

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA



Actividad biológica del extracto etanólico de las hojas,
corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto"
frente a cepas de enterobacterias. Ayacucho-2013.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

PRESENTADO POR

Bach. NAJARRO LAURA, Vilma

AYACUCHO, PERÚ
2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. VILMA NAJARRO LAURA

R.D Nº 107 – 2014 – FCB - D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las 4.15 de la tarde del día viernes 05 de Setiembre de 2014, en el Auditorio del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga se reunieron los miembros del Jurado Evaluador presididos por el Dr. Jesús De La Cruz Arango encargado mediante la R.D. Nº 107-2014-FCB-D de fecha 18 de agosto de 2014, además de conformar parte de Jurado Evaluador y como miembros del colegiado el Mg. Aurelio Carrasco Venegas, Blga Ruth Elsa Huamán De La Cruz y el Mg Víctor Luis Cárdenas López quien también ejerce la función de Secretario Docente en merito a la R.D. arriba citada, con la finalidad de recepcionar, en acto público, la sustentación de la tesis titulada **Actividad biológica del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill “palto” frente a cepas de enterobacterias. Ayacucho-2013.** Presentada por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica Srta. Vilma Najarro Laura quien pretende optar el Título Profesional de Químico- Farmacéutica. Verificada la documentación que sustenta el presente acto académico, el presidente autorizó a la sustentante a dar inicio a la exposición y sustentación en el tiempo de cuarentaicinco minutos tal como lo estipula el Reglamento General de la Universidad.

Concluida con la exposición el presidente invitó a los miembros del Jurado Evaluador puedan solicitar a la sustentante aclaraciones, ampliaciones o interrogantes que crean necesarios.

Concluida con esta etapa del presente acto académico el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente las instalaciones del Auditorio del Departamento Académico de Ciencias Biológicas con la finalidad de que los Miembros del Jurado Evaluador puedan deliberar y calificar en privado, obteniendo los siguientes resultados.

JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN...	RESPUESTA	PROMEDIO
Dr. JESÚS DE LA CRUZ ARANGO	16	17	17
Mg. AURELIO CARRASCO VENEGAS	17	18	18
Blga. RUTH HUAMÁN DE LA CRUZ	17	17	17
Mg VÍCTOR L. CÁRDENAS LÓPEZ	17.....	17	17
	PROMEDIO		17

De la calificación efectuada se obtuvo la nota promedio de (17) DIECISIETE.

A continuación se invitó a la sustentante y al público asistente a ingresar al Auditorio con la finalidad de poner de su conocimiento el resultado de la evaluación y se le tome el Juramento Farmacéutico.

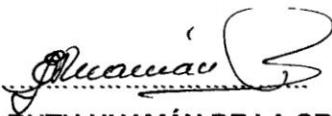
El acto de sustentación culminó siendo las cinco y cuarenticinco de la tarde, firmando al pie del presente los miembros del Jurado Evaluador en señal de conformidad.



 Dr. JESÚS DE LA CRUZ ARANGO
 PRESIDENTE-MIEMBRO



 Mg. AURELIO CARRASCO VENEGAS
 MIEMBRO



 Blga. RUTH HUAMÁN DE LA CRUZ
 MIEMBRO



 Mg. VÍCTOR L. CÁRDENAS LÓPEZ
 SECRETARIO - DOCENTE

DEDICATORIA

A Dios, mis padres, hijos y hermanos

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que hicieron posible mi formación profesional.

A mis asesores Mg. Víctor Luis Cárdenas López y Q.F. Vivian Vilma Falconi Oré; por el apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Persea americana</i> Mill.	4
2.3. Metabolitos secundarios	7
2.4. Las enterobacterias	8
2.5. Agentes antibacterianos	11
2.6. Ciprofloxacino, farmacocinética y farmacodinamia	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Ubicación	14
3.2. Materiales	14
3.3. Preparación de la muestra	14
3.4. Determinación de la actividad antibacteriana	15
3.5. Análisis de datos	19
IV. RESULTADOS	20
V. DISCUSIÓN	26
VI. CONCLUSIONES	34
VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación sistemática de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" según el Sistema de Clasificación de Cronquist	4
Tabla 2	Concentraciones decrecientes de las diluciones de los extractos	18
Tabla 3	Metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto". Ayacucho 2013	21
Tabla 4	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica y <i>Shigella sonnei</i> 25931. Ayacucho 2013	22
Tabla 5	Promedio de halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica y <i>Shigella sonnei</i> . Ayacucho 2013	23
Tabla 6	Porcentaje de halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" en cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica y <i>Shigella sonnei</i> , frente al estándar ciprofloxacino 5 µg. Ayacucho 2013	24
Tabla 7	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica y <i>Shigella sonnei</i> . Ayacucho 2013	25

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1	Estructura química del ciprofloxacino	Página 13
----------	---------------------------------------	--------------

INDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Certificado de la clasificación taxonómica	41
Anexo 2	Certificado de cepas bacterianas	42
Anexo 3	Coloración de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto"	43
Anexo 4	Extractos etanólico de <i>Persea americana</i> Mill. "palto"	44
Anexo 5	Medios de cultivo y preparación de los inóculos	45
Anexo 6	Halos de inhibición de los diferentes extractos frente a las tres cepas en estudio	46
Anexo 7	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida	47
Anexo 8	Halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, corteza y semillas de <i>Persea americana</i> frente a cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 23122	48
Anexo 9	Halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, semillas y corteza de <i>Persea americana</i> frente a cepa de <i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	49
Anexo 10	Halos de inhibición del extracto etanólico de la corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepa de <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica ATCC 14028	50
Anexo 11	Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de hojas, corteza y semillas de <i>P. americana</i> frente a cepa de <i>Escherichia coli</i> . ATCC 23122	51
Anexo 12	Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de hojas, corteza y semillas de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepa de <i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	52
Anexo 13	Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de la corteza y semillas de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepa de <i>Salmonella enterica</i> subesp enterica ATCC 14028	53
Anexo 14	Discos de ciprofloxacino	54
Anexo 15	Preparación del extracto etanólico	55
Anexo 16	Determinación de la actividad antimicrobiana	56
Anexo 17	Ensayos con el extracto etanólico	57
Anexo 18	Matriz de consistencia	59

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto", realizado en los laboratorios de bioquímica y microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en los meses de Junio a Noviembre del 2013. El tipo de investigación fue básico experimental. Se empleó el método de disco difusión de Kirby Bauer utilizando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931. Fueron ensayadas concentraciones de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 y 10%; como control se utilizó ciprofloxacino de 5µg. Los extractos contienen: taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, quinonas, catequinas, azúcares reductores, alcaloides, triterpenos y/o esteroides. Se encontró que el extracto etanólico de las hojas de *P. americana* muestra una actividad antibacteriana frente a *E. coli*, alcanzando 22,8% de inhibición al 10%; CMI de 0,625 mg/ml y CMB de 1,250 mg/ml; frente a cepa de *Shigella sonnei*, alcanzando 27,9% de inhibición al 10%, CMI 0,625 mg/ml y CMB de 1,250 mg/ml; no muestran actividad significativa sobre *Salmonella enterica*. Así el extracto de la corteza muestra una actividad antibacteriana frente a *E. coli*, alcanzando 24,8% de inhibición al 10%, CMI de 0,039 mg/ml y CMB de 0,078 mg/ml; *Salmonella enterica* fue inhibida en 12,0% con una CMI de 0,156 mg/ml y CMB de 0,313 mg/ml; *Shigella sonnei* fue inhibida en un 21,9% con una CMI 1,250 mg/ml y CMB de 2,500 mg/ml y el extracto etanólico de la semilla muestra una actividad frente a *E. coli* alcanzando 34,2% de inhibición al 10% con una CMI de 0,039 mg/ml y CMB de 0,078 mg/ml; frente a *Shigella sonnei* el halo de inhibición fue de 51,2% con una CMI de 0,002 mg/ml y la CMB de 0,005 mg/ml; frente a *Salmonella enterica* alcanzando 14,9% de inhibición al 10%; CMI de 0,313 mg/ml y CMB de 0,625 mg/ml. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla tienen actividad antibacteriana frente a las cepas de enterobacterias en estudio.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) *Escherichia Coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no sólo cuando los constituyentes de las plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como material base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos.¹

En la actualidad estamos expuestos a muchas enfermedades de índole microbiana que son tratados con medicamentos comerciales, que al no ser consumidos en forma correcta producen una resistencia de las bacterias a dicho fármaco, por lo que con mayor frecuencia el medicamento resulta ineficiente², en este sentido, la medicina tradicional o herbolaria es una alternativa para tratar enfermedades infecciosas.

Las comunidades rurales utilizan tradicionalmente las plantas como medio para curar sus enfermedades. Ellos han recibido de generación en generación un bagaje de conocimientos que se ha acumulado desde tiempos inmemoriales sobre selección, manejo, conservación y uso de las diferentes especies de plantas que crecen en nuestro país, y en los últimos años los habitantes de las ciudades están utilizando por lo que se puede decir que está en auge la medicina tradicional.

Entre las especies utilizadas tenemos a *Persea americana* Mill. "palto", una lauraceae originario de América Central y México, es cultivado actualmente en casi todos los países de clima cálido y templado^{3,4} incluido el Perú que cuenta con una serie de microclimas, uno de ellos con características aptas para el desarrollo de la especie *Persea americana* Mill. "palto", particularmente en nuestra región, en zonas cálidas de la provincia de Huanta, y el Valle del río Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM)¹ también en la región de Apurímac se cultivan en los Valles de Pampas y Pulcay, es muy utilizada por sus propiedades alimenticias, medicinales por su uso tradicional para diferentes afecciones entre las cuales antiespasmódica, antihelmíntica. Los compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antibacteriana generalmente son compuestos fenólicos y polifenoles entre los que se encuentran quinonas, flavonoides, taninos. Otros son los terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, entre otro *Persea americana* Mill. "palto" presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Shigella* y *Samonella*.^{4,5}

Objetivo General.

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de enterobacterias.

Objetivos específicos:

1. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".
2. determinar la actividad antibacteriana frente a cepas de enterobacterias a diferentes concentraciones.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del problema de investigación

El Perú es un campo abierto para la investigación debido a la rica flora distribuida en la región costera, andina y amazónica, las cuales han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y curación de sus enfermedades; siendo utilizadas en la prevención, diagnóstico y eliminación del desequilibrio físico, mental o social,¹ el cual comprende prácticas basadas sobre la confianza de la experiencia y la observación de cientos de años; esta medicina es parte de la tradición de cada país y el empleo de sus prácticas se transmite de generación en generación ya sea oral o escrita.⁴

Estudios realizados en Bolivia confirmaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Mill. "palto", resultando positivo a la prueba cualitativa antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*.⁵ El extracto etanólico de la semilla presentó actividad antibacteriana y antidiarreica a una dosis de 5 g/kg de peso contra *Shigella* en ratas, determinándose que los compuestos responsables de dichas actividades son los taninos y flavonoides.⁶ Así mismo, se ha reportado que el aceite de palto es usado como emoliente y es útil en lesiones escamosas de la piel y que el extracto liofilizado de la semilla administrado en ratones

mostró efecto anti-ictérico y hepatoprotector caracterizado por la normalización de aminotransferasas y curación de lesiones hepáticas.^{7,8}

También se ha demostrado que *Persea americana* presenta una actividad antibacteriana, antihelmíntica y antiespasmódica. La semilla, sin ninguna extracción, ejerce una acción antihelmíntica, atribuyéndose a tres de sus compuestos aislados: el 1,2,4, trihidroxi-n-heptadeca-16-eno contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*; catequina y flavona contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.⁹ El extracto de la cáscara y semilla de *Persea americana* tienen actividad antioxidante determinados por el método DPPH, debido a sus compuestos fenólicos y procianidinas. Su actividad antimicrobiana *in vitro* sobre bacterias Gram negativas como la *E. coli* es más notoria debido a la mayor sensibilidad de estas.¹⁰

2.2. *Persea americana* Mill.

2.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 1. Clasificación sistemática de *Persea americana* Mill. "palto", según el Sistema de Clasificación de Cronquist.

Categoría taxonómica	Clasificación
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	LAURALES
FAMILIA	LAURACEAE
GÉNERO	<i>Persea</i>
ESPECIE	<i>Persea americana</i> Mill.
N.V.	"palto"

Fuente: *Herbarium Huamangensis*, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, 2013.

2.2.2. Descripción botánica

Árbol usualmente de nueve metros, pero puede ser hasta de 18 metros de altura, a veces notoriamente erecto, tallo cilíndrico, erecto, leñoso, ramificado con una corteza áspera y a veces surcada longitudinalmente. Su copa adquiere diversas formas como globosa y acampanada; la corteza es suberosa y agrietada de color pardo oscuro.^{11, 12} La raíz es pivotante, muy ramificada, de distribución radial; las raíces secundarias y terciarias se distribuyen superficialmente.^{9,11} Las hojas son alternas, ovaladas o elípticas; coriáceas, enteras dispuestas en espiral alrededor de la rama con peciolo cortos delgados, con base aguda o truncada. Cuando son jóvenes presentan un brillo en el haz, el envés glauco y opaco.^{9,12} Agrupadas en inflorescencia panicular, axilar o terminal.^{8,12} La flor del palto es muy especial porque su comportamiento es único; son hermafroditas, el fruto es grande baya, mesocarpio caroso, generalmente periforme, oviforme o globosa, la piel puede ser gruesa, rugosa y quebradiza, delgada o gruesa de color verde oscuro y en ocasiones morado oscuro casi negro dependiendo del grado de madurez, la pulpa es de color amarillo verdosa y verde clara y de consistencia mantequillosa; la semilla es grande voluminosa, puntiaguda y está protegida por una envoltura apergamizada al endocarpio con dos cotiledones de color rosado, blanco amarillento.¹³ El palto, originario de América Central y México, es cultivado actualmente en casi todos los países de clima cálido y templado incluido el Perú. Por lo tanto, se llevó no solo a la Antillas sino a casi todas las áreas tropicales y subtropicales en donde hay condiciones ambientales favorables para su desarrollo; así como las Filipinas, Indias orientales, Islas Mauricio, Singapur, Malasia, Hawái, Florida, California. Entre sus principales usos están el alimenticio y de manera tradicional se utiliza como planta medicinal, su fruto y aceites son ampliamente utilizados como productos de

belleza tanto para la piel y cabello, y sus hojas para la elaboración de expectorante.¹³

2.2.3. Composición química

La pulpa y la semilla son ricas en triglicéridos de ácidos grasos: cáprico, mirístico palmítico (17-29%), esteárico, palmitoleico (6-12%), oleico (42-63%) linoleico (9-16%) y linolénico (<1%), que forman el 80% del contenido graso del fruto. El aceite de la semilla, a su vez es rico en vitamina E, escualeno, hidrocarburos, alcoholes alifáticos saturados, terpenos y esteroides (beta-sitosterol); entre los azúcares destacan D-alfa-manoheptita, D-manoheptulosa y perseitol, adicionalmente, contienen protocianidina y carotenos. Las hojas contienen principalmente estragol, (+)-pineno, cineol, trans-anetol, alcanfor, beta-pineno y limoneno, flavonoides (quercetina), catequinas, epicatequinas, cianidina, serotonina, dopamina, abacatina que le otorga un sabor amargo,⁷ amigdalina (ácido cianhídrico), ácido gálico, almidón, manitol. La corteza contiene 3,5% de metil chavicol y anetol,⁷ alcaloides, perseita, resinas y sustancias minerales, en el endospermo, aminoácidos: valina, lisina, leucina, ácido aspártico y glutámico.^{4,14}

2.2.4. Propiedades y usos medicinales

Presenta actividad antibacteriana, vermífuga, antidiarreica, analgésica, antiinflamatoria, antirreumático, antiamebiano, antihelmíntica, antipalúdica y antiespasmódica.⁹ Se le atribuye propiedades abortivas, hipotensora, reguladora del ciclo menstrual, hipoglucemiante, hipolipidémica; también se reportan que el jugo de las hojas tienen efecto antibiótico, enemagogo; el extracto con éter de petróleo de la semilla tiene actividad frente a *Staphylococcus aureus* y el extracto etanólico de la semilla tiene actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *staphylococcus*; a tres de sus compuestos aislados se les atribuye las

propiedades (catequina, flavona y 1,2,4, trihidroxi-n-heptadeca-16-eno).³ La corteza se utiliza como vermífugo y antibiótico,¹⁰ la semilla es utilizada en el tratamiento de la neuralgia intercostal; así como el aceite de la semilla para suavizar la piel y cicatrizar las heridas.¹⁵

2.3. Metabolitos secundarios

Las plantas medicinales típicamente contienen una mezcla de diferentes compuestos químicos que pueden actuar individualmente, aditivamente o sinérgicamente para mejorar la salud. Una sola planta puede contener sustancias que pueden actuar como antibióticos naturales. La literatura científica reporta innumerables compuestos secundarios de origen vegetal con efecto antibacteriano sobre microorganismos patógenos como: Los taninos son compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 Dalton. Su capacidad antioxidante, es debido al elevado número de grupos hidroxilo y la capacidad de unirse a proteínas, son la base de su actividad bactericida y bacteriostática. Los aceites esenciales son antisépticos frente a microorganismos Gram positivas y Gram negativas e incluso frente a hongos productores de micosis y ciertas levaduras. Algunos aceites esenciales posiblemente inhiban con más facilidad a microorganismos Gram negativas y Gram positivas como los de *Cinnamomum verum* "canela". Las saponinas también son un grupo de metabolitos secundarios que han mostrado efectos antimicrobianos.^{16,17}

Las dos acciones más importantes de los ácidos fenólicos son la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, por lo que se usan como antisépticos y desinfectantes; también los flavonoides poseen acciones farmacológicas antibacterianas; las quinonas y naftoquinonas han mostrado actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* por interferir en la

síntesis del ARN dependiente del ADN. Destacan por su actividad antimicrobiana los derivados terpénicos oxidados, representado en primer lugar por los derivados fenólicos, timol y carvacrol, los cuales se unen a los grupos amino e hidroxilamina de las proteínas de la membrana bacteriana lo que conduce a la modificación de su permeabilidad y origina la muerte de la bacteria. Los derivados alcohólicos y cetónicos, tales como linalol, geraniol, citral, alcanfor, etc., poseen igualmente propiedades antibacterianas menos marcadas que las del timol y carvacrol.^{16,17}

2.4. Las enterobacterias

Las enterobacterias, nombre común de la familia de bacterias Gram negativas;¹⁸ esta familia es la más grande y heterogénea; está formada por bacilos o cocobacilos con importancia clínica de tamaño 1,0 a 6,0 μm . y/o anaerobios facultativos, y de modo habitual se observa su crecimiento tras 18 a 24 horas de incubación en una gran variedad de medios no selectivos y selectivos; móviles (con flagelación peritrica) o inmóviles, se caracterizan por ser fermentadoras de glucosa con o sin producción de gas;^{19,20} tienen como hábitat natural el intestino del hombre y de varias especies animales. Se les ha encontrado en insectos y algunas son patógenas de plantas,^{19,21} muchas ocasionan efectos patógenos de gravedad variable, en otros casos pueden actuar como saprófitas formando parte de la flora gastrointestinal, aunque también como consecuencia de esto se puede encontrar en el agua y en el suelo. Son bastante resistentes a los agentes externos.⁷ No producen citocromo oxidasa, presentan un metabolismo fermentativo, reducen los nitratos a nitritos y, en ocasiones, a nitrógeno atmosférico, son capaces de fermentar otros azúcares y alcoholes con la consiguiente producción de ácidos y, en ocasiones, también gas, puede producir gran cantidad de fermentos, como por ejemplo gelatinasas, descarboxilasas,

ureasas, galactoxidasas, desaminasas, etc., algunas son capaces de producir ácido sulfhídrico (S_2H), como por ejemplo *Proteus*, otras producen indol, como la *E. coli*, lo que facilita su identificación. Presentan ciertas similitudes bioquímicas con otras familias, como por ejemplo *Vibrionaceae*.^{18,19}

2.4.1. Morfología, patogenia y epidemiología

La morfología nos da una información primaria sobre el tipo de bacteria, pero no de forma concluyente, por lo que la forma está dada por la rigidez de su pared; mayormente presentan tres formas básicas que son esféricos (cocos), bastoncillo o cilíndrica (bacilo), helicoidal (espirilos). Las bacterias comprenden tamaños que van desde 0,1 μm de ancho a más de 50 μm de diámetro; algunas pueden ser excepcionalmente grandes que pueden alcanzar 50 μm de diámetro y 0,5 mm de largo, sin embargo, la dimensión de una bacteria media de forma bacilar, como la *Escherichia coli* es de 1 x 3 μm ; aunque las formas jóvenes son de tipo coco bacilar, fermentadoras de glucosa, móviles, fermentadoras de lactosa con producción de ácido y gas, resistentes a temperaturas altas, saprofito de la flora aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo.^{18,19}

La *Salmonella* está formada por bacilos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos que rodean al microorganismo y no desarrollan cápsula ni espora, móviles, produce H_2S , fermentan la glucosa pero no lactosa.¹⁹

Shigella tiene forma de bastoncillo, no móvil, no formadora de esporas e incapaz de fermentar la lactosa. Utilizan la glucosa como fuente de energía pero no produce gas tampoco de S_2H .¹⁸

De acuerdo al tamaño grande y la composición diversa de la familia *Enterobacteriaceae*, se han descrito muchos factores de virulencia en las cepas patógenas.^{19,21} La endotoxina, es un factor de virulencia compartida por todas las bacterias Gram negativas. La toxicidad reside en el componente lipídico A, que son macromoléculas complejas que contienen fosfolípidos y lipopolisacáridos

(LPS) que son constituyentes de la pared bacteriana y sólo se liberan cuando la célula muere o se lisa, su especificidad antigénica se localiza en la fracción polisacárido. En las enterobacterias el lípido A siempre es el mismo y el polisacárido es variable y da lugar a los centenares de antígenos O que aparecen en las distintas cepas. Los efectos farmacológicos de las endotoxinas incluyen: fiebre, leucopenia seguida de leucocitosis, activación del complemento, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada, disminución de la circulación periférica y la perfusión de órganos importantes, choque endotóxico y muerte. La cápsula es especialmente útil para la bacteria como una fase protectora que hace más difícil la fagocitosis, puesto que los antígenos capsulares hidrofílicos repelen la superficie hidrofóbica de las células fagocíticas; estos antígenos ocultan también a los de la pared celular y, por tanto, interfieren en la unión de los anticuerpos a la bacteria, y con ello le da una mayor sobrevivencia a la bacteria.^{19,21} Otro factor es la variación antigénica, que consiste en variar sus antígenos y con ello presentar una diferente presencia inmune para la identificación y respuesta del huésped.¹⁹ La producción de exotoxinas: casi todos son productos que funcionan como enterotoxinas pueden ser termolábiles y termoestables, como la toxina Shiga y las hemolisinas.¹⁹ La expresión de factores de adherencia está dada por las fimbrias y la mayoría de enterobacterias expresan fimbrias tipo I, colaboran de manera importante para la adherencia de la bacteria a la superficie mucosa del huésped; se ha detectado antígenos con factor de colonización de la fimbrias en algunas cepas de *E. coli* productoras de gastroenteritis.^{19,21}

E. coli produce infecciones de heridas, vías respiratorias, meningitis neonatal, vías urinarias y aparato digestivo (diarrea en guarderías y hospitales); asociados frecuentemente con sepsis bacteriana; la mayoría de las infecciones, a excepción de la meningitis neonatal y la gastroenteritis, son endógenas, tiene

una distribución mundial, sin incidencia estacional en países con climas tropicales, países en vías de desarrollo, la transmisión es fecal-oral. Los tratamientos se realizan con antibióticos que demuestren actividad *in vitro*, control apropiado de las infecciones nosocomiales, mejora de higiene.^{19,22}

La bacteria sobrevive en leche, huevos, quesos, camarones, distribuida en todo el mundo sin incidencia estacional, *S. sonnei* predomina en Norte de América y Europa. La terapia antibiótica se emplea para disminuir el número de gérmenes y la duración del estado de portador en pacientes sintomáticos, lavado de mano, limpieza de ropa de cama sucia.¹⁸

La *Salmonella* produce infecciones asintomáticas agudas, gastroenteritis aguda, bacteriemia con o sin supuración local, fiebre tifoidea, estado de portador crónico asintomático. Las infecciones por *Salmonella typhi* ocurren más comúnmente durante los meses calurosos de verano y otoño su infección implica contacto directo o indirecto con una persona con fiebre tifoidea o con un portador crónico; la forma más común de transmisión es por la ingestión de alimentos o agua contaminado con heces humanas, también puede ocurrir por vía transplacentaria o puede ocurrir al momento del parto, cuando una madre portadora infecta al bebé por la vía fecal-oral.^{18,19} Es un agente zoonótico de distribución universal, se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación y en el proceso de alimentos, también por vía sexual.²⁰

2.5. Agentes antibacterianos

La denominación agente antibacteriano o antiinfeccioso, se utiliza para designar a cualquier fármaco que actúa contra uno o más tipos de microorganismos.²³

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos.^{24,25}

2.6. Ciprofloxacino, farmacocinética y farmacodinamia

Es una fluoroquinolona incorporado en 1987, de segunda generación, compuesto que goza de mayor eficacia terapéutica y capacidad de actuación sistémica. Además posee un espectro más amplio, una rápida y notable actividad bactericida frente a Gram negativas, incluida *P. aeruginosa*, es activa frente a algunos patógenos atípicos, pero tiene moderada actividad frente a Gram positivas y prácticamente nula frente a anaerobios. Presenta una excelente biodisponibilidad que supera el 70% por vía oral, prolongado tiempo de vida media, altos volúmenes de distribución, difunde bien en la próstata, hueso, pulmón, líquido pleural y tejidos blandos. Pasa al líquido cefalorraquídeo sólo en presencia de meninges inflamadas e importante eliminación renal. Ciprofloxacino actúa a nivel intracelular inhibiendo en forma selectiva la síntesis de ADN en la bacteria a través de la inhibición de las topoisomerasas bacterianas. Dirigiéndose hacia a la girasa de ADN y la topoisomerasa IV, para muchas bacterias Gram negativas como *E. coli* la girasa es blanco primario del ciprofloxacino.²³ Actúa uniéndose e inhibiendo principalmente a la topoisomerasa II o ADN-girasa, que tiene una sub unidad A y una subunidad B. Con los aminoácidos de las alfa hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN, formando un complejo quinolona-enzima-ADN que contiene ADN roto.²⁴

Ciprofloxacino es potente bactericida contra *E. coli* y diversas especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Campylobacter* y *Neisseria*.²⁵

2.6.1. Farmacoquímica del ciprofloxacino

Para todas las quinolonas como para el ciprofloxacino, el grupo carboxilo en la posición tres y el grupo ceto en la posición 4 son necesarios para la inhibición de la topoisomerasa bacteriana. Los grupos 3-carboxil y 4-ceto pueden facilitar el pasaje a través de la membrana externas bacteriana al producir quelación con

los iones de magnesio, los átomos de flúor en la posición seis aumenta la inhibición en la ADN-girasa y la penetración de la célula; el resultado es una actividad antimicrobiana adicional.^{25,26}

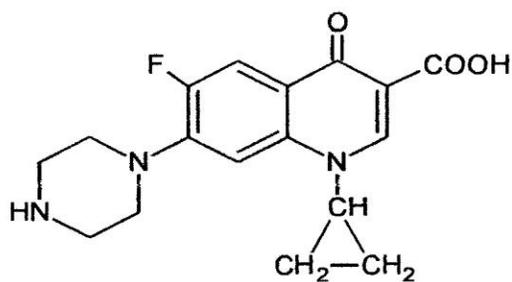


Figura 1. Estructura química del ciprofloxacino.²⁴

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de Bioquímica y Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Materiales

3.2.1. Población

Hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" que fueron recolectados en el valle de Pulcay, distrito de Huaccana, provincia de Chincheros, región de Apurímac a 3050 msnm.

3.2.2. Muestra

1 kg de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto.

3.2.3. Microorganismos de ensayo

Escherichia coli ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931 que fueron adquiridos del Laboratorio de Bacteriología del Área Académica de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la UNSCH.

3.3. Preparación de la muestra

3.3.1. Recolección y procesamiento de la muestra

La recolección y selección de las hojas, corteza y semilla se realizó de acuerdo a las recomendaciones establecidas por Villar del Fresno.¹⁷

Las hojas, corteza y semilla fueron sometidas a un tratamiento de limpieza y selección para eliminar todo elemento extraño. Seguidamente fueron desecados a temperatura ambiente bajo ventilación sobre papel kraft, durante 15 días y finalmente fueron sometidas a molienda hasta obtener un polvo fino no mayor a 3 mm.¹⁷

3.3.2. Preparación del extracto de las hojas, corteza y semilla

Se pesó 1 kg de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" pulverizadas luego se añadió 2 l de etanol de 96° y las tres muestras fueron maceradas por separado en un frasco de vidrio de color ámbar por un periodo de 7 días con agitación diaria. Seguidamente se filtró en un sistema al vacío y se procedió a concentrar utilizando el equipo de baño María a una temperatura de 45°C hasta obtener un extracto seco y conservándose el extracto en el refrigerador a una temperatura de 8°C hasta realizar las diferentes pruebas antibacterianas.¹⁷

3.3.3. Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios

Para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto", se realizaron mediante reacción de coloración y precipitación siguiendo la metodología propuesta por Miranda.²⁸

3.4. Determinación de la actividad antibacteriana

La evaluación antibacteriana se realizó utilizando el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) para la determinación del halo de inhibición, y por el método de

dilución en caldo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).^{29,30}

A. Activación de las bacterias

Para activar las cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931, procedió a inocular en tubos de ensayo con 5ml de caldo nutritivo, se incubó a una temperatura de 37°C por 18 horas³¹

B. Preparación del inóculo de las bacterias

Con las tres cepas reactivadas se procedió por separado a seleccionar 5 colonias en 5 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37°C hasta que la turbidez sea visible (5 horas fase logarítmica). Y se ajustó la turbidez visualmente al estándar de 0,5 de la escala de McFarland.³¹

3.4.1. Determinación del halo de inhibición

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido lo que se evidencia con la formación de halos de inhibición; de forma que cuanto más susceptible sea el microorganismo frente a los tratamientos, más amplia será la zona de crecimiento inhibido.

Procedimiento

- En cada placa Petri se colocaron 20 ml de agar Mueller Hinton previamente esterilizado y se dejó solidificar en el medio.
- Con un hisopo estéril sumergir en la suspensión y eliminar el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo.
- Inocular la superficie de la placa de agar Mueller Hinton con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie por tres direcciones. Por

último, pasar el hisopo por el perímetro externo del agar. Dejar reposar 5 minutos.

- Colocar los discos impregnado con los extractos a diferentes concentraciones sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar y con el control positivo (ciprofloxacino 5µg). Dejar las placas 15 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar la placa en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
- Medir los diámetros de la zona de inhibición con una regla utilizando luz refleja sobre fondo negro.

Interpretación: La formación de halo de inhibición significa sensibilidad (S) y la no formación resistencia (R).³¹

Determinación del porcentaje de inhibición: Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

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

3.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)³¹

Se define como la cantidad o la concentración mínima de un agente químico antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo.

Procedimiento

- Se prepararon 15 tubos de ensayo previamente esterilizados y rotulados del 1 al 15.
- A partir del tubo 1 hasta el tubo 15, se agregó 1ml del caldo nutritivo.
- Posteriormente se agregó 1ml del extracto al tubo 1, a partir del cual se traspasó 1ml al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 14, del cual se tomó 1ml y se descartó. El tubo 15 no recibió extracto, siendo éste el control.

- Luego se agregó 1ml del inóculo de la cepa bacteriana a todos los tubos y se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas.

Interpretación: Se considera CMI como la concentración correspondiente al tubo con menor concentración donde no ha habido desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez.

Tabla 2. Concentraciones decrecientes de las diluciones de los extractos

Extracto de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" (mg/ml)					
Tubo	0,5%	1,0%	3,0%	5,0%	10,0%
1	2,500	5.000	15.000	25.000	50.000
2	1,250	2.500	7.500	12.500	25.000
3	0,625	1.250	3.750	6.250	12.500
4	0,313	0.625	1.875	3.150	6.250
5	0,156	0.313	0.938	1.563	3.150
6	0,078	0.156	0.469	0.781	1.563
7	0,039	0.078	0.234	0.391	0.781
8	0,020	0.039	0.117	0.195	0.391
9	0,010	0.020	0.059	0.098	0.195
10	0,005	0.010	0.029	0.049	0.098
11	0,002	0.005	0.015	0.024	0.049
12	0,001	0.002	0.007	0.012	0.024
13	0,0006	0.001	0.004	0.006	0.012
14	0,0003	0.0005	0.002	0.003	0.006

3.4.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)³¹

Se define como la concentración más baja de un antibacteriano que produce la muerte del 99,9% del microorganismo probado y solo permite la supervivencia del 0.1% de los microorganismo en cultivo.

Procedimiento

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se determinó a partir de la Concentración Mínima Inhibitoria, de la siguiente manera:

- Una vez observado la turbidez, al determinar la CMI; se procedió a sembrar con la ayuda del asa de Kolle, los caldos no turbios en las placas con agar Mueller Hinton.
- Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas.

Interpretación: Se determinó la CMB verificando si hubo o no crecimiento de cepa bacteriana en las placas sembradas.

3.5. Análisis de datos

Los resultados se presentan en tablas y figuras. También se realizó la interpretación mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, con el programa SPSS versión 21.

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto". Ayacucho 2013.

Metabolitos Secundarios	Ensayo	E. etanólico		
		Hojas	Corteza	Semilla
Alcaloides	Dragendorff	+++	+	+++
Triterpenos y Esteroides	Lieberman - Burchard	+++	++	++
Resinas	Resinas	+++	++	+
Azúcares reductores	Fehling	++	++	+
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	++	+	++
Flavonoides	Shinoda	++		++

Leyenda:

Leve : (+)
 Moderado : (++)
 Fuerte : (+++)

Tabla 4. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. enterica y *Shigella sonnei*. Ayacucho 2013.

Especie bacteriana	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Persea americana</i> Mill. "palto"		
	Hoja	corteza	semilla
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23122	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica ATCC 14028	-	+	+
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	+	+	+

Leyenda:

No presenta actividad antibacteriana

: -

Presenta actividad antibacteriana

: +

Tabla 5. Promedio de halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* y *Shigella sonnei*. Ayacucho 2013.

Conc. %	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
	Hoja	Corteza	Semilla	Hoja	Corteza	Semilla	Hoja	Corteza	Semilla
0,5	6,32	6,2	6,3	-	5,0	-	5,0	5,04	5,48
1,0	8,06	7,33	8,3	-	5,08	5,5	5,32	5,12	9,94
3,0	9,46	8,02	9,3	-	5,14	5,5	6,08	5,16	10,9
5,0	9,7	10,04	10,08	-	5,24	6,26	8,86	5,78	13,7
10,0	10,18	11,06	15,24	-	6,04	7,5	9,14	7,18	16,8

Leyenda:

No hubo halo de inhibición : -

Tabla 6. Porcentaje de halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" en cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* y *Shigella sonnei*, frente al estándar ciprofloxacino 5 µg. Ayacucho 2013.

Conc. %	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
	Hoja	Corteza	Semilla	Hoja	Corteza	Semilla	Hoja	Corteza	Semilla
0,5	14,2	13,9	14,1	-	10,0	-	15,2	15,4	16,7
1,0	18,1	16,4	18,6	-	10,1	11,0	16,2	15,6	30,3
3,0	21,2	18,0	20,9	-	10,2	11,0	18,5	15,7	33,2
5,0	21,7	22,5	22,6	-	10,4	12,5	27,0	17,6	41,8
10,0	22,8	24,8	34,2	-	12,0	14,9	27,9	21,9	51,2

Leyenda:

No hubo halo de inhibición : -

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. enterica y *Shigella sonnei*. Ayacucho 2013.

N	C mg/ml	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
		H	Co	S	H	Co	S	H	Co	S
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	:	+
Concentración Mínima Inhibitoria	:	*
Concentración Mínima Bactericida	:	**
Concentración	:	C
Hoja	:	H
Corteza	:	Co
Semilla	:	S

V. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931; con el objetivo de comprobar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" sobre estos microorganismos, principales inductores de las afecciones gastrointestinales. La actividad antibacteriana sobre estos microorganismos está representada por la presencia de los halos de inhibición. Mientras mayor es el diámetro del halo de inhibición mejor es la actividad antibacteriana del extracto en estudio.

Es común el empleo de las semillas, hojas y corteza con la finalidad de obtener variados efectos terapéuticos, entre las diversas aplicaciones terapéuticas se incluyen aquellas con actividad antibacteriana, razón a ello es que se procedió a realizar su estudio.

Para la extracción del extracto de las hojas, corteza y semilla de la *Persea americana* Mill. "palto" se utilizó como solvente el etanol, tal como lo realizó Acharte³⁰. La Tabla 3, muestra los resultados de la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".

Del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Persea americana* Mill. "palto", se puede apreciar presencia de alcaloides, terpenos, esteroides y resinas, azúcares reductores, taninos fenoles y flavonoides. Resultados similares fueron reportados por Torres para el extracto acuoso de las hojas de *Persea americana* Mill. con presencia de flavonoides derivados del quercetol, catequina, epicatequina, perseita y persiteol; también terpenos, sesquiterpenos, taninos.³ Otro estudio sobre la capacidad antioxidante de plantas medicinales como palto, eucalipto, alcachofa y otros, reportó, en general, su alto contenido de fenoles observados en el extracto de las hojas.³² Así mismo Niogret *et al*³³ Determinaron la presencia de terpenoides en un estudio que realizaron sobre las variaciones de los terpenoides en *Persea americana* Mill. La presencia de compuestos fenólicos como los terpenoides también se hizo evidente en la muestra usada para este trabajo.

En el extracto etanólico de la corteza *Persea americana* Mill. "palto", se observa la presencia de alcaloides, taninos y fenoles, triterpenos, esteroides, resinas, azúcares reductores; tal como reportan Niogret *et al*³³ la presencia de resinas y alcaloides en la corteza de *Persea americana* Mill. Otro estudio realizado en hojas y corteza de *Cinnamomum verum* "canela" reporta la presencia de flavonoides, lignanos y taninos con la cual demostraron su actividad antibacteriana, antifúngica y antiespasmódica.³ Los resultados obtenidos en esta investigación muestran la presencia de dichos compuestos en la hoja y corteza de *Persea americana* Mill., que ofrece una fuente natural de antibacterianos sugiriendo así la potencialidad de uso terapéutico.

El extracto etanólico de las semillas de *Persea americana* Mill. "palto", presenta metabolitos secundarios como alcaloides, triterpenos, esteroides, resinas, azúcares reductores, taninos, fenoles y flavonoides. Resultados similares reportaron Idris *et al*³⁴ en un screening fitoquímico y estudio de la actividad

antibacteriana de la semilla de *Persea americana*, lo cual reveló la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides esteroidales y terpenoides. Así mismo Rodríguez *et al*¹⁰ en un estudio realizado sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* de la semilla de *Persea americana*, en el que reportaron una variedad considerable de compuestos fenólicos como catequinas y ácido hidroxibenzoico (OH-B), ácido hidroxicinámico (C-OH), flavonoles, y procianidinas. Las epicatequinas fueron los compuestos más abundantes (98%). La presencia de estos metabolitos también se hizo evidente en la muestra usada para este trabajo.

Como se observa en Tabla 3 hay presencia de taninos y fenoles pero no la que se esperaba, esto podría atribuir al tipo de disolvente utilizado para la extracción ya que la polaridad del disolvente juega un papel clave en el aumento fenólico, por lo general los disolventes menos polares se consideran adecuados para la extracción de fenoles lipófilos así como la acetona acuosa (70%) es eficiente para la recuperación de taninos y que el etanol era el disolvente menos efectiva de acuerdo a nuestros resultados.¹⁰

Estos resultados podrían también explicarse por las diferentes condiciones de crecimiento de la planta, los factores ambientales, el estado de maduración y técnicas de procesamiento en la extracción de los metabolitos secundarios.¹⁷

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 del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto". Así la Tabla 4 muestra la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, ATCC 23122 y *Shigella sonnei* ATCC 25931; Giao *et al*⁶² en un estudio realizado sobre la capacidad antioxidante y actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales como eucalipto, alcachofa y palto reportaron que

dicha actividad antibacteriana se debía, en general, a su alto contenido de fenoles observados en el extracto de las hojas. Así mismo reporta Torres que el extracto metanólico de la hoja y tallo de *Persea americana* Mill tienen una actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, y el extracto acuoso de la hoja y tallo tienen una actividad antiespasmódica frente al ilion de cerdo y el útero de rata³, se atribuye esta actividad a la buena presencia de compuestos activos con actividad antimicrobiana presente en el extracto.

No presenta actividad antibacteriana a las concentraciones estudiadas; frente a cepa de *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028. La estructura química de la cubierta bacteriana Gram negativa es más sofisticada que las Gram positivas, de ahí que la actividad sobre aquellas es mínima.

El extracto etanólico de la corteza de *Persea americana* Mill. "palto" presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, ATCC 23122 *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931. Los taninos se encuentran en cualquier parte de la planta como es el caso de la corteza al cual se asigna distintos efectos como estimulación de células fagocitarias, actividad antitumoral y un amplio espectro antibacteriano. Su acción antibacteriana puede estar relacionada con su capacidad para inactivar las adhesinas del microorganismo, enzimas, proteínas de transporte de la cubierta celular, también forman complejos con los polisacáridos de la pared celular.¹⁷ En efecto, nuestros resultados también evidenciaron la presencia de taninos y otros compuestos con actividad antibacteriana, por lo que cabe la posibilidad de atribuirle a estas sustancias dicho efecto antibacteriano, ya que muchas experiencias previas de este tipo han demostrado que los taninos presentes en una especie vegetal tienen, entre otras, acción antibacteriana¹⁰, como es el caso de la corteza frente *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

El extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Mill. "palto" presenta una actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931 estos resultados podrían ser debido a la naturaleza de los metabolitos presente en el extracto de estudio y de sus mecanismos de acción sobre los microorganismos ensayados que son similares a los obtenidos por un estudio realizado en Bolivia en la semilla de *Persea americana* Mill. "palto", en la cual la actividad es atribuida a los metabolitos secundarios como flavonoides y taninos⁵. Otro estudio reporta que el extracto etéreo de la semilla de *Persea americana* Mill. "palto" tiene actividad frente a *Staphylococcus aureus* y el extracto etanólico de la semilla *Persea americana* Mill. "palto" tiene actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.³³

La variabilidad en la actividad antimicrobiana de los extractos de palto podría ser debido a la naturaleza de las sustancias antimicrobianas presentes en los extractos y de sus mecanismos de acción sobre los microorganismos ensayados. La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, taninos, terpenos, alcaloides y flavonoides están documentados en la literatura científica.

El mecanismo responsable del efecto antibacteriano 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 menor. Su actividad de los taninos es debida, probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y a nivel de la pared celular de la bacteria. Otro factor muy

importante que haya influido en la variabilidad de la actividad antibacteriana de los extractos de *Persea americana* Mill. "palto", es el solvente de extracción.¹⁷ El uso de extracto etanólico es común para este tipo de estudios. Sin embargo, la selección de otros disolventes no polares fuertes para aislar agentes con actividad antimicrobiana debido a la naturaleza lipídica de las paredes celulares bacterianas, por lo que se prefieren fracciones de baja polaridad como hexano y acetona que incluso inhiben a micobacterias.³⁵

Los espectros de las actividades antimicrobianas exhibidas por los extractos se podrían atribuir a la presencia de estos fitoconstituyentes lo que podría significar que *Persea americana* Mill. "palto" representa una fuente potencial de agentes terapéuticos.³⁴ y que, además, se estaría respaldando su uso empírico en la medicina tradicional.

Es de esperar que el estándar ciprofloxacino, por ser un fármaco de síntesis, con un grado de pureza y espectro de acción definido, muestre los resultados de inhibición esperado, es por ello que, en todos los casos, la eficacia antimicrobiana es muy superior a los extractos de *Persea americana* Mill. "palto". En la Tabla 5 y 6 se puede observar el promedio y el porcentaje de halos de inhibición de los diferentes extractos frente a las diferentes cepas en estudio, por lo que se puede decir que todos los extractos en estudio muestran cierta actividad inhibitoria sobre las diferentes cepas empleadas. En general las plantas sintetizan sustancias químicas como factor defensivo, tal es el caso de los flavonoides que son conocidos por ser sintetizados en respuesta al ataque microbiano.³⁴ Un estudio preliminar de las semillas de *Persea americana*, ha revelado la presencia de catequinas, ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámico, flavonoles y procianidinas,¹⁰ resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo.

Los diferentes extractos mostraron actividad antimicrobiana sobre las bacterias en estudio. Se sabe que los metabolitos secundarios se distribuyen en toda la planta, exhibiendo diferencias cuantitativas entre un órgano y otro. Esta diferencia se pone de manifiesto en la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas, cortezas y semillas de *P. americana* frente a cada cepa. En efecto, se puede apreciar que el extracto de la semilla muestra un porcentaje de inhibición de 51,2%, frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931 seguido de *Escherichia coli* con un halo de inhibición 32,2% y un halo de inhibición de 14,9% frente a cepa *Salmonella enterica* a una concentración del 10%.

El extracto etanólico de hojas muestra un halo de inhibición de 27,9% frente a cepa de *Shigella sonnei*, un halo de inhibición de 22,8% frente a cepa de *Escherichia coli*; y el extracto etanólico de la corteza *Persea americana* Mill. "palto" muestra un halo de inhibición de 24,8% frente a cepa de *Escherichia coli*, un halo de inhibición de 21,9% frente a cepa de *Shigella sonnei* y un halo de inhibición de 12,0% frente a cepa de *Salmonella enterica*. Como se puede apreciar el extracto de la semilla muestra mayor porcentaje de inhibición ya que es el órgano donde se concentra la mayor parte de metabolitos secundarios activos con actividad antibacteriana, seguida de las hojas y corteza. En este sentido, podría afirmarse, que se trata de los taninos y fenoles presentes en estos órganos de *P. americana*³³, además del grado de susceptibilidad de *S. sonnei* frente a los metabolitos mayoritarios de la semilla, lo que se ha visto traducida en un valor porcentual inhibitorio de 51,2% a mayor concentración. Tal como reporta estudios sobre la peptona, b-galactósido, ácido abscísico glicosilada, alcaloides, celulosa, poligalacto ureasa y los aceites volátiles fueron reportados para *Persea americana* Mill. "palto" ³⁶, y podrían coadyuvar de manera sinérgica con la actividad frente a las bacterias Gram negativas ensayadas. A pesar de la fuerte resistencia intrínseca de estos microorganismos

a la mayoría de agentes antimicrobianos, es importante la inhibición lograda con *P. americana*. Dado que los valores de CMI son bajos para todos los extractos, esto es indicativo de que los fitoconstituyentes de las hojas y semillas de *P. americana* tienen un alto potencial terapéutico que incluso trabajos científicos preliminares con los extractos etanólico y clorofórmico de las semillas inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* mostrando valores de CMI ≤ 50 g/ml. respectivamente.³⁵

Afirmar con exactitud el metabolito secundario con actividad antibacteriana, resultaría impreciso ya que, como se dijo, todos poseen cierta capacidad de actuar frente a muchos microorganismos y se han postulado múltiples formas de actuación de estos metabolitos sobre los microorganismos que conducen a la muerte de las bacterias.³⁷

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de las hojas de *Persea americana* Mill. "palto" presenta una actividad antibacteriana frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931 y *Escherichia coli* ATCC 23122; no presenta ninguna actividad antibacteriana frente a cepa de *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028. El extracto etanólico de la corteza de *Persea americana* Mill. "palto" presenta una actividad frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Shigella sonnei* ATCC 25931 y *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC. Finalmente el extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Mill. "palto" presenta una actividad antibacteriana frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Escherichia coli* ATCC 13122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC.
2. El extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" presentan metabolitos secundarios: En las hojas presenta una fuerte cantidad de alcaloides, triterpenos y esteroides, resinas; moderada cantidad de azúcares reductores, taninos y fenoles, flavonoides; la corteza presenta moderada cantidad de triterpenos y esteroides, resinas, azúcares reductores, leve cantidad de taninos y fenoles; por último la semilla presenta una fuerte cantidad de alcaloides moderada cantidad de triterpenos y esteroides, taninos y fenoles, flavonoides; leve cantidad de resinas y azúcares reductores.
3. Los resultados del extracto etanólico de las hojas de *Persea americana* Mill.

“palto” frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 23122, reporta una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0,625 mg/ml; y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 1,250 mg/ml; frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931, reporta una Concentración Mínima Inhibitoria de 0,625 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 1,250 mg/ml no muestran actividad significativa sobre *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 14028. Así el extracto etanólico de la corteza reporta una Concentración mínima Inhibitoria (CMI) de 0,039 y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,078 mg/ml frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 23122, frente a cepa de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 14028 reporta una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0,156 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,313 mg/ml; mientras la cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931 reporta una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 1,250 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 2,500 mg/ml El extracto etanólico de la semilla muestra una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0,039 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,078 mg/ml frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 23122; frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931 reporta una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0,002 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,005 mg/ml; frente a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 25931 reporta una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0,625 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 1,250 mg/ml. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. “palto” presentan actividad antibacteriana frente a las cepas de enterobacterias en estudio.

VII. RECOMENDACIONES

1. Identificar y cuantificar las moléculas presentes en el extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" con actividad antibacteriana.
2. Realizar estudios antibacterianos del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" a concentraciones mayores que las estudiadas.
3. Continuar con el estudio del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a hongos y parásitos.
4. Evaluar el grado de toxicidad del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".
5. Seguir investigando plantas medicinales con actividad antibacteriana para lograr alternativas del tratamiento de infecciones bacterianas.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carhuapoma M, Angulo P. Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectivas de desarrollo en la región los Libertadores Wari. Agencia de Cooperación; 1999.
2. Ryan K, George C. Microbiología médica una introducción a las enfermedades infecciosas 4^a ed. México: Editorial McGRAW-HILL Interamericana S.A; 2004.
3. Torres L, Tapia M, Aguilar A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Editorial Gráficas Rey S.L; 2005.
4. Arango M. Plantas medicinales: Botánica de interés médico. Colombia; 2006.
5. 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.
6. Vilcapoma D. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la semilla de palta [Tesis]. Huancayo: Universidad Peruana los Andes. Facultad de Ciencias de la Salud; 2011.
7. Muñoz O, Wilkomirsky T. Plantas medicinales de uso en Chile, química y farmacología. 2^a ed. Santiago de Chile: Editorial Maval Ltda.; 2004.
8. Eduardo O; Sánchez, Col. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos Argentina. Ciencia, docencia y tecnología; 2012, 23(45):165-185.
9. Hall V, Rocha M, Rodríguez E. Plantas medicinales Vol. II (Revista en internet) Centro nacional de información de medicamentos (CIMED). INIFAR. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica; 2002.
10. Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59(10):5625-5635.
11. José M. Box M. Prontuario de agricultura, cultivos agrícolas. España: Editorial Mundi-Prensa; 2005.
12. Orduz J, Rangel J. Plantas frutales tropicales potenciales para el pie de monte llanero. Colombia: Editorial Corpoica; 2002.
13. Bernal E, Díaz D. Tecnología para el cultivo del aguacate. Colombia: Editorial Produmedios; 2008.
14. Carita M. Estudios preliminares hacia la estandarización para la valoración hepatóxica y nefrotóxica de extractos vegetales (*Persea americana*) en ratones [Tesis]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; 2005.
15. Vega M. Etnobotánica de la Amazonia peruana. Quito: Editorial Abya-Yala; 2001.
16. Kuklinski C. Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Editorial Omega S.A; 2003.

17. Villar del Fresno A. Farmacognosia general. España: Editorial Síntesis S.A; 1999.
18. Granados R, Villaverde C. Microbiología, bacteriología, características y clasificación bacteriana, virología. Características y técnicas bioquímicas. Barcelona: Editorial Paraninfo S.A; 2003.
19. Cárdenas V. Bacteriología. Ayacucho. s/e; 2012.
20. Chucrón S. Microbiología fundamentos básicos. Lima: Editorial M&S Impresores; 2006.
21. Romero E. Patología general y fisiopatología Tomo I. 5ª ed. Madrid: Editorial Alhambra; 1980.
22. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.
23. Alvarado J. Antibióticos y quimioterapicos. 2ª ed. Lima: Editorial AMP ediciones; 2006.
24. Goodman y Gilman. Las Bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª. ed. México: Editorial McGraw-Hill interamericana; 2004.
25. Flórez J. Farmacología humana. 2ª ed. Barcelona: Ediciones Científicas y técnicas S.A; 2003.
26. Cotillo P. Farmacología: mecanismo de acción. Glosario. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 1998.
27. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2ª ed. Lima: Editorial Fondo PUCP; 1994.
28. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Instituto de farmacia y alimentos. La Habana; 2000.
29. Granados R, Villaverde C. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general y parasitología general tomo II. 2ª ed. Barcelona: Editorial Paraninfo S.A; 2007.
30. Acharte D, Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus Aurantium L.* "naranja" frente a una cepa de *Cándida Albicans* ATCC 10231. [Tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas, 2010.
31. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª. Ed. España: Editorial Masson; 2005.
32. Gião MS, González-Sanjósé ML, Rivero-Pérez MD, Pereira CI, Pintado ME, Malcata FX. Infusions of Portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. Journal of the Science of Food and Agriculture; 2007, 87(14):2638-2647.
33. Niogret J, Epsky ND, Schnell RJ, Boza EJ, Kendra PE, Heath RR. Terpenoid Variations within and among Half-Sibling Avocado Trees, *Persea americana* Mill. (Lauraceae). PloS one; 2013, 8(9): 73601.
34. Idris S, Ndukwe G, Gimba, C. Preliminary phytochemical screening and

- antimicrobial activity of seed extracts of *Persea americana* (avocado pear). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences; 2009, 2(1):173-176.
35. Gómez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. Amer-Eur J Scient Res; 2008, 3(2):188-194.
 36. Yasir M, Das S, Kharya MD. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. Pharmacognosy reviews; 2010, 4(7):77.
 37. Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Comejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. BMC complementary and alternative medicine; 2013, 13(1):109.
 38. Brñas F. 2010. Usos locales y diversidad del aguacate (*Persea americana* Mill.) en el Municipio de Chilchota. [Tesis]. Puebla: Colegio de Postgraduados Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Puebla; 2010.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 8. Certificado de clasificación taxonómica.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

CERTIFICA

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Vilma, **NAJARRO LAURA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de investigación. Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist, A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	LAURALES
FAMILIA	:	LAURACEAE
GENERO	:	<i>Persea</i>
ESPECIE	:	<i>Persea americana Mill.</i>
N.V.	:	"palto"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 29 de Mayo del 2013

Dpto. Laura Najarro Najarro
JEFE

Anexo 2

Tabla 9. Certificado de las cepas bacterianas.



CERTIFICACIÓN

El que suscribe Mg. Víctor Luis Cárdenas López, Jefe del Laboratorio de Bacteriología del Área Académica de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas certifica que se están proporcionando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931 a la Srta. Vilma NAJARRO LAURA, egresada de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica quien desarrollará la investigación titulada: Actividad Biológica del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill "palto" frente a cepas de enterobacterias. Ayacucho, 2013.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que crea conveniente.

Ayacucho, 14 de agosto de 2013.


M.Sc. VÍCTOR CÁRDENAS LÓPEZ
BIÓLOGO-MICROBIÓLOGO
C.B.P. 1866

Anexo 3

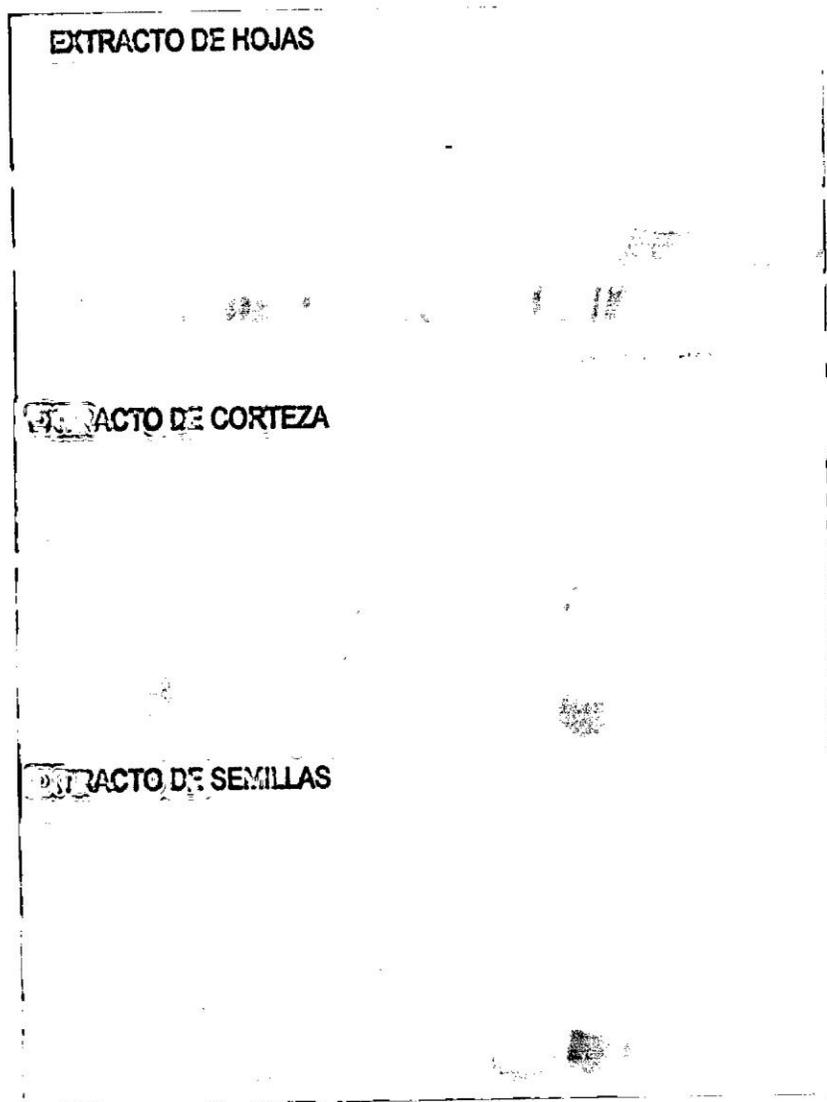


Figura 2. Coloraciones de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".

Anexo 4

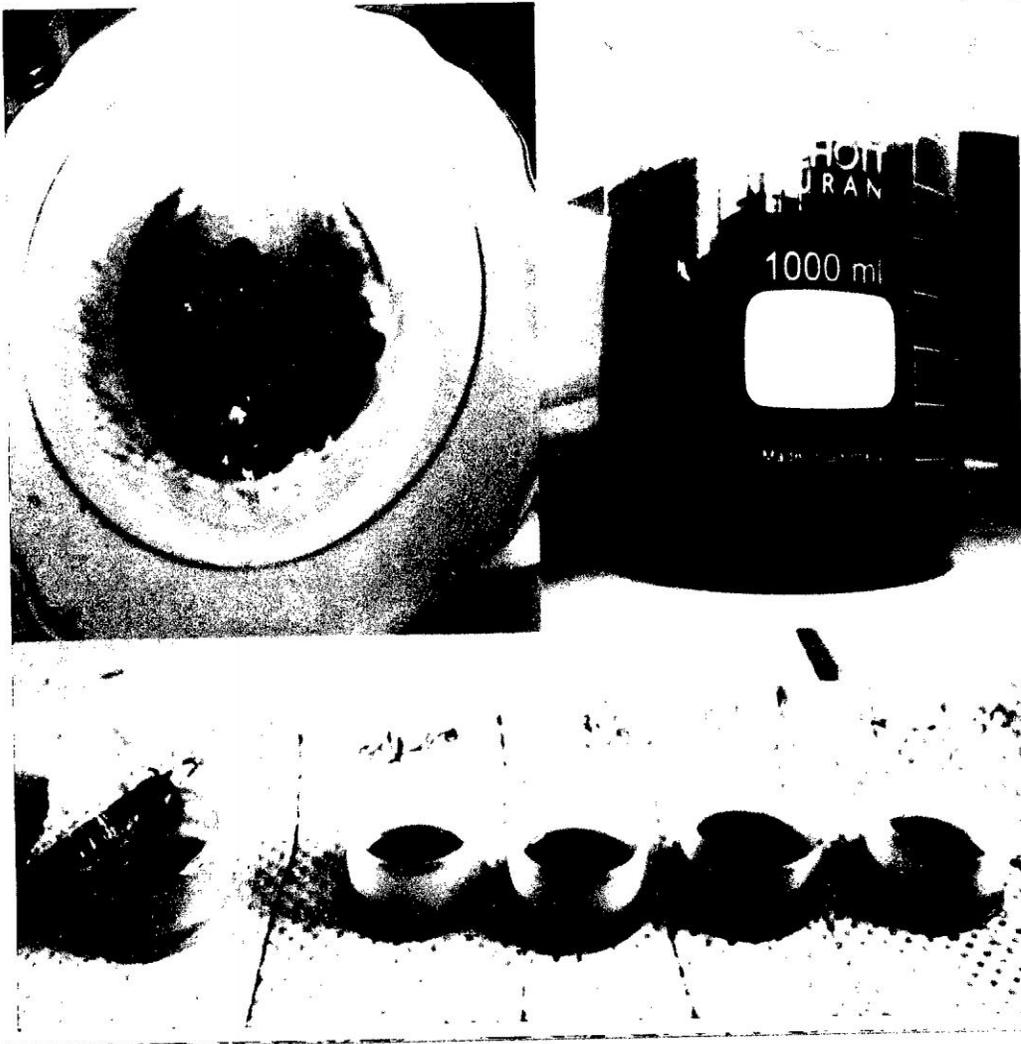


Figura 3. Extracto etanólico de hojas corteza y semilla *Persea americana* Mill. "palto".

Anexo 5



Figura 4. Medios de cultivo y preparación de los inóculos.

Anexo 6

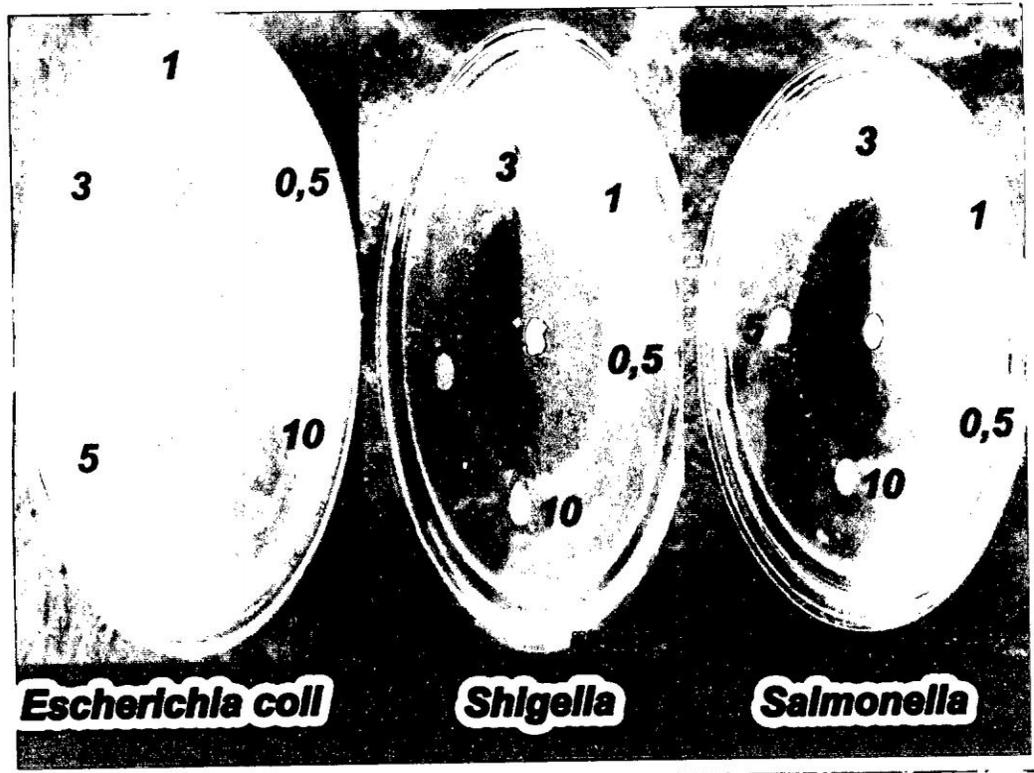


Figura 5. Halos de inhibición de los diferentes extractos según cepas.

Anexo 7

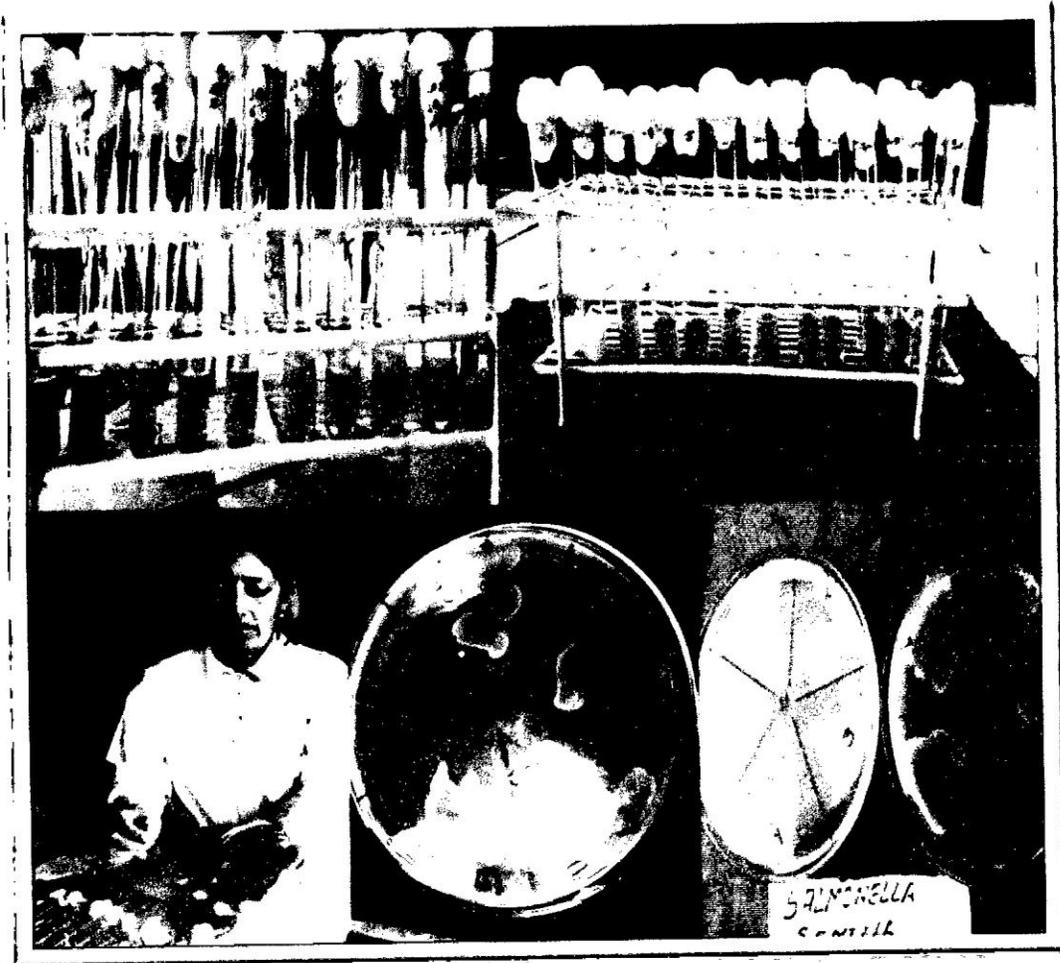


Figura 6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.

Anexo 8

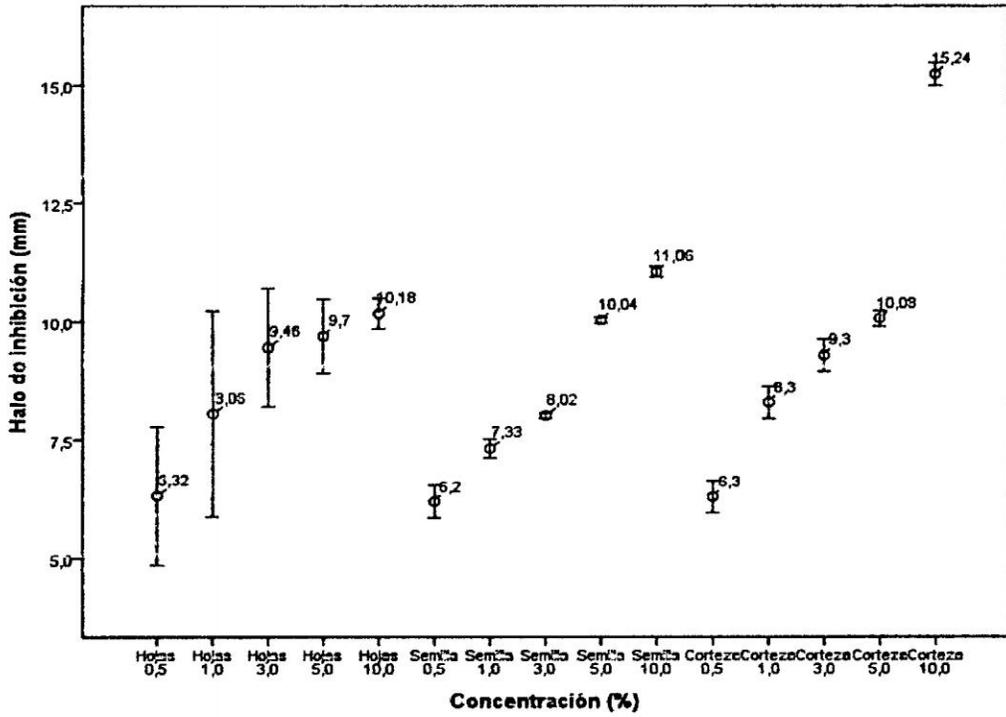


Figura 7. Halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, semilla y corteza de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepa de *Escherichia coli*. ATCC 23122.

Anexo 9

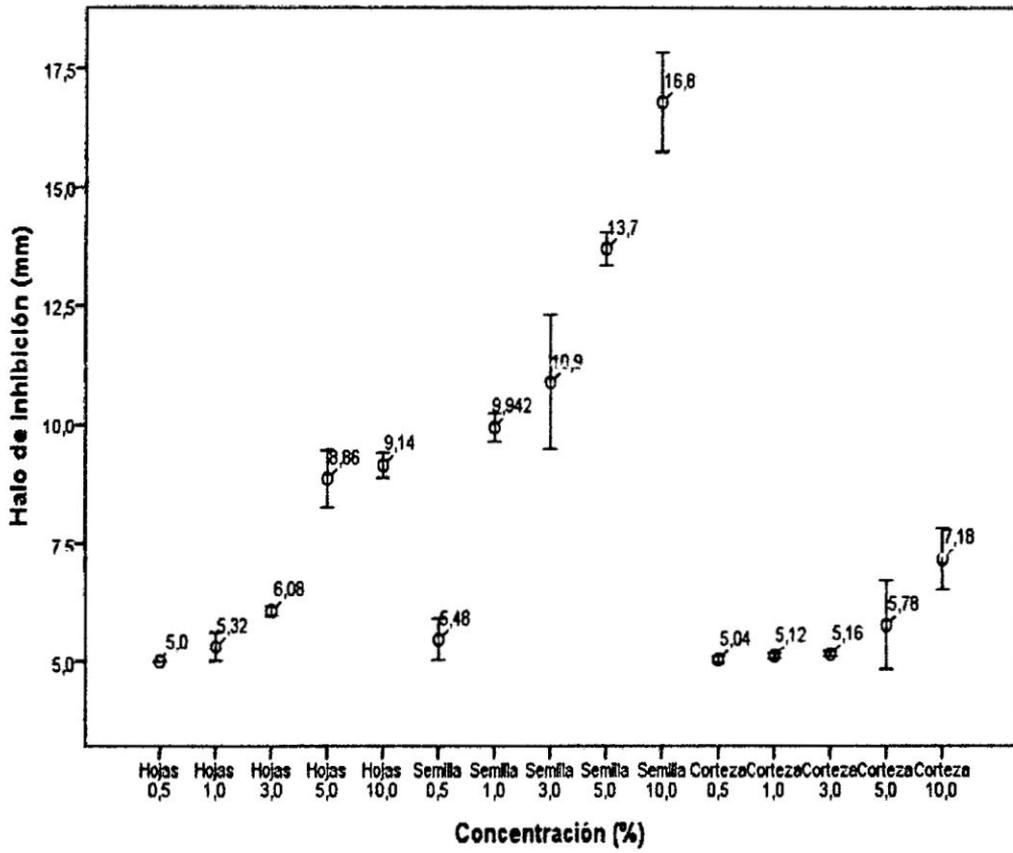


Figura 8. Halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, semilla y corteza de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Anexo 10

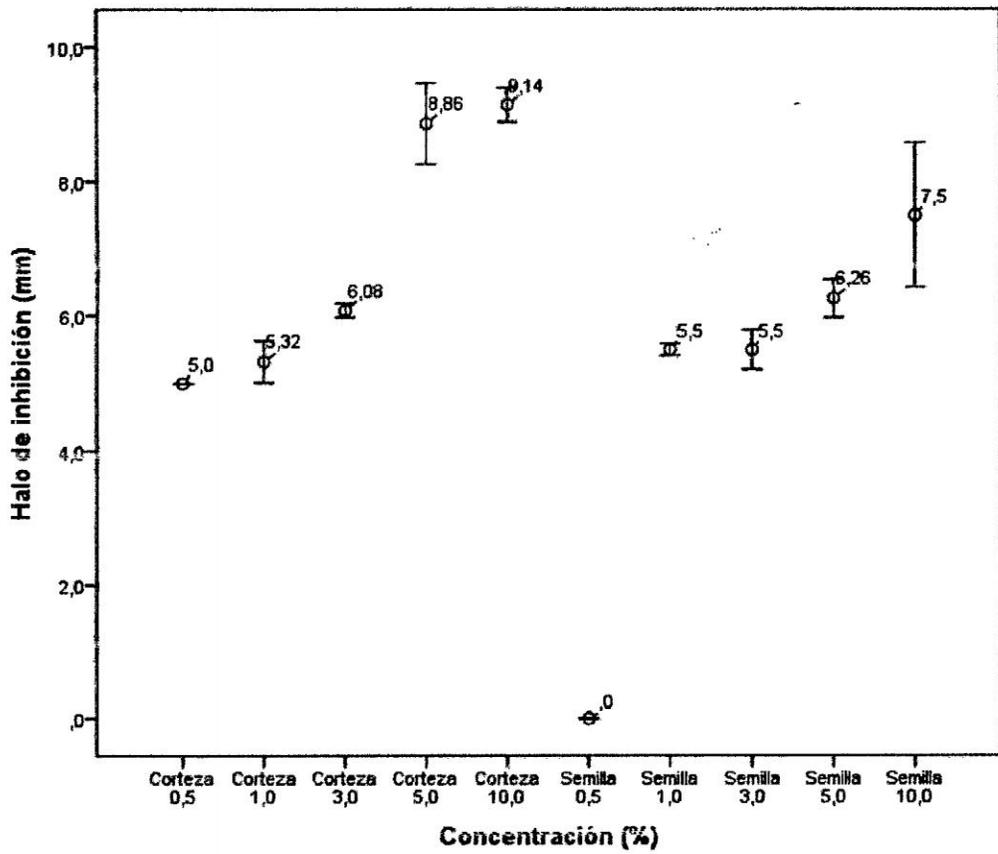


Figura 9. Halos de inhibición del extracto etanólico de la corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028.

Anexo 11

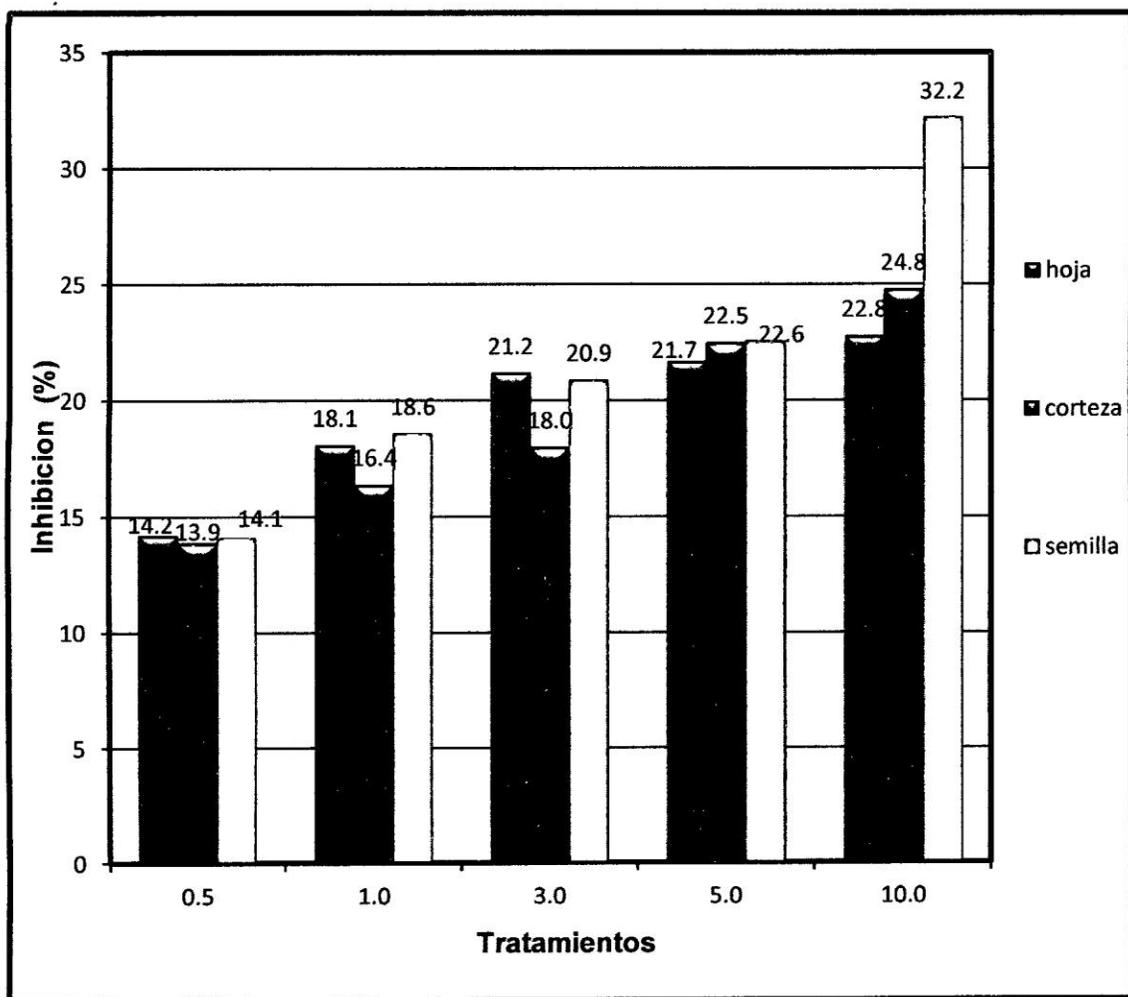


Figura 10. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepa de *Escherichia coli*.ATCC 23122.

Anexo 12

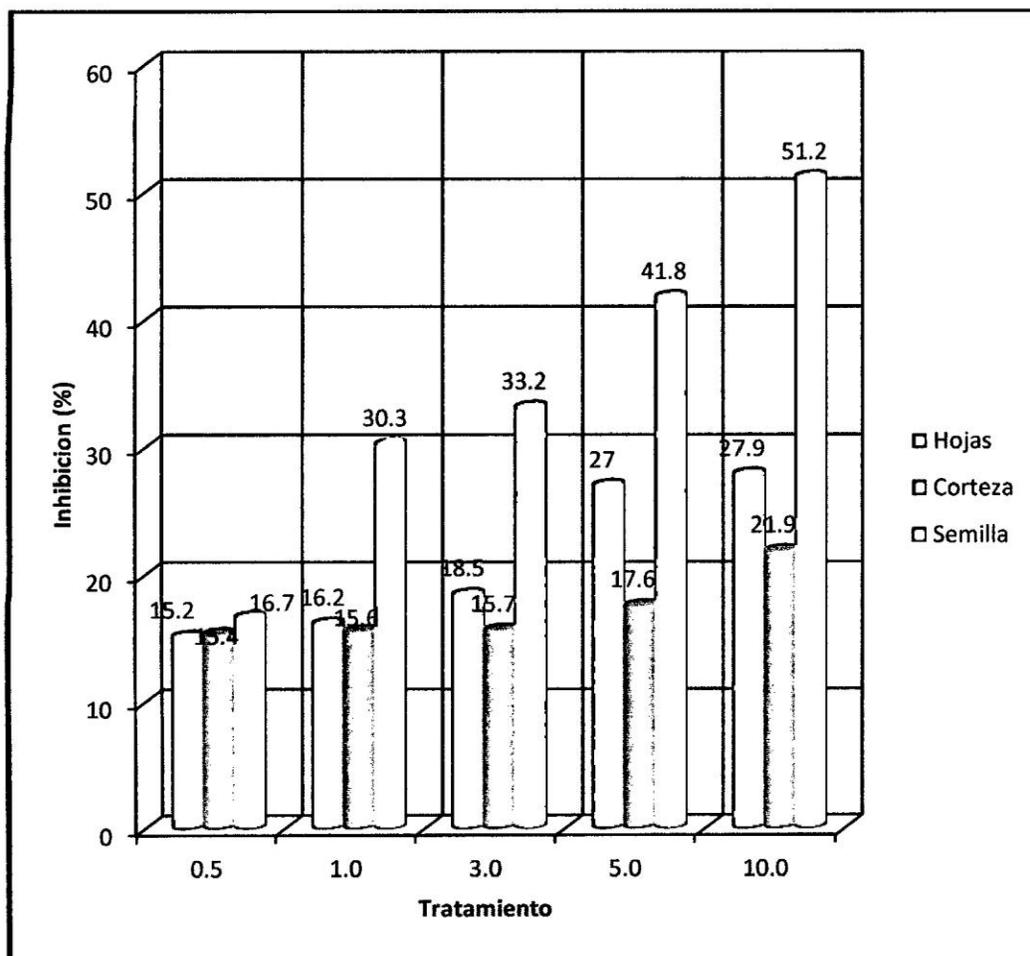


Figura 11. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Anexo 13

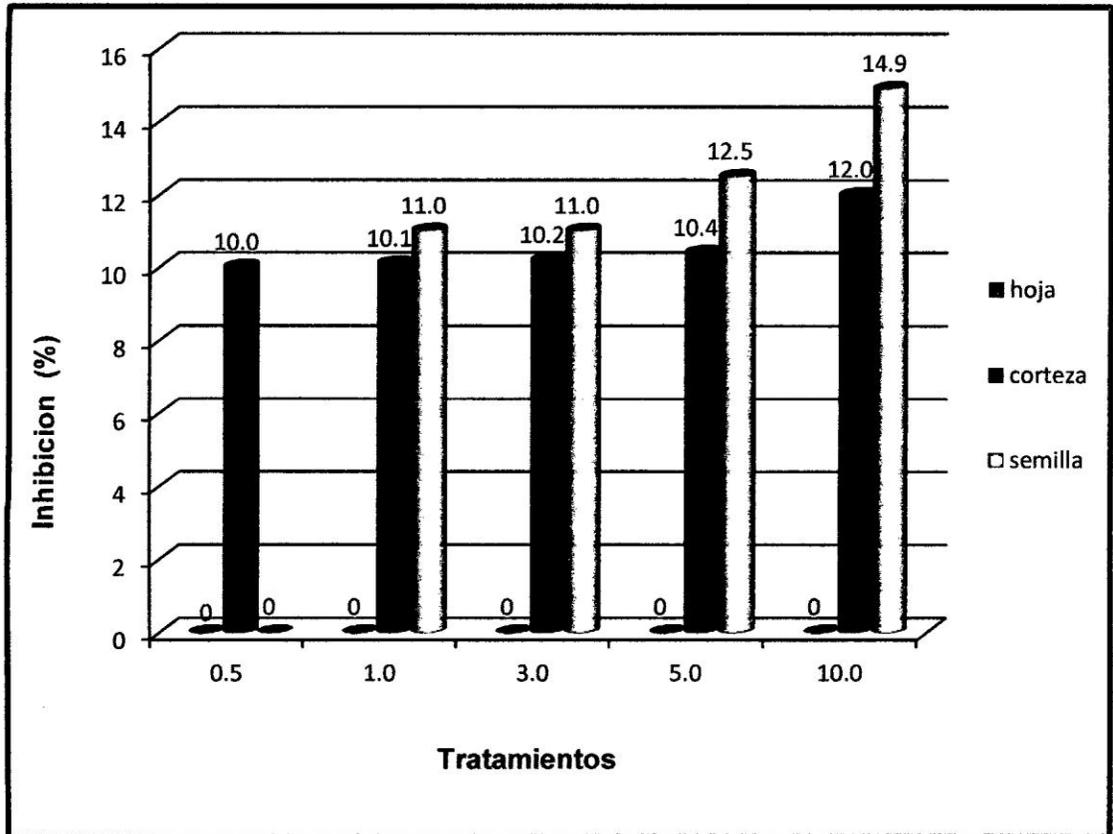


Figura 12. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Salmonella enterica* subsp. enterica ATCC 14028.

Anexo 14

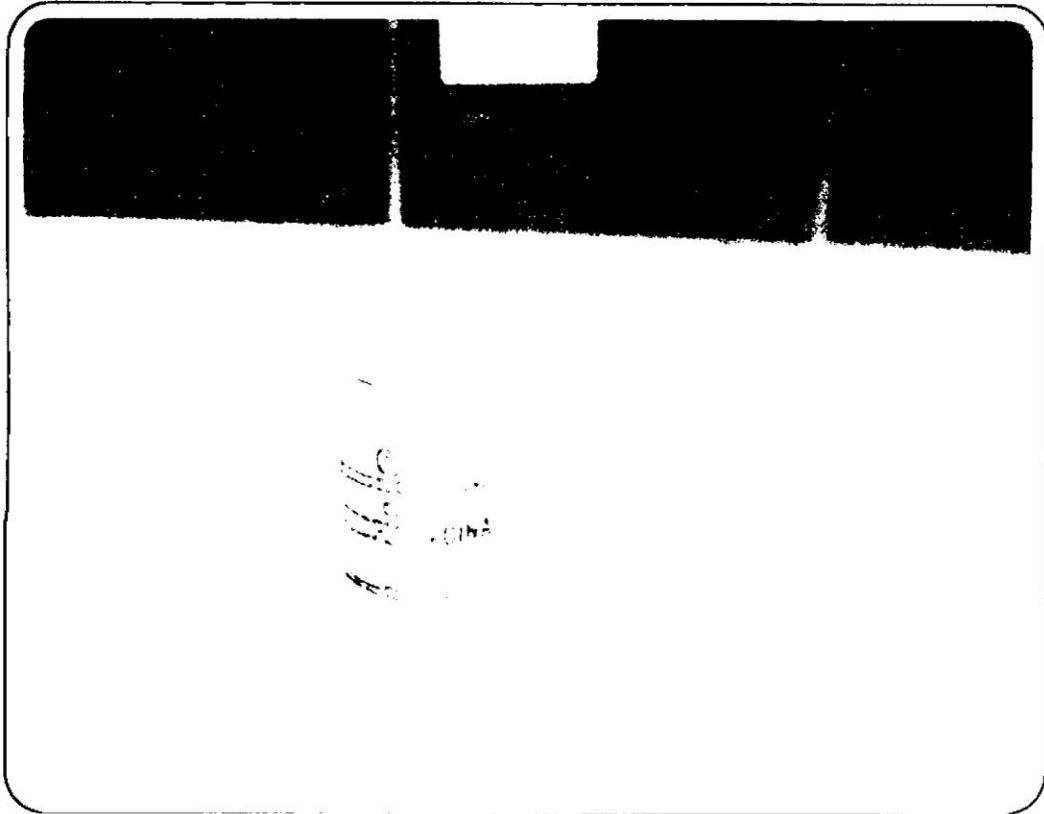


Figura 13. Discos de ciprofloxacino.

Anexo 15

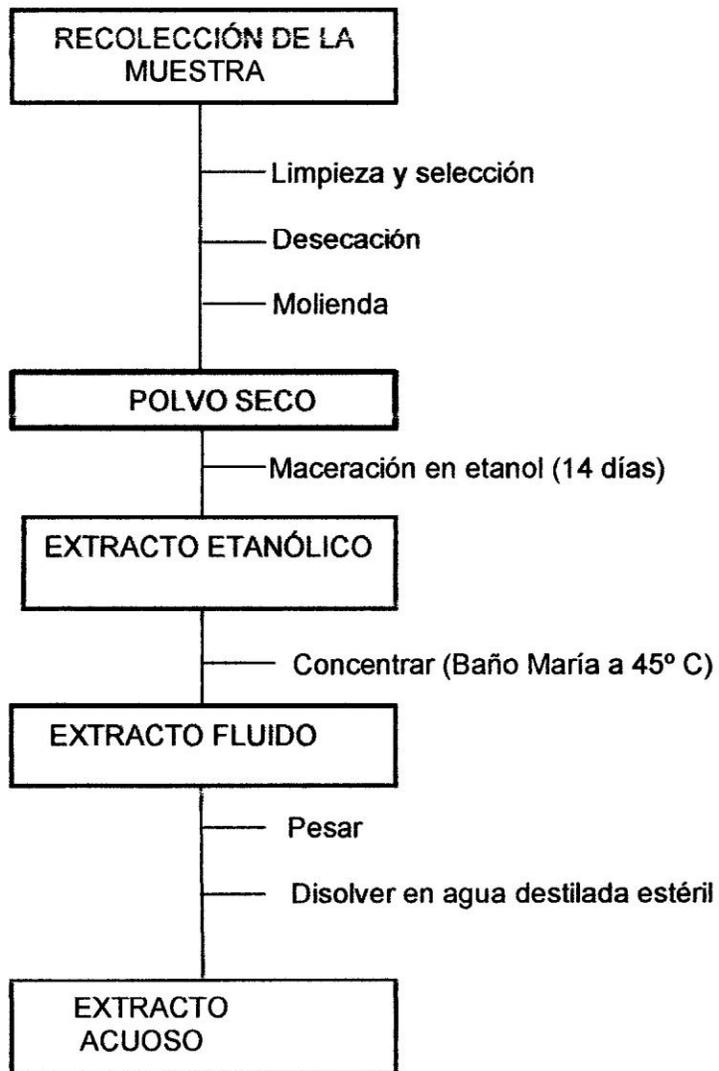


Figura 14. Preparación del extracto etanólico.

Anexo 16

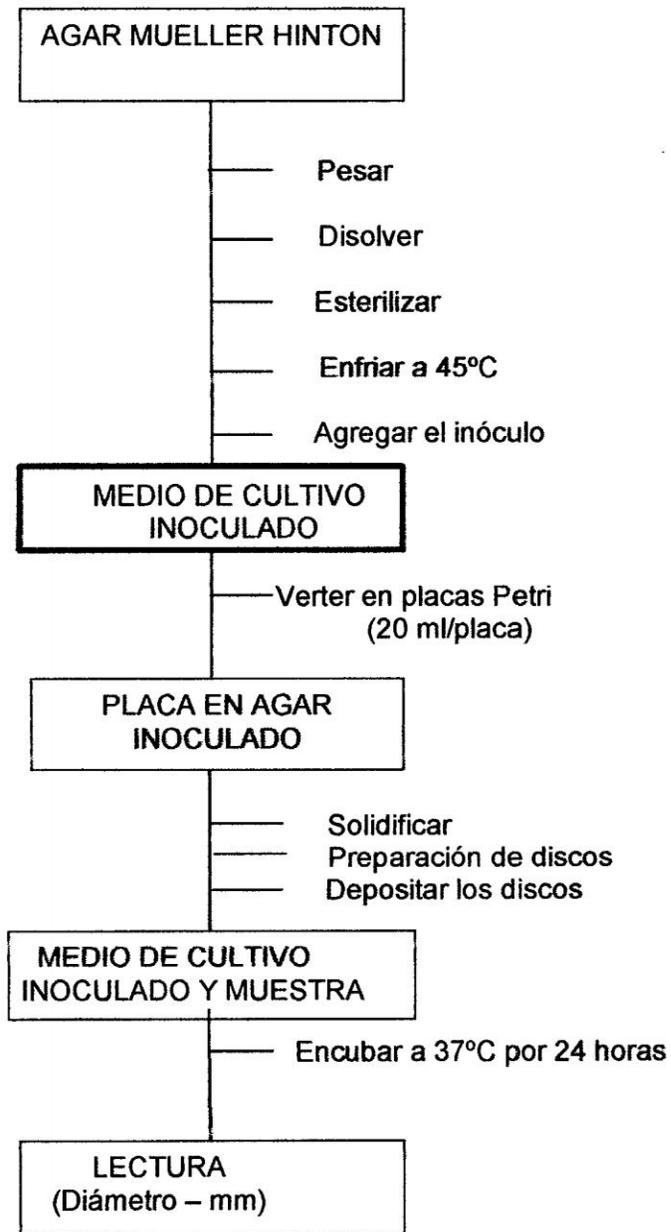


Figura 15. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Anexo 17

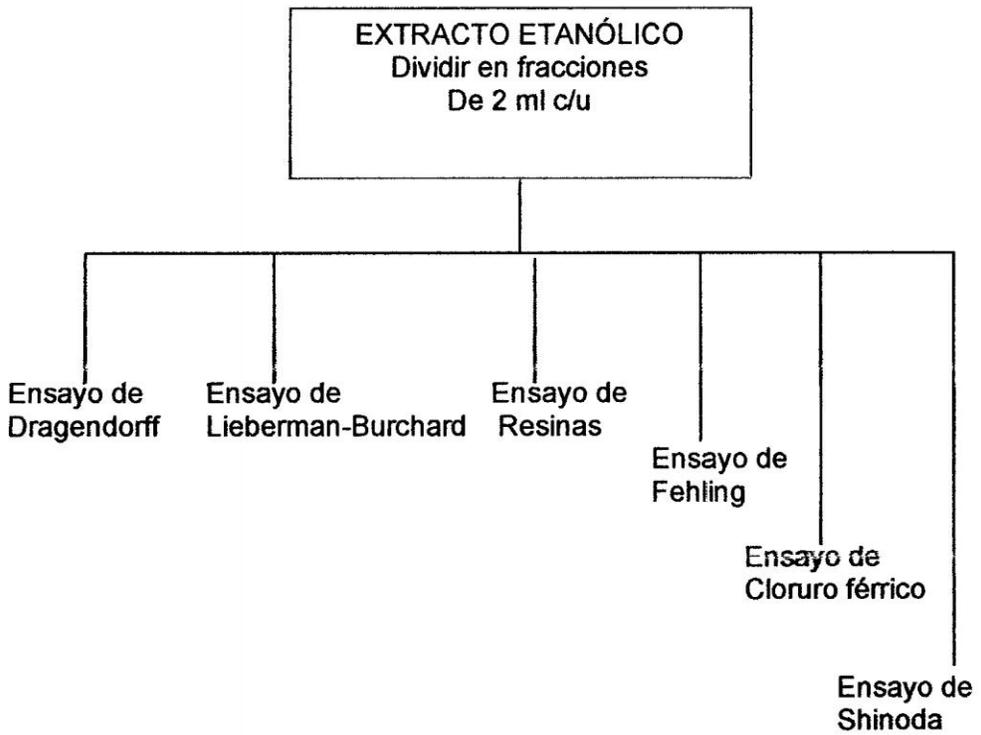


Figura 16. Ensayos con el extracto etanólico.

Anexo 18.
Tabla 10. Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Marco teórico	Metodología
Actividad biológica del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepas de enterobacterias, Ayacucho 2013.	¿Tendrá actividad biológica el extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" en cepas de enterobacterias?	<p>Objetivo General:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepas de enterobacterias. <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Realizar la marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto". • Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" frente a cepas de enterobacterias a diferentes concentraciones. • Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto". • Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto". 	El extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto" tienen actividad antibacteriana frente a cepas de enterobacterias.	<p>Variable Independiente: El extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto".</p> <p>Enterobacterias:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i>. • <i>Shigella sonnei</i>. • <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica. <p>Indicadores: Concentraciones de 0.5; 1.0; 3.0; 5.0 y 10% del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto".</p> <p>Variable dependiente: Actividad biológica.</p> <p>Indicador: Halos de inhibición en mm. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida en mg/ml.</p>	<p><i>Persea americana</i> Mill. "palto".</p> <ul style="list-style-type: none"> - Clasificación taxonómica - Descripción botánica - Propiedades y usos medicinales - Metabolitos secundarios con actividad antibacteriana. <p>Existe evidencia que da soporte científico a la posible actividad biológica de metabolitos tales como taninos, aceites esenciales, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, etc.</p> <p>Enterobacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> - Morfología. - Patogenia y epidemiología. <p>Antibacterianos Ciprofloxacino</p> <ul style="list-style-type: none"> - Farmacocinética y farmacodinamia. - Farmacoquímica. 	<p>Nivel de Investigación. Experimental.</p> <p>Población. Hojas, corteza y semillas de <i>Persea americana</i> Mill "palto" que crecen en el distrito de Huaccana, provincia de Chincheros, región Apurímac.</p> <p>Muestra. 1 kg de hojas, corteza y semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palto".</p> <p>Unidad Experimental: Cepas de: <i>Escherichia coli</i> ATCC 23122, <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica ATCC 14028 y <i>shigella sonnei</i> ATCC 25931, adquiridas del Laboratorio de Bacteriología del Área Académica de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la UNSCH.</p> <p>El método a utilizar es difusión en disco (Kirby Bauer).</p> <p>Diseño experimental Se ensayaron cinco concentraciones de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 y 10,0% con cinco repeticiones cada una sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 23122, <i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica ATCC 14028 y <i>shigella sonnei</i> ATCC 25931.</p> <p>Análisis Estadístico Los resultados se procesarán en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de tukey con un nivel de significancia de 0,05.</p>

Actividad biológica del extracto etanólico de las hojas corteza y semilla de *Persea americana* Mill. “palto” frente a cepas de enterobacterias. Ayacucho, 2013.

Vilma Najarro Laura¹, Víctor Luis Cárdenas López¹ y Vilma Vivian Falconí Ore¹.

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. “palto”, realizado en los laboratorios de bioquímica y microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en los meses de Junio a Noviembre del 2013. El tipo de investigación fue básico experimental. Se empleó el método de disco difusión de Kirby Bauer utilizando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931. Fueron ensayadas concentraciones de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 y 10%; como control se utilizó ciprofloxacino de 5µg. Los extractos contienen: taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, quinonas, catequinas, azúcares reductores, alcaloides, triterpeno y/o esteroides. Se encontró que el extracto etanólico de las hojas de *P. americana* muestra una actividad antibacteriana frente a *E. coli*, alcanzando 22,8% de inhibición al 10%; CMI de 0,625mg/ml y CMB de 1,250 mg/ml; frente a cepa de *Shigella sonnei*, alcanzando 27,9% de inhibición al 10%, CMI 0,625 mg/ml y CMB de 1,250 mg/ml; no muestran actividad significativa sobre *Salmonella enterica*. Así el extracto de la corteza muestra una actividad antibacteriana frente a *E. coli*, alcanzando 24,8 % de inhibición al 10%, CMI de 0,039 mg/ml y CMB de 0,078 mg/ml; *Salmonella enterica* fue inhibida en 12,0% con una CMI de 0,156 mg/ml y CMB de 0,313 mg/ml; *Shigella sonnei* fue inhibida en un 21,9% con una CMI 1,250 mg/ml y CMB de 2,500 mg/ml y el extracto etanólico de la semilla muestra una actividad frente a *E. coli* alcanzando 34,2 % de inhibición al 10% con una CMI de 0,039 mg/ml y CMB de 0,078mg/ml; frente a *Shigella sonnei* el halo de inhibición fue de 51,2 % con una CMI de 0,002 mg/ml y la CMB de 0,005 mg/ml; frente a *Salmonella enterica* alcanzando 14,9% de inhibición al 10%; CMI de 0,313 mg/ml y CMB de 0,625 mg/ml. Se concluye que los extractos etanólico de las hojas, corteza y semilla tienen actividad antibacteriana frente a las cepas bacterianas en estudio.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) *Escherichia Coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931

SUMMARY

The present study was conducted to determine the antibacterial activity of the ethanol extract from the leaves, bark and seeds of *Persea americana* Mill. "Avocado", performed in the laboratories of biochemistry and microbiology at the School of Biological Sciences, National University San Cristobal de Huamanga in the months from June to November 2013 the research was experimental basics. The method of Kirby Bauer disk diffusion using *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subsp. enterica and *Shigella sonnei* ATCC 14028 ATCC 25931. Fueron tested concentrations of 0.5, 1.0, 3.0; 5.0 to 10%; 5 ug ciprofloxacin as a control was used. Extracts containing: tannins, phenolic compounds, flavonoids, lactones and / or coumarins,

quinones, catechins, reducing sugars, alkaloids, triterpene and / or steroids. It was found that the ethanolic extract of the leaves of *P. americana* shows an antibacterial activity against *E. coli*, reaching 22.8% inhibition at 10%; MIC of 0.625 mg / ml and MBC 1,250 mg / ml; against *Shigella sonnei*, reaching 27.9% inhibition to 10%, CMI 0.625 mg / ml and MBC 1,250 mg / ml; not show significant activity on *Salmonella enterica*. Thus the bark extract shows an antibacterial activity against *E. coli*, reaching 24.8% inhibition to 10%, MIC of 0.039 mg / ml and MBC 0,078 mg / ml; *Salmonella enterica* was inhibited by 12.0% with an MIC of 0.156 mg / ml and 0.313 mg MBC / ml; *Shigella sonnei* was inhibited by 21.9% with an MIC 1.250 mg / ml and WBC of 2,500 mg / ml and the ethanol extract of the seed shows activity against *E. coli* reaching 34.2% inhibition at 10% an MIC of 0.039 mg / ml and MBC 0,078mg / ml; *Shigella sonnei* versus the zone of inhibition was 51.2% with an MIC of 0.002 mg / ml and the MBC of 0,005 mg / ml; *Salmonella enterica* versus 14.9% inhibition reached 10%; MIC of 0.313 mg / ml and MBC 0.625 mg / ml. It is concluded that the ethanolic extracts of the leaves, bark and seeds have antibacterial activity against the bacterial strains studied.

Keywords: *Persea americana* Mill, minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CMB) *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028 and ATCC 25931 *Shigella sonnei* l

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no sólo cuando los constituyentes de las plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como material base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos.¹

En la actualidad estamos expuestos a muchas enfermedades de índole microbiana que son tratados con medicamentos comerciales, que al no ser consumidos en forma correcta producen una resistencia de las bacterias a dicho fármaco, por lo que con mayor frecuencia el medicamento resulta ineficiente², en este sentido, la medicina tradicional o herbolaria es una alternativa para tratar enfermedades infecciosas.

Las comunidades rurales utilizan tradicionalmente las plantas como medio para curar sus enfermedades. Ellos han recibido de generación en generación un bagaje de conocimientos que se ha acumulado desde tiempos inmemoriales sobre selección, manejo, conservación y uso de las diferentes especies de plantas que crecen en nuestro país, y en los últimos años los habitantes de las ciudades están utilizando por lo que se puede decir que está en auge la medicina tradicional.

Entre las especies utilizadas tenemos a *Persea americana* Mill. "palto", una lauraceae originario de América Central y México, es cultivado actualmente en casi todos los países de clima cálido y templado^{3, 4} incluido el Perú que cuenta con una serie de microclimas, uno de ellos con características aptas para el desarrollo de la especie *Persea americana* Mill. "palto", particularmente en nuestra región, en zonas cálidas de la provincia de Huanta, y el Valle del río Apurímac, Ene y Mantaro

(VRAEM)¹ también en la región de Apurímac se cultivan en los Valles de Pampas y Pulcay, es muy utilizada por sus propiedades alimenticias, medicinales por su uso tradicional para diferentes afecciones entre las cuales antiespasmódica, antihelmíntica. Los compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antibacteriana generalmente son compuestos fenólicos y polifenoles entre los que se encuentran quinonas, flavonoides, taninos. Otros son los terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipeptidos, entre otro *Persea americana* Mill. "palto" presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Shigella* y *Samonella*.^{4,5} Debido a esto nos planteamos el objetivo general de:

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931, y los objetivos específicos: Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto", determinar la actividad antibacteriana frente a cepas de enterobacterias a diferentes concentraciones; determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".

MATERIALES Y MÉTODOS

DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

Hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" que fueron recolectados en el valle de Pulcay, distrito de Huaccana, provincia de Chincheros, región de Apurímac a 3050 msnm, Perú.

Muestra

1 kg de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".

Microorganismos de ensayo

Escherichia coli ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931 que fueron adquiridos del Laboratorio de Bacteriología del Área Académica de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la UNSCH.

DISEÑO METODOLÓGICO

Metodología para la recolección de datos

Recolección y procesamiento de la muestra

La recolección y selección de las hojas, corteza y semilla se realizó de acuerdo a las recomendaciones establecidas por Villar del Fresno.

Las hojas, corteza y semilla fueron sometidas a un tratamiento de limpieza y selección para eliminar todo elemento extraño. Seguidamente fueron desecados a temperatura ambiente bajo ventilación sobre papel kraf, durante 15 días y finalmente fueron sometidas a molienda hasta obtener un polvo fino no mayor a 3 mm.⁶

Preparación del extracto de las hojas, corteza y semilla

Se pesó 1 kg de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" pulverizadas luego se añadió 2 l de etanol de 96° y las tres muestras fueron maceradas por separado en un frasco de vidrio de color ámbar por un período de 7 días con agitación diaria. Seguidamente se filtró en un sistema al vacío y se procedió a concentrar utilizando el equipo de baño María a una temperatura de 45°C hasta obtener un extracto seco y conservándose el extracto en el refrigerador a una temperatura de 8°C hasta realizar las diferentes pruebas antibacterianas.⁶

Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios

Para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto", se realizaron mediante reacción de coloración y precipitación siguiendo la metodología propuesta por Miranda.²⁸

Determinación de la actividad antibacteriana

La evaluación antibacteriana se realizó utilizando el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) para la determinación del halo de inhibición, y por el método de dilución en caldo para la determinación de la CMI y CMB.^{7,8}

A. Activación de las bacterias

Para activar las cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931, procedió a inocular en tubos de ensayo con 5ml de caldo nutritivo, se incubó a una temperatura de 37°C por 18 horas⁹

B. Preparación del inóculo de las bacterias

Con las tres cepas reactivadas se procedió por separado a seleccionar 5 colonias en 5 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37°C hasta que la turbidez sea visible (5 horas fase logarítmica). Y se ajustó la turbidez visualmente al estándar de 0,5 de la escala de McFarland.⁹

Determinación del halo de inhibición⁹

- En cada placa Petri se colocaron 20 ml de agar Mueller Hinton previamente esterilizado y se dejó solidificar en el medio.
- Con un hisopo estéril sumergirlo en la suspensión y eliminar el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo.
- Inocular la superficie de la placa de agar de Mueller Hinton con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie por tres direcciones. Por último, pasar el hisopo por el perímetro externo del agar. Dejar reposar 5 minutos.
- Colocar los discos impregnado con los extractos a diferentes concentraciones sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar y con el control positivo (ciprofloxacino 5µg). Dejar las placas 15 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar la placa en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
- Medir los diámetros de la zona de inhibición con una regla utilizando luz refleja sobre fondo negro.

Interpretación: La formación de halo de inhibición significa sensibilidad (S) y la no formación resistencia (R).

Determinación del porcentaje de inhibición: Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

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

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)⁹

- Se prepararon 15 tubos de ensayo previamente esterilizados y rotulados del 1 al 15.
- A partir del tubo 1 hasta el tubo 15, se agregó 1 ml del caldo nutritivo.
- Posteriormente se agregó 1 ml del extracto al tubo 1, a partir del cual se traspasó 1 ml al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 14, del cual se tomó 1 ml y se descartó. El tubo 15 no recibió extracto, siendo éste el control.
- Luego se agregó 1 ml del inóculo de la cepa bacteriana a todos los tubos y se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas.

Interpretación Se considera CMI como la concentración correspondiente al tubo con menor concentración donde no ha habido desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez.

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)⁹

- Una vez observado la turbidez, al determinar la CMI; se procedió a sembrar con la ayuda del asa de Kolle, los caldos no turbios en las placas con agar Mueller Hinton
- Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas.

Interpretación: Se determinó la CMB verificando si hubo o no crecimiento de cepa bacteriana en las placas sembradas.

Análisis de datos

Los resultados se presentan en tablas y figuras. También se realizó la interpretación mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, con el programa SPSS versión 21.

RESULTADOS

Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas,

corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto". Ayacucho 2013.

Metabolitos Secundarios	Ensayo	E. etanólico		
		Hojas	Corteza	Semilla
Alcaloides	Dragendorff	+++	+	+++
Triterpenos y Esteroides	Lieberman - Burchard	+++	++	++
Resinas	Resinas	+++	++	+
Azúcares reductores	Fehling	++	++	+
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	++	+	++
Flavonoides	Shinoda	++		++

Leyenda: Leve (+), Moderad (++), Fuerte (+++)

Tabla 4. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931. Ayacucho 2013.

Especie bacteriana	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Persea americana</i> Mill. "palto"		
	Hoja	corteza	semilla
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23122	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> ATCC 14028	-	+	+
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	+	+	+

Leyenda: No presenta actividad antibacteriana (-), presenta actividad antibacteriana (+)

Tabla 5. Promedio de halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* y *Shigella sonnei*. Ayacucho 2013.

Co. nc. %	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
	Hoja	Corteza	Semilla	Hoja	Corteza	Semilla	Hoja	Corteza	Semilla
0,5	6,3	6,2	6,3	-	5,0	-	5,0	5,04	5,48

3,0	9,4 6	8,02	9,3	-	5,14	5,5	6,0 8	5,16	10,9
5,0	9,7	10,0 4	10,08	-	5,24	6,26	8,8 6	5,78	13,7
10, 0	10, 18	11,0 6	15,24	-	6,04	7,5	9,1 4	7,18	16,8

Leyenda: No hubo halo de inhibición (-)

Tabla 6. Porcentaje de halos de inhibición del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" en cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. enterica y *Shigella sonnei*, frente al estándar ciprofloxacino 5 µg. Ayacucho 2013.

Co nc. %	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
	Ho ja	Cort eza	Semi lla	Hoj a	Cort eza	Semi lla	Ho ja	Cort eza	Semi lla
0,5	14, 2	13,9	14,1	-	10,0	-	15, 2	15,4	16,7
1,0	18, 1	16,4	18,6	-	10,1	11,0	16, 2	15,6	30,3
3,0	21, 2	18,0	20,9	-	10,2	11,0	18, 5	15,7	33,2
5,0	21, 7	22,5	22,6	-	10,4	12,5	27, 0	17,6	41,8
10, 0	22, 8	24,8	34,2	-	12,0	14,9	27, 9	21,9	51,2

Leyenda: No hubo halo de inhibición (-)

Tabla 7 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del extracto etanólico de hojas, corteza y semilla *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. enterica y *Shigella sonnei*. Ayacucho 2013.

N	C mg/ml	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
		H	Co	S	H	Co	S	H	Co	S
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 (**), Concentración ©, Hoja (H), Corteza (Co), Semilla (S)

DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931; con el objetivo de comprobar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto" sobre estos microorganismos, principales inductores de las afecciones gastrointestinales. La actividad antibacteriana sobre estos microorganismos está representada por la presencia de los halos de inhibición. Mientras mayor es el diámetro del halo de inhibición mejor es la actividad antibacteriana del extracto en estudio.

Es común el empleo de las semillas, hojas y corteza con la finalidad de obtener variados efectos terapéuticos, entre las diversas aplicaciones terapéuticas se incluyen aquellas con actividad antibacteriana, razón a ello es que se procedió a realizar su estudio.

Para la extracción del extracto de las hojas, corteza y semilla de la *Persea americana* Mill. "palto" se utilizó como solvente el etanol, tal como lo realizó Acharte⁸. La Tabla 3, muestra los resultados de la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto".

Del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Persea americana* Mill. "palto", se puede apreciar presencia de alcaloides, terpenos, esteroides y resinas, azúcares reductores, taninos fenoles y flavonoides. Resultados similares fueron reportados por Torres para el extracto acuoso de las hojas de *Persea americana* Mill. con presencia de flavonoides derivados del quercetol, catequina, epicatequina, perseita y perseitol; también terpenos, siskiterpenos, taninos.³ Otro estudio sobre la capacidad antioxidante de plantas medicinales como palto, eucalipto, alcachofa y otros, reportó, en general, su alto contenido de fenoles observados en el extracto de las hojas.¹⁰ Así mismo Niogret *et al*¹¹. Determinaron la presencia de terpenoides en un estudio que realizaron sobre las variaciones de los terpenoides en *Persea americana* Mill. La presencia de compuestos fenólicos como los terpenoides también se hizo evidente en la muestra usada para este trabajo.

En el extracto etanólico de la corteza *Persea americana* Mill. "palto", se observa la presencia de alcaloides, taninos y fenoles, triterpenos, esteroides, resinas, azúcares reductores; tal como reportan Niogret *et al*¹¹. la presencia de resinas y alcaloides en la corteza de *Persea americana* Mill. Otro estudio realizado en hojas y corteza de *Cinnamomum verum* "canela" reporta la presencia de flavonoides, lignanos y taninos con la cual

demonstraron su actividad antibacteriana, antifúngica y antiespasmódica.³ Los resultados obtenidos en esta investigación muestran la presencia de dichos compuestos en la hoja y corteza de *Persea americana* Mill., que ofrece una fuente natural de antibacterianos sugiriendo así la potencialidad de uso terapéutico.

El extracto etanólico de las semillas de *Persea americana* Mill. "palto", presenta metabolitos secundarios como alcaloides, triterpenos, esteroides, resinas, azúcares reductores, taninos, fenoles y flavonoides. Resultados similares reportaron Idris y col. en un screening fitoquímico y estudio de la actividad antibacteriana de la semilla de *Persea americana*, lo cual reveló la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides esteroidales y terpenoides.¹² Así mismo, Rodríguez et al¹³ en un estudio realizado sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* de la semilla de *Persea americana*, en el que reportaron una variedad considerable de compuestos fenólicos como catequinas y ácido hidroxibenzoico (OH-B), ácido hidroxicinámico (C-OH), flavonoles, y procianidinas. Las epicatequinas fueron los compuestos más abundantes (98%). La presencia de estos metabolitos también se hizo evidente en la muestra usada para este trabajo.

Como se observa en Tabla 3 hay presencia de taninos y fenoles pero no la que se esperaba, esto podría atribuir al tipo de disolvente utilizado para la extracción ya que la polaridad del disolvente juega un papel clave en el aumento fenólico, por lo general los disolventes menos polares se consideran adecuados para la extracción de fenoles lipófilos así como la acetona acuosa (70%) es eficiente para la recuperación de taninos y que el etanol era el disolvente menos efectiva de acuerdo a nuestros resultados.¹³

Estos resultados podrían también explicarse por las diferentes condiciones de crecimiento de la planta, los factores ambientales, el estado de maduración y técnicas de procesamiento en la extracción de los metabolitos secundarios.⁶

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 del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. "palto". Así la Tabla 4 muestra la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Persea americana* Mill. "palto" frente a cepas de *Escherichia coli*, ATCC 23122 y *Shigella sonnei* ATCC 25931; Giao et al⁶ en un estudio realizado sobre la capacidad antioxidante y actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales como

eucalipto, alcachofa y palto reportaron que dicha actividad antibacteriana se debía, en general, a su alto contenido de fenoles observados en el extracto de las hojas. Así mismo reporta Torres que el extracto metanólico de la hoja y tallo de *Persea americana* Mill. tienen una actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, y el extracto acuoso de la hoja y tallo tienen una actividad antiespasmódica frente al ilion de cerdo y el útero de rata³, por lo que se le puede atribuirle esta actividad a la buena presencia de compuestos activos con actividad antimicrobiana presente en el extracto en estudio.

No presenta actividad antibacteriana a las concentraciones estudiadas; frente a cepa de *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028. La estructura química de la cubierta bacteriana Gram negativa es más sofisticada que de las Gram positivas, de ahí que la actividad sobre aquellas es mínima.

El extracto etanólico de la corteza de *Persea americana* Mill. "palto" presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931. Los taninos se encuentran en cualquier parte de la planta como es el caso de la corteza al cual se asigna distintos efectos como estimulación de células fagocitarias, actividad antitumoral y un amplio espectro antibacteriano. Su acción antibacteriana puede estar relacionada con su capacidad para inactivar las adhesinas del microorganismo, enzimas, proteínas de transporte de la cubierta celular, también forman complejos con los polisacáridos de la pared celular.¹⁷ En efecto, nuestros resultados también evidenciaron la presencia de taninos y otros compuestos con actividad antibacteriana, se atribuye a estas sustancias dicho efecto antibacteriano, ya que muchas experiencias previas de este tipo han demostrado que los taninos presentes en una especie vegetal tienen, entre otras, acción antibacteriana¹³, como es el caso de la corteza frente *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

El extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Mill. "palto" presenta una actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella enterica* subesp. enterica ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 25931 estos resultados podrían ser debido a la naturaleza de los metabolitos presente en el extracto de estudio y de sus mecanismos de acción sobre los microorganismos ensayados que son similares a los obtenidos por un estudio realizado en Bolivia en la semilla de *Persea americana* Mill. "palto", en la

cual la actividad es atribuida a los metabolitos secundarios como flavonoides y taninos⁵. Otro estudio reporta que el extracto etéreo de la semilla de *Persea americana* Mill. tiene actividad frente a *Staphylococcus aureus* y el extracto etanólico de la semilla *Persea americana* Mill. "palto" tiene actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.¹¹

La variabilidad en la actividad antimicrobiana de los extractos de palto podría ser debido a la naturaleza de las sustancias antimicrobianas presentes en los extractos y de sus mecanismos de acción sobre los microorganismos ensayados. La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, taninos, terpenos, alcaloides y flavonoides están documentados en la literatura científica.

El mecanismo responsable del efecto antibacteriano 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 menor. Su actividad de los taninos es debida, probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y a nivel de la pared celular de la bacteria. Otro factor muy importante que haya influido en la variabilidad de la actividad antibacteriana de los extractos de *Persea americana* Mill. "palto", es el solvente de extracción.⁶ El uso de extracto etanólico es común para este tipo de estudios. Sin embargo, la selección de otros disolventes no polares fuertes para aislar agentes con actividad antimicrobiana debido a la naturaleza lipídica de las paredes celulares bacterianas, por lo que se prefieren fracciones de baja polaridad como hexano y acetona que incluso inhiben a micobacterias.¹⁴

Los espectros de las actividades antimicrobianas exhibidas por los extractos se podrían atribuir a la presencia de estos fitoconstituyentes lo que podría significar que *Persea americana* Mill. "palto" representa una fuente potencial de agentes terapéuticos.¹² y que, además, se estaría respaldando su uso empírico en la medicina tradicional.

Es de esperar que el estándar ciprofloxacino, por ser un fármaco de síntesis, con un grado de pureza y espectro de acción definido, muestre los resultados de inhibición esperado, es por ello que, en todos los casos, la eficacia antimicrobiana es muy superior a los extractos de *Persea americana* Mill. "palto".

En la Tabla 5 y 6 se puede observar el promedio y el porcentaje de halos de inhibición de los diferentes extractos frente a las diferentes cepas en estudio, por lo que se puede decir que todos los extractos en estudio muestran cierta actividad inhibitoria sobre las diferentes cepas empleadas. En general las plantas sintetizan sustancias químicas como factor defensivo, tal es el caso de los flavonoides que son conocidos por ser sintetizados en respuesta al ataque microbiano.¹² Un estudio preliminar de las semillas de *Persea americana*, ha revelado la presencia de catequinas, ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámico, flavonoles y procianidinas,¹³ resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo.

Los extractos etanólico mostraron actividad antimicrobiana sobre las bacterias en estudio. Se sabe que los metabolitos secundarios se distribuyen en toda la planta, exhibiendo diferencias cuantitativas entre un órgano y otro. Esta diferencia se pone de manifiesto en la actividad antibacteriana de los extractos etanólico de semillas, cortezas y hojas de *P. americana* frente a cada cepa. En efecto, se puede apreciar que el extracto de la semilla muestra un porcentaje de inhibición de 51,2%, frente a cepa de *Shigella sonnei* ATCC 25931 seguido de *Escherichia coli* con un halo de inhibición 32,2% y un halo de inhibición de 14,9% frente a cepa *Salmonella enterica* a una concentración del 10%.

El extracto etanólico de hojas muestra un halo de inhibición de 27,9% frente a cepa de *Shigella sonnei*, un halo de inhibición de 22,8% frente a cepa de *Escherichia coli*; y el extracto etanólico de la corteza *Persea americana* Mill. "palto" muestra un halo de inhibición de 24,8% frente a cepa de *Escherichia coli*, un halo de inhibición de 21,9% frente a cepa de *Shigella sonnei* y un halo de inhibición de 12,0% frente a cepa de *Salmonella enterica*. Como se puede apreciar el extracto de la semilla muestra mayor porcentaje de inhibición ya que es el órgano donde se concentra la mayor parte de metabolitos secundarios activos con actividad antibacteriana, seguida de las hojas y corteza. En este sentido, podría afirmarse, que se trata de los taninos y fenoles presentes en estos órganos de *P. americana*¹¹, además del grado de susceptibilidad de *S. sonnei* frente a los metabolitos mayoritarios de la semilla, lo que se ha visto traducida en un valor porcentual inhibitorio de 51,2% a mayor concentración. Tal como reporta estudios sobre la peptona, b-galactósido, ácido abscísico glicosilada, alcaloides, celulosa, poligalacto ureasa y los aceites volátiles fueron reportados para *Persea americana* Mill. "palto"¹⁵, y podrían coadyuvar de manera

sinérgica con la actividad frente a las bacterias Gram negativas ensayadas. A pesar de la fuerte resistencia intrínseca de estos microorganismos a la mayoría de agentes antimicrobianos, es importante la inhibición lograda con *P. americana*. Dado que los valores de CMI son bajos para todos los extractos, esto es indicativo de que los fitoconstituyentes de las hojas y semillas de *P. americana* tienen un alto potencial terapéutico que incluso trabajos científicos preliminares con los extractos etanólico y clorofórmico de las semillas inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* mostrando valores de CMI ≤ 50 g/ml. respectivamente.¹⁴

Afirmar con exactitud el metabolito secundario con actividad antibacteriana, resultaría impreciso ya que, como se dijo, todos poseen cierta capacidad de actuar frente a muchos microorganismos. y se han postulado múltiples formas de actuación de estos metabolitos sobre los microorganismos que conducen a la muerte de las bacterias.¹⁶

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carhuapoma M, Angulo P. Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectivas de desarrollo en la región los Libertadores Wari. Agencia de Cooperación; 1999.
2. Ryan K, George C. Microbiología médica una introducción a las enfermedades infecciosas 4ª ed. México: Editorial McGRAW-HILL Interamericana S.A; 2004.
3. Torres L, Tapia M, Aguilar A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Editorial Gráficas Rey S.L; 2005.
4. Arango M. Plantas medicinales: Botánica de interés médico. Colombia; 2006.
5. 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
6. Villar del Fresno A. Farmacognosia general. España: Síntesis S.A; 1999.
7. Granados R, Villaverde C. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general y parasitología general tomo II. 2ª ed. Barcelona: Editorial Parininfo S.A; 2007.
8. Acharte D, Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus Aurantium L.* "naranja" frente a una cepa de *Cándida Albicans* ATCC 10231. [Tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas, 2010.
9. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª. Ed. España: Editorial Masson; 2005.
10. Gião MS, González-Sanjosé ML, Rivero-Pérez MD, Pereira CI, Pintado ME, Malcata FX. Infusions of Portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. Journal of the Science of Food and Agriculture; 2007, 87(14):2638-2647.
11. Niogret J, Epsky ND, Schnell RJ, Boza EJ, Kendra PE, Heath RR. Terpenoid Variations within and among Half-Sibling Avocado Trees, *Persea americana* Mill. (Lauraceae). PloS one; 2013, 8(9): 73601.
12. Idris S, Ndukwe G, Gimba, C. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of seed extracts of *Persea americana* (avocado pear). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences; 2009, 2(1):173-176.
13. Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59(10):5625-5635.
14. Gomez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. Amer-Eur J Scient Res; 2008, 3(2):188-194.
15. Yasir M, Das S, Kharya MD. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. Pharmacognosy

reviews; 2010, 4(7):77.

16. Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Comejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. BMC complementary and alternative medicine; 2013, 13(1):109.