



## Efecto Inhibitorio de fracciones polifenolicas de la semilla de *Persea americana* var. *Hass* sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*

Inhibitory effect of seed polyphenolic fractions of *Persea americana* var. *Hass* on the *Helicobacter pylori* growth

Laura Camila Valdés<sup>1\*</sup>, Camilo Daniel Obando<sup>1</sup>, Alvaro Pazos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Universidad de Nariño, Ciudad Universitaria, Sede Torobajo, Pasto, Colombia.

Recibido: Septiembre 15 de 2021

Aceptado: Noviembre 17 de 2021

\*Correspondencia del autor: Laura Camila Valdés

E-mail: laurita.camilav@hotmail.com

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i33.241>

### Resumen

**Introducción:** El cáncer gástrico (CG) es la principal causa de muerte por cáncer en Colombia y de etiología multifactorial, asociada a factores genéticos del huésped, factores ambientales y el oncopatogeno *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) como el principal factor de riesgo de la enfermedad. El aguacate (*Persea americana* var. *Hass*, (*P. americana*)) posee un alto contenido de polifenoles, con actividad bactericida, antioxidante, anti-ureasa, y antiinflamatoria, que a su vez limitan los cambios en el ambiente gástrico que favorecen la colonización de la bacteria y posterior desencadenamiento de la cascada precancerosa. **Objetivo:** Evaluar la concentración mínima inhibitoria de fracciones polifenolicas de la semilla de *P. americana* sobre el crecimiento *in vitro* de *H. pylori*. **Resultados:** La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las tres fracciones obtenidas de la semilla de *P. americana* en cultivo de *H. pylori in vitro*, mostró que las fracciones uno y dos inhibieron el crecimiento bacteriano a 3000 ppm, mientras que la fracción 3 a 1500 ppm,  $P < 0,05$ . **Conclusión:** Se encontraron tres biofracciones polifenolicas de la semilla *P. americana*, principalmente constituidas por procianidinas, con actividad antibacteriana *in vitro* de *Helicobacter pylori*, sin embargo, la fracción tres, de mayor peso molecular, inhibió el crecimiento de manera significativa a una CMI de 1500 ppm, comparada con las fracciones uno y dos.

**Palabras clave:** Antibacteriano, cáncer gástrico, concentración mínima inhibitoria, inhibición (DeCS/MESH).

## Abstract

**Introduction:** Gastric cancer (GC) is the main cause of cancer death in Colombia and of multifactorial etiology, associated with genetic factors of the host, environmental factors and the oncopathogen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) as the main risk factor of the disease. The avocado (*Persea americana* var. *Hass*, (*P. americana*)) has a high content of polyphenols, with bactericidal, antioxidant, anti-urease, and anti-inflammatory activity, which in turn limit changes in the gastric environment that favor colonization bacteria and subsequent triggering of the precancerous cascade. **Objective:** To evaluate the minimum inhibitory concentration of polyphenolic fractions of *P. americana* seed on the in vitro growth of *H. pylori*. **Results:** The evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the three fractions obtained from the *P. americana* seed in *H. pylori* culture *in vitro*, showed that fractions one and two inhibited bacterial growth at 3000 ppm, while fraction 3 at 1500 ppm,  $P < 0.05$ . **Conclusion:** Three polyphenolic biofractions of the *P. americana* seed were found, mainly constituted by procyanidins, with *in vitro* antibacterial activity of *Helicobacter pylori*, however, fraction three, with a higher molecular weight, significantly inhibited growth at a MIC of 1500 ppm, compared to fractions one and two.

**Keywords:** Antibacterial, gastric cancer, minimum inhibitory concentration, inhibition. (DeCS/MESH).

## Introducción

El cáncer gástrico (CG) es la principal causa de muerte por cáncer en Colombia; con una etiología multifactorial, asociada a factores genéticos del huésped, factores ambientales y el oncopatogeno *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) como el principal factor de riesgo de la enfermedad (1), infectando a más del 50% de la población mundial (2). La incidencia de CG en la región andina de Nariño es una de las más altas del mundo (150 por cada 100.000 habitantes) y en particular la prevalencia de la infección por *H. pylori* en la región de Nariño supera el 90% la cual, en la mayoría de los casos, representa el agente causal de gastritis crónica, enfermedad ulcero péptica y cáncer gástrico (3).

El CG está precedido por un prolongado proceso precanceroso que dura varias décadas (cascada precancerosa), comenzando por la infección con *H. pylori* (3). En consecuencia, la erradicación de la infección se plantea como la única estrategia válida de prevención de CG (4). Los esquemas de tratamiento estándar (triple terapia), tendientes a la erradicación de *H. pylori* involucran como primera línea de tratamiento en clínica un inhibidor de bomba de protones, claritromicina y amoxicilina (5). Sin embargo, el incremento del fracaso terapéutico se ha reflejado en una disminución significativa (60 al 75%), del éxito de la erradicación de *H. pylori* en Colombia. Entre los principales factores del fracaso terapéutico esta la baja adherencia al tratamiento, la baja cobertura del sistema de seguridad social en salud a la población a riesgo de CG y el aumento de re-

sistencia de *H. pylori* a los diferentes antibióticos (6,7). Por tanto, es necesario buscar nuevas estrategias que permitan coadyuvar los tratamientos convencionales y mejorar el aclaramiento de la infección por *H. pylori* en particular el municipio de La Florida Nariño, población andina considerada de alto riesgo de CG.

Estudios previos indican que propiedades antioxidantes y contenidos fenólicos presentes en frutas como el aguacate, poseen agentes antibacteriales, antioxidantes, antiinflamatorio, en donde el fraccionamiento de estos compuestos ha mostrado moléculas tales como ácido cafeoilquínico, flavonoides fenilpropanoides y taninos, con actividad antitumoral en ratones (8). También se demostró que los polifenoles del aguacate (*Persea americana*) degradan la membrana celular y desnaturalizan la enzima ureasa de *H. pylori* que media el proceso de su colonización en la mucosa gástrica (9). Haciéndose importante identificar la o las fracciones polifenolicas de la semilla del aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) con mayor capacidad anti-*H. pylori*, que permitan acercarse a la identificación y desarrollo de nuevos compuestos con potencial farmacéutico.

## Materiales y métodos:

**Ensayos para detectar CMI de cada extracto obtenidos de aguacate.** El protocolo se realizó según las descripciones del manual: Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución (MIC testing) (10). El método de dilución doble en agar se usó para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

la cual en este estudio fue definida como concentración más baja del extracto de la semilla del aguacate que puede inhibir el crecimiento visible de *H. pylori* después de diez días de incubación en condiciones de microaerofilia.

**Preparación de soluciones stock.** se preparó una solución stock para cada fracción las cuales fueron proporcionadas por el grupo de salud pública, la concentración de esta solución inicial para cada extracto fue de 24.000 ppm, para lo cual se pesó 0,6 g de la muestra en una balanza analítica y se disolvió inicialmente en un beaker de 50 mL con 10 mL de agua destilada estéril, con la ayuda de un magneto sobre la plancha de agitación sin aumentar la temperatura. Una vez disuelta se pasó el contenido a un balón aforado de 25 mL y se completó el aforo con agua destilada estéril, se trasvaso el contenido a un tubo falcón estéril y se colocó en luz UV toda la noche para esterilizar el contenido. Para evitar algún

tipo de degradación ocasionado por la luz ambiental, se cubrió los tubos con papel aluminio y finalmente se conservó estas muestras a -80 °C en el freezer.

**Preparación de medios de cultivo.** Se preparó un medio de cultivo de agar Mueller Hinton con suplementó de 10% de sangre desfibrinada de cordero, 1% del suplemento Isovitalax y la cantidad en mililitros requerida de cada extracto para cada concentración en un rango desde 375 a 6000 ppm (Tabla 1). Después de preparar los agares se llevaron a esterilización en autoclave a 121°C y 15 PSI durante 15 minutos, posteriormente se añadió al medio la cantidad de volumen indicada para Isovitalax, extracto y finalmente la sangre de cordero, para finalizar se sirvió 10mL del agar preparado en cajas Petri pequeñas desechables y se dejó solidificar. Para realizar el control de esterilidad de los medios se tomaron cajas al azar y se colocaron en incubación a 37° C por 24h con el fin de evaluar la presencia de contaminantes.

**Tabla 1.** Concentraciones del medio de cultivo para las diluciones de los extractos polifenólicos de *P. americana*.

Dilución	Agar Muller Hinton (g)	Vol de agua destilada (mL)	Vol de extracto (mL)	Vol del suplemento Isovitalax (mL)	Vol de sangre de cordero (mL)	Concentración final de los extractos (ppm)	Vol final* (mL)
1	1.4	19.5	7.5	0.3	3	6000	30.3
2	1.4	23.25	3.75	0.3	3	3000	30.3
3	1.4	25.12	1.87	0.3	3	1500	30.3
4	1.4	26.06	0.93	0.3	3	750	30.3

Vol= volumen \* El volumen final fue repartido en 10mL en cajas Petri, logrando así que cada dilución se evalué por triplicado.

**Inoculación de los aislados de *H. pylori*.** La inoculación de los medios se llevó a cabo con el sobrante de las biopsias con previa activación de *H. pylori* (30 minutos a 37°C). Con un asa de argolla calibrada de 10uL, se tomó la muestra y se extiende en el agar, realizando un sembrado masivo. las cajas se incubaron en condiciones microaerofilicas en incubadora de CO2 al 10% y 37 °C, se realizó una revisión a los cuatro, seis y diez días para evaluar la CMI de cada fracción ensayada. Como control positivo con respecto al crecimiento de *H. pylori*, se tomó una cepa ATCC 43504 en una caja con medio base sin el extracto polifenólico.

**Identificación bioquímica.** A nivel macroscópico se identificó colonias pequeñas, traslúcidas, a manera de gotas de rocío (11), las cuales se identificaron por las siguientes pruebas bioquímicas.

- Prueba de oxidasa: Con una tira de oxidasa se tomó

directamente del cultivo en caja Petri colonias aisladas de *H. pylori*, observando el cambio en la coloración de la zona reactiva de la banda. La prueba es positiva para *H. pylori* cuando la tira presenta cambio de coloración (blanco a color azul oscuro) (11).

- Prueba de Catalasa: Se emulsionaron colonias del cultivo en porta objetos con dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10%. La presencia de burbujas indica una reacción positiva *H.* (11).

- Prueba de detección Ureasa: Del cultivo se tomó una colonia y con un asa se inoculo en un tubo Nunc con 1 ml de solución de urea con rojo de fenol al 10%, como indicador de pH. La prueba es positiva para *H. pylori* al presentarse un cambio de coloración de amarillo a fucsia (11).

- Tinción de Gram: En un portaobjetos se realizó un

frotis de colonias de *H. pylori* en agua destilada con posterior fijación al calor. Se utilizó el protocolo estándar de coloración de Gram y en el microscopio con un objetivo de 100X se evaluó la presencia de bacilos Gram negativos (coloración rosada) como resultado positivo para la identificación de *H. pylori* (11).

**Análisis estadístico.** Para el conteo de las colonias bacterianas se utilizó la aplicación APD Colony Counter App Liteel (12) y se reportó en unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos de las UFC por fracción se organizaron en tablas del programa Excel 2019, donde se tuvo como variable respuesta o dependiente el crecimiento de *H. pylori* (Y), y como variable independiente (X), representa la CMI de las fracciones. Las diluciones de los polifenoles son la unidad experimental en este ensayo.

Para determinar los efectos de las interacciones entre

las variables dependiente e independientes (Y y X), se empleó una prueba estadística Anova multifactorial para el análisis de varianza de varios factores (Fracción, concentración) para variable dependiente (Colonias), esto con el fin de identificar qué factores tienen efecto estadístico significativo sobre la variable dependiente (crecimiento de *H. pylori* en UFC). Se realizó gráficos de medias y medias marginales para explicar las diferencias encontradas entre las variables independientes, estas pruebas se ejecutaron en los programas estadísticos IBM SPSS Statistics versión 2.4 y Statgraphics Centurion XVIII.

**Resultados**

**Concentración mínima inhibitoria de las fracciones polifenolicas obtenida de la semilla de aguacate.** De las 75 cajas Petri inoculadas se obtuvo un crecimiento menor a 1 UFC a una concentración de 1500 ppm en la fracción 3, y de 3000 ppm en las fracciones 1 y 2 (tabla 2).

**Tabla 2.** Concentraciones del medio de cultivo para las diluciones de los extractos Polifenolicos de *Persea americana* var. Hass.

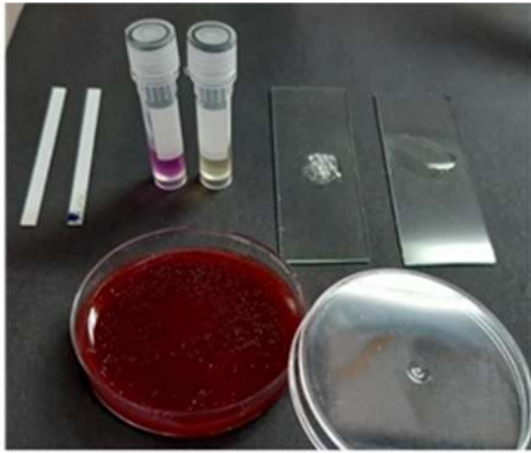
Fracción 1		Fracción 2		Fracción 3	
Concentración	UFC	Concentración	UFC	Concentración	UFC
375	10	375	15	375	10
750	5	750	10	750	5
1500	2	1500	2	1500	0
3000	0	3000	0	3000	0
6000	0	6000	0	6000	0

**Identificación bioquímica.** Al realizar la identificación bioquímica para garantizar que las colonias formadas en los medios de cultivo correspondan a *Helicobacter pylori*, se obtuvo los resultados contenidos en la tabla 3 y figuras 1 y 2.

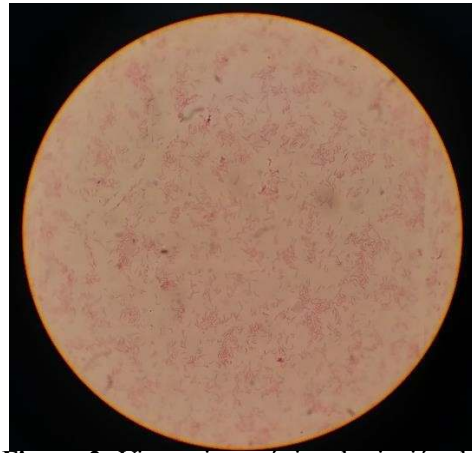
**Tabla 3:** Resultados de las pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica	Resultados	Descripción
<b>Oxidasa (a)</b>	+	Cambio de coloración en la banda de blanco a azul
<b>Ureasa (b)</b>	+	Cambio de coloración del reactivo de amarillo a fucsia
<b>Catalasa (c)</b>	+	Producción de burbujas al contacto con la bacteria
<b>Tinción de Gram (d)</b>	-	Tinción negativa, mostrando bacilos espiralados

: prueba positiva (+); prueba negativa (-)



**Figura 1:** a; prueba de oxidasa, b; prueba de ureasa, c; prueba de catalasa, d; control de *Helicobacter pylori*.



**Figura 2:** Vista microscópica de tinción de Gram (10x)

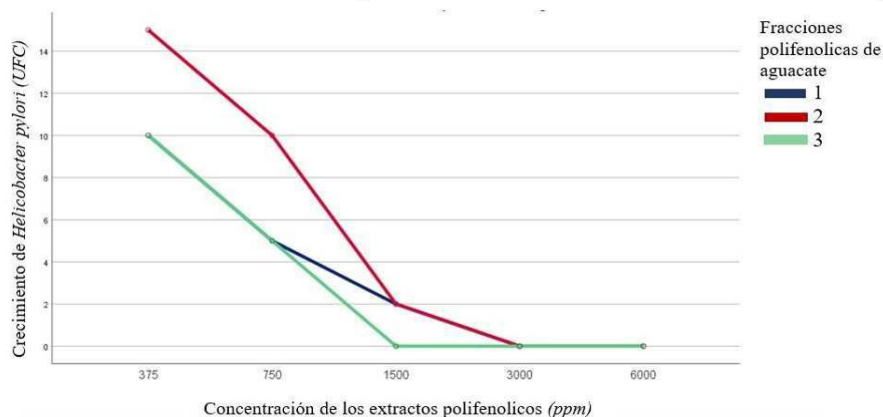
**Análisis estadístico.** Luego de realizar el conteo de colonias bacterianas en las cajas Petri de cada concentración de las fracciones polifenolicas de la semilla de *P. americana* var. *Hass*, se reportaron los datos de la tabla 1 en el programa Excel 2019, y se procedió a realizar la prueba de distribución normal, en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVIII e IBM SPSS statistics versión 2.4, siendo positivas, por lo cual se continuo a realizar la prueba ANOVA multifactorial para establecer las interacciones entre variables.

**Tabla 4.** Efecto inhibitorio de las fracciones polifenolicas a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *H. pylori* (UFC).

Variables	Suma de Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración vs UFC de <i>H. pylori</i>	314,933	4	78,7333	32,36	0,0001	
B: Fracción vs UFC de <i>H. pylori</i>	16,5333	2	8,26667	3,40	0,0855	

En la prueba ANOVA multivariada se descompone entre la variación de UFC de *H. pylori* en las diferentes fracciones y concentraciones. Se infiere que la concentración del extracto en partes por millón tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento de *H. pylori* con un 95,0% de confianza, explicando la relación, que al aumentar la concentración del extracto polifenólico aumenta la inhibición de *H. pylori* ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, las fracciones polifenolicas del aguacate, no mostraron significancia estadística entre ellas ( $P > 0,05$ ).

Concentración mínima inhibitoria de fracciones polifenolicas de *P. americana*, sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*



**Figura 3.** Concentración mínima inhibitoria de fracciones polifenolicas del aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) según unidades formadoras de colonias de *Helicobacter pylori*.

La figura 3 indica la relación de concentración y fracciones respecto a las UFC de *H. pylori*, donde se observa que las fracciones 1 y 2 tienen un valor mínimo inhibitorio *in vitro* sobre *Helicobacter pylori* mayor (3000 ppm). En contraste la fracción 3 muestra una CMI de 1500 ppm.

### Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las fracciones de la semilla de aguacate (*Persea americana* var *Hass*) ejercen actividad anti-*H. pylori*, en concentraciones de 3000 ppm para las fracciones polifenólicas de menor peso molecular correspondientes a las fracciones 1 y 2, mientras que la fracción de mayor peso molecular correspondientes a la fracción 3 a 1500 ppm. En consecuencia, se obtuvo que la mejor CMI para este estudio fue de 1500 ppm de la fracción 3 con significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

En anteriores investigaciones se ha demostrado el efecto inhibitorio de los polifenoles de otros alimentos sobre esta bacteria, como por ejemplo aceite de oliva, nigella sativa, arándanos, prunus mume, en los cuales examinaron el efecto de los polifenoles de estos en aislados clínicos de *H. pylori*, observando la actividad antibacteriana, entre los diversos compuestos fenólicos como la forma dialdehídica de descarboximetil ligstroside aglicona, demostrando el efecto bactericida a una concentración mínima inhibitoria (CMI) con un rango entre 1.3 a 750 ppm (13,14), otro estudio realizado con fracciones de propóleo, obtuvieron resultados donde se reportaron 4 fracciones, con concentraciones en un rango de CMI entre 256-1256 ppm, de las cuales la de mayor peso molecular, presentó una mejor CMI (15), lo anteriormente dicho hace posible relacionar las fracciones del aguacate como una alternativa para la erradicación de la bacteria gracias al potencial bactericida, situándose en el promedio de inhibición de productos naturales.

Estudios anteriores mencionan que los polifenoles del aguacate (*Persea americana*) degradan la membrana celular y desnaturalizan la enzima ureasa de *H. pylori* que media el proceso de su colonización en la mucosa gástrica (9). Estudios previos reportan que polifenoles del epicarpio del aguacate (*Persea americana* var. *Hass* y var. *Mill*) inhiben la enzima ureasa propia de *H. pylori* a una CMI de 1500 ppm, debido a que poseen moléculas tales como ácido cafeoilquinico, flavonoides fenilpropanoides y taninos los cuales tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y bactericidas

(12,16). Demostrando que el análisis antagónico de los compuestos polifenólicos mediante su fraccionamiento, funcionan como coadyuvantes en la erradicación de *H. pylori*.

Se comprueba que las fracciones polifenólicas del *P. americana* var. *Hass* tienen actividad inhibitoria de *H. pylori* como se ha descrito en estudios anteriores realizados con diferentes productos naturales, donde las fracciones de mayor peso molecular mostraron mejor actividad anti-*H. pylori*.

Estos estudios pueden escalar al mejoramiento en el tratamiento de *H. pylori* y de esta manera ayudar en la prevención del cáncer gástrico, estandarizando los métodos con el soporte de evidencia científica y así poder difundir la información beneficiando, a la región andina de Nariño. Se recomienda seguir estudiando el efecto inhibitorio que puedan tener las diferentes moléculas que conforman las fracciones polifenólicas *in vitro*, las cuales ayuden al tratamiento en la erradicación de *H. pylori*, investigando sobre diversos aspectos todavía desconocidos como lo son, la actividad antiinflamatoria, citotóxica, antitumoral y

posibles efectos adversos, así como estudios *in vivo* que permitan aclarar las dudas sobre la respuesta de *H. pylori* en animales infectados.

Las fracciones polifenólicas de semilla de aguacate mostraron efecto inhibitorio *in vitro* de *Helicobacter pylori*, destacándose la fracción polifenólica de mayor peso molecular, con una CMI de 1500 ppm.

### Agradecimientos

Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo financiero, académico y el uso de equipos por parte del grupo de investigación de salud pública; además a los aportes a nivel académico realizados por profesores y demás compañeros, quienes contribuyeron desde sus áreas de conocimiento para el desarrollo de este proyecto.

### Conflicto de intereses

Ninguno

### Financiación.

Grupo de Salud pública Universidad de Nariño.

## Referencias

1. Otero Regino, W. (2008). Cáncer gástrico en Colombia: un diagnóstico tardío que amerita el compromiso del Estado. *Rev. colomb. Gastroenterol*, 23(4): 302- 304.
2. Internacional Agency for Research on Cancer: IARC (2018). Cancer Today: GLOBOCAN 2018- Top cancer percountry, estimated number of deaths in 2018, both sexes, all ages. Recuperado de. <http://gco.iarc.fr/today>.
3. Correa, P. (2011). Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Rev. Colomb. Cirug.* 26(2), 111-117.
4. Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917): 860-867.
5. Figueroa, M., Cortés, A., Pazos, Á., & Bravo, L. E. (2012). Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*; 32(1): 32-42.
6. Urgesi, R., Cianci, R., & Riccioni, M. E. (2012). Update on triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*: current status of the art. *Clin Exp Gastroenterol*, 5:151-157
7. Megraud, F. (2004). H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53(9): 1374-1384.
8. De Francesco, Vincenzo, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., et al. (2010). Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic. *J Gastrointestin Liver Dis*, 19(4): 409-414.
9. Pastene, E.; Hebel, S.; García, A. (2012). Polifenoles con efecto anti-*Helicobacter pylori*: fuentes de obtención y su potencial utilización en fitomedicamentos, nutraceuticos y alimentos funcionales. *Rev Farmacol Chile*, 5: 35-50.
10. Malbrán, C. (2012). Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilucion [MIC testing]. M07-A9; 32(2). 32 (2). Disponible en: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51470/v43e652019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., Lopéz, M., & Royo, G. (2004). diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En L. Manuel, *Procedimientos en microbiología clinica* (págs. 75-105). Madrid: SEIMC.
12. Wong, Chun-Foong; Yeo, Joshua Yi; Gan, Samuel Ken-En (2016). APD Colony Counter App: Using Watershed algorithm for improved colony counting. *Nat. Methods Appl. Notes*, 1-3. <https://oar.a-star.edu.sg/storage/o/o13no50vx3/775-an9774.pdf>
13. Chávez, F., Aranda, M., García, A., & Pastene, E. (2011). Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. *Hass*) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *B Latinoam Caribe PL*. 10(3): 265-280.
14. Romero, M., Freire, J. Pastene, E., García, A., Aranda, M., & González, C. (2019). Propolis polyphenolic compounds affect the viability and structure of *Helicobacter pylori* in vitro. *Rev. Bras. Farmacog.*, 29: 325-332.
15. Murali, M. R., Naveen, S. V., Son, C. G., & Raghavendran, H. R. B. (2014). Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some commonly known natural products: bench to bedside. *Integrat. Med. Resear.*, 3(3): 111-118.
16. Basante, J., Cruz, S., Osorio, C., & Hurtado, N. (2016). Obtención, fraccionamiento y determinación de la composición de extractos polifenólicos de aguacate (*Persea americana* Mill). In: Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, 2016, Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://sired.udenar.edu.co/id/eprint/3651>