



EVALUACION DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE PÉTALOS DE ROSAS

J. Bareiro¹, L. I. Schelegueda^{2,3}, P. Zema¹, J. Gabilondo⁴, C. A. Campos^{2,3}, L. Malec¹

1 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento Química Orgánica. Buenos Aires, Argentina.

2 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias. Buenos Aires, Argentina.

3 CONICET - Universidad de Buenos Aires, Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Buenos Aires, Argentina.

4 EEA INTA San Pedro. Ruta 9 km 170. Buenos Aires, Argentina.

E-mail: malec@qo.fcen.uba.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el contenido de polifenoles y la actividad antimicrobiana de extractos de pétalos de rosas. Se trabajó con seis cultivares de rosas: *Gran Gala*, *Bella Época*, *Kardinal*, *Queen Elizabeth*, *Traviatay* *Cristóbal Colón*. El contenido de polifenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu expresando el resultado en equivalentes de ácido gálico (AG) como mg AG / g muestra seca (m.s.). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar utilizando como microorganismos indicadores *Listeria innocua* (bacteria Gram positiva, subrogante del patógeno *Listeria monocytogenes*) y *Pseudomonas aeruginosa*, (bacteria deteriorativa Gram negativa). En los casos en que se observó actividad frente a alguna de las cepas, ésta se cuantificó mediante la determinación de los títulos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los contenidos de polifenoles oscilaron entre 52,3 y 169,8 mg AG / g m.s. Los mayores valores correspondieron a los cultivares de *Traviata*, *Gran Gala* y *Kardinal* con pétalos de color rojo, y los menores a los cultivares *Cristóbal Colón* y *Queen Elizabeth*, de colores naranja y rosa respectivamente. Todos extractos estudiados mostraron actividad inhibitoria frente a ambas bacterias. Al determinar los títulos contra *L. innocua*, se observó que *Gran Gala*, *Bella Época*, *Traviatay* *Kardinal* mantuvieron su actividad inhibitoria hasta la dilución 16^{-1} , mientras que *Queen Elizabeth* y *Cristóbal Colón* lo hicieron hasta la dilución 8^{-1} . Con respecto a los títulos contra *P. aeruginosa*, se encontró que los extractos de *Gran Gala* y de *Kardinal* conservaron su actividad antagonista hasta la dilución 16^{-1} , mientras que los cuatro extractos restantes lo hicieron hasta la dilución 8^{-1} . Tal como se esperaba, en todos los casos se observó que a medida que los extractos se diluyeron, la zona de inhibición disminuyó. Estos resultados guardan concordancia con el contenido de polifenoles totales, especialmente respecto a la actividad contra *L. innocua*. Los resultados sugieren que los extractos estudiados podrían ser aplicados para la conservación de alimentos. En particular, aquellos obtenidos a partir de cultivares de color rojo serían los más efectivos.

Palabras clave: pétalos de rosas, polifenoles, actividad antimicrobiana, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Introducción

En los últimos años ha crecido el interés por las flores comestibles dentro del campo de las investigaciones en fitoquímicos, debido a los efectos positivos observados, asociados a la salud humana (Lu, Li y Yin, 2016). En particular, el cultivo de las plantas de rosa puede realizarse para la industria de la flor de corte o para ser vendidas como plantas ornamentales. En el tiempo que lleva la obtención de una planta de tamaño comercial, se producen varias floraciones, las cuales se desechan, dejando el material a campo. Las rosas descartadas durante el desarrollo del cultivo podrían utilizarse como alimento e incluso, para extraer sustancias de interés con el fin de sustituir aditivos sintéticos, tanto en la industria de alimentos como farmacéutica, cosmética o textil. De esta manera, se lograría una producción más eficiente del cultivo agregando valor a la economía local mediante una alternativa a la comercialización tradicional.

Los pétalos de rosas presentan elevados contenidos en vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, particularmente polifenoles (dos Santos y col., 2018; Pires y col., 2017). Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de fitoquímicos clasificados como metabolitos secundarios. Éstos desempeñan diversas funciones fisiológicas en las plantas, como intervenir en el crecimiento, reproducción y procesos defensivos frente a distintos tipos de estrés. Dentro de las actividades biológicas asociadas a beneficios para la salud humana se encuentran sus efectos anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, antialérgicos, antivirales e inhibidores de enzimas prooxidantes (De Ancos y col., 2015; Rajeshwari, Shobha y Andallu, 2014; Scalbert y col., 2005). En este contexto, los extractos florales y sus aceites esenciales también se consideran potenciales agentes antimicrobianos naturales. Voon, Bhat y Rusul (2012) han reportado que poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos y de deterioro, atribuyendo su eficacia a sus constituyentes bioactivos.

En base a lo expuesto, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el contenido de fenoles totales y la actividad antimicrobiana de extractos de pétalos de rosa de 6 cultivares diferentes, y evaluar, además, si ambos parámetros se encuentran relacionados.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestras

Se trabajó con seis cultivares de rosas (*Rosa sp*), con colores de pétalos variados. Los cultivares utilizados fueron *Gran Gala*, *Kardinal* y *Traviata* (color rojo), *Bella Época* y *Queen Elizabeth* (color rosa) y *Cristóbal Colón* (color naranja). De cada cultivar se utilizaron las flores abiertas de 3 cosechas, tomando 10 flores de cada cosecha. Se separaron los pétalos, y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se liofilizaron, molieron y almacenaron a -20°C. A partir de los polvos se obtuvieron los extractos para realizar las determinaciones detalladas a continuación. Además, se determinó el contenido de humedad por secado en estufa de vacío a 65 °C hasta constancia de peso según AOAC: 920.151 (1990).

2.2 Preparación de extractos

Para analizar el contenido de fenoles totales se pesó aproximadamente 0,05 g de muestra de cada cultivar de rosa. Cada muestra se trató con 5 ml de etanol 80% (v/v) y se incubó 15 minutos a 50 °C en baño ultrasónico de 37 kHz Elmasonic S 30H (Elma Schmid bauer GmbH, Alemania). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a 8500 rpm, se filtró al vacío y se guardó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de solvente de extracción al pellet y se centrifugó nuevamente por 10 minutos. Se filtró y los sobrenadantes se llevaron a 10 ml con etanol 80%.

Para la cuantificación de la actividad antimicrobiana, los extractos se prepararon empleando 0,25 g de muestra por cada 10 ml del solvente de extracción. Luego, se evaporó el solvente hasta una concentración 5 veces mayor que la inicial, con el objetivo de eliminar el etanol y aumentar la concentración de compuestos bioactivos. Todas las extracciones se realizaron por duplicado y se guardaron en freezer hasta su análisis.

2.3. Determinación del contenido de polifenoles

La determinación del contenido de polifenoles totales en los extractos se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. A 250 µl de extracto se le agregaron 4 ml de agua bidestilada y 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 3 minutos, se incorporaron 500 µL de Na₂CO₃ 1N agitando en vortex. Se mantuvo 120 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, USA). En paralelo se realizó una curva de calibración empleando concentraciones de ácido gálico en el rango de 0,06 a 0,3 mg/ml Los

resultados se expresaron como mg de ácido gálico (AG) / g muestra seca (ms). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4. Determinación de actividad antimicrobiana

2.4.1. Ensayo de Difusión en agar

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos se evaluó aplicando el método de difusión en agar, metodología recomendada por el National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999). Como cepas indicadoras, se utilizaron los siguientes microorganismos de colección: *Listeria innocua* ATCC 33090 (como alternativa al patógeno *Listeria monocytogenes*), *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (como representante de las bacterias deteriorativas Gram positivas), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 (ambas como representantes de las bacterias deteriorativas Gram negativas) y *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 (como representante de levaduras deteriorativas resistentes a condiciones ambientales adversas). Brevemente, se inoculó agar TSA (o Sabouraud en el caso de *Z. bailii*) al 1,2% con 10^6 UFC/ml de los cultivos indicadores y se prepararon placas de Petri, dispensando 20 ml del agar inoculado. Una vez que el agar solidificó, se formaron pocillos de 6 mm de diámetro, utilizando un sacabocados estéril. Se colocaron 50 μ l de extracto en cada pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante 2 horas y luego a 30 °C durante 24 horas. Como control se utilizó el solvente de extracción, evaporado de la misma manera que los extractos. Luego de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición obtenidos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4.2. Determinación de los títulos de los extractos con actividad antimicrobiana

En los casos en los cuales se detectó actividad antagonista, se determinaron los títulos de los extractos. Para ello, se repitió el procedimiento antes descrito, sembrando en cada pocillo sucesivas diluciones de los extractos. El título de los extractos se definió como la mayor dilución que produjo una zona de inhibición visible (Delgado y col., 2005). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.5. Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos de la determinación del contenido de polifenoles se analizaron llevando a cabo un ANOVA de un factor (cultivar) seguido por el test de Tukey para comparación de muestras múltiples. La significatividad estadística se evaluó a un nivel de 5% ($\alpha=0,05$). El análisis estadístico se realizó mediante el empleo del programa Infostat.

3. Resultados y discusión

3.1. Contenido de polifenoles totales

La Tabla 1 presenta el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu, sobre los pétalos de los distintos cultivares de rosa estudiados. Los resultados se expresaron como miligramos de AG / g ms debido a que se ha reportado que este ácido fenólico es el mayoritario en rosas (Trinh, Choi, y Bae, 2018; Vinokur y col., 2006).

Tabla 1. Contenido de fenoles totales

Cultivar	Fenoles totales (mg _{AG} /g ms)
<i>Traviata</i>	170 ^a ± 5
<i>Gran Gala</i>	151 ^b ± 7
<i>Kardinal</i>	119 ^c ± 7
<i>Bella Época</i>	92 ^d ± 4
<i>Cristóbal Colón</i>	70 ^e ± 3
<i>Queen Elizabeth</i>	52 ^f ± 2

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

En la Figura 1 se puede observar la variedad de colores que presentan los pétalos estudiados, previo al tratamiento de deshidratación mediante liofilización y posterior molienda. A partir de los resultados descritos anteriormente se podría inferir que existe una relación entre el color de los pétalos y el contenido de fenoles totales, ya que los cultivares de color rojo, *Gran Gala*, *Traviata* y *Kardinal* son aquellos que presentan los valores más elevados de este parámetro.



Figura 1. Cultivares de rosa estudiados en el presente trabajo.

3.2. Actividad Antimicrobiana

Al llevar a cabo el ensayo de difusión en agar, no se observó actividad antagonista por parte del solvente de extracción, esto indica que, en caso de encontrar halos de inhibición, los mismos se deben únicamente a la presencia de los extractos estudiados.

Al evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de pétalos de rosas, se observó que los 6 cultivares estudiados presentaron actividad contra *L. innocua* y contra *Ps. aeruginosa*. En el primer caso se obtuvieron halos de inhibición entre 16 y 18 mm, mientras que, en el segundo caso, los halos hallados presentaron diámetros entre 12 y 15 mm (Tablas 2 y 3). Estos resultados indican que los extractos fueron más efectivos contra *L. innocua* que contra *Ps. aeruginosa*. Ningún extracto logró inhibir el desarrollo del resto de los microorganismos indicadores.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió determinar los títulos de los 6 cultivares contra *L. innocua* y contra *Ps. aeruginosa*. En el primer caso, se observó que los cultivares *Gran Gala*, *Bella Época*, *Kardinal* y *Traviata* mantuvieron su actividad inhibitoria hasta la dilución 16^{-1} , mientras que *Queen Elizabeth* y *Cristóbal Colon* lo hicieron hasta la dilución 8^{-1} (Tabla 2). Cabe destacar que los cultivares que presentaron mayor título, son los que presentan pétalos de colores más intensos (Figura 1). Al determinar los títulos contra *Ps. aeruginosa*, se observó que sólo los cultivares *Gran Gala* y *Kardinal* conservaron su actividad antagonista hasta la dilución 16^{-1} . Los 4 cultivares restantes presentaron actividad inhibitoria hasta la dilución 8^{-1} (Tabla 3).

Como era de esperar, en todos los casos la zona de inhibición fue menor a medida que aumentó la dilución de los extractos. Por último, cabe mencionar que los cultivares que presentaron mayor actividad antagonista, son también los que presentan mayor contenido de polifenoles totales.

Tabla 2. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos contra *L. innocua* expresados en mm.

Cultivar	Dilución					
	1	2^{-1}	4^{-1}	8^{-1}	16^{-1}	32^{-1}
<i>Gran Gala</i>	18	16	14	12	10	-
<i>Bella Época</i>	16	15	13	11	9	-
<i>Kardinal</i>	17	15	14	12	10	-
<i>Queen Elizabeth</i>	16	14	12	10	-	-
<i>Traviata</i>	18	15	13	12	10	-
<i>Cristóbal Colón</i>	17	16	13	9	-	-

Tabla 3. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos contra *Ps. aeruginosa* expresados en mm.

Cultivar	Dilución					
	1	2 ⁻¹	4 ⁻¹	8 ⁻¹	16 ⁻¹	32 ⁻¹
<i>Gran Gala</i>	13	12	11	10	9	-
<i>Bella Época</i>	15	13	11	10	-	-
<i>Kardinal</i>	14	12	10	9	8	-
<i>Queen Elizabeth</i>	13	12	10	8	-	-
<i>Traviata</i>	14	13	11	9	-	-
<i>Cristóbal Colón</i>	12	11	9	8	-	-

La actividad antimicrobiana de extractos de pétalos de flores ha sido previamente reportada. Sin embargo, la información acerca de los cultivares utilizados en este estudio y acerca de la actividad antagonista de pétalos de flores contra *L. innocua* es muy escasa. A pesar de trabajar con otras variedades de flores comestibles, y en algunos casos, con otros microorganismos indicadores, la bibliografía reporta resultados similares a los obtenidos en este estudio. A modo de ejemplo, Ozkan y col. (2004) y Ksouri y col. (2009) observaron actividad antimicrobiana de extractos de flores de *Rosa damascena* y *Tamarix gallica* L., respectivamente. En ambos casos, los extractos eran ricos en polifenoles. Por otra parte, China y col., (2012) observaron halos de inhibición entre 12 y 17 mm al evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de flores de *Sesbania grandiflora* que contenían polifenoles. En el mismo estudio, observaron que los microorganismos Gram positivos fueron más sensibles a los extractos que los Gram negativos. En concordancia con esto, en el presente estudio, la inhibición producida sobre *L. innocua* (Gram positiva) fue mayor que la producida sobre *Ps. Aeruginosa* (Gram negativa).

4. Conclusiones

Los resultados demuestran que los extractos de pétalos de rosas estudiados son fuente de polifenoles y de compuestos con actividad antimicrobiana contra dos microorganismos de relevancia en el área de los alimentos. Los cultivares *Gran Gala*, *Traviata* y *Kardinal* de coloración roja, fueron los que presentaron resultados más promisorios y por ende podrían ser aplicados para la conservación de alimentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

Referencias

- A.O.A.C., Association of the Official Analytical Chemists (1990). Official Methods of the Association of the Official Analytical Chemists. 15^o Edición. Arlington, Virginia, USA.
- China, R., Mukherjee, S., Sen, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., Ghosh, S., Dhar, P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbaniagrandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological Research*, 167, 500-506.
- De Ancos B., Colina-Coca C., González-Peña D., Sánchez-Moreno C. (2015). Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products. In: Gupta VK, Tuohy MG, Lohani M, O'Donovan A (ed). *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd..
- Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Tenreiro, R., Peres, C. (2005). Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *Journal of Microbiological Methods*, 62, 121-124.
- dos Santos, A. M. P., Silva, E. F. R., dos Santos, W. N. L., da Silva, E. G. P., dos Santos, L. O., da S. Santos, B. R., dos Santos, W. P. C. (2018). Evaluation of minerals, toxic elements and bioactive compounds in rose petals (*Rosa* spp.) using chemometric tools and artificial neural networks. *Microchemical Journal*, 138, 98–108.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarixgallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2083-2091.
- Lu, B., Li, M., Yin, R. (2016). Phytochemical content, health benefits, and toxicology of common edible flowers: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.; 56, S130–S148.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA, USA.
- Ozkan, G., Sagdic, O., Baydar, N.G., Baydar, H. (2004). Note: Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascene* flowers extracts. *Food Science and Technology International*, 10(4), 277-281.
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: Valorization as new food ingredients. *Food Chemistry*, 220, 337–343.
- Rajeshwari C.U., Shobha R.I., Andallu B. (2014). Review: phytochemicals in diet and human health with special reference to polyphenols. *Annals of Phytomedicine*. 3:4-25.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:287–306.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- Trinh, L. T. P., Choi, Y.-S., & Bae, H.-J. (2018). Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Industrial Crops and Products*, 125, 261–268.
- Vinokur, Y., Rodov, V., Reznick, N., Goldman, G., Horev, B., Umiel, N., & Friedman, H. (2006). Rose Petal Tea as an Antioxidant-rich Beverage: Cultivar Effects. *Journal of Food Science*, 71(1), S42–S47.
- Voon, H. C., Bhat, R., y Rusul, G. (2012). Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(1), 34–55.