

Artículo original

Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos de semillas de *Persea americana* Mill. "palta hass" frente a *Escherichia coli*

Antibacterial activity of phenolic compounds from seed of *Persea americana* Mill. "Hass avocado" front *Escherichia coli*

Lía Romaní¹, Edwin Enciso¹, Víctor Cárdenas², Yovani M. Condorhuamán³

¹ Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias de la Salud.

² Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Biológicas.

³ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Resumen

En el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos de la fracción de acetato de etilo de la semilla de *Persea americana* Mill. "palta Hass". Las paltas fueron recolectadas en la provincia de Huanta y las semillas sometidas a un proceso de extracción etanólica, desengrasado con éter de petróleo y finalmente extraídas con acetato de etilo. Los compuestos fenólicos fueron aislados por cromatografía en capa fina e identificados por espectrofotometría ultravioleta. Se empleó el método de difusión de discos de Kirby Bauer utilizando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y ensayadas a concentraciones de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 y 15,0%; como control se utilizó ciprofloxacino 30 µg. La fracción de acetato de etilo presentó compuestos fenólicos y flavonoides, mostró actividad antibacteriana de 81,5% de inhibición al 10%; concentración mínima inhibitoria de 0,625 mg/mL y concentración mínima bactericida de 1,250 mg/mL con halos de inhibición estadísticamente significativos $p < 0,05$. Se concluye que la fracción de acetato de etilo de la semilla de *Persea americana* Mill. tiene compuestos fenólicos con actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 35218.

Palabras clave: *Persea americana* Mill.; actividad antibacteriana; compuestos fenólicos; *Escherichia coli* ATCC 35218.

Abstract

In the present study was determined the antibacterial activity of the phenolic compounds of the ethyl acetate fraction isolated from *Persea americana* Mill. seed "Hass avocado". The avocados were harvested in the province of Huanta and the seeds were subjected to an ethanolic extraction process, degassed with petroleum ether and finally extracted with ethyl acetate. The phenolic compounds were isolated by thin layer chromatography and identified by ultraviolet spectrophotometry. The Kirby Bauer disc diffusion method was used using the strains of *Escherichia coli* ATCC 35218; Which were tested at concentrations of 1, 2,5, 5, 10 and 15%; ciprofloxacin 30 µg was used as the control. The ethyl acetate fraction showed phenolic compounds and flavonoids, showed an antibacterial activity of 81,5% inhibition at 10%; minimum inhibitory concentration of 0,625 mg/mL and minimum bactericidal concentration of 1,250 mg/mL with statistically significant inhibition halos $p < 0,05$. Was concluded that the ethyl acetate fraction from the *Persea americana* Mill. seed has phenolic compounds with antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 35218.

Keywords: *Persea americana* Mill.; antibacterial activity; phenolic compounds; *Escherichia coli* ATCC 35218.

Correspondencia:

Edwin Enciso Roca
Portal Independencia N° 57 UNSCH Ayacucho
Email: encisoqf@hotmail.com

Recibido: 04/06/2016; **aceptado:** 29/09/2017

Citar como:

Romaní L, Enciso E, Cárdenas V, Condorhuamán YM. Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos de semillas de *Persea americana* Mill. "palta hass" frente a *Escherichia coli*. *Ciencia e Investigación* 2017 20(2):19-22.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercial_Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales con fines medicinales tienen un valor importante para el desarrollo de las investigaciones farmacológicas, como insumo en la síntesis de nuevos fármacos o principios activos. Actualmente estamos expuestos a muchas enfermedades de etiología microbiana que son tratadas con medicamentos validados y reconocidos (antimicrobianos), que al no ser administrados en forma correcta producen resistencia bacteriana.^{1,2}

Los compuestos polifenólicos son metabolitos activos; evidenciados en investigaciones *in vitro*, *in vivo* y en ensayos clínicos, que revelan indican que estos componentes proveen beneficios para la salud³. Los compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antibacteriana generalmente son compuestos fenólicos y polifenoles en las que se encuentran quinonas, flavonoides y taninos.⁴ Las comunidades rurales utilizan tradicionalmente las plantas como medio para curar sus enfermedades. En el área andina se cultivan diversas frutas y hortalizas, entre las que se encuentra la palta, que se consume principalmente en forma natural. La revalorización de estas frutas como de sus residuos o desechos vegetales, son poco conocidas fuera de sus regiones de origen, lo que sería de gran beneficio para el poblador rural del interior del Perú.^{5,6}

Persea americana Mill. (palta) pertenece a la familia Lauráceas y es originaria de Guatemala, México y parte de Centro América; es cultivada actualmente en casi todos los países de clima cálido y templado, incluido el Perú, que cuenta con una serie de microclimas, uno de estos con características aptas para el desarrollo de esta especie, particularmente en zonas cálidas de la provincia de Huanta y el Valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM).¹

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de *Persea americana* Mill. frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño de investigación fue experimental con posprueba única y grupo control,⁷ realizado en los laboratorios de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud y de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra de la especie vegetal estuvo constituida por tres kg de semillas de *Persea americana* Mill. “palta Hass” recolectadas en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

Obtención e identificación de la fracción acetato de etilo.- Para aislar el fraccionamiento de acetato de etilo, las semillas primero fueron secadas, molidas y maceradas con alcohol etílico al 96%, se realizó dos extracciones, evaporándose a sequedad el extracto, se extrajo la grasa con éter de petróleo, se hizo una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, usando un embudo de separación, para recobrar la fracción de acetato de etilo y volatilizar a sequedad. Los compuestos fenólicos presentes en esta fracción, fue-

ron evaluados con la reacción de Shinoda, por cromatografía en capa fina y por espectrofotometría UV.⁸⁻¹⁰

Determinación del halo de inhibición.- Se siguió la técnica por Kirby Bauer, a concentraciones de 1,0; 2,5, 5,0; 10,0; y 15,0% y como control positivo se empleó ciprofloxacino 30 µg, utilizando como medio de cultivo agar Müeller Hinton, en el que se observó la formación o no de halos de inhibición.¹¹

Determinación del porcentaje de inhibición.- Se usó la siguiente fórmula¹¹

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control}} \times 100$$

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).- Se utilizó el procedimiento de macro dilución, observando el crecimiento de la bacteria mediante la aparición de turbidez en el medio, o mediante cambio de color, por lo que el punto final de la CMI se definió a simple vista por la falta de turbidez en el caldo, para ello se compararon los tubos con el control de crecimiento.¹¹

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).- Se procedió a partir de la CMI, realizándose de la siguiente manera: una vez observada la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar, con la ayuda de un hisopo estéril, los caldos no turbios en las placas con agar Müeller Hinton, se incubó a 37 °C por 24 horas, verificando si hubo o no crecimiento de bacterias en las placas sembradas.¹¹

Análisis estadístico.- Los resultados fueron procesados con el análisis de varianza considerándose estadísticamente significativos para $p < 0,05$, empleando el paquete estadístico SPSS versión 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo de las semillas de *Persea americana* Mill. “palta Hass” sobre *Escherichia coli*, principal responsable de infecciones intestinales y urinarias. La actividad antibacteriana fue representada por la presencia de los halos de inhibición.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción descrita, separado de las semillas de *Persea americana* Mill. “palta Hass”, donde se puede apreciar la presencia de compuestos fenólicos, taninos y flavonoides; resultados similares a los reportados por Chávez⁶ quien determinó el contenido de fenoles en los extractos metanólico y acetó-

Tabla 1. Ensayo fitoquímico de la fracción de acetato de etilo de *Persea americana* Mill. “palta Hass”.

Ensayo	Metabolitos secundarios	Resultados	Características
Cloruro férrico	Fenoles	+++	Azul verdosa oscura
Gelatina	Taninos	++	Precipitado oscuro
Shinoda	Flavonoides	+++	Naranja rojizo

Legenda: (+) Escaso; (++) Regular; (+++) Abundante

nico de cáscara y semilla de aguacate según la prueba de Folin Ciocalteu y cuyos resultados determinaron mayor presencia en el extracto metanólico a diferencia del acetónico. Los mismos resultados se observaron en el contenido de flavonoides. Rengifo ¹² identificó triterpenos, quinonas, aminoácidos, flavonoides, compuestos fenólicos y trazas de lactonas en aceite de la semilla de palta *Persea americana* Mill. Var. Hass fuerte. Escobar *et al.* ⁵ identificaron taninos y flavonoides en el extracto etanólico de la semilla de *Persea americana*. Najarro ¹³ identificó taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides en extracto etanólico de las semillas de *Persea americana* Mill. y responsabiliza la actividad antibacteriana a los flavonoides. Ilozue *et al.* ¹⁴ identificaron en la semilla de *Persea americana*, esteroides, alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides y glucósidos cardíacos. Owusu *et al.* ¹⁵ determinaron que el extracto metanólico de las hojas de *Persea americana* Mill. muestra actividad antimicrobiana potente con las mayores zonas de inhibición (0 - 1,8 mm) en el ensayo de difusión en agar y con la más baja CMI en el ensayo de dilución en caldo contra un panel de microorganismos que incluye *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*; datos similares al obtenido apoyan el uso etnomedicinal de las hojas de *Persea americana* para el tratamiento de las infecciones.

En caso de la actividad antibacteriana, el uso de la técnica de difusión en disco Kirby Bauer permite un análisis preliminar eficaz para demostrar efectos antibacterianos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill. “palta Hass”. En la Figura 1 se puede observar la variación de halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo frente a la cepa en estudio, por lo que se puede evidenciar que todas las concentraciones muestran actividad inhibitoria sobre la cepa empleada. En la Figura 2 se aprecia que la fracción de acetato de etilo muestra un porcentaje de inhibición de 81,5% frente a cepa de *Escherichia coli* a una concentración de 10%, siendo estadísticamente similar a Ciprofloxacino, antibiótico que fue utilizado como estándar debido a que es el de elección en el tratamiento de infecciones intestinales y urinarias, en donde la *Escherichia coli* es el germen responsable en un 50%.

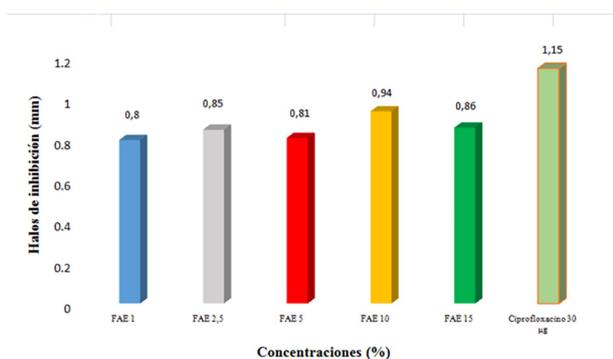


Figura 1. Variación de los halos de inhibición por las diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo. ANOVA p<0,05. FAE: fracción acetato de etilo.

La Tabla 2 muestra la CMI y CMB de la fracción de acetato de etilo frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218; con CMI de 0,625 mg/mL y CMB de 1,250 mg/mL, esto indica de que los fitoconstituyentes de las semillas de *Persea americana* Mill. tienen un alto potencial terapéutico que incluso trabajos científicos preliminares como reporta Najarro ¹³ en el extracto etanólico de la semilla, inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*. De igual manera, Gómez *et al.* ¹⁶ señalaron que los extractos etanólico y clorofórmico de la semillas inhiben el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando valores de CMI ≤ 50 mg/mL respectivamente en sus resultados.

Chávez ⁶ en su estudio realizado sobre evaluación antioxidante y antimicrobiana con extractos metanólico y acetónico de residuos de aguacate, contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, reportó que en extractos metanólico y acetónico de cáscara y semillas mostraron mayor capacidad antimicrobiana en los tres tipos de bacterias a diferencia de la cáscara, dicha actividad se debe a su alto contenido de fenoles y flavonoides. Así mismo, Escobar *et al.* ⁵ evaluaron el efecto antidiarreico a

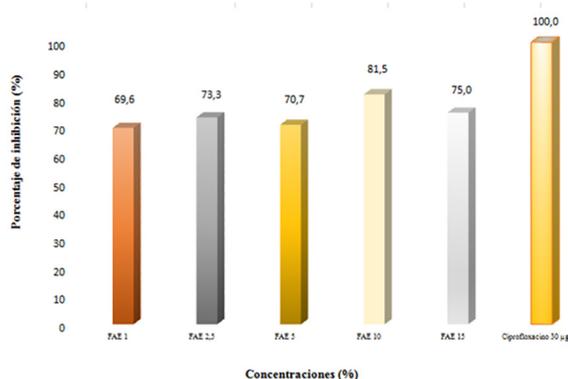


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la fracción de acetato de etilo frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 en comparación con ciprofloxacino.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de la fracción de acetato de etilo de la semilla de *Persea americana* Mill. “palta Hass”.

Número de los tubos	FAE 10% [] mg/mL	Inhibición y muerte de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
1	2,500	-
2	1,250	**
3	0,625	*
4	0,313	+
5	0,156	+
6	0,078	+
7	0,039	+
8	0,020	+
9	0,010	+
10	0,005	+
11	0,002	+
12	0,001	+
13	0,0006	+

Leyenda: No hubo crecimiento (-), Hubo crecimiento (+), CMI (*), CMB (**)

través de pruebas por inducción con *Escherichia coli* en ratas Wistar. Ilozue *et al.*¹⁴ determinaron la actividad antimicrobiana del extracto, con cuatro disolventes diferentes, de semillas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, utilizando técnicas de difusión en disco. El extracto de acetato de etilo demostró una actividad pronunciada contra los organismos de prueba. La actividad del extracto metanólico frente a *Staphylococcus aureus* fue alto, mientras que el de éter de petróleo fue mínima contra *Escherichia coli*.

El mecanismo responsable de la actividad antibacteriana de los fenoles puede estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados, posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacciones inespecíficas con las proteínas. La presencia de hidroxilos en los anillos le confiere a los flavonoides mayor actividad contra bacterias Gram positivas al inhibir la síntesis de ADN, en contraste con las Gram negativas, sobre las que la actividad es menor⁶.

El espectro de la actividad antimicrobiana exhibida por el extracto se podrían atribuir a la presencia de estos fitoconstituyentes, lo que podría significar que *Persea americana* Mill “palta Hass” representa una fuente potencial de agentes terapéuticos.

CONCLUSIONES

La fracción de acetato de etilo de las semillas de *Persea americana* Mill “palta Hass” presenta compuestos fenólicos con actividad antibacteriana a una concentración del 10% frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218, y la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de la fracción de acetato de etilo fue de 0,625 mg/mL y 1,250 mg/mL, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carhuapoma M, Angulo P. Plantas medicinales en atención primaria de salud agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectivas de desarrollo de la Región Los Libertadores Wari. Agencia Cooperación Técnica del Perú del Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. Lima; 1999.
- Ryan K, Ray C. Sherris: Microbiología médica 5ª ed. México DF: Mc Graw-Hill; 2016.
- Osuna L, Tapia M, Aguilar A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicanas para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Gráficas Rey; 2005.
- Mercado G, Carrillo L, Medrano A, López J, Álvarez E. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. Nutr Hosp, 2013;28(1):36-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>.
- Escobar M, Pinto D, Zabalaga S, Escalante A, Bustamante Z. Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de palto (*Persea americana*) y buganvilla (*Bougainvillea glabra*). BIOFARBO. 2010; 18(2):53-60. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632010000200006&script=sci_arttext.
- Chávez P. Evaluación antioxidante y antimicrobiana en extractos de residuos de aguacate. [Tesis de grado para optar al Título de Maestro en Ciencias en Recursos Naturales]. Obregón, Sonora: Instituto Tecnológico de Sonora; 2011. Disponible en: http://biblioteca.itson.mx/dac_new/tesis/309_chavez_pedro.pdf.
- Sampieri R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación, 5ª ed. México DF: Mc Graw- Hill; 2014.
- Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilax sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría para Optar al Grado Académico de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
- Villar del Fresno A. Farmacognosia general. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1999.
- Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio, farmacognosia y productos Naturales. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000.
- Granados R, Villaverde P. Microbiología: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general, parasitología general. 2ª ed. Madrid: Thomson editores; 2007.
- Rengifo P. Caracterización del aceite de la semilla de palta *Persea Americana* Mill. Var. Hass fuerte y medición de su actividad antioxidante, [Tesis de Doctor en Farmacia y Bioquímica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
- Najarro V. Actividad biológica del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill, “palto” frente a cepas de enterobacterias. [Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013
- Ilozue N, Ikezu U, Ugwu P. Anti-Microbial and Phytochemical Screening of the Seed Extracts of *Persea Americana*. JPBS. 2014;9(2):23-5. Disponible en: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol9-issue2/Version-6/F09262325.pdf>.
- Owusu N, Ama S, Mensah J, Badu M, Arhinand S, Mensah M. Phytoconstituents, antimicrobial and antioxidant properties of the leaves of *Persea americana* Mill cultivated in Ghana. JMPPR, 2015;9(36):933-9. DOI: 10.5897/JMPPR2015.5902.
- Gómez R, Arzate C, Quintanilla R, Tamez P, Tamez R, Monreal E, Rodríguez C. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Laurácea avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (spreng) Less (Astaraceae) leaf extracts and active fractions gainst *Mycobacterium tuberculosis*. Amer-Eur J Scient Res. 2008;3(2):188-94. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/3fd0/a028af296baec3af6a44c326002b03470173.pdf>.
- Idris S, Ndukwe G, Gimba E. Preliminary Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of seed extracts of *Persea americana* (Avocado pear). Bajopas, 2009;2(1):173-6. DOI: 10.4314/bajopas.v2i1.58538.