

**Evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana del tocosh de papa
(*Solanum tuberosum*)**

Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of potato (*Solanum tuberosum*) tocosh

Yábar Villanueva, E⁽¹⁾, Reyes De la Cruz, V⁽¹⁾, Casas Vásquez, J⁽¹⁾

⁽¹⁾ Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional del Centro del Perú
E- Mail: eyabar@uncp.edu.pe

Resumen: Se ha evaluado la actividad antioxidante y antimicrobiana del tocosh y de suero de tocosh durante su fermentación. Se utilizó Tocosh fermentado en laboratorio y tocosh elaborado artesanalmente, también se utilizó suero de tocosh (agua de la papa fermentada concentrada hasta 10, 20 y 30%). Se determinó la actividad antioxidante método DPPH^{••}. Se determinó la actividad antibacteriana mediante el porcentaje de inhibición (difusión en disco Kirby y Bauer) con discos de ampicilina 20 µg como referencia para *E. coli* y oxacilina 1 µg para *S. aureus* y la concentración mínima inhibitoria de los extractos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante micro dilución en caldo. El incremento de la actividad antioxidante y del porcentaje de inhibición frente a *E. coli* y *S. aureus* tienen una tendencia logarítmica, con valores más altos a los 30 días de fermentación. *E. coli* es resistente a los sueros del tocosh, intermedio al tocosh artesanal y sensible al tocosh de laboratorio, indicando que el tocosh de laboratorio presenta mayor porcentaje de inhibición, mientras que *S. aureus* es sensible a los dos tipos de tocosh, indicando que el tocosh como extracto tiene mayor actividad antibacteriana comparada al suero de tocosh. La actividad mínima inhibitoria del tocosh frente a *E. coli* es 25% y frente a *S. aureus* es 0.781%, demostrando que el tocosh inhibe a *S. aureus* significativamente más que a *E. coli*.

Palabras clave: porcentaje de inhibición, Actividad mínima inhibitoria, extracto de tocosh, suero de tocosh

Abstract: The antioxidant and antibacterial activity of tocosh and tocosh serum has been evaluated during fermentation. Tocosh fermented in laboratory and traditional tocosh were used, and tocosh serum (fermented potato water concentrated up to 10, 20 and 30%) was used. Antioxidant activity (DPPH^{••} method) was determined. The antibacterial activity was determined by inhibition percentage (Kirby and Bauer disc diffusion) with 20 µg ampicillin discs as a reference for *E. coli* and oxacillin 1 µg for *S. aureus* and the minimum inhibitory concentration of the extracts against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* subsp. aureus ATCC 25923 by micro dilution in broth. The increase in antioxidant activity and inhibition percentage against *E. coli* and *S. aureus* have a logarithmic tendency, with higher values at 30 days of fermentation. *E. coli* is resistant to tocosh serum, intermediate to traditional tocosh and sensitive to laboratory tocosh, indicating that laboratory tocosh has a higher inhibition percentage, while *S. aureus* is sensitive to both types of tocosh, indicating that Tocosh as an extract has a higher antibacterial activity compared to tocosh serum. The minimum inhibitory concentration of tocosh against *E. coli* is 25% and against *S. aureus* is 0.781%, by demonstrating that tocosh inhibits *S. aureus* significantly more than *E. coli*.

Key words: inhibition percentage, minimum inhibitory concentration, tocosh extract, tocosh serum

1. Introducción

El tocosh, resultado de la fermentación-putrefacción bacteriana de la papa, almacenada en pozos construidos en la tierra, envueltos en paja y presionados mecánicamente con piedras bajo una corriente de agua de manantial, es tradicionalmente considerado como antibiótico natural y muy apreciado por los consumidores a pesar de su olor muy desagradable, fortalece el sistema inmunológico, posee actividad antioxidante y citoprotectora sobre la mucosa gástrica. Debido a la escasa información científica realizada sobre las propiedades medicinales del tocosh, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana del tocosh y del suero de tocosh durante su procesamiento.

La fermentación mejora la actividad antioxidante debido a un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides resultado de una hidrólisis microbiana, induce la descomposición estructural de las paredes celulares de las plantas, que lleva a la liberación o síntesis de varios compuestos antioxidantes (Hur et al., 2014). La fermentación láctica produce ácido láctico como producto principal, bacteriocinas, exopolisacáridos (EPS), compuestos aromáticos, enzimas, vitaminas B (principalmente folato, riboflavina, cobalamina), mejor conservación del ácido ascórbico, glutatión, polioles bajos en calorías (manitol, sorbitol), que mejoran la seguridad, la calidad nutricional, propiedades sensoriales y actividad antioxidante, el aumento de la actividad antioxidante durante la fermentación se atribuye principalmente a la liberación de compuestos bioactivos por parte de las bacterias ácido lácticas (Fessard et al., 2017). Por lo tanto el tocosh al ser un producto fermentado puede presentar gran actividad antioxidante y así alta actividad antibacteriana.

2. Materiales y Métodos

Se utilizó tocosh fermentado en laboratorio y tocosh elaborado artesanalmente, también se utilizó suero de tocosh (agua de la papa fermentada) concentrada hasta 10, 20 y 30%.

Se utilizaron los siguientes Métodos

- i. Actividad antioxidante: Método DPPH^{••} propuesto por Brand-Williams et al. (1995).
- ii. Análisis químico mediante cromatografía de gas-MS (servicio Universidad Nacional de Ingeniería)
- iii. Determinación de la actividad antibacteriana

Se determinó el porcentaje de inhibición y la concentración mínima inhibitoria de los extractos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 Código: R4607050 Marca: REMEL procedencia:USA y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 Código: R4607010 Marca: REMEL Procedencia: USA.

Método difusión en disco (Método de Kirby y Bauer). Se usó Discos de sensibilidad en blanco cartucho por 50 unidades Marca: REMEL y como antibióticos de referencia se usó Disco de sensibilidad de ampicilina 20 µg x 50 discos lote 2217951 para *E. coli* y Disco de sensibilidad de oxacilina 1 µg x 50 discos lote 2248254 para *S. aureus*. Cada ensayo se repitió tres veces (CLSI MO2–A12 ,2015)

- Para *E. coli*: Pasterán F, Galas M. (2008)
- Para *S aureus*: **Sacsaquispe** RE, Velásquez J. (2002)

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando vernier con pantalla digital. Una vez obtenido el diámetro de inhibición de los discos se procedió a calcular el porcentaje de inhibición respecto al antibiótico de referencia:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro inhibición de muestra} \times 100}{\text{Diámetro inhibición antibiotico referencia}}$$

Se interpretó los resultados según estándares interpretativos de zona de diámetro y actividad mínima inhibitoria para las bacterias estudiadas (CLSI M100-S22, 2012)

iv. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Método de micro dilución en caldo. Pasterán F, Galas M. (2008).

Se realizaron diluciones seriadas a la mitad en caldo Mueller Hinton (MH) – OXOID como sigue 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.000156, 0.000078, 0.000039 de extracto concentrado de tocosh/mL. Se emplearon dos controles: el primero fue el control positivo (caldo MH al que se añadió la suspensión bacteriana) y el segundo fue el control negativo (caldo MH sin antimicrobiano y sin suspensión bacteriana). Las diluciones en serie de los extractos crudos en caldo y las suspensiones bacterianas se añadieron a las Microplacas en blanco de 96 micropocillos la concentración de 5×10^8 organismos/mL (McFarland Equivalence Turbidity

Standard 0.5 Código: R20410: REMEL Presentación: UNIDAD Procedencia: USA) Los valores de MIC se determinaron como las concentraciones más bajas que impiden el crecimiento visible. La lectura se realizó a 620 nm en el lector de microplacas Biotek ELX808.

3. Resultados

3.1. Actividad antioxidante

Se diferenció la actividad antioxidante del extracto de tocosh y del suero (fig 1), además se evaluó la actividad antioxidante durante su fermentación (fig 2)

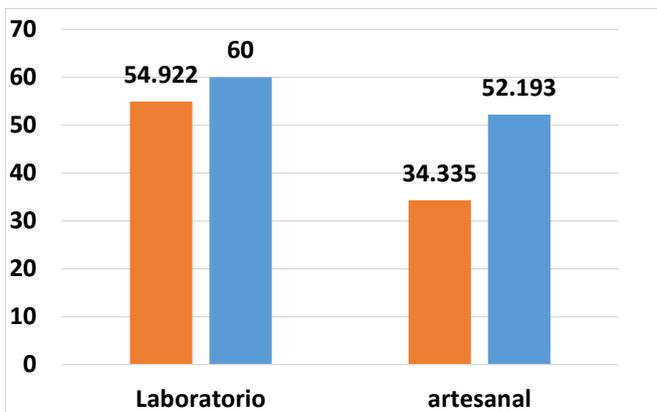


Figura 1. Capacidad antioxidante del tocosh fermentado artesanal y en laboratorio

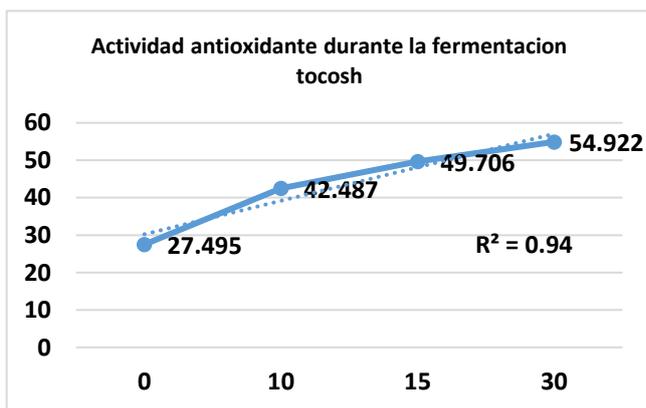


Figura 2. Actividad antioxidante durante la fermentación del tocosh

3.2 Actividad antibacteriana

3.2.1 Porcentaje de inhibición

Se determinó el porcentaje de inhibición de diferentes sueros (100% =suero sin concentrar) y sueros concentrados hasta 10, 20 y 30 % de su volumen y se comparó con el tocosh artesanal y de laboratorio (fig. 3) además se evaluó el porcentaje de

inhibición frente a las dos bacterias durante la fermentación (fig.4).

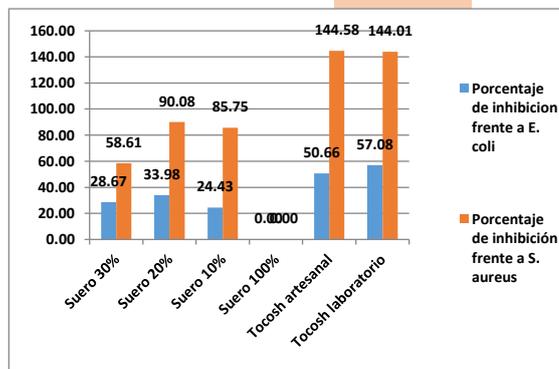


Figura 3. Porcentaje de inhibición de tocosh frente a E. coli y S. aureus

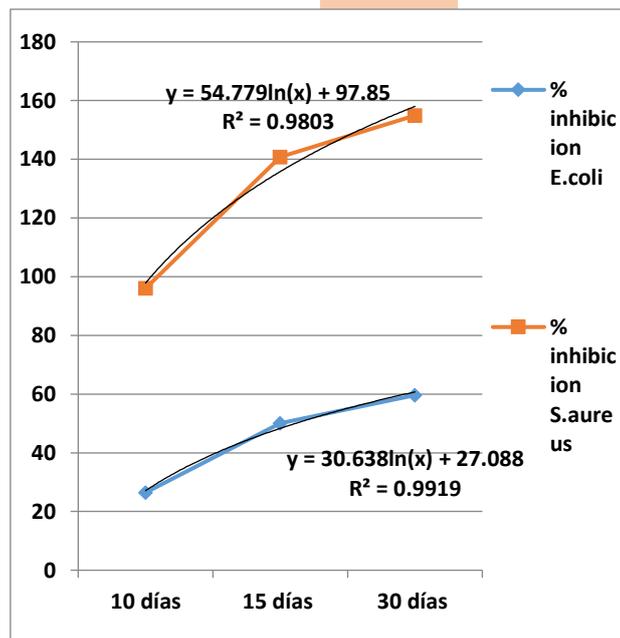


Figura 4. Porcentaje de inhibición del tocosh durante fermentación frente a E. coli y S. aureus

3.2.2 Actividad mínima inhibitoria (MIC)

Se determinó la dilución que no presenta crecimiento bacteriano frente a *E. coli* (fig. 5) y frente a *S. aureus* (fig. 6).

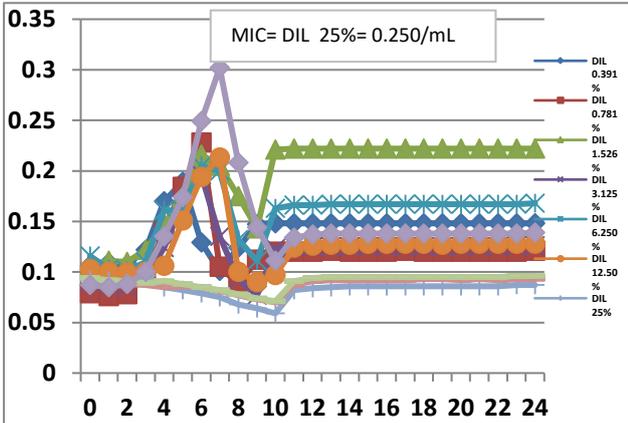


Figura 5. Actividad mínima inhibitoria del tocosh frente a *E.coli*

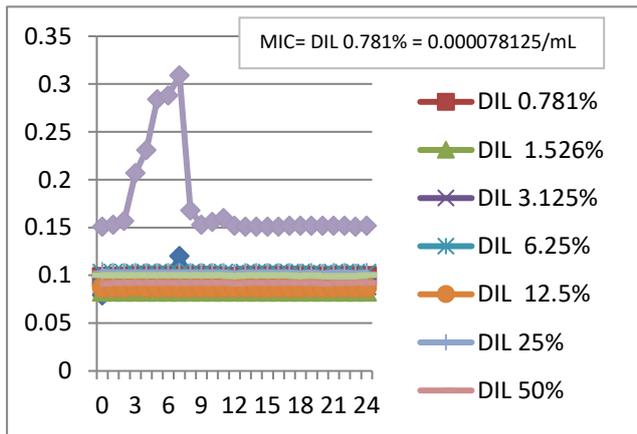


Figura 6. Actividad mínima inhibitoria del tocosh frente a *S. aureus*

b. Análisis químico.

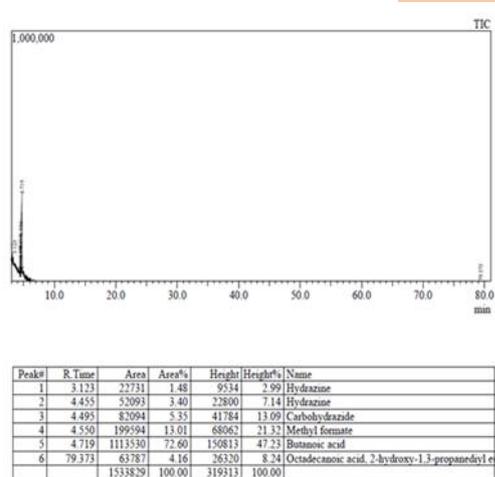


Figura 7. Compuestos químicos detectados en extracto de tocosh cromatografía de gas-MS

4. Discusion

El suero y el tocosh concentrado obtenido por fermentación en laboratorio presentaron mayor actividad antioxidante comparado al suero y tocosh fermentado artesanalmente, esto podría deberse a las condiciones de fermentación controladas en laboratorio. Con este resultado se confirma la actividad antioxidante y el efecto citoprotector del tocosh (Sandoval MH y col 2015). Por otro lado, el incremento de la actividad antioxidante durante la fermentación tiene una tendencia logarítmica con $R^2=0,94$ lográndose la mayor concentración 926.276 ± 59.19 (μ mol trolox g^{-1}) ó $54.922\% \pm 3.51$ a 30 días de fermentación.

En la figura 3 se puede observar que tocosh y suero inhiben al *S.aureus* significativamente más que a *E. coli*, sin embargo el tocosh inhibe a las bacterias mucho más que el suero, también se puede observar que no hay diferencia significativa entre el tocosh artesanal y de laboratorio frente a las dos bacterias estudiadas. La concentración del suero hasta 20% presenta mayor porcentaje de inhibición.

Según el estándar interpretativo de ampicilina ≥ 17 ; $I=14-16$; $R\leq 13$, el *E.coli* ATCC 25922 es resistente a los sueros, intermedio al tocosh artesanal y sensible al tocosh de laboratorio.

Según el estándar interpretativo de oxacilina $S\geq 13$; $I=11-12$; $R\leq 10$, el *S. aureus* ATCC 25923 es resistente al suero no concentrado y al suero concentrado hasta 30% , Intermedio a los sueros concentrados a 20 y 10 % y Sensible al tocosh tanto artesanal y de laboratorio.

En un estudio se determinó el efecto antibacteriano in vitro de *Solanum tuberosum* (papa fermentada) en cepas de

Escherichia coli con gentamicina el cual superó en sensibilidad comparado con ceftriaxona que fue en gran medida Moderadamente Sensible o Intermedio (Pesantes, 2015).

El incremento del porcentaje de inhibición durante la fermentación tiene tendencia logarítmica con $R^2=0.9803$ para *E. coli* y $R^2=0.9919$ para *S. aureus*, lográndose el mayor porcentaje de inhibición a los 30 días de fermentación con halos de 18.41 mm en promedio y 59.64% de inhibición para *E.coli* y 21.86 mm en promedio y 154.92% de inhibición para *S. aureus*, indicando el tocosh inhibe *S. aureus* significativamente más que *E. coli*.

Las condiciones particulares en las cuales se da el proceso de fermentación permiten el crecimiento de bacterias ácido lácticas. El perfil microbiano del tocosh reveló *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides* como las principales especies de LAB presentes durante la fermentación, los cuales mostraron actividades antibacterianas, así como la capacidad de producción de aminos biogénicas. (Jimenez y col 2018)

Según el análisis químico en cromatografía de gas se determinó un componente principal que es el ácido octadecanoico o ácido esteárico que podría contribuir con la actividad antimicrobiana y que según Quillana E. y col (2012) muchos de los productos metabólicos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, reuterina y bacteriocinas, contribuyen con la actividad antibacteriana, por ello realizó la búsqueda de cepas lácticas productoras de sustancias antimicrobianas y cepas sensibles a los compuestos en mención, mediante las técnicas de bicapa y difusión en agar, enfrentándolas unas contra otras en grupos de 10 y concluyó que *Lactobacillus plantarum Tsh.pa* y *Tsh.IIIa* son las mejores cepas, que muestran mayor capacidad antagonista frente a cepas taxonómicamente afines y con posibilidades de ser utilizadas como bioconservantes de alimentos.

Según las figuras 5 y 6, la actividad mínima inhibitoria del tocosh es la dilución en la cual no existe crecimiento bacteriano y cuya curva se asemeja al control (-). El MIC frente a *E.coli* se observa en la dilución 2 es decir no existe crecimiento bacteriano hasta 25% de extracto de tocosh (0.250 ml de extracto de tocosh/mL de solución) y se observa crecimiento de *E.coli* a concentraciones más bajas. El MIC frente a *S. aureus* es la dilución 0.781% es decir no existe crecimiento de *S. aureus* hasta la dilución 0.781% (0.000078125mL de extracto de tocosh /mL solución).

5. Conclusiones

- El incremento de la actividad antioxidante y del porcentaje de inhibición frente a *E. coli* y *S. aureus* tienen una tendencia logarítmica durante la fermentación.
- *E.coli* ATCC 25922 es resistente a los sueros del tocosh, intermedio al tocosh artesanal y sensible al tocosh de laboratorio, indicando que el tocosh fermentado en condiciones de laboratorio presenta mayor porcentaje de inhibición, mientras que *S. aureus* ATCC 25923 es resistente al suero no concentrado, Intermedio a los sueros concentrados 20 y 10 % y Sensible al tocosh tanto artesanal y de laboratorio.
- La actividad mínima inhibitoria del tocosh frente a *E.coli* es 25% y frente a *S. aureus* es 0.781%, demostrando que el tocosh inhibe a *S.aureus* significativamente más que a *E. coli*.

Agradecimientos: Los autores pueden reconocer a las personas o instituciones que han contribuido de alguna manera con la investigación.

Contribución de los autores: Emilio Yábar, realizó los análisis e interpretación de la actividad antioxidante. Vilma Reyes realizó el análisis y la interpretación de la actividad antimicrobiana. José Casas realizó el análisis e interpretación estadística. Todos los autores revisaron el manuscrito.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Referencias bibliográficas

- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LebensmittelWissenschaft und Technologie*: 28(1), 25-30 (1995).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). M100-S22 Vol 32-No 3 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty second informational supplement 22nd edition
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). MO2 –A12 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standards 12th edition

- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2012) M07-A9 Vol. 32 No. 2 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.
- Fessard, A., Kapoor, A., Patche, J., Assemat, S., Hoarau, M., Bourdon, E., Bahorun, T., & Remize, F. (2017). Lactic Fermentation as an Efficient Tool to Enhance the Antioxidant Activity of Tropical Fruit Juices and Teas. *Microorganisms*, 5 (23),
- Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y-C., Inwook Choi, I., & Kim, G-B. (2014). Review Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods, *Food Chemistry*, 160:1, 346-356.
- Jimenez E, Yepez A, Perez-Cataluña A, Ramos E, Zúñiga D, Vignolo G, Aznar R. Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes – by high throughput sequencing (HTS) and culturing LWT - Food Science and Technology 87(2018) 567-574
- Pasterán F, Galas M. (2008) Manual de Dto. Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” Centro Regional Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y E. coli de Referencia WHO-Global Salm Surv para América del Sur.
- Pesantes, P.P. (2015). Efecto antibacteriano in vitro de *Solanum tuberosum* (papa fermentada) en cepas de *Escherichia coli* comparado con gentamicina y ceftriaxona. Tesis para optar el título de médico cirujano. Facultad de medicina humana. Universidad Privada Antenor Orrego
- Quillama, E., Dávila, S., Medina, A., Avalos C. & Paredes D. (2012). Selección de cepas nativas de bacterias lácticas con capacidad antagonista para su uso en la fermentación de «tocosh». XXI RC ICBAR. Resúmenes – Biotecnología. Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria. Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM, Lima–Perú
- Sacsquispe RE, Velásquez J. (2002) Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30. Instituto Nacional de Salud
- Sandoval, M., Tenorio, J., Tinco, A., Loli, R., & Calderón, S. (2015). Efecto antioxidante y citoprotector del tocosh de *Solanum tuberosum* ‘papa’ en la mucosa gástrica de animales de experimentación. *Anales de la Facultad de Medicina*; 76(1):15-20.