el tiempo 0 son más que los encontrados a las 32 h de fermentación. Esta diferencia puede deberse a que los fenoles solubles en solventes orgánicos como el utilizado en este estudio se encuentran en formas libres o formas esterificadas conjugadas o enlazados covalentemente a azúcares o péptidos pequeños. Por lo tanto, durante la fermentación, estos enlaces se rompen con la ayuda de enzimas, dando como resultado la liberación parcial y completa de los compuestos (Roasa et al., 2021).

El hexósido de cafeoilo está presente en casi todas las muestras. El hexósido de cafeoilo y el ácido 5-cafeoilquínico son ésteres de cinamato y tienen actividad antimicrobiana (Pacheco et al., 2021). El hexósido de cafeoil también está presente en diferentes frutas como el tomate (Patras et al., 2017) y el ciricote (Pacheco et al., 2021). Gallagil-hexósido es un derivado del ácido gálico. Galagil-hexósido también está presente en los fenoles libres en el tiempo 0 y no en las otras muestras.

El ácido benzoico es uno de los compuestos ligados que no se libera durante el proceso de fermentación evaluado. El ácido benzoico es una subestructura esencial de varios productos naturales y se puede encontrar en microorganismos y plantas (Ye et al., 2021). El ácido p-cumaroil glicólico y el éster etílico del ácido p-cumárico se encuentran libres en el momento de la fermentación (8 h). Estos dos compuestos son derivados del ácido p-cumárico, metabolitos vegetales que exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Li et al., 2022). (+)-Gallocatequina es una catequina presente de forma ligada en el tiempo 0, que está presente de manera accesible en los tiempos 8, 32 y 80 h y no se encuentra en el tiempo 32 de la fracción ligada. La presencia de este compuesto libre demuestra la eficacia de FES.

2.5 Conclusiones

La FES con *A. niger* GH1 es una tecnología biotecnología efectiva para liberar compuestos fenólicos y obtener enzimas como β-glucosidasa y celulasa. Las condiciones de tamaño de partícula (<0.25-2.3 mm) y humedad (65%) en la FES fueron buenas para incrementar la actividad antioxidante que se relaciona positivamente con la cantidad de fenoles libres.

El análisis microestructural de la muestra fermentada a las 32 h muestra la invasión completa del hongo en el material vegetal. La identificación de moléculas de las muestras de compuestos libres y ligados por RP-HPLC-ESI-MS muestra la presencia de compuestos fenólicos reportados con diferentes actividades biológicas como antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante. Entre los compuestos libres identificados a partir de los desechos de la piña se encuentran el hexósido de cafeoílo, el hexósido de p-cumaroílo y el hexósido de gallagillo. Estos hallazgos brindaron una visión amplia del posible uso de los desechos de piña en la industria alimentaria y farmacéutica y es una contribución importante a la economía circular.

2.6 Referencias

Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. Food Chemistry, 152, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093

Aguilar, C. N., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., & Augur, C. (2002). Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of Aspergillus niger Aa-20. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, 102–103, 407–414. https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:407

Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L. A., Ramírez-Coronel, A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2007). Microbial tannases: Advances and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(1), 47–59. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2

Aliyah, A., Alamsyah, G., Ramadhani, R., & Hermansyah, H. (2017). Production of α-Amylase and β-Glucosidase from Aspergillus niger by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. Energy Procedia, 136, 418–423. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.269

AOAC 920.39. (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical chamist. In AOAC.

AOAC 973.18. (1990). Official methods of analysis of the Association of Oficial Analytical Chemists International. Fiber (acid detergent) and lignin (H2SO4) in animal feed.

Aruna, T. E. (2019). Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 57, 102193. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193

Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A. F., Buenrostro, J. J., Prado-Barragán, A.,

Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). The complete biodegradation pathway of ellagitannins by Aspergillus niger in solid-state fermentation. Journal of Basic Microbiology, 56(4), 329–336. https://doi.org/10.1002/jobm.201500557

Ascacio-Valdés, J. A., Buenrostro, J. J., De la Cruz, R., Sepúlveda, L., Aguilera, A. F., Prado, A., Contreras, J. C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2014). Fungal biodegradation of pomegranate ellagitannins. Journal of Basic Microbiology, 54(1), 28–34. https://doi.org/10.1002/jobm.201200278

Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(1), 197–210. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001

Brito, T. B. N., R.S. Lima, L., B. Santos, M. C., A. Moreira, R. F., Cameron, L. C., C. Fai, A. E., & S.L. Ferreira, M. (2021). Antimicrobial, antioxidant, volatile and phenolic profiles of cabbage-stalk and pineapple-crown flour revealed by GC-MS and UPLC-MSE. Food Chemistry, 339, 127882. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127882

Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di, A., La, F., & Nucci, R. (2002). Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. 162, 791–798. https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1016/S0168-9452(02)00022-5

Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., & Prado-Barragán, L. A. (2017). Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. Process Biochemistry, 62, 16–23. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.016

Chakraborty, S., Gupta, R., Jain, K. K., & Kuhad, R. C. (2016). Cost-effective production of cellulose hydrolysing enzymes from *Trichoderma* sp. RCK65 under SSF and its evaluation in saccharification of cellulosic substrates. Bioprocess and Biosystems Engineering, 39(11), 1659–1670. https://doi.org/10.1007/s00449-016-1641-6

Chen, Y. hung, Chen, Y. J., Chou, C. Y., Wen, C. C., & Cheng, C. C. (2019). UV-protective activities of pineapple leaf extract in zebrafish embryos. Research on Chemical Intermediates, 45(1), 65–75. https://doi.org/10.1007/s11164-018-3632-5

Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., & Damasius, J. (2018). Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15, 185–191. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.015

Correia, R. T. P., McCue, P., Magalhães, M. M. A., Macêdo, G. R., & Shetty, K. (2004). Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. Process Biochemistry, 39(12), 2167–2172. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.034

Crognale, S., Liuzzi, F., D'Annibale, A., de Bari, I., & Petruccioli, M. (2019). *Cynara cardunculus* a novel substrate for solid-state production of Aspergillus tubingensis cellulases and sugar hydrolysates. Biomass and Bioenergy, 127, 105276. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105276

Cruz-Hernández, M., Augur, C., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2006). Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. Food Technology and Biotechnology, 44(4), 541–544.

da Silva, D. I. S., Nogueira, G. D. R., Duzzioni, A. G., & Barrozo, M. A. S. (2013). Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. Industrial Crops and Products, 50, 557–562. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.001

de la Rosa, O., Múñiz-Marquez, D. B., Contreras-Esquivel, J. C., Wong-Paz, J. E., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2020). Improving the fructooligosaccharides production by solid-state fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 27, 101704. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101704

de Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Barros, M. P. de, Mano, C. M., & Goulart, M. O. F. (2009). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. Food Chemistry, 115(2), 469–475. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.045

Dibanda Romelle, F., Ashwini, R. P., & Manohar, R. S. (2016). Chemical composition of some selected fruit peels. European Journal of Food Science and Technology, 4(4), 12–21. www.eajournals.org

Difonzo, G., Vollmer, K., Caponio, F., Pasqualone, A., Carle, R., & Steingass, C. B. (2019). Characterisation and classification of pineapple *(Ananas comosus* [L.] Merr.) juice from pulp and peel. Food Control, 96, 260–270. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.015

dos Santos, A. C., Ximenes, E., Kim, Y., & Ladisch, M. R. (2019). Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. Trends in Biotechnology, 37(5), 518–531. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.010

Du, S. kui, Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. lin. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. LWT - Food Science and Technology, 55(1), 308–313. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001

Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. Trends in Food Science and Technology, 88, 302–315. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029

Idris, A. S. O., Pandey, A., Rao, S. S., & Sukumaran, R. K. (2017). Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. Bioresource Technology, 242, 265–271.

https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.092

Jericó Santos, T. R., Santos Vasconcelos, A. G., Lins de Aquino Santana, L. C., Gualberto, N. C., Buarque Feitosa, P. R., & Pires de Siqueira, A. C. (2020). Solid-state fermentation as a tool to enhance the polyphenolic compound contents of acidic Tamarindus indica by-products. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 30. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101851

Khanahmadi, M., Arezi, I., Amiri, M. sadat, & Miranzadeh, M. (2018). Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 13, 272–282. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.005

Kodagoda, K., & Marapana, R. (2017). Development of non-alcoholic wines from the wastes of Mauritius pineapple variety and its physicochemical properties KHGK Kodagoda and RAUJ Marapana. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(3), 492–497.

Kumar, M., Izyan, N., Azelee, W., Nor, A., & Ramli, M. (2022). International Journal of Food Microbiology Microbial biotechnology approaches for conversion of pineapple waste in to emerging source of healthy food for sustainable environment Pineapple flesh Pineapple leaves. International Journal of Food Microbiology, 373, 109714. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109714

Leite, P., Silva, C., Salgado, J. M., & Belo, I. (2019). Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. Industrial Crops and Products, 137, 315–322. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.044

Li, Y., Saravana Kumar, P., qiu, J., Ran, Y., Tan, X., Zhao, R., Ai, L., Yuan, M., Zhu, J., & He, M. (2022). Production of bioactive compounds from callus of *Pueraria thomsonii* Benth with promising cytotoxic and antibacterial activities. Arabian Journal of Chemistry, 15(6), 103854. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103854

Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. 3 Biotech, 7(1). https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y

Lu, X., Li, F., Zhou, X., Hu, J., & Liu, P. (2022). Biomass, lignocellulolytic enzyme production and lignocellulose degradation patterns by *Auricularia auricula* during solid state fermentation of corn stalk residues under different pretreatments. Food Chemistry, 384, 132622. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132622

Makkar, H. P. S. (2003). Makkar, H. P. S. (2003). Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage, 49–51. doi:10.1007/978-94-017-0273-7_3. 2, 49–51.

Manfrin Dias, L., Vieira dos Santos, Beatriz Brant Albuquerque, C. J., Bruno, E., Pasquini, D., & Alves Baffi, M. (2016). Biomass sorghum as a novel substrate in solid state

fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. Journal of Applied Microbiology, 38, 42–49. https://doi.org/DOI: 10.1111/jam.13672

Martinez-Medina, G. A., Chávez-González, M. L., Verma, D. K., Prado-Barragán, L. A., Martínez-Hernández, J. L., Flores-Gallegos, A. C., Thakur, M., Srivastav, P. P., & Aguilar, C. N. (2021). Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacohe as recent trends. Journal of Functional Foods, 77. https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104326

Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advances, 29(3), 365–373. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008

Micanquer-Carlosama, A., Cortés-Rodríguez, M., & Serna-Cock, L. (2020). Formulation of a fermentation substrate from pineapple and sacha inchi wastes to grow *Weissella cibaria*. Heliyon, 6(4), 0–7. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03790

Miller, G. (1959). Use of DinitrosaIicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analitycal Chemistry, 31(3), 426–428. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Mohamed, S. A., Saleh, R. M., Kabli, S. A., & Al-Garni, S. M. (2016). Influence of solid state fermentation by *Trichoderma* spp. on solubility, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activities of commercial turmeric. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 80(5), 920–928. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1136879

Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Schmidt, E. M., Bonafe, E. G., Eberlin, M. N., Sawaya, A. C. H. F., & Visentainer, J. V. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. Food Research International, 77, 392–399. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(2), 211–219. 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Mussatto, S. I., Aguilar, C. N., Rodrigues, L. R., & Teixeira, J. A. (2009). Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. Carbohydrate Research, 344(6), 795–800. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.01.025

Nagao, N., Matsuyama, T., Yamamoto, H., & Toda, T. (2003). A novel hybrid system of solid state and submerged fermentation with recycle for organic solid waste treatment. Process Biochemistry, 39(1), 37–43. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00292-3

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction

and analysis. Food Research International, 74, 10–36. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018

Pacheco, N., Méndez-Campos, G. K., Herrera-Pool, I. E., Alvarado-López, C. J., Ramos-Díaz, A., Ayora-Talavera, T., Talcott, S. U., & Cuevas-Bernardino, J. C. (2021). Physicochemical composition, phytochemical analysis and biological activity of ciricote (*Cordia dodecandra* A. D.C.) fruit from Yucatán. Natural Product Research, 36(1), 440–444. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1774763

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2009). Pre-treatment of agro-industrial residues. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues, 35, 13–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_2

Patras, M. A., Jaiswal, R., & Kuhnert, N. (2017). Profiling and quantification of regioisomeric caffeoyl glucoses in Solanaceae vegetables. Food Chemistry, 237, 659–666. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.150

Prajapati, B. P., Kumar Suryawanshi, R., Agrawal, S., Ghosh, M., & Kango, N. (2018). Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. Bioresource Technology, 250, 733–740. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.099

Qdais, A. H., Abdulla, F., & Qrenawi, L. (2010). Solid Waste Landfills as a Source of Green Energy: Case Study of Al Akeeder Landfill. Jordan Journal of Mechanical and Industrial Engineering, 4(1), 69–74.

Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Ali, M. M., Nooman, M. U., & Al-Kashef, A. S. (2015). Antioxidant and anticancer agents produced from pineapple waste by solid state fermentation. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research, 7(6), 287–296.

Rico, X., Gullón, B., Alonso, J. L., & Yáñez, R. (2020). Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview. Food Research International, 132, 109086. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086

Roasa, J., De Villa, R., Mine, Y., & Tsao, R. (2021). Phenolics of cereal, pulse and oilseed processing by-products and potential effects of solid-state fermentation on their bioaccessibility, bioavailability and health benefits: A review. Trends in Food Science and Technology, 116, 954–974. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.027

Robledo, A., Aguilera-Carbó, A., Rodriguez, R., Martinez, J. L., Garza, Y., & Aguilar, C. N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(6), 507–513. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0309-x

Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A., & Garrido, A. (2004). Polyphenol Changes during Fermentation of Naturally Black Olives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(7), 1973–1979. https://doi.org/10.1021/jf030726p

Saenz-Mendoza, A. I., Zamudio-Flores, P. B., García-Anaya, M. C., Velasco, C. R., Acosta-Muñiz, C. H., de Jesús Ornelas-Paz, J., Hernández-González, M., Vargas-Torres, A., Aguilar-González, M. Á., & Salgado-Delgado, R. (2020). Characterization of insect chitosan films from *Tenebrio molitor* and *Brachystola magna* and its comparison with commercial chitosan of different molecular weights. International Journal of Biological Macromolecules, 160, 953–963. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.255

Sarangi, P. K., Singh, T. A., Singh, N. J., Shadangi, K. P., Srivastava, R. K., Singh, A. K., Chandel, A. K., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2022). Sustainable utilization of pineapple wastes for production of bioenergy, biochemicals and value-added products: A review. Bioresource Technology, 127085. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127085

Şehirli, A. Ö., Sayiner, S., Savtekin, G., & Velioğlu-Öğünç, A. (2020). Protective effect of bromelain on corrosive burn in rats. Burns, 6–12. https://doi.org/10.1016/j.burns.2020.12.006

Selvam, K., Govarthanan, M., Kamala-Kannan, S., Govindharaju, M., Senthilkumar, B., Selvankumar, T., & Sengottaiyan, A. (2014). Process optimization of cellulase production from alkali-treated coffee pulp and pineapple waste using *Acinetobacter* sp. TSK-MASC. RSC Advances, 4(25), 13045–13051. https://doi.org/10.1039/c4ra00066h

Sepúlveda, L., Romaní, A., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. (2018). Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 47, 38–45. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.012

Steingass, C. B., Glock, M. P., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2015). Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MSn and GC-MS analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407(21), 6463–6479. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8811-2

Sybron, A., Rai, D. K., Vaidya, K. R., Hossain, M. B., & Benkeblia, N. (2019). Scientia Horticulturae E ff ects of ripening stage on the content and antioxidant capacities of phenolic compounds of arils, seeds and husks of ackee fruit Blighia sapida Köenig. Scientia Horticulturae, 256, 108632. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108632

Taherzadeh-Ghahfarokhi, M., Panahi, R., & Mokhtarani, B. (2019). Optimizing the combination of conventional carbonaceous additives of culture media to produce lignocellulose-degrading enzymes by Trichoderma reesei in solid state fermentation of agricultural residues. Renewable Energy, 131, 946–955. https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.130

Teles, A. S. C., Chávez, D. W. H., Santiago, M. C. P. de A., Gottschalk, L. M. F., & Tonon, R. V. (2021). Composition of different media for enzyme production and its effect on the recovery of phenolic compounds from grape pomace. Biocatalysis and Agricultural

Biotechnology, 35. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102067

Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. Lwt, 112, 108236. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.003

Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martinez-Medina, G. A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez-Pérez, O. B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdes, J., & Aguilar, C. N. (2018). Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2. https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00052

Tollin, N. (2016). Economía Circular para una Innovación Territorial: Un enfoque metabólico.

Upadhyay, A., Lama, J. P., & Tawata, S. (2010). Utilization of Pineapple Waste: A Review. Journal of Food Science and Technology Nepal, 6(0), 10–18.

Vega-Castro, O., Contreras-Calderon, J., León, E., Segura, A., Arias, M., Pérez, L., & Sobral, P. J. A. (2016). Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralsthonia eutropha*. Journal of Biotechnology, 231, 232–238. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018

Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Pan, Y., & Du, L. (2006). Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 143(4), 429–435. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.002

Xue, P., Liao, W., Chen, Y., Xie, J., Chang, X., & Peng, G. (2022). Release characteristic and mechanism of bound polyphenols from insoluble dietary fiber of navel orange peel via mixed solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. LWT - Food Science and Technology, 113387. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113387

Ye, Y., Chen, Y., Hou, Y., Yu, H., Zhu, L., Sun, Y., Zhou, M., Chen, Y., & Dong, M. (2021). Two new benzoic acid derivatives from endophytic fungus *Aspergillus versicolor.* Natural Product Research, 36(1), 223–228. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1777121.

Yeo, J. D., Tsao, R., Sun, Y., & Shahidi, F. (2021). Liberation of insoluble-bound phenolics from lentil hull matrices as affected by *Rhizopus oryzae* fermentation: Alteration in phenolic profiles and their inhibitory capacities against low-density lipoprotein (LDL) and DNA oxidation. Food Chemistry, 363, 130275. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130275

Yepes-Betancur, D. P., Márquez-Cardozo, C. J., Cadena-Chamorro, E. M., Martinez-Saldarriaga, J., Torres-León, C., Ascacio-Valdes, A., & Aguilar, C. N. (2021). Solid-state fermentation – assisted extraction of bioactive compounds from hass avocado seeds. Food and Bioproducts Processing, 126, 155–163.

https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.012

Zeng, R., Yin, X. Y., Ruan, T., Hu, Q., Hou, Y. L., Zuo, Z. Y., Huang, H., & Yang, Z. H. (2016). A novel cellulase produced by a newly isolated *Trichoderma virens*. Bioengineering, 3(2), 1–9. https://doi.org/10.3390/bioengineering3020013

3 Capítulo 3:
Optimización de proceso de extracción de compuestos antimicrobianos de residuos fermentados de piña MD2

3.1 Resumen

Es necesaria la exploración de compuestos antimicrobianos naturales debido a la resistencia bacteriana que presentan actualmente a los antibióticos sintéticos. Los residuos de piña fermentados pueden ser una fuente natural importante de compuestos fenólicos con capacidad antimicrobiana. En este trabajo se realizaron ensayos preliminares sobre el residuo de piña fermentado para determinar el comportamiento de tres factores (relación sólido/líquido (mg/mL), etanol (%) y ciclos de extracción (N°) en relación con los fenoles totales (FT) extraídos por ultrasonido (EAU). Posteriormente, se optimizaron estos factores por medio de un diseño estadístico Box- Behnken, utilizando como variable respuesta los FT. El extracto optimizado y prepurificado con amberlita se caracterizó por HPLC-MS y se evaluó la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por técnica de microdilución y mediante curva de crecimiento bacteriano. La ecuación polinomial de segundo orden arrojada por el diseño Box-Behnken para la relación de las tres variables independientes evaluadas y la variable respuesta fue significativa ($p<0.05$). Los valores óptimos para relación sólido/líquido, porcentaje de etanol y ciclos de extracción fueron: 82 mg/mL, 26 % y 2 ciclos, respectivamente. El extracto obtenido en el proceso de optimización fue efectivo como agente antimicrobiano contra *S. aureus* y *L. monocytogenes,* con CMI de 50 mg/mL y 12.5 mg/mL, respectivamente. Los principales compuestos identificados en extracto antimicrobiano fueron, 3,4-DHPEA-EA, floretina 2'-O-xilosil-glucósido y ácido feruloiltartárico. En conclusión, el material fermentado de residuos de piña es una fuente prometedora de compuestos fenólicos con capacidad antibacteriana.

3.2 Introducción

La resistencia bacteriana causada por el uso inadecuado de antibióticos es una amenaza en la medicina humana y veterinaria (Barros et al., 2020). Además, la intensificación de los sistemas de producción animal y la globalización aumentan el riesgo de transmisión de bacterias multirresistentes entre diferentes ecosistemas, lo cual se convierte en un problema de salud pública (Loureiro et al., 2016). Por lo tanto, los nuevos enfoques para el control de enfermedades se han desplazado hacia alternativas con antibacterianos naturales que pueden ser de origen vegetal, animal o microbiano, incluyendo extractos de plantas, péptidos, proteínas, polisacáridos, entre otros (Serna & Enríquez, 2013).

Estudios previos demuestran la eficacia como agentes antimicrobianos de compuestos fenólicos presentes en plantas. Compuestos fenólicos como la catequina presente en las plantas de té tiene efecto antimicrobiano contra *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y actividad antifúngica contra *C. albicans* ATCC 10231 (Salman et al., 2022). Los flavonoides también han sido ampliamente descritos como agentes antimicrobianos contra bacterias grampositivas y gramnegativas; extractos de *Prunus domestica* ricos en estos compuestos fueron probados contra *Enterobacter* sp.UJA37p obteniendo resultados favorables (Ortega-Vidal et al., 2022). Algunas de las estructuras fenólicas presentes en los residuos de la piña son linalol, el α-terpineol y el furfural, estudiadas por su efecto inhibitorio contra *Escherichia Coli, Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Brito et al. 2021).

La extracción de compuestos bioactivos es el paso más importante para convertir material biológico en productos útiles con actividad biológica, como la capacidad antimicrobiana. Actualmente la extracción asistida con métodos no convencionales es muy usada. Algunos de estos métodos son ultrasonido, la extracción asistida por microondas, la extracción con líquido presurizado, extracción con fluidos supercríticos, etc. Estas técnicas incluyen el menor uso de solventes peligrosos, alto rendimiento de extracción y menos horas para lograr recuperaciones satisfactorias (Lourenço et al., 2021).

El primer paso para la extracción es seleccionar el solvente más adecuado para extraer los compuestos de interés. Los solventes más utilizados para la extracción de compuestos

fenólicos son el metanol, el etanol y la acetona. Una extracción sólida líquida simple, aunque, en muchos casos es efectiva, puede ser mejorada si es asistida por las técnicas no convencionales mencionadas anteriormente (Safdar et al., 2017). Las ondas ultrasónicas producidas en el ultrasonido son altamente eficientes para la liberación de compuestos dentro de las células debido a que dañan las paredes celulares. Este fenómeno ocurre debido a que las ondas provocan cavidades en el interior del material vegetal por contracción y expansión de la molécula (Luque-Garcia & Luque de Castro, 2003).

Por la problemática global expuesta, este trabajo busca evaluar un antimicrobiano natural de compuestos fenólicos de material fermentado de residuos de piña MD2 obtenidos mediante una extracción optimizada asistida con ultrasonido, contra *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

3.3 Metodología

3.3.1 Reactivos

Para el proceso de extracción se usó etanol grado analítico (ACS) Sigma-Aldrich. Para las pruebas microbiológicas fueron usados agar palcam Oxoid (CM0877), bear parker Merck KGaA y mueller-hinton Merck KGaA y caldo nutritivo Oxoid (CM0001).

3.3.2 Microorganismos

Para este estudio se usaron *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* OM757876. Las cepas fueron reactivadas en agar palcam, bear parker y mueller-hinton a 37 °C por 24 h, respectivamente. Los microrganismos fueron obtenidos del laboratorio de bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia.

3.3.3 Obtención del material fermentado

Los residuos de piña MD2 se fermentaron siguiendo la metodología descrita en el numeral 2.3.4 del capítulo 2. Se utilizaron 8 g de material seco entre cáscara y corazón (70:30 p/p) con un tamaño de partícula entre <0.25mm-2.3mm y humedad del 65%. Se inocularon $2x10^7$ esp/g de soporte del hongo *A. niger* GH1 y se incubó a 37°C por 32 h.

3.3.4 Análisis preliminares de extracción de compuestos bioactivos

Se realizaron análisis preliminares para determinar los límites y puntos centrales que se utilizaron en el proceso de optimización (sección 3.3.5). Las muestras antes de ponerlas en el ultrasonido fueron homogeneizadas usando un vortex (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) a 9000 rpm durante 1 min. Todas las extracciones se realizaron con el equipo de ultrasonido (Branson Scientific Ultrasonic 2510) a 37 °C y con una frecuencia de 40 kHz. La temperatura del agua en el ultrasonido se controló continuamente con un termómetro de mercurio, lo que permitió un control de temperatura exacto durante el proceso de extracción. Se realizaron ensayos para determinar el tiempo de extracción en el equipo de ultrasonido, para esto se evaluó cada 5 min hasta los 90 min el contenido fenólico, utilizando una relación sólido/líquido de 120 mg/mL y una concentración de 50% de etanol. Se determinó que después de 45 min de extracción con ultrasonido la cantidad de contenido fenólico no tuvo diferencia significativa ($p>0.05$), por tanto, para los futuros experimentos el tiempo de extracción se estableció a 45 min (Resultados presentados en el Anexo 5).

La extracción se realizó en recipientes eppendorf cerrados de 2 mL. La relación sólido/líquido varió entre 30 mg/mL y 210 mg/mL con 50% de etanol y 3 ciclos, la concentración de etanol como solvente de extracción varió entre 0 y 100% con una relación sólido/líquido de 120 mg/mL y tres ciclos; y el número de ciclos variaron entre 1 y 5 con una relación sólido/líquido de 120 mg/mL y 50% de etanol. Para medir el contenido de FT de cada muestra, al terminar cada ciclo se unieron los sobrenadantes en tubos de ensayo y al terminar el total de los ciclos cada muestra se llevó a 5 mL con el fin de que todas las muestras evaluadas tuvieran el mismo volumen.

Los extractos obtenidos se almacenaron a -60 °C hasta que se realizaron las evaluaciones de FT y capacidad antimicrobiana (en menos de 3 días). Cada proceso de extracción se realizó por triplicado.

3.3.5 Diseño de Box-Behnken

Los resultados obtenidos en el numeral anterior fueron usados como referencia para realizar un diseño estadístico Box-Behnken con tres factores, tres niveles y una variable

respuesta. Los factores se establecieron en tres niveles codificados como se observa en la Tabla 3.1. El diseño consistió en 15 corridas aleatorias (n = 45, debido a que cada proceso de extracción se realizó por triplicado). La cantidad de FT se eligió como variable dependiente debido a que otros autores han comprobado su actividad antimicrobiana (Salman et al., 2022). Los datos del Box-Behnken se aproximaron a una ecuación polinomial de segundo orden y se generó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar los coeficientes de regresión lineal, cuadrática y de interacción individuales. Al obtener el resultado del diseño estadístico Box-Behnken se realizó la medición de FT con los valores de cada variable optimizada.

Tabla 3.1. Valores no codificados y codificados de los factores estudiados en el diseño estadístico Box- Behnken.

	Niveles en diseño Box-Benhken		
Variables	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Relación sólido/líquido (mg/mL)	25	90	155
Ciclos (N°)	2	3	4
Etanol (%)	10	50	90

3.3.6 Contenido fenólico total (FT)

Los FT se determinaron siguiendo la metodología descrita por (Molyneux, 2004). La medición se realizó en microplaca de 96 pocillos. Se tomaron 20 µL de cada una de las muestras, se mezclaron por 5 min con 20 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Pasados los 5 min las muestras se mezclaron con 20 µL de carbonato de sodio (0.01 M) por 5 min y finalmente se añadieron 125 µL de agua destilada. Posteriormente se realizó la lectura a 750 nm en un lector de microplacas (Biotek ELx800). Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico/g de materia seca. La curva de calibración se realizó midiendo la absorbancia de concentraciones conocidas entre 0-0.6 de mg de ácido gálico/ml de ácido gálico para obtener el contenido fenólico del extracto de cada muestra.

3.3.7 Identificación de compuestos por RP-HPLC-ESI-MS

El extracto obtenido con las condiciones optimizadas en el apartado 3.3.5 fue secado en un horno convectivo a 60°C y reconstituido en agua destilada, luego fue prepurificado con amberlita XAD 16 y filtrado a través de un filtro de nailon de 0.45 µm.

Para la identificación de compuestos por RP-HPLC-ESI-MS se tomaron 1.5 mL del extracto filtrado y se inyectó en el HPLC (columna C18: 150 mm x 2,1 mm, 3 µm, Grace, USA). El sistema Varian HPLC consta de un muestreador automático (Varian Pro Star 410, EE. UU.), un detector PDA (Varian Pro Star 330, EE. UU.) (eluyentes: ácido fórmico y acetonitrilo) y una bomba ternaria (Varian Pro Star 230I, EE. UU.). El gradiente aplicado fue: inicial, 3% B; 0–5 min, 9% B lineal; 5-15 min, 16% B lineal; 15–45 min, 50% B lineal. El análisis LC-ESI-MS consiste en un espectrómetro de masas (Espectrómetro de masas IT Varian 500-MS, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) y operado en modo de iones negativos $[MH]^{-1}$. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de aspersión 5.0 kV, voltaje capilar 90.0 V y temperatura 35°C (Ascacio-Valdés et al., 2016).

3.3.8 Actividad antimicrobiana

A. Determinación de concentración mínima inhibitoria

La muestra de la optimización se secó en un horno (Binder, Alemania) a 40°C durante 6 h, luego la muestra se diluyó en agua destilada, se prepurificó con amberlita XAD 16, se secó nuevamente y se reconstituyó en agua estéril para obtener concentraciones entre 100 mg/mL y 3 mg/mL. Para obtener una concentración conocida de unidades formadoras de colonia UFC de cada patógeno (*L. monocytogenes, S. aureus* y *E. coli)* se ajustó una solución de NaCl (8.5%) a una densidad óptica (OD600) entre 0.15 y 0.20. El control positivo tenía medio de cultivo con la bacteria y el control negativo (esterilidad) tenía medio de cultivo y solución salina sin la bacteria. Se utilizó penicilina (500 mg) como estándar de referencia. Las muestras se dispusieron en una placa de 96 pocillos. En cada pozo se añadieron 20 µL del extracto optimizado, 20 µL de bacteria patógena y 160 µL de medio de cultivo (caldo nutritivo). A continuación, las placas de microdilución se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas. Luego, se transfirieron 5 µL de cada pocillo al agar específico para cada bacteria con el fin de comprobar la inhibición producto de la interacción del extracto

optimizado con el patógeno. Los medios de cultivo se incubaron a 37 °C durante 24 h. La CMI se estableció como la concentración a la que se identificó el crecimiento de la menor cantidad de colonias (Azevedo et al., 2021).

B. Curva de crecimiento bacteriano

La curva de crecimiento bacteriano se realizó siguiendo la metodología descrita por Babii et al. (2016). En este ensayo solo se evaluaron las bacterias que presentaron inhibición con el extracto optimizado en la sección 3.3.8-A. En cada pozo se añadieron 20 µL de extracto optimizado con la CMI según la bacteria del ensayo (50 y 12.5 mg/mL), 20 µL de bacteria patógena (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y 160 µL de medio de cultivo (caldo nutritivo). El control positivo tenía medio de cultivo con la bacteria. La concentración del antimicrobiano y las UFC de cada bacteria se estandarizaron de la misma forma que en la sección 3.3.8-A de este capítulo. A continuación, las placas de microdilución se incubaron a 37 °C en condiciones aeróbicas. La lectura de las microplacas para evaluar el crecimiento de las bacterias se realizó cada hora en un espectrofotómetro de microplaca a 630 nm.

3.3.9 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado con muestras independientes. Todos los análisis se informaron mediante medias y desviaciones estándar. Los resultados fueron analizados por ANOVA, se utilizó la prueba de Tukey para analizar la diferencia significativa ($P<0.05$). El análisis estadístico y el diseño experimental se realizó utilizando el software Minitab 21.1.1 y las gráficas de superficie de respuesta se realizaron en MATLAB 2021b.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Análisis preliminares

La figura 3.1 muestra los resultados del análisis preliminar de la interacción entre la variable respuesta (FT) y los tres factores evaluados, relación de sólido/líquido, concentración de etanol y número de ciclos. Investigaciones pasadas han demostrado la relevancia de estos tres factores en procesos de extracción de FT (Torres-León et al. 2017). En la Figura 3.1 se observa que los FT para los tres factores evaluados primero asciende y luego desciende,

en todas las figuras (a, b y c), también se observa la muestra en dónde se obtuvo la mejor extracción marcada con la letra a por la prueba tuckey en la barra de desviación estándar. El análisis del comportamiento de estas figuras permite escoger los puntos centrales (medio (0)) del diseño Box-Benhken. Para la concentración de etanol fue de 50%, para la relación sólido/líquido fue de 90mg/mL y para el número de ciclos de 3 ciclos.

A. Concentración de etanol

Como se observa en la Figura 3.1a, la extracción fue mayor cuando se usó entre 10 y 30 % de etanol, se evidencia diferencia significativa con respecto al 100% de etanol ($p>0.05$). El comportamiento de la concentración de etanol con respecto a la cantidad de FT permitió establecer los límites de esta variable en el diseño Box-Benhken (Tabla 3.1)

La combinación de etanol y agua permite la extracción de una amplia cantidad de FT. Esta extracción se debe a la afinidad de los solventes con los FT. El etanol además de ser un solvente GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), tiene más baja polaridad que el agua, esto asegura un buen rango de FT extraídos. Además, los ácidos fenólicos de pH altos presentes en los residuos de piña como el ácido benzoico y ácidos cinámicos, no se pueden extraer completamente con disolventes orgánicos puros, por lo que se recomienda la mezcla de alcohol y agua o acetona y agua (Rasheed et al., 2012). Una mayor afinidad de los fenoles presentes en el extracto evaluado en una solución con 10-30% de etanol sugiere que la mayor cantidad de fenoles extraídos son polares.

Estudios con residuos orgánicos no fermentados demuestran que otras combinaciones de etanol: agua son efectivas para la extracción de FT. Lourenço et al. (2021) y M'hiri et al. (2014) demostraron que 80% de etanol es la mejor concentración para la extracción de FT de cáscara de piña y cáscara de cítricos, respectivamente. Mientras, Brahmi et al. (2022) demostraron que 40% de etanol es la mejor concentración para la extracción de FT de las flores de *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. Esta diferencia se puede deber a que el perfil de FT cambia debido al efecto de la FES como se evidencia en el capítulo 2.

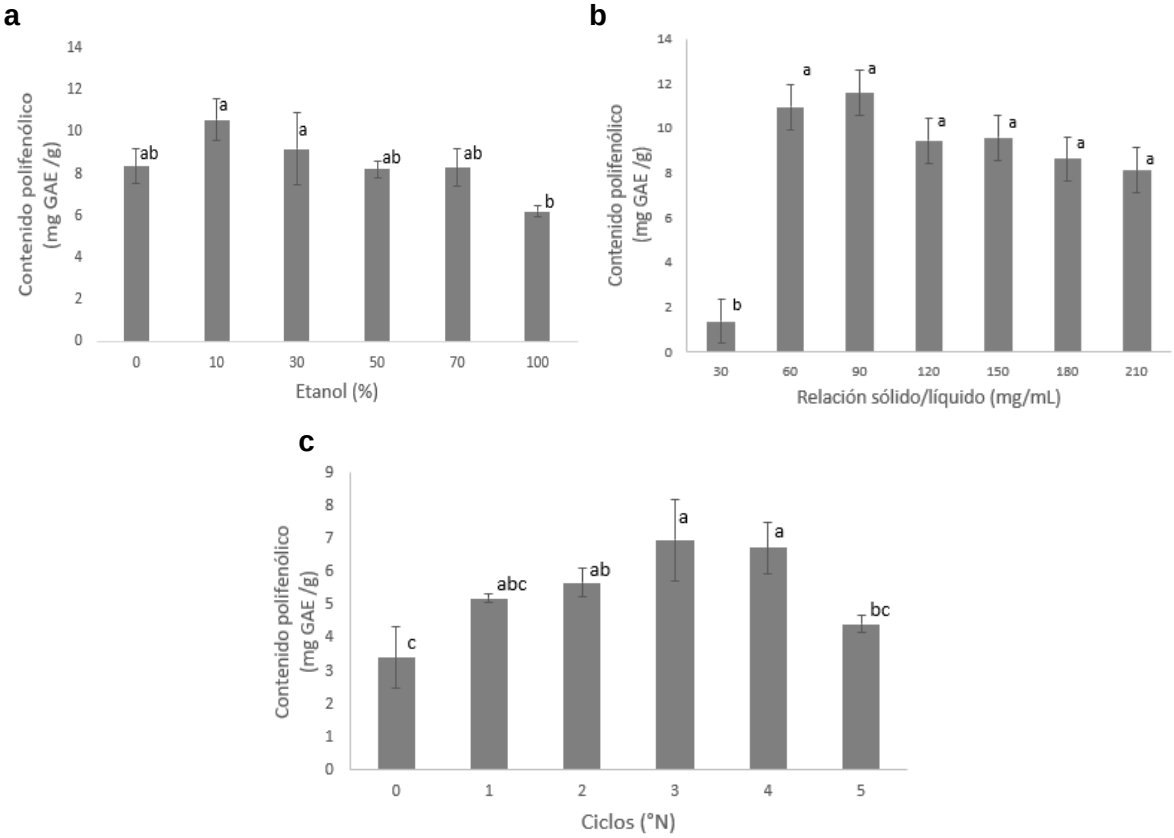


Figura 3.1. Efecto de la concentración de etanol (a), Relación sólido/líquido (b) y número de ciclos (c) sobre el contenido de FT obtenido a partir de residuos de piña fermentados. Las letras corresponden a prueba de Tukey ($p<0.05$). Letras compartidas no hay diferencia significativa.

B. Relación sólido/líquido

Como se observa en la Figura 3.1b la cantidad de FT también depende de la relación de sólido/líquido usada en la extracción. La relación de sólido/líquido más alta fue entre 60 y 90 mg/mL de etanol, sin embargo, no se presentó diferencia significativa ($p>0.05$) después de 60 mg/ml. Con una relación sólido/líquido mayor a 90 mg/mL el contenido de fenoles baja porque la viscosidad media comienza a aumentar, este fenómeno puede dificultar el efecto de cavitación acústica porque la presión negativa en la región de rarefacción (expansión de las burbujas) tiene que superar la fuerte cohesión entre partículas (Venkateswara et al., 2021). El comportamiento de la relación sólido/líquido con respecto al contenido de FT permitió establecer los límites de esta variable en el diseño Box-Benhken (Tabla 3.1).

La relación sólido/líquido afecta el gradiente de concentración, aumentando la tasa de penetración de los compuestos de una fase sólida a una fase líquida. Es conveniente que hasta que se termine la extracción el solvente sobrepase la fase sólida, es decir, la fase sólida se mantenga sumergida (Selahvarzi et al., 2022).

El estudio de Rasheed et al. (2012) evidenció que proporciones de sólido/líquido similares son efectivas para obtener FT de residuos de frutas. Rasheed et al. (2012) optimizaron el proceso de extracción de FT de residuos de piña y demostraron que la mejor relación es 50 mg de residuos secos por mL de solvente.

C. Número de ciclos

Entre los factores que afectan la extracción de FT se encuentra el número de ciclos. Como se observa en la Figura 3.1c en el tercer ciclo se obtuvo la mayor cantidad de compuestos fenólicos y hubo una diferencia significativa entre la extracción sin ciclos, es decir, sin tratamiento con ultrasonido y con 5 ciclos. El comportamiento de la relación ciclos de extracción con respecto al contenido de FT permitió establecer los límites de esta variable en el diseño Box-Benhken (Tabla 3.1).

El aumento de número de ciclos aumenta la cantidad de FT porque logra extraer la cantidad total de FT en el material orgánico, sin embargo, cuando ya no es posible extraer más FT del material no es recomendable hacer más ciclos debido al gasto energético y al daño que se puede ocasionar en los FT debido a la pirolisis y oxidación por la liberación de hidroxilos que se desencadenan al exponer el material vegetal a largos tiempos de EAU (Venkateswara et al., 2021). Varios autores recomiendan los ciclos consecutivos para aumentar la cantidad de compuestos bioactivos obtenidos en la extracción. Autores como Garmus et al. (2015) y Pérez-Jiménez et al. (2008) recomiendan el uso de entre tres y dos ciclos como mínimo para la obtención de FT, respectivamente.

3.4.2 Diseño de Box-Behnken

El efecto de la concentración de etanol, relación sólido/liquido y número de ciclos en una variable dependiente o respuesta (FT) se optimizaron con un diseño Box-Benhken.

Al aplicar el análisis de regresión múltiple sobre los datos experimentales (Tabla 3.2), el modelo para la variable respuesta, es expresado con la siguiente ecuación polinomial cuadrática.

Eq. (6) $CFT = 9.31214 + 0.0253535 * A + 0.0855959 - 1.06166 * C - 0.000341706 * A^2 + 0.0000568958 * A * B + 0.0190796 * A * C - 0.000601747 * B^2 - 0.0379684 * B * C + 0.153779 * C\text{^}2$

Donde A son los mg de material fermentado, B concentración de etanol y C el número de ciclos.

Los coeficientes de los factores en la ecuación 6 revelan la importancia de cada parámetro, notando que el signo positivo significa que el factor afecta directamente la contenido de FT, como el efecto de la relación sólido/líquido (A), concentración de etanol (B), la interacción de relación sólido/líquido y concentración de etanol (A:B), la interacción de la relación sólido/líquido y número de ciclos (A:C) y la relación cuadrática de número de ciclos (C).

Tabla 3.2. Valores experimentales y predichos obtenidos para el contenido de FT de extractos de residuos de piña fermentado.

Experimento	Valores experimentales	Valores predichos por el modelo
1	14.262 ± 1.57	11.718
2	9.580 ± 0.45	6.988
3	12.176 ± 1.52	11.996
4	9.346 ± 1.94	9.458
5	7.239 ± 1.97	6.347
6	9.290 ± 1.11	10.098
7	6.183 ± 0.83	5.689
8	10.069 ± 1.51	9.512
9	9.604 ± 2.28	9.512
10	6.069 ± 1.12	5.327
11	4.289 ± 0.81	5.049
12	10.081 ± 0.14	12.358
13	8.865 ± 2.67	9.512
14	1.741 ± 0.39	2.216
15	8.440 ± 3.04	8.885

En el análisis de varianza (ANOVA) en la Tabla 3-3 muestra que el coeficiente de determinación (Rˆ2 = 0.9381) y el coeficiente de determinación ajustado (Rˆ2 ajustado = 0.8266) indican que el modelo se ajusta bien a los datos de laboratorio, debido a que el valor del coeficiente de determinación refleja el porcentaje de los resultados experimentales que el modelo es capaz de explicar. Además, el valor de prueba de falta de ajuste (0.12) no es significativo *(*p>0.05), lo que corrobora que el modelo de ajuste es adecuado para describir los datos experimentales. En esta misma tabla también se evidencia que solo los efectos lineales, relación sólido/líquido y concentración de etanol fueron significativos (*p*<0.05*).* Ninguno de los efectos cuadráticos ni de las interacciones fueron significativos *(*p>0.05).

Tabla 3.3. Resultados ANOVA de la ecuación polinomial de segundo orden.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
A	1	19.356	19.355	10.83	0.022
B	1	88.953	88.953	49.75	0.001
C	1	0.820	0.820	0.46	0.528
A*A	1	7.696	7.696	4.30	0.093
B*B	1	3.423	3.423	1.91	0.225
C*C	1	0.087	0.088	0.05	0.834
A:B	1	0.088	0.088	0.05	0.834
A:C	1	6.152	6.152	3.44	0.123
B:C	1	9.226	9.226	5.16	0.072
Falta de ajuste	3	8.204	2.735	7.43	0.121
Rˆ2	0.938				
Rˆ2 ajustado	0.826				

A:mg de material fermentado; B: concentración de etanol; C: número de pasos

La Figura 3.2 muestra las superficies de respuesta de la relación de los tres factores evaluados y la variable respuesta (FT). La Figura 3.1a muestra que al aumentar la cantidad de ciclos y aumentar la relación sólido/liquido, aumenta la cantidad de FT, esto debido a que se encuentran presentes mayor cantidad de fenoles libres y se están extrayendo la mayor parte de estos; en la Figura 3.1b muestra que al disminuir la concentración de etanol y aumenta el número de pasos, aumenta la cantidad de FT, esto puede deberse a la naturaleza química de los compuestos presentes en el material fermentado, que son más

compatibles con concentraciones bajas de etanol y en Figura 3-2-c se observa que al disminuir la concentración de etanol y aumentar la cantidad de mg de material fermentado, aumenta la cantidad de FT, esto debido a que entre mayor cantidad de material fermentado, mayor cantidad de FT libres.

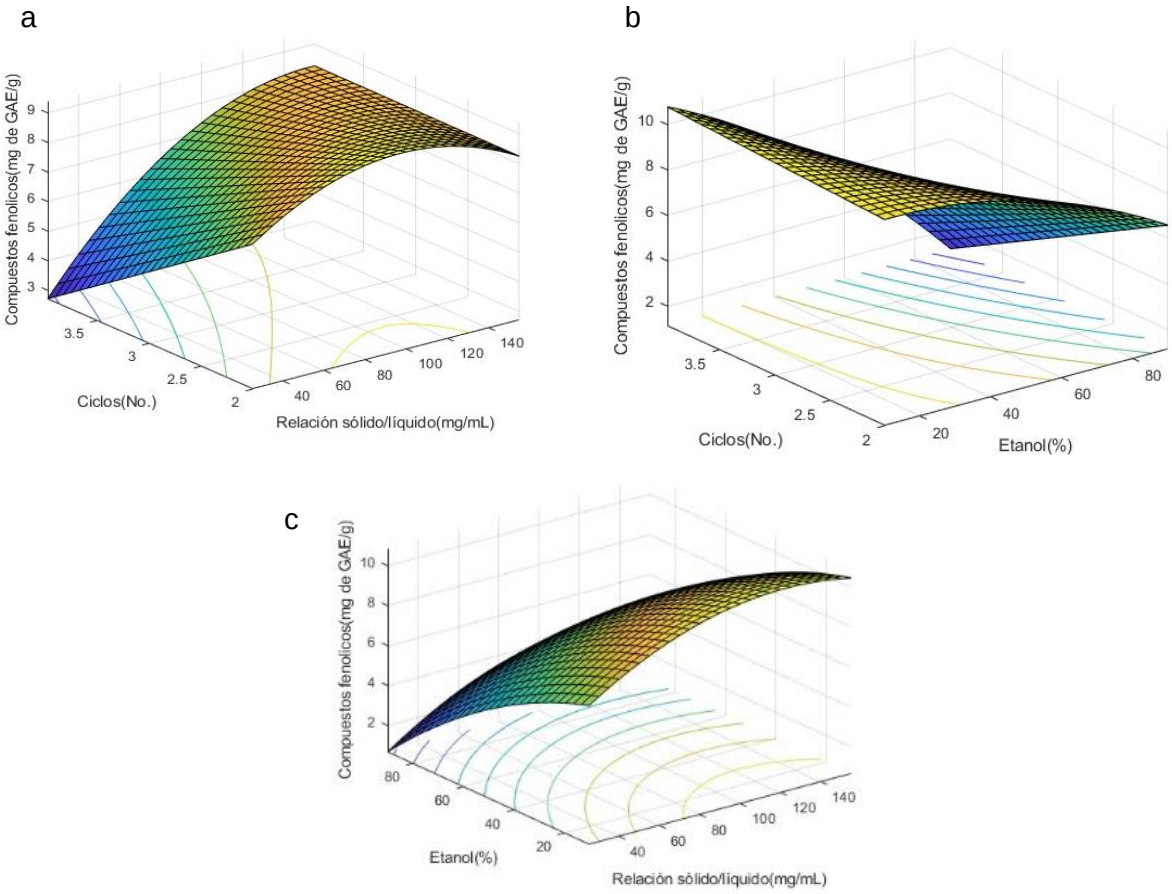


Figura 3.2. Superficies de respuesta correspondiente a la interacción entre los tres factores evaluados (concentración de etanol, cantidad de material fermentado y número de pasos).**a.** Relación de No. de ciclos y relación sólido/líquido (50% de etanol), **b.** Relación de No. de ciclos y % de etanol (90 mg de material fermentado por mL) y **c.** Relación de porcentaje de etanol y relación sólido/líquido (3 ciclos).

3.4.3 Verificación del modelo

Los resultados optimizados fueron: 26 % de etanol, relación sólido/líquido de 82 mg/mL y 2 ciclos, con estos resultados se obtuvo una cantidad de FT de 12 mg de EAG/g material seco, cantidad cercana a la predicha por el modelo (12.33 mg de EAG/g material seco). Estos resultados se relacionan con los analizados en la sección 3.4.1 de este capítulo, en donde se obtuvo la mayor cantidad de FT con 30% de etanol, una relación sólido/líquido entre 60 y 90 mg/mL y 3 ciclos. Otros estudios de optimización con residuos de piña, obtuvieron una cantidad de FT inferiores a los reportados por este estudio. Lourenço et al. (2021) obtuvieron 11.10±0.01 mg de EAG/g material seco con extracción sólido-líquido simple, con 80% de etanol, relación sólido/líquido mg/mL, un ciclo de extracción y 25 min de extracción a temperatura ambiente y Rasheed y Ong (2016) obtuvieron 1.17 mg de EAG/g material seco con extracción sólido-liquido simple, con 80% de metanol, relación sólido/líquido 0.5 mg/mL, un ciclo de extracción y 90 min de extracción a temperatura ambiente. Igualmente, una investigación con EAU con otros residuos agroindustriales obtuvo cantidades inferiores de FT. Selahvarzi et al. (2022) obtuvieron la mayor cantidad de FT de cáscara de granada (2.70 mg EAG/g) y cítricos (1.86 mg EAG/g) en una EAU con una relación sólido: líquido de 25 mg/mL, 40 min de extracción y 70°C. En primera instancia, la diferencia de los resultados de este estudio con los obtenidos en otros estudios de piña se puede deber al uso de ultrasonido que hace más eficiente la extracción y con respecto a los otros estudios, con otros residuos agroindustriales se puede deber a la diferencia de los perfiles fenólicos de cada material orgánico.

3.4.4 Compuestos presentes en el extracto optimizado

La Figura 3.3 muestra los compuestos presentes en el extracto optimizado obtenido a partir del material de residuos de piña MD2 fermentado, 3,4-DHPEA-EA de la familia del tyrosol, floretina 2'-O-xilosil-glucósido de la familia de las dihydrochalcones y ácido feruloiltartárico de la familia de los ácidos metoxicinámicos. El tyrosol (1) es un alcohol fenetílico presente en diferentes fuentes naturales como antioxidante fenólico natural. Se ha demostrado que este compuesto produce alargamiento de la fase de latencia y retraso en el crecimiento microbiano de *S. aureus* (Casadey et al., 2021). Floretina 2'-O-xilosil-glucósido (2) es un ácido hidroxibenzoico que pertenece al grupo de los flavonoides, tiene efecto antioxidante,

antinflamatorio y se usa para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Yuste et al., 2019). El ácido feruloiltartárico (3) es un fenol derivado del ácido tetrárico, este compuesto se ha relacionado directamente con el tratamiento de la diabetes. La funcionalidad de este compuesto se ha relacionado con el ácido cinámico, de estos ácidos se ha demostrado una inhibición efectiva del crecimiento de cepas bacterianas gran (+) y gram (-) en concentraciones por debajo de 1 mg/g (Atar, 2021).

Al igual que en este capítulo, en el capítulo 2 en la sección 2.4.6 (RP-HPLC-ESI-MS analítica) se identificaron los compuestos presentes a las 32 h de fermentación, entre ellos el hexósido de cafeoilo, ácido 5-cafeoilquínico y (+)-Galocatequina, obtenidos mediante extracción sólido:líquido con una relación sólido/líquido de 1:30, 90% de etanol y 45°C. Aunque, la identificación de los compuestos se determinó a la misma hora de fermentación, la extracción de los compuestos se realizó en condiciones diferentes y el uso de ultrasonido como método de extracción puede cambiar el perfil fenólico debido a pirólisis y oxidación como se evidencia en este capítulo.

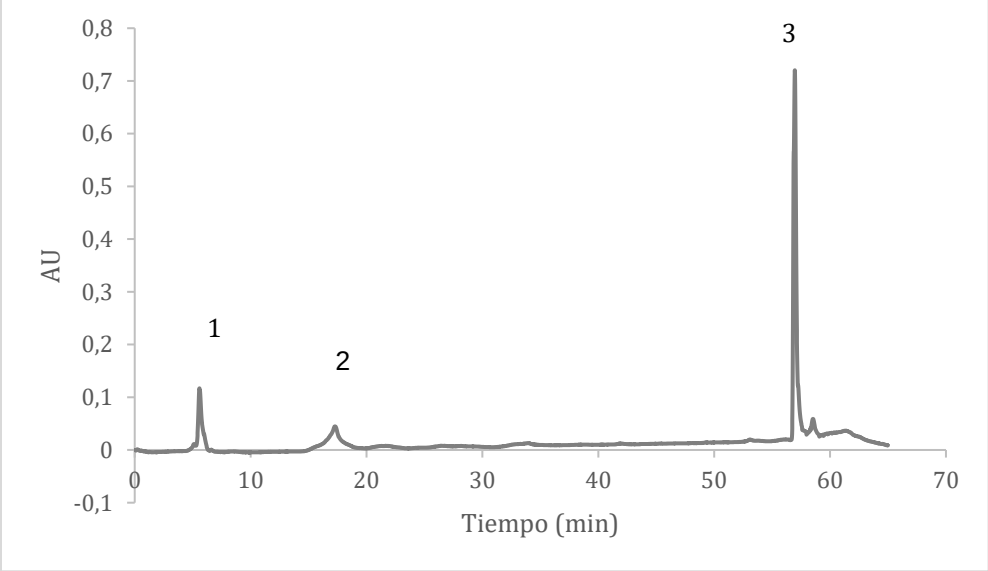


Figura 3.3. Identificación de compuestos de extracto optimizado por cromatografía de alta resolución (RP-HPLC-ESI-MS). **1.** 376.8 [M-H] m/z Tyrosol (3,4-DHPEA-EA). ***2***.568.1 [M-H] m/z Dihydrochalcones (Floretina 2'-O-xilosil-glucósido) **3.** 324.9 Ácidos metoxicinámicos (ácido feruloiltartárico).

Por otro lado, el uso de amberlita XAD16, permite la separación de grupos fenólicos de otros compuestos que no son de interés para este estudio, como los carbohidratos. La amberlita XAD16 es un adsorbente polimérico utilizado en la adsorción y pre-purificación de compuestos orgánicos a partir de soluciones acuosas. Aunque, prepurificar el extracto mediante amberlita XAD deja biodisponibles menos moléculas que en el extracto original, permite reconocer cuáles compuestos están actuando en la actividad biológica analizada y permite alargar la vida útil del extracto (Li et al., 2021).

3.4.5 Actividad antimicrobiana

A. Determinación de concentración mínima inhibitoria

El extracto obtenido de la optimización realizada al material de residuos fermentados fue evaluado como agente antimicrobiano contra tres microorganismos patógenos, *E. Coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

En la Figura 3.4 se evidencia que la CMI del extracto de piña fermentada pre-purificado contra *S. aureus* es de 50mg/mL y la CMI de *L. monocytogenes* es de 12.5mg/mL. El *S. aureus* y *L. monocytogenes* son patógenos gram (+) que se pueden encontrar en alimentos (carnes, verduras, leche y alimentos listos para el consumo). La diferencia en cuanto a la cantidad de extracto necesario para inhibir el crecimiento de cada unas de las bacterias gram (+) puede deberse al mecanismo de resistencia de estas mediante la producción de enzimas. Del mismo modo, otras investigaciones demuestran que la discrepancia en los sitios de unión de los fenoles a la pared celular de cada microorganismo, puede ser la explicación de que el *S. aureus* necesite más extracto que la *L. monocytogenes* para ser inhibido (Pastoriza et al., 2015).

Estudios con otros residuos agroindustriales como la semilla y cáscara de aguacate (Calder & Iztapalapa, 2016) y los residuos de café (Pastoriza et al., 2015), con compuestos fenólicos similares identificados en este estudio (Figura 3.3) obtenidos mediante extracción sólido-líquido, también han demostrado ser antimicrobianos contra *L. monocytogenes* y *S. aureus.* En general, los fenoles se acumulan en la superficie de las bacterias mediante la interacción de los radicales hidroxilos con la membrana celular, lo que induce, la despolarización de las bacterias, la pérdida de contenido celular y por tanto, el gradiente de pH a través de la membrana, lo cual conlleva a que el nivel de ATP también se reduzca y provoque la muerte

celular (Bouarab-Chibane et al., 2019). Existen dos mecanismos celulares reportados usados por los fenoles sobre las bacterias, el primero involucra el cambio de la permeabilidad de la membrana celular y el segundo en la interferencia de las funciones básicas de la célula (Bouarab Chibane et al., 2019).

Gomes et al. (2018) evidenciaron que extractos ricos en derivados de flavonoides inhiben el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923, como el extracto de *Juglans regia* L., con una CMI de 0.78 mg/mL y *Eucalipto globulus* Labill con una CMI de 0.19 mg/mL. Monente et al. (2015) evidenciaron que el extracto de borra de café, que contiene ácidos hidroxicinámicos (compuesto de estructura similar a los ácidos metoxicinámicos presentes en el extracto de piña fermentado), antocianidinas, flavan-3-oles y flavonoles, tuvo actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes (*CMI = 20 mg/mL), debido al efecto negativo sobre la permeabilidad de la membrana de la bacteria que tiene los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. Diarra et al. (2020) estudiaron el efecto del extracto de orujo de arándanos, fuente importante de antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos como los reportados en la Figura 3.3 contra *L. monocytogenes,* evidenciando una CMI 2 mg/mL.

Por otro lado, según Salman et al. (2022) el efecto negativo sobre la *E. coli* se puede deber a que las bacterias gram (-) son más resistentes a los compuestos fenólicos debido a la estructura de su pared celular. La estructura menos compleja de la pared celular de las bacterias gram (+) la hace más permeable a los compuestos antimicrobianos (Salman et al., 2022 y Zaidan et al., 2005).

a **b** **c**

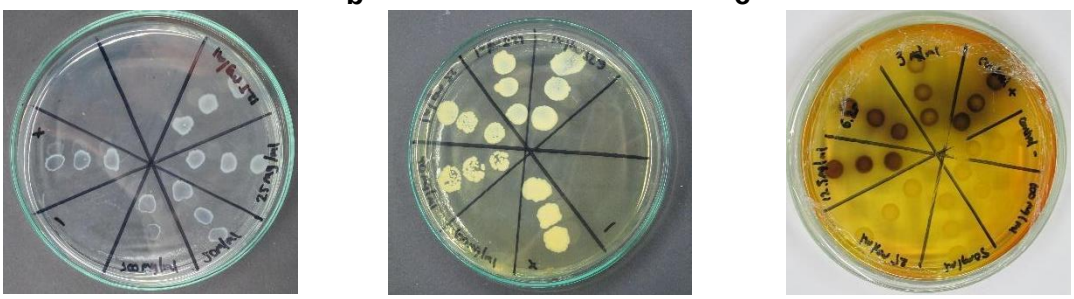
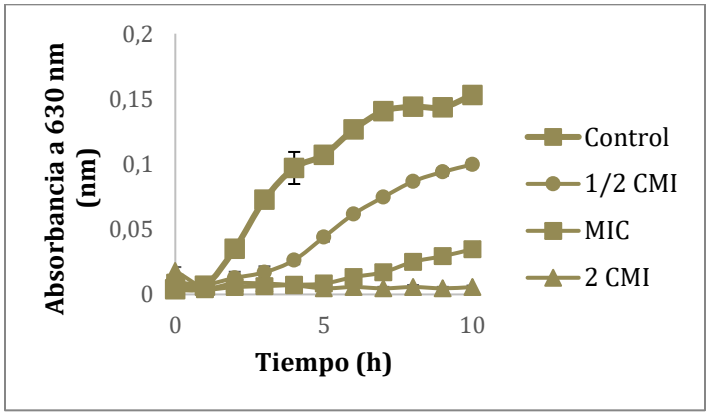


Figura 3.4. Comprobación de concentración mínima inhibitoria de residuos de piña MD2 fermentados contra tres microorganismos patógenos **a.** *E. coli* ***b.*** *S. aureus* ***c****. L. monocytogenes*

B. Curva de crecimiento bacteriano

Para evaluar la eficacia del extracto optimizado de la FES de residuos de piña como agente antimicrobiano, se llevaron a cabo experimentos adicionales utilizando caldo nutritivo suplementado con diferentes concentraciones del extracto optimizado ½ CMI, CMI y 2x CMI. Como se observa en la Figura 3.5, el extracto optimizado y prepurificado inhibió significativamente el desarrollo de ambas bacterias para todas las concentraciones utilizadas, siendo el efecto inhibidor más bajo en el caso de *S. aureus* en comparación con *L. monocytogenes.*

a.



b.

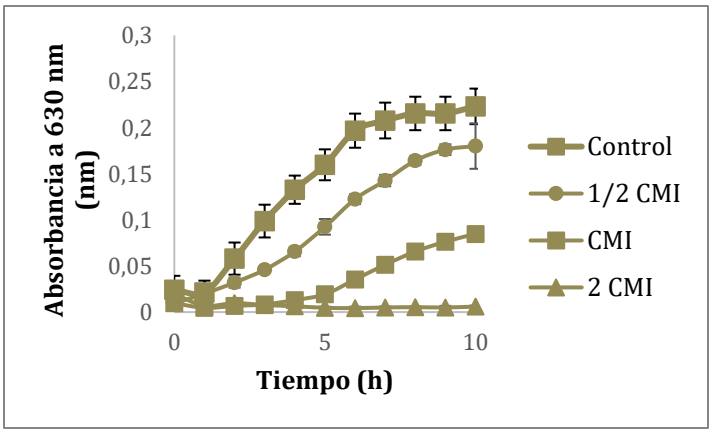


Figura 3-5. Curva de crecimiento bacteriano en caldo nutritivo a diferentes concentraciones de extracto optimizado. **a** - *L. monocytogenes*; **b** - *S. aureus* (■ control, ▲ 2 CMI, x CMI, ● ½ CMI).

El extracto optimizado y pre-purificado utilizado en este experimento provocó un retraso significativo en el crecimiento de ambas bacterias, siendo la fase de latencia más prolongada en las bacterias con el antimicrobiano en comparación con el control. Se registraron diferentes reacciones entre estos dos microorganismos, para *S. aureus y L. monocytogenes* con ½ CMI, para *L. monocytogenes* se muestra una fase de latencia entre 0 y 3 h mientras que para el *S. aureus* no se presentó estado de latencia, mientras que con la CMI se evidenció crecimiento después de un período de retraso prolongado de 4 y 6 h, respectivamente. Además, es necesario enfatizar que las propiedades antimicrobianas del extracto optimizado conducen no sólo a la inhibición del crecimiento bacteriano, sino también a la muerte de las células bacterianas a concentraciones equivalentes a 2x MIC para las dos bacterias estudiadas. La dinámica del crecimiento bacteriano también reveló que las concentraciones crecientes del extracto optimizado inhiben progresivamente el crecimiento de *S. aureus y L. monocytogenes.*

Babii et al. (2016) obtuvieron resultados similares con el uso de flavonoide tricíclico obtenido a través de síntesis química como agente antimicrobiano, con una fase de latencia de 9 h con CMI de 0.24 µg/mL. Azi et al. (2022) al igual que en la presente investigación, en las curvas de crecimiento bacteriano mostraron que la actividad antibacteriana de los polifenoles del suero de kéfir fermentado extraídas con el uso de ultrasonido depende de su tiempo de exposición y concentración.

3.5 Conclusiones

Se puede concluir que la extracción sólido líquido asistido con ultrasonido es una tecnología efectiva para aumentar la liberación de FT con actividad antimicrobiana en residuos de piña fermentados. En este trabajo, se empleó con éxito un diseño de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de extracción de FT con capacidad antimicrobiana a partir de los residuos de piña sometidos a FES. La extracción de FT es afectada significativamente por los efectos lineales de relación sólido/líquido y concentración de etanol. Los factores óptimos de extracción de FT fueron: 86mg de material fermentado por mL de solvente, 26% de etanol y 2 ciclos. El extracto de material fermentado obtenido de la optimización de la extracción asistida con ultrasonido fue efectivo como agente antimicrobiano contra *S. aureus y L. monocytogenes* a CMI de 50mg/mL y 12.5mg/mL,

respectivamente. Este trabajo evidencia que los residuos de piña fermentados son una fuente orgánica importante de compuestos fenólicos con actividad biológica.

3.6 Referencias

Atar, L. (2021). Physicochemical and antimicrobial properties of cassava starch films with ferulic or cinnamic acid ´ n Ordo n. LWT, 144. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111242

Azevedo, D., Maria, T., Correia, S., Torres-le, C., Brayner, F. A., Ascacio-Valdes, J., & Alvarez-p, O. B. (2021). Antioxidant and anti-staphylococcal activity of polyphenolic-rich extracts from Ataulfo mango seed. LWT, 148. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111653

Azi, F., Li, Z., Xu, P., & Dong, M. (2022). Transcriptomic analysis reveals the antibacterial mechanism of phenolic compounds from kefir fermented soy whey against *Escherichia coli* 0157 : H7 and *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 383(1), 109953. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109953

Barros, G., Melo, C., Oliveira, M., Silva, J., Santos, R., & Oliveira, S. (2020). Impacto financiero de la terapia con antibióticos en la resistencia a múltiples fármacos bacterianos en un hospital de emergencia en Pernambuco, Brasil. Ars Pharmaceutica, 61(2), 121–126. http://dx.doi.org/10.30827/ars.v61i2.115337

Babii, C., Bahrin, L. G., Neagu, A., Gostin, I., Mihasan, M., Birsa, L. M., & Stefan, M. (2016). Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids. https://doi.org/10.1111/jam.13048

Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. Frontiers in Microbiology, 10(APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829

Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(4), 1457–1474. https://doi.org/10.1002/jsfa.9357

Brahmi, F., Blando, F., Sellami, R., Mehdi, S., De Bellis, L., Negro, C., Haddadi-Guemghar, H., Madani, K., & Makhlouf-Boulekbache, L. (2022). Optimization of the conditions for ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. flowers and comparison with conventional procedures. Industrial Crops and Products, 184, 114977. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114977

Casadey, R., Challier, C., Altamirano, M., Spesia, M. B., & Criado, S. (2021). Antioxidant and antimicrobial properties of tyrosol and derivative- compounds in the presence of vitamin B2. Assays of synergistic antioxidant effect with commercial food additives. Food Chemistry, 335, 127576. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127576

Calder, M., & Iztapalapa, U. (2016). LWT - Food Science and Technology Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado

byproducts Jos e. 65, 46–52. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.048

Diarra, M. S., Hassan, Y. I., Block, G. S., Drover, J. C. G., Delaquis, P., & Oomah, B. D. (2020). Antibacterial activities of a polyphenolic-rich extract prepared from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) fruit pomace against *Listeria* spp. Lwt, 123, 109056. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109056

Garmus, T. T., Paviani, L. C., Queiroga, C. L., & Cabral, F. A. (2015). Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin *(Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO2, ethanol and water as solvents. Journal of Supercritical Fluids, 99, 68–75. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.016

Gomes, F., Martins, N., Barros, L., Elisa, M., Oliveira, M. B. P. P., Henriques, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus,* the dairy industry pathogen. Industrial Crops & Products, 112, 515–520. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.027

Li, F., Chen, B., Han, Y., Cao, Y., Hong, X., & Xu, M. (2021). Enhanced adsorption of caprolactam on phenols-modified Amberlita XAD16. 161. Reactive and Functional Polymers.161. https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104850

Loureiro, R. J., Roque, F., Teixeira Rodrigues, A., Herdeiro, M. T., & Ramalheira, E. (2016). Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. Revista Portuguesa de Saude Publica, 34(1), 77–84. https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003

Lourenço, S. C., Campos, D. A., Gómez-García, R., Pintado, M., Oliveira, M. C., Santos, D. I., Corrêa-Filho, L. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2021). Optimization of natural antioxidants extraction from pineapple peel and their stabilization by spray drying. Foods, 10(6). https://doi.org/10.3390/foods10061255

Luque-Garcia, J., & Luque de Castro, M. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22(1), 41–47. https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1016/S0165-9936(03)00102-X

M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Boudhrioua, N. M. (2014). Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds. Food Reviews International, 30(4), 265–290. https://doi.org/10.1080/87559129.2014.924139

Makkar, H. P. S. (2003). Makkar, H. P. S. (2003). Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage, 49–51. doi:10.1007/978-94-017-0273-7_3. 2, 49–51.

Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., De Peña, M. P., & Cid, C. (2015). Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. Journal of Functional Foods, 12, 365–374. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.006

Ortega-Vidal, J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Martínez-Bailén, M., Salido, S., & Altarejos, J. (2022). Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood residue of European plum (*Prunus domestica* L.). Industrial Crops and Products, 176.

https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114296

Pastoriza, S., Ru, A., & Jim, A. (2015). Revalorization of coffee by-products . Prebiotic , antimicrobial and antioxidant properties. LWT - Food Science and Technology. 61, 12–18. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.031

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. Food Research International, 41(3), 274–285. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004

Rasheed, A., Cobham, E., Zeighami, M., & Ong, S. (2012). Extraction of Phenolic Compouds from Pineapple Fruit. The 2nd International Symposium on Processing & Drying of Foods, Vegetables and Fruits, 3–7.

Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulate* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. Journal of Food and Drug Analysis, 25(3), 488–500. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010

Salman, S., Öz, G., Felek, R., Haznedar, A., Turna, T., & Özdemir, F. (2022). Effects of fermentation time on phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of green, oolong, and black teas. Food Bioscience, 49, 101884. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101884

Selahvarzi, A., Ramezan, Y., Reza, M., & Namdar, B. (2022). Food Bioscience Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from pomegranate and orange peels and their antioxidant activity in a functional drink. Food Bioscience, 49, 101918. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101918

Serna, L., & Enríquez, C. E. (2013). Antimicrobial activity of Weisella confusa and its metabolites against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae.* Revista Colombiana de Biotecnolgía, 15(2), 63–70. https://doi:1015446/rev.colomb.biote.v15n2.34979

Torres-León, C., Rojas, R., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R., & Aguilar, C. N. (2017). Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. Food and Bioproducts Processing, 105, 188–196. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.005

Venkateswara, M., Singh, A., Sunil, C. K., & Rawson, A. (2021). Trends in Food Science & Technology Ultrasonication - A green technology extraction technique for spices : A review. Trends in Food Science & Technology, 116, 975–991. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.006

Yuste, S., Ludwig, I. A., Rubió, L., Romero, M., & Pedret, A. (2019). In vivo biotransformation of (poly) phenols and anthocyanins of red-fleshed apple and identification of intake biomarkers. Journal of Functional Foods, 55,146–155. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.013

Zaidan, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A., & Zakiah, I. (2005). In

vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Tropical Biomedicine, 22(2), 165–170.

Zamuz, S., Munekata, P. E. S., Dzuvor, C. K. O., Zhang, W., Sant'Ana, A. S., & Lorenzo, J. M. (2021). The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food. A review. Trends in Food Science and Technology, 110,385–392. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.068

Zeng, W., He, Q., Sun, Q., Zhong, K., & Gao, H. (2012). International Journal of Food Microbiology Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*. International Journal of Food Microbiology, 153(1–2), 78–84. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.019

4 Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los residuos de la piña MD2, cáscara y corazón, sirven como sustrato de FE debido a su composición química y física. Los carbohidratos y minerales presentes en los residuos de piña permiten un rápido crecimiento radial de *Aspergillus niger* GH1, microorganismo fermentador usado en este estudio.

La FES es un método biotecnológico eficiente para la obtención de compuestos fenólicos totales con capacidad antioxidante y producción de enzimas fundamentales para llevar a cabo el proceso fermentativo. Compuestos con alta actividad biológica como ácido p-cumaroil glicólico y el éster etílico del ácido p-cumárico identificados mediante HPL-MS están presentes en los residuos de piña fermentados.

La optimización usando un diseño experimental de superficie de respuesta (Box- Behnken) permite predecir por medio de un polinomio de segundo orden la cantidad de compuestos fenólicos totales presentes en la hora 32 de FES de residuos de piña MD2 obtenidos con ultrasonido. Esta optimización llevó a la conclusión de que la combinación de un método biotecnológico, un método convencional (extracción sólido-liquido) y un método no convencional (ultrasonido) es una estrategia viable para una liberación significativa de compuestos fenólicos con capacidad antimicrobiana contra *S. aureus* y *L. monocytogenes.* Con el uso de estas técnicas amigables con el medio ambiental, y de fácil uso, se logra mitigar la contaminación producida por la disposición final de residuos como el evaluado en este trabajo.

4.2 Recomendaciones

Incorporar la metodología biotecnología de fermentación en estado sólido para el tratamiento de residuos en plantas agroindustriales de piña y evaluar el costo-beneficio de este cambio.

Remplazar en un alimento, antioxidantes sintéticos como BHA y BHT por extracto obtenido de la FES de residuos de piña para evaluar su eficacia.

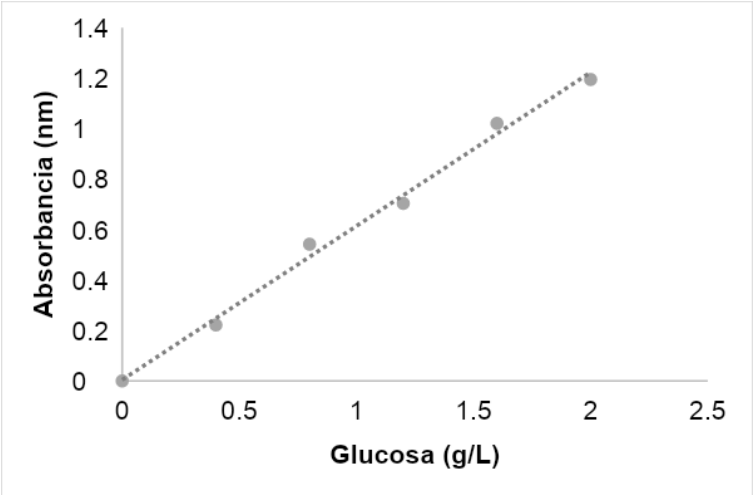
Incorporar el extracto obtenido en la optimización de extracción de compuestos fenólicos totales como aditivo en una película o recubrimiento alimentario funcional y evaluar su función como agente antioxidante y antimicrobiano.

Caracterizar la torta o precipitado después de hacer la extracción.

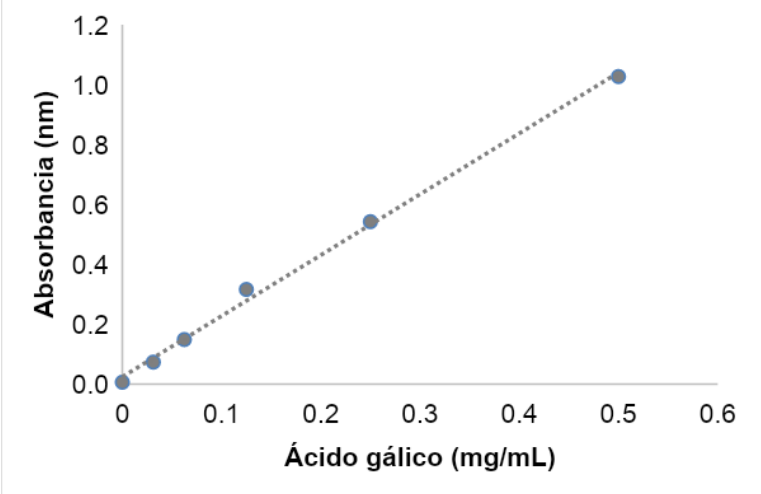
Investigar el fenómeno que causa la inhibición bacteriana por ejemplo con el uso de técnicas robustas de biología molecular.

5 Anexos

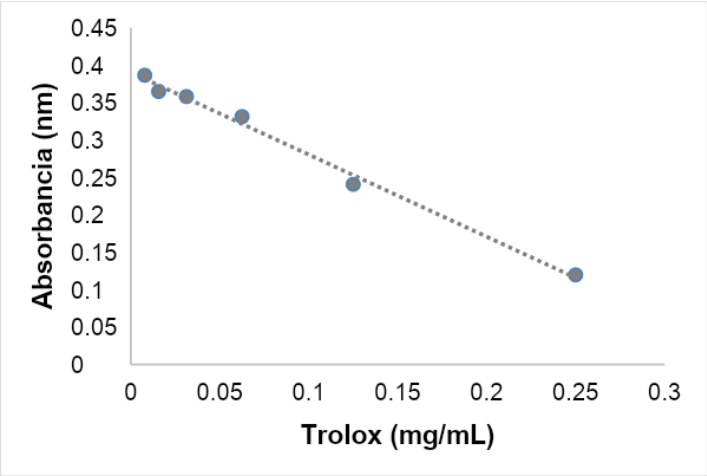
Anexo 1. Curva de calibración de azúcares reductores con glucosa.



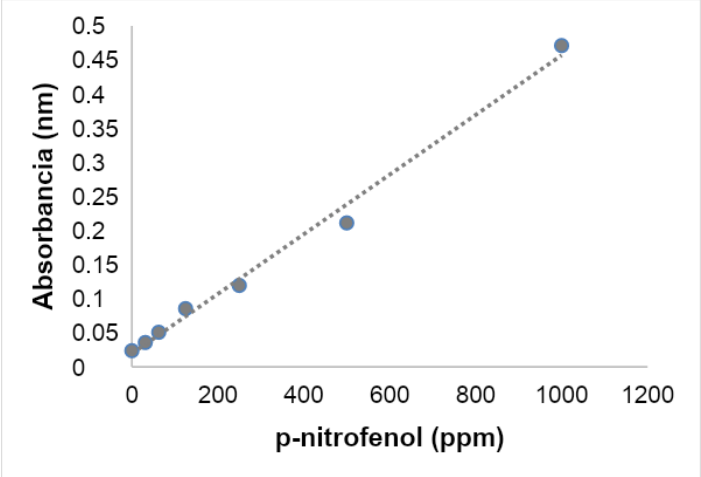
Anexo 2. Curva de calibración de contenido fenólico con ácido gálico.



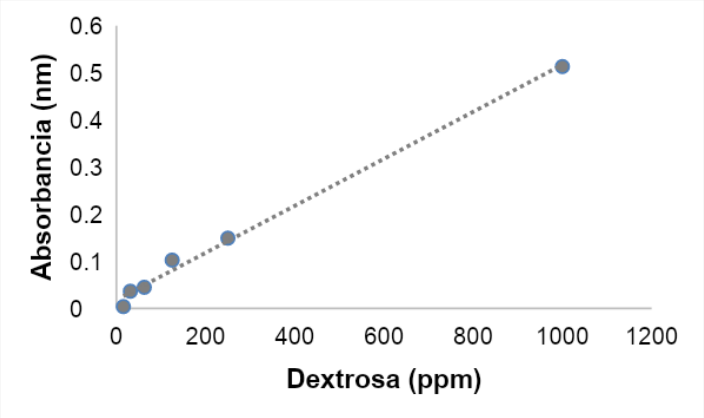
Anexo 3. Curva de calibración de capacidad antioxidante con trolox.



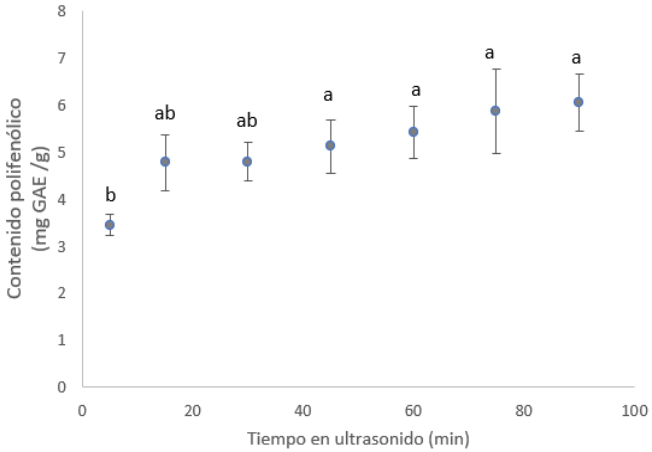
Anexo 4. Curva de calibración de actividad de β-glucosidasa con p-nitrofenol.



Anexo 5. Curva de calibración de actividad de celulasa con dextrosa.



Anexo 6. Extracción de compuestos fenólicos vs tiempo de extracción sólido: líquido en ultrasonido.



Anexo 7. Reconocimientos

- Noticia: Alumna destacada de la Universidad Nacional de Colombia realizó estancia en la UA de C. EL HERALDO DE SALTILLO. Mayo, 2022. https://www.elheraldodesaltillo.mx/2022/05/13/alumna-destacada-de-la-universidad-nacional-de-colombia-realizo-estancia-en-la-ua-de-c/

- Noticia UNAL: Estudiante de la UNAL Medellín se destaca en pasantía en México por su investigación posgradual. Junio. 2022.

https://medellin.unal.edu.co/noticias/4718-estudiante-de-la-unal-medellin-se-destaca-en-pasantia-en-mexico-por-su-investigacion-posgradual.html

Sarah Lucía Paz Arteaga es ingeniera agroindustrial de la UNAL Palmira. Foto: cortesía Miguel Soriano

- Ganadora por la mejor ponencia presentada en modalidad poster en la sesión de Bioprocesos. III Simposio virtual de estudiantes y egresados en biotecnología y áreas afines. Universidad Nacional de Colombia. Septiembre,2022.

Las Facultades de Ciencias de las Sedes Bogotá y Medellín

Otorgan el presente reconocimiento a

Sarah Lucía Paz Arteaga

C.C. 1151963566

Como ganadora por la mejor ponencia presentada en modalidad de póster en la sesión de Bioprocesos, en el Evento

III Simposio Virtual de Estudiantes y Egresados en Biotecnología y áreas afines

Con el trabajo titulado

"Fermentación en estado sólido para liberación de compuestos fenólicos a partir de residuos de piña MD2"

- Articulo sometido en la revista Food chemistry (Manuscript number: FOODCHEM-D-22-00740). Prospects for the valorization of pineapple waste: chemical, functional and biotechnological potential.