

ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL POLVO DE SEMILLAS DE AGUACATES

Luis E. Henríquez^{1}, Jairo H. Patiño¹ y Mario A. García²*

*¹Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria (INTAL), Carretera 50 G No. 12 Sur-91.
Itagüí, Colombia.*

**E-mail: director@fundacionintal.org*

²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, CP 13600. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La actividad antimicrobiana del polvo de semillas de aguacate (*Persea americana* Mill. var. *Hass*) se estimó por el método de la concentración mínima inhibitoria para cepas microbianas seleccionadas por su relación con el deterioro de productos cárnicos. El polvo de las semillas de aguacate inhibió el crecimiento de las cepas microbianas ensayadas, observándose resultados positivos a la menor concentración del aditivo (48,8 mg/L), lo que demuestra su potencial antimicrobiano para su aplicación en la formulación de alimentos para garantizar su inocuidad e incrementar su vida útil. Sin embargo, es necesario verificar su influencia en los cambios de los atributos sensoriales y eficacia antimicrobiana en diferentes productos.

Palabras clave: *Persea americana*, aguacates, semillas de aguacate, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Estimation of antimicrobial activity of avocado seeds powder
The antimicrobial activity of avocado (*Persea americana* Mill. var. *Hass*) seeds powder was assessed by the minimum inhibitory concentration method for microbial strains selected for their relationship with the spoilage of meat products. Avocado seeds powder inhibited the growth of microbial strains tested, with positive results at the lowest additive concentration (48.8 mg/L), demonstrating its potential as antimicrobial for use in the formulation of food to ensure safety and increase their shelf life. However, it is necessary to verify its influence on changes in the sensory attributes and antimicrobial efficacy in various products.

Keywords: *Persea americana*, avocado, avocado seeds, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

El aguacate es un producto que está incluido en la Agenda Interna de Productividad, Competitividad y Visión 2019 de Colombia. Es por esto que la Gobernación de Antioquia viene promocionando el cultivo de la variedad Hass y su comercialización. Las cifras de producción de aguacate en el país en 2010 fueron de 201 869 t (1). Sin embargo, simultáneas con este crecimiento, las pérdidas poscosecha son un factor limitante para la comercialización del producto; para minimizar este impacto y generar valor agregado se buscan alternativas tecnológicas que sean viables para

**Luis E. Henríquez Arias: Ingeniero Agrícola, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (2009). Actualmente se desempeña como responsable del Laboratorio de Empaques y Aptitud Sanitaria del Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria, donde participa en actividades de investigación y desarrollo relacionadas con la evaluación de envases y su relación con la vida útil de los alimentos.*

su industrialización; una de ellas es el aprovechamiento de los residuos de su procesamiento como las semillas, a partir de las cuales se obtiene un polvo con potencialidades como ingrediente antimicrobiano para mejorar la conservación e inocuidad de ciertos productos alimenticios.

En la actualidad existe un creciente interés por el empleo de extractos vegetales con actividad antimicrobiana (2-6), en aras de satisfacer las necesidades de los consumidores relacionadas con el consumo de alimentos sanos y sin aditivos químicos.

La eficacia antimicrobiana de los extractos vegetales que se observa en condiciones in vitro es diferente a su efecto en los sistemas alimenticios complejos (3), donde inciden las interacciones entre factores intrínsecos (pH, sal, antioxidantes y otros aditivos) y extrínsecos (temperatura, vacío, envasado en atmósfera modificada y características de los microorganismos) (7). Esto podría ser un reto en la utilización de los antimicrobianos naturales en la formulación de alimentos, al necesitarse una concentración más alta que podría dar lugar a cambios desfavorables en el sabor y aroma de los alimentos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del polvo de semillas de aguacate var. Hass mediante la estimación de su concentración mínima inhibitoria para cepas microbianas seleccionadas por su relación con el deterioro de productos cárnicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como parte del acondicionamiento de las semillas, estas se lavaron con agua potable y sumergieron en una disolución de Citrosan al 0,3 % (v/v) durante 10 min, para luego obtener trozos menores que 1 cm³ que se secaron a 55 °C durante 48 h. Al polvo obtenido en un molino Retsch (SM 2000, Alemania) se le determinó la distribución del tamaño de partículas mediante la prueba de los tamices, en la que se emplearon los tamices No. 20; 30; 40 y 50, con un tamaño de partículas entre 300 y 850 µm (ASTM E-11/95). El proceso de tamizado se realizó a una amplitud de vibración de 2 mm en período continuo durante los primeros 10 min y luego se incrementó a 2,5 mm durante otros 10 min y se pesaron las fracciones retenidas en las diferentes mallas.

La determinación de la concentración de los microorganismos para la definición del patrón 0.5 de la escala McFarland (1,5 x 10⁸ bacterias/mL) se midió la absorbancia en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS a 620 nm usando como blanco el caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*, Merck) y como muestra cada cepa bacteriana comparada con el patrón 0.5 de la escala McFarland (8). Se realizó la lectura de absorbancia de la dilución hasta 10⁻³ de cada cepa microbiana y sembró en placa profunda en agar PCA (*Plate Count Agar*, Merck), incubada a 36 ± 2 °C durante 24 h para su posterior lectura cada 30 min para obtener las ecuaciones lineales al graficar la absorbancia vs. concentración. Este procedimiento se realizó para cada bacteria en estudio.

La actividad antimicrobiana del polvo de semillas de aguacate se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), con las siguientes cepas microbianas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Salmonella* spp., seleccionadas por su relación con el deterioro de los productos cárnicos. La CMI se determinó por el método indirecto basado en la estimación del crecimiento microbiano por turbidez en el cultivo en medio líquido (9).

La preparación de las cepas bacterianas y diluciones se realizó a partir de los cultivos de trabajo de cada una de las cepas de estudio, sembradas en caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Merck), de los que se tomó un inóculo y sembró por aislamiento en agar TSA (*Trypticase Soy Agar*, Merck), incubadas a 36 ± 2 °C durante un tiempo específico según la velocidad de crecimiento de cada microorganismo. Se midió la absorbancia a 620 nm a la muestra recién incubada, se realizó una siembra profunda en PCA y se incubó a 36 °C por 24 h para su posterior lectura. La medición de la absorbancia se realizó cada 30 min y se sembró en placa profunda hasta la dilución 10⁻³. Este procedimiento se repitió hasta la realización de cinco mediciones. El tiempo para obtener la concentración de la muestra bacteriana se estableció mediante las ecuaciones lineales al graficar la absorbancia vs. concentración previamente obtenidas.

Para la preparación de las diluciones para determinar la CMI se usaron 12 tubos con 4 mL de caldo TSB. Al tubo número 1 se le adicionó 0,4 g del agente activo y

Tabla 1. Distribución del tamaño de partículas del polvo de semillas de aguacate var. Hass

No. de malla	Malla (mm)	Masa del tamiz (g)	Masa del tamiz y muestra (g)	Masa de la muestra (g)	Materia retenida (%)
20	0,850	302,09	319,11	17,02	5,48
30	0,600	296,96	361,70	64,74	20,85
40	0,425	274,53	349,56	75,03	24,17
50	0,300	264,32	346,21	81,89	26,37
Fondo	-	355,36	427,17	71,81	23,13

se homogenizó hasta disolverlo completamente. Del tubo 1 se transfirieron 2 mL al segundo tubo con caldo TSB y así sucesivamente hasta completar los 12 tubos con el objetivo de obtener concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano. Del último tubo se descartaron 2 mL de la disolución. Posteriormente se inocularon 100 µL de cada microorganismo en evaluación se inocularon en cada tubo (de la serie de 12) a partir de la dilución 10⁻³. Se tomó un tubo control que solamente contenía medio de cultivo TSB y se inoculó. Todos los tubos fueron incubados durante 48 h a 36 ± 2 °C. Después de la incubación se realizó la lectura de los tubos y la ausencia de turbidez en el caldo TSB demostró un resultado positivo para la inhibición bacteriana por los cristales de plata. Los tubos donde se evidenció turbidez fueron confirmados sembrando 1 mL en profundidad en agar TSA. La CMI se expresó mg/L y el resultado se reportó tomando el tubo inmediatamente anterior al cual hubo crecimiento de microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución del tamaño de partículas del polvo de semillas de aguacates var. Hass (Tabla 1), es un parámetro que se debe considerarse para mejorar la eficiencia del mezclado y por tanto garantizar una distribución homogénea del aditivo en las formulaciones de los productos en los que se emplee. Por tal motivo se seleccionó para la estimación de la CMI, la masa de polvo retenida en el tamiz No. 50 que ofrece el menor tamaño de partículas.

La Tabla 2 muestra los resultados de la determinación de los tiempos de incubación para obtener la concentración microbiana (1,5 x 10⁸ UFC/mL) según el patrón 0,5 de la escala McFarland a partir de las ecuaciones lineales obtenidas para el crecimiento de cada una de las cepas en estudio, para posteriormente estimar la CMI.

Tabla 2. Modelos lineales para estimar el tiempo de incubación para obtener la concentración microbiana según el patrón 0,5 de la escala McFarland

Microorganismo	Ecuación	R ²	Tiempo de incubación (min)
<i>Salmonella</i> spp.	y= 3,8587x + 5,2174	0,874	> 270
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	y= 2,3561x + 7,0046	0,895	> 480
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	y= 13,006x + 2,5483	0,614	180 y 210

y: concentración microbiana (1,5 x 10⁸ UFC/mL) según el patrón 0,5 de la escala McFarland;

x: absorbancia.

La Tabla 3 presenta los resultados de la CMI del polvo de semillas de aguacate var. Hass. Se observa que la concentración mínima a la cual el agente activo inhibió el desarrollo microbiano correspondió, en todos los casos, a la mayor dilución (48,8 mg/L), es decir, no se observó resistencia a la acción bacteriostática del polvo por ninguna de las cepas, lo que pudo deberse a los efectos antifúngico y antibacteriano de los compuestos borbonol, persina y acetogeninas (10-12). Sin embargo, otros trabajos señalan varias clases de compuestos tales como fitoesteroles, triterpenos, ácidos grasos, ácidos furanoicos, flavonoides y proantocianidinas, como los responsables tanto de su efecto antifúngico como antibacteriano (13).

Se ha reportado el efecto antibacteriano del aguacate, mayormente de cultivares o híbridos comerciales para diversas bacterias. Los extractos etanólicos de hojas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Mycobacterium tuberculosis* (14). Los extractos metanólicos derivados de frutos o semillas tienen efecto antimicrobiano contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomona aeruginosa*, *S. aureus* y *Corynebacterium ulcerans* (11).

La actividad del extracto etanólico de aguacate criollo mexicano contra las bacterias Gram negativas como el *S. typhimurium*, tiene gran relevancia debido a que este tipo de bacterias tienen gran resistencia a muchos de los agentes antimicrobianos (15). Los componentes

reportados en aguacate como flavonoides, esteroides y terpenoides, actúan como reactivos en la pared celular de las bacterias (proteínas solubles), ocasionándoles la muerte (16).

En trabajos con extractos de hojas, frutos, cáscara y semillas en aguacate var. Hass, se ha reportado la actividad antifúngica de los extractos contra *Colletotrichum gloesporioides*, *C. albicans*, *Aspergillus glaucus* y *Penicillium notatum* (11,17-19).

En otro trabajo (11) se demostró que un extracto acetónico de semilla tenía la capacidad antimicrobiana, con efecto antibacteriano y antifúngico sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. glaucus* y *P. notatum*, pero no presentó efecto sobre *E. coli* y *Pseudomona fluorescens*.

CONCLUSIONES

El polvo de las semillas de aguacates var. Hass inhibió el crecimiento de las cepas microbianas ensayadas, observándose resultados positivos a la menor concentración del aditivo (48,8 mg/L), lo que demuestra su potencial antimicrobiano para su aplicación en la formulación de alimentos para garantizar su inocuidad e incrementar su vida útil, aunque es necesario verificar su influencia en los cambios de los atributos sensoriales y eficacia antimicrobiana en diferentes productos.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria del polvo de semillas de aguacate var. Hass

Microorganismo	Dilución (g/L)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0,39	0,19	0,098	0,049
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Presencia de crecimiento; se observó turbidez en los tubos con TSB.

REFERENCIAS

1. Buelvas, G. A.; Patiño J. H. y Cano-Salazar, J. A. *Rev. Lasallista Investig.* 9 (2): 138-150, 2012.
2. Tajkarimi, M. M.; Ibrahim, S. A. y Cliver, D. O. *Food Control.* 21 (9): 1199-1218, 2010.
3. Burt, S. *Inter. J. Food Microbiol.* 94 (3): 223-253, 2004.
4. Fisher, K. y Phillips, C. *Trends Food Sci. Technol.* 19 (3): 156-164, 2008.
5. Tiwari, B. K.; Valdramidis, V. P.; O'Donnell, C. P.; Muthukumarappan, K.; Bourke, P. y Cullen, P. J. *J. Agric. Food Chem.* 57 (14): 5987-6000, 2009.
6. Perumalla, A. V. S. y Hettiarachchy, N S. *Food Res. Inter.* 44 (4): 827-839, 2011.
7. Gammariello, D.; Di Giulio, S.; Conte, A. y Del Nobile, M. A. *J. Dairy Sci.* 91 (11): 4138-4146, 2008.
8. NTC 2455. Desinfectantes. Limpiadores líquidos. Desinfectantes para uso doméstico. Colombia, 2000.
9. Boschetto, D. L.; Lerin, L.; Cansian, R.; Castellã, S. B. y Di Luccio, M. *Chem. Eng. J.* 204-206: 210-216, 2012.
10. Giffoni-Leite, J. J.; Salles-Brito, E. H.; Aguiar-Cordeiro, R.; Nogueira-Brilhante, R. S.; Costa-Sidrim, J. J.; Medeiros-Bertini, L.; de Moraes, S. L. y Gadelha-Rocha, M. F. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42 (2): 110-113, 2009.
11. Neeman, I.; Lifshitz, A. y Kashman, Y. *Appl. Microbiol.* 19: 470-473, 1970.
12. Ciegler, A.; Detroy, R. W. y Lillehoj, E. B. Patulin, penicillin acid and other carcinogenic lactones. En: *Microbial Toxins vol. VI* (Ciegler, A.; Kadis, S. y Ajl, S. J., eds.). Academic Press, Nueva York, 409-434, 1971.
13. Moraes, S. M.; Facundo, V. A.; Bertini, L. M.; Cavalcanti, E. S. B.; Anjos-Junior, J. F.; Ferreira, S. A.; Brito, E. S. y Souza-Neto, M. A. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 670-675, 2007.
14. Gómez-Flores, R.; Verástegui-Rodríguez, L.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, P.; Tamez-Guerra, R. y Rodríguez-Padilla, C. *J. Med. Plant Res.* 2 (1): 5-10, 2008.
15. Ndukwe, K. C.; Okeke, I. N.; Lamikanra, A.; Adesina, S. K. y Aboderin, O. J. *Contemp. Dental Pract.* 6 (3): 86-94, 2005.
16. Cowan, M. M. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582, 2002.
17. Adikaram, N. K. B.; Ewing, D. F.; Karunaratne, A. M. y Wijeratne, E. M. K. *Phytochem.* 31: 93-96, 1992.
18. Prusky, D.; Plumbley, R. A. y Kobiler, I. *Physiol. Plant Pathol.* 40: 279-285, 1991.
19. Carman, R. M. y Handley, P. N. *Phytochem.* 50: 1329-1331, 1999.