

# ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS VEGETALES OBTENIDOS A PARTIR DE HOJAS DE BRÁSSICAS

Franco Ramírez Alejandra Cecilia (1), Gutiérrez Robles Martín Eduardo (1), Abraham Juárez Ma. del Rosario (2), Cerón García Abel (2), Ozuna César (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [ac.franco\_ram@hotmail.com]

2 [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [cesar.ozuna@ugto.mx]

## Resumen

Actualmente, el uso de extractos naturales como agentes antimicrobianos en alimentos es un tema de gran interés. El objetivo general de esta investigación fue determinar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales obtenidos a partir de hojas externas de brócoli, coliflor y col en un hongo deteriorador de alimentos (*Alternaria spp.*). Las muestras fueron deshidratadas a 60°C y posteriormente se realizaron extractos de cada una de ellas con una mezcla de metanol-agua (80:20 v/v). Finalmente, se eliminó el metanol de los extractos empleando un rotaevaporador (65°C y 45 min). Los extractos fueron caracterizados midiendo su contenido de compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante. La actividad antimicrobiana de los extractos se realizó mediante la técnica placa envenenada. Los extractos de hojas de coliflor mostraron un mayor contenido en compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y porcentaje de neutralización del radical DPPH (438.86±27.39 mg EAG/g P.S., 687.65±7.40 mg EQ/g P.S. y 95.87%, respectivamente), lo cual fue correlacionado con un alto porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio del hongo (24.14±0.58%) frente a los otros extractos estudiados. Los resultados obtenidos muestran un potencial de los extractos de coliflor, brócoli y col para el control de enfermedades postcosecha y preservación de frutas y hortalizas.

## Abstract

Currently, the use of natural extracts as antimicrobial agents in foods is a topic of great interest. The general aim of this research was to determine the antimicrobial activity of plant extracts obtained from external leaves of broccoli, cauliflower and cabbage on a food-deteriorating fungus (*Alternaria spp.*). The samples were dehydrated at 60°C and their extracts were prepared in a methanol-water mixture (80:20 v/v). Finally, the methanol was removed from the extracts using a rotavaporator (65°C and 45 min). The extracts were characterized by measuring their bioactive compound content and their antioxidant capacity. The antimicrobial activity of the extracts was determined by the poisoned plaque test. The extracts from cauliflower leaves showed the highest total phenolic content, total flavonoid content and percentage of DPPH radical neutralization (438.86±27.39 mg GAE/g DW, 687.65±7.40 mg QE/g DW and 95.87%, respectively) in comparison to the other studied extracts. Moreover, cauliflower leaf extracts also showed a high percentage of mycelial growth inhibition of the fungus (24.14±0.58%). The results obtained in this work point to the potential of cauliflower, broccoli and cabbage leaf extracts for post-harvest disease control and fruit and vegetable preservation.

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos los seres humanos han utilizado plantas con fines medicinales. Actualmente, se ha demostrado que algunas especies de plantas contienen sustancias de importancia biológica [1]. Además, la recuperación de compuestos bioactivos a partir de subproductos vegetales es un tema de gran interés en el área de tecnología de los alimentos y en el desarrollo sustentable. La industria agroalimentaria produce una gran cantidad de desperdicios y subproductos que representan una fuente de contaminación. Sin embargo, estos desechos pueden ser una fuente de compuestos antioxidantes y antimicrobianos [2].

Los subproductos de las frutas y hortalizas (hojas, tallos, cáscaras y semillas) pueden poseer un alto contenido de compuestos fenólicos, los cuales juegan un papel importante en la protección de estos productos contra agentes patógenos [3]. Por otro lado, los flavonoides incrementan ciertas actividades bioactivas (antibacterial, antifúngica, antiviral, etc.) en los extractos obtenidos a partir de este tipo de matrices vegetales [4].

Por otro lado, los microorganismos fitopatógenos son de gran preocupación debido a que constituyen un factor de riesgo para la salud pública y pérdidas económicas en la agricultura [5]. El género *Alternaria spp.* puede deteriorar alimentos y forrajes produciendo micotoxinas patógenas. Este hongo puede comportarse como oportunista o infectar por sí solo al fruto y sus lesiones iniciales aumentan cubriendo el producto con un moho negro durante su desarrollo, su etapa postcosecha y/o comercialización [6].

Por tal motivo, el objetivo general de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales obtenidos a partir de hojas externas de brócoli, coliflor y col en un hongo deteriorador de alimentos (*Alternaria spp.*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

Las hojas externas de brócoli (*Brassica oleracea italica*), coliflor (*Brassica oleracea var. botrytis*) y

col (*Brassica oleracea var. capitata* L.) fueron adquiridas en la central de abastos de la ciudad de Irapuato, Guanajuato, México. Posteriormente, fueron transportadas a la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato para su procesamiento.

Para el proceso de deshidratación, las muestras fueron cortadas en forma cuadrangular (1x1 cm, espesor 0.23±0.05 mm) evitando los nervios de las hojas. Posteriormente, 30 g de cada muestra fueron deshidratados a 60°C empleando un horno de secado (CE3F, Shel Lab, Estados Unidos) hasta alcanzar un peso constante [7]. Posterior a su deshidratación, las muestras fueron procesadas inmediatamente.

### Preparación de los extractos vegetales

Se emplearon 4.5 g de muestra deshidratada, las cuales se trituraron en un mortero agregando 150 ml de una mezcla de metanol-agua (80:20 v/v). El sobrenadante se recuperó en tubos ámbar con tapa y durante 1 h con agitación continua se realizó la extracción. Posteriormente, el extracto se centrifugó (10 min a 5000 rpm) para separar las fracciones líquida y sólida. Finalmente, se almacenó en frascos ámbar a 4°C para su análisis correspondiente.

Para la concentración de los extractos vegetales (brócoli, coliflor y col), se colocó 110 ml del extracto en un matraz de bola para concentrarse a través de un rotavapor (65°C, 45 min) hasta obtener un volumen de 22 ml, dando como resultado extractos libres de metanol [8].

### Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

La determinación de compuestos fenólicos totales de los extractos concentrados se realizó a través de la metodología propuesta por Slinkard & Singleton [9]. Los valores de absorbancia se leyeron a 765 nm y el contenido fenólico total de las muestras se reportó en equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (EAG/g P.S.).

El contenido de flavonoides totales de los extractos se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Khanam et al. [10] leyendo los valores de absorbancia a una longitud de onda de 415 nm. Los resultados se reportaron como

equivalentes de quercetina por gramo de peso seco (EQ/g P.S.).

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos se siguió el método propuesto por Soengas et al. [11] con ligeras modificaciones. Se preparó el reactivo DPPH metanólico a una concentración de 100  $\mu$ M, se probaron diferentes concentraciones del extracto 100, 50 y 25  $\mu$ L, con 100  $\mu$ L del reactivo DPPH preparado. Las muestras se mantuvieron 30 min en oscuridad y la lectura se realizó a 517 nm en un lector de microplacas para absorbancia (xMARK Microplate Manager). Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de neutralización del radical DPPH. Todas las lecturas de compuestos bioactivos y actividad antioxidante se realizaron por triplicado.

### Actividad antimicrobiana

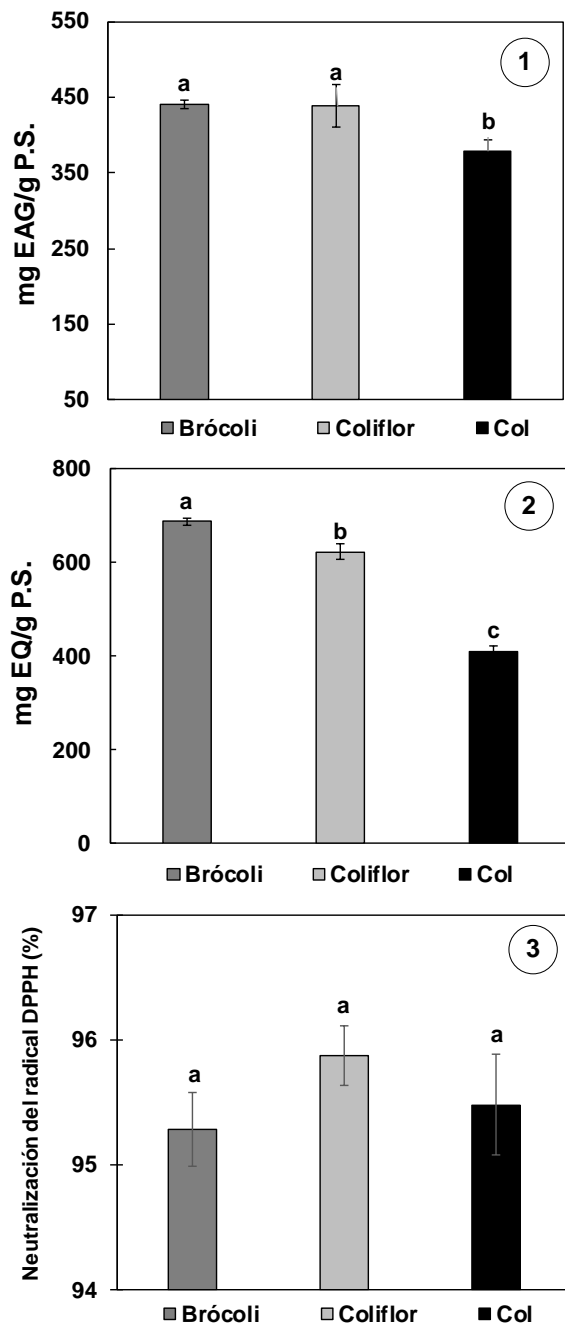
Para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos se empleó la técnica placa envenenada empleada por Santos et al. [12] se inoculó el hongo de *Alternaria spp.* en placas de agar PDA y se incubó a 28°C.

Los extractos concentrados de brócoli, coliflor y col se esterilizaron por medio de acrodiscos (filtros) estériles de 0.22  $\mu$ m. Se realizaron diluciones de los extractos vegetales filtrados para las concentraciones de 1 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL.

En placas estériles se colocó 1 ml de los extractos vegetales en las diferentes concentraciones estudiadas y 20 ml de agar PDA. En las placas solidificadas que contenían extracto vegetal y agar PDA se les colocó un disco de 6 mm de diámetro con micelio de *Alternaria spp.* Se realizó un control positivo (agar PDA, antifúngico Azoxistrobin y micelio del microorganismo), así como un control negativo (agar PDA y micelio del microorganismo). Las pruebas se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Imagen 1.1 se observa que los extractos obtenidos a partir de hojas externas de brócoli y coliflor presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos totales ( $440.61 \pm 5.27$ ,  $438.86 \pm 27.39$  mg EAG/g P.S., respectivamente) en comparación a los extractos de hojas col ( $379.23 \pm 14.53$  mg EAG/g P.S.).

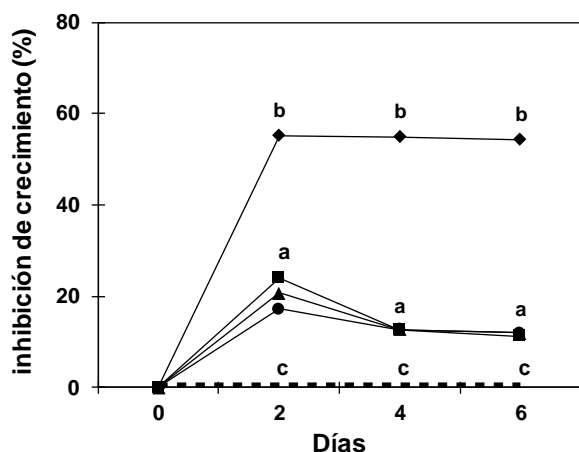


**IMAGEN 1:** Concentración de compuestos fenólicos totales (1), flavonoides totales (2) y actividad antioxidante (3) en extractos de brócoli, coliflor y col. Los subíndices a, b y c muestran diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En la Imagen 1.2 se muestra un mayor contenido de flavonoides totales en el extracto de brócoli, seguido por el de coliflor y col ( $687.65 \pm 7.40$ ,  $623.80 \pm 15.68$  y  $411.32 \pm 11.40$  mg EQ/g P.S., respectivamente).

Gutiérrez-Robles et al. [7] obtuvieron valores inferiores para el contenido de fenoles ( $206.33$ - $147.75$  mg EAG/g P.S.) y flavonoides totales ( $142.24$ - $66.80$  mg EQ/g P.S.) en extractos de hojas de brócoli, coliflor y col deshidratadas a  $60^\circ\text{C}$ . Sin embargo, es importante mencionar que estos autores estudiaron extractos metanólicos. Estas diferencias se podrían atribuir al hecho de rotavaporar los extractos y concentrarlos.

En el caso de la capacidad antioxidante de los extractos, no se observó entre ellos una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el porcentaje de neutralización del radical DPPH, los cuales oscilaron entorno a un 95% (Imagen 1.3).



**IMAGEN 2:** Efecto de los extractos de brócoli (●), coliflor (■) y col (▲) en el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de *Alternaria spp.* Control positivo (♦) y control negativo (---). Los subíndices a, b y c muestran diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de *Alternaria spp.*, previamente se estudió el efecto de la concentración de la dilución de los extractos estudiados, siendo la de 1 mg/mL la más efectiva para la inhibición del crecimiento del hongo (datos no mostrados).

El control positivo mostró un porcentaje de inhibición  $55.17 \pm 0.58\%$  en el día 2. En ese punto, los extractos de hojas de coliflor mostraron un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento ( $24.14 \pm 0.58\%$ ) en comparación con los extractos de col y brócoli ( $20.69 \pm 0.58\%$  y  $17.24 \pm 0.58\%$ , respectivamente) (Imagen 2).

El mayor porcentaje de inhibición presentado en los extractos de hojas de coliflor frente a los de brócoli y col puede ser asociado con las altas concentraciones de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante que posee en comparación con los extractos de brócoli y coliflor (Imagen 1). Sin embargo, a partir del día 4 se observó una disminución en el porcentaje de inhibición de todos los extractos vegetales, hasta un valor de 12%. Este valor se mantuvo constante hasta el final del tratamiento (día 6).

Los resultados obtenidos en esta investigación son congruentes con los obtenidos por Rodríguez-Maturino et al. [13]. Estos autores analizaron el extracto de chile chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) contra *Alternaria alternata* y mostraron una disminución en el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo durante el tiempo de tratamiento. Rodríguez-Maturino et al. [13] atribuyeron la inhibición del crecimiento del micelio de *Alternaria alternata* a una interacción de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el chile con la pared celular del hongo, inhibiendo algunas enzimas fúngicas y permitiendo el bloqueo de rutas enzimáticas vitales.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, los extractos de hojas externas de brócoli, coliflor y col parecen ser una fuente de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Además, los extractos presentan una importante actividad antimicrobiana contra *Alternaria spp.* Por tal motivo, dichos extractos podrían ser empleados para el control de enfermedades postcosecha y preservación de frutas y hortalizas. Sin embargo, sería necesario profundizar en estudios que permitan caracterizar estos extractos con el objetivo de garantizar la calidad e inocuidad de los mismos en los alimentos a los que podrían ser aplicados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de PRODEP “Apoyo a la incorporación de nuevos PTC” (SEP-MEXICO). Proyecto UGTO-PTC-557.

## REFERENCIAS

- [1] Ramírez, L. E. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* año XV, 42, 263-264.
- [2] Ayaz, F. A., Hayırlıoğlu-Ayaz, S., Alpay-Karaoğlu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichová, J., & Strnad, M. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107(1), 19-25.
- [3] Nilkara, S., Chiewchan, N. & Devahastin, S. (2009) Production of antioxidant dietary fibre powder from cabbage outer leaves. *Food and Bioprocess Technology*, 87, 301- 302.
- [4] Ayala- Zavala, J. F., Rosas- Domínguez, C., Vega- Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh- cut fruits using their own byproducts: Looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175- R178.
- [5] Corzo, B. D. C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 81-82.
- [6] Caro, C. J. J (2016). Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) para el control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Tesis de licenciatura en biólogo Microbiólogo Parasitólogo, 5-30.
- [7] Gutiérrez, M. E. G., Ramírez, A. C. F., García, A. C., Juárez, M. D. R. A., & Ozuna, C. (2017). Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos vegetales del sector agroalimentario del Estado de Guanajuato. *Jóvenes en la Ciencia*, 2(1), 1334-1339.
- [8] Jaiswal, A. K., Rajauria, G., Abu- Ghannam, N. & Gupta, S. (2011). Phenolic composition, antioxidant capacity and antibacterial activity of selected Irish Brassica vegetables. *Natural Product Communications*, 6(0), 1-2.
- [9] Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- [10] Khanam, U. K. S., Oba, S., Yanase, E., & Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 979-987.
- [11] Soengas, P., Cartea, M. E., Francisco, M., Sotelo, T., & Velasco, P. (2012). New insights into antioxidant activity of Brassicas crops. *Food Chemistry*, 134, 2012. 726.
- [12] Santos, J., Branco, A., Silva, A., Pinheiro, C., Goés, N. A., Uetanabaro, A., Queiro, S. & Osuna, J. (2009) Antimicrobial activity of Agave sisalana. *African Journal of Biotechnology*, 8 (22), 6182-6183.
- [13] Rodríguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sánchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juárez, O & Aviles-Marin, M. (2014) Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepin (*capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (1), 72-77.