

Artículo de Investigación

Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos y aceite esencial de *Campomanesia xanthocarpa* (guavirá).

Cinthia Noemí Burgos Cantoni^{1*}

¹Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Itapúa. Encarnación - Paraguay.

*Autor correspondiente: Cinthia Noemí Burgos Cantoni; cinthiaburgos@cyt.uni.edu

Recibido: 21/12/2020 **Aceptado:** 09/08/2021

Resumen

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico y el aceite esencial de *Campomanesia xanthocarpa* "guavirá" en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae*, planteándose la hipótesis de que tanto el aceite esencial como el extracto hidroalcohólico tiene efecto inhibitor en el crecimiento de dichas cepas. El tipo de investigación es aplicada con diseño experimental, empleando las hojas de *C. xanthocarpa* para obtener aceite esencial por hidrodestilación de arrastre de vapor, extracto hidroalcohólico a 50°, 60° y 70° y extracto glicólico con glicerina al 87% por el método de maceración. La siembra de las cepas patógenas se hizo en camada y para fijar las concentraciones se utilizó el método por difusión. Para el análisis de resultados, se utilizó el análisis de varianza y comparaciones múltiples con la prueba de Tukey para identificar si el promedio de las medias de los halos es diferente con respecto algún tratamiento; es así que, el extracto hidroalcohólico de *C. xanthocarpa* a 70° tiene mayor efecto inhibitorio en las concentraciones respecto a los demás extractos, encontrándose así a las cepas de *Staphylococcus aureus* sensible frente a dicho extracto con un halo de 14 mm.

Palabras claves: bactericida, efecto inhibitor, hidrodestilación por arrastre de vapor, maceración alcohólica.

Abstract

The objective of the present study is to evaluate the effect of the concentrations of hydroalcoholic extract and the essential oil of *Campomanesia xanthocarpa* "guavirá" on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus agalactiae*, under the hypothesis that both the essential oil and the hydroalcoholic extracts have an inhibitory effect on the growth of these strains. An applied research with an

experimental design was utilised, using the leaves of *C. xanthocarpa* to obtain the essential oil by steam hydrodistillation, hydroalcoholic extract at 50 °, 60 ° and 70 ° and the glycolic extract by using 87% glycerin. The sowing of the pathogenic strains was carried out in litters and the diffusion method was used to set the concentrations. For the analysis of results, the analysis of variance and multiple comparisons with the Tukey test were used to identify if the average of the means of halos is different in relation to the treatment, thus the hydroalcoholic extract of *C. xanthocarpa* at 70° showed a greater inhibitory effect in the concentrations compared to the other extracts, and that *Staphylococcus aureus* strains are sensitive to this extract with a halo of 14 mm.

Key words: Bactericidal, inhibitory effect, steam hydrodistillation, alcoholic maceration.

1. Introducción

En el país se cuenta con numerosas especies de plantas con frutos comestibles, pero en la mayoría de ellas no se encuentran datos, al menos suficientes sobre su composición en nutrientes y compuestos bioactivos. Sin embargo se producen cambios en la flora de la zona por la deforestación y el aumento de asentamientos rurales, lo que lleva a la extinción de algunas especies (1).

La especie *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex. O. Berg popularmente conocida como guavirá y pertenece a la familia Myrtaceae, planta nativa del Paraguay así como también endémica del Brasil y Uruguay (2). En su composición nutricional destaca su elevadísimo contenido de vitamina C (17,8 mg.100 g⁻¹), y con solo consumir tres frutos de *C. xanthocarpa* casi se cubren los requerimientos diarios de esta vitamina (65 a 90 mg/día). Su capacidad antioxidante total también es de interés ya que es superior a los 500 mg.100 g⁻¹ (3) (4).

La etimología del *Campomanesia* indica el género dedicado por Ruiz y Pavón al diplomático español Pedro Rodríguez Campomanes y Sorrida (1723-1803), director de la Real Academia de Historia de Madrid. El nombre de la especie *Xanthocarpa*, proviene del griego *xanthos* amarillo y *karpos* fruto, por el color de sus frutos comestibles una vez maduros (2)(5)(6).

Esta planta se puede hallar en abundancia en las zonas de la región Oriental de Paraguay, como ser el Alto Paraná, Itapúa, Misiones y Caazapá. Puede adaptarse al clima caluroso y además en lugares sombreados (7). Sus frutos redondos, cuando están maduros son de colores amarillo-anaranjados, pulposos y tienen un sabor dulce, por lo que son consumidos por las aves y el hombre (8).

Los alimentos están constantemente expuestos a la contaminación causada por agentes patógenos, adquiridos durante el almacenamiento, el transporte o el procesamiento después

de la cosecha, lo que traen consigo pérdidas significativas en la calidad, cantidad y composición de nutrientes, con la consecuente reducción del valor en el mercado (9). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los casos registrados de pérdidas de alimentos en mal estado en los que se incluyen cereales, granos, nueces, frutas, verduras, carnes y especias, se reportan en cifras equivalentes a toneladas métricas de alimentos cada año (9) (10).

Con el propósito de generar una mayor inocuidad alimentaria, se deben originar alternativas que conduzcan a los conservantes antimicrobianos naturales como fuentes de inhibición de microorganismos, para garantizar el aprovechamiento y prolongar la vida útil de los alimentos, disminuyendo así los conservantes químicos.

En este contexto, en los últimos años los aceites esenciales naturales se han convertido en un tema de investigación en beneficio de la industria alimentaria puesto que han demostrado una importante actividad bacteriana frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos (9).

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (11). Son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (12).

La extracción discontinua o simultánea incluye la maceración, una extracción que se realiza a temperatura ambiente protegida de la luz (13). Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, etanol o glicerina) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles, tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica, luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (13) (14).

El objetivo general de este trabajo consiste en evaluar los parámetros fitoquímicos y capacidad antibacteriana del extracto de *Campomanesia xanthocarpa* (guavirá), frente a algunos microorganismos patógenos que contaminan los alimentos.

2. Materiales y Métodos

El tipo de estudio de la investigación fue aplicado con diseño experimental con post prueba únicamente y número de repeticiones, y la toma de muestra del *Campomanesia xanthocarpa* se realizó durante el año 2020 tomando en cuenta solamente a las hojas que hayan madurado recientemente y cuyo crecimiento se ha detenido, pero no estén en estado senil, excluyendo plantas que han estado bajo largo periodo de estrés climático o nutricional, que presenten daño mecánico, atacadas por insectos o por enfermedades.

La obtención de los extractos se realizó inicialmente llevando a secado en estufa por convección de aire a 40°C las hojas recogidas por un periodo de 6 a 7 horas aproximadamente. Luego del secado las hojas fueron procesadas a molienda mecánica (licuadora marca Philips) y posteriormente filtradas con tamiz de abertura 50mm x 70mm, y almacenadas en frascos herméticos hasta su uso. Para la maceración se realizaron 3 concentraciones de alcohol 50° (50/50 agua/alcohol), 60° (40/60 agua/alcohol) y 70° (30/70 agua/alcohol), y para el extracto glicólico se utilizó glicerina pura (C₃H₈O₃) 87% de la marca Biopack. Fueron mezclados 500 gr. de las hojas de *C. xanthocarpa* con 500 ml de alcohol 50°, 500 gr. de las hojas de *C. xanthocarpa* con 500 ml de alcohol 60°, 500 gr. de las hojas de *C. xanthocarpa* con 500 ml de alcohol 70° y 500 gr. de las hojas de *C. xanthocarpa* con 500 ml de glicerina 87%, cada una de las mezclas en un frasco de color ámbar con tapa esmerilada sellado con parafilm, y llevado a un lugar seco y fresco en ausencia de luz con agitación esporádica durante un periodo de 8 días. El producto final fue filtrado con una bomba de vacío de la marca htc, kitasato de 1000 ml y embudo de buchner con papel de filtro cualitativo, y llevado a estufa a 40°C por un lapso de 24 horas.

Para la extracción del aceite esencial se utilizó un equipo de arrastre de vapor de agua tipo Antonacopoulos de la marca IVA. Se pesaron 50 g de las hojas procesadas de *C. xanthocarpa* y fueron introducidas en la ampolla de Antonacopoulos, se agregó agua destilada estéril para que la muestra baje hasta el fondo de la ampolla, se agregaron perlas de vidrio antiespuma. Se añadió agua destilada al balón generador de vapor hasta el 50% de su capacidad y fueron agregadas las perlas de vidrio para regularizar la ebullición. Fueron conectadas todas las partes del equipo como el refrigerante y las conexiones de agua, y una vez armado el sistema, se llevó a temperatura media de 60 a 70°C por 4 horas. En un erlenmeyer de 500 ml fueron recogidas las gotas del producto obtenido en total un volumen de 153 ml, el mismo fue almacenado a temperatura ambiente en un frasco de color ámbar con tapa a rosca hasta su uso.

Para garantizar la calidad de esta prueba se emplearon las cepas de colección siguientes: gram positivos *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. agalactiae* identificado

mediante un sistema automatizado (Vitek2), gram negativo *E. coli* ATCC 25922. Para la actividad antimicrobiana se utilizó el medio de cultivo Muller Hinton vertido en placas petri de 15mm con 25 ml de medio de cultivo y en los tratamientos se aplicó el método de difusión en pozo (Kirby-Bauer modificado) con 30 μ L de extracto inoculado en cada pocillo. La técnica de siembra fue en camada o superficial con el propósito de aplicar las concentraciones obtenidas. Para la preparación del inóculo se estandarizó en 5×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) equivalente al patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland incubadas a 37°C. Fueron consideradas 5 repeticiones para cada concentración, calculando el diámetro del halo medido en mm en base a los estándares del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS), para evaluar el efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano. Se incubaron controles de etanol 50°, 60° y 70° (v/v) y glicerina sin extractos, para contrastar con los resultados de los extractos.

Tabla 1. Patrones estándar del halo de inhibición para los microorganismos en estudio puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición.

Cepas	Interpretación	Carga del disco μ L	Halos de inhibición (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Sensible	30	> 13
	Intermedio	30	11 - 13
	Resistente	30	< 11
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sensible	30	>18
	Intermedio	30	15 - 17
	Resistente	30	<14
<i>Enterococcus</i>	Sensible	30	>17
	Intermedio	30	15-16
	Resistente	30	<14
<i>Streptococcus</i>	Sensible	30	>19
	Intermedio	30	16-18
	Resistente	30	<15

Sensible: significa que el crecimiento del microorganismo está inhibido a la concentración fármaco o extracto.

Intermedia: significa que el crecimiento del microorganismo está inhibido solamente a la dosis máxima recomendada.

Resistente: significa que el microorganismo es resistente a las concentraciones del fármaco o extracto.

Estas normas de interpretación las ha establecido el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Se realizaron análisis fisicoquímicos a las hojas antes de la extracción como Humedad (N° 984.25; AOAC, 1997), pH (potenciometría directa), Proteínas (928.65; AOAC, 1997), Cenizas (940.26; AOAC, 1997).

3. Resultados y Discusión

3.1. Resultados Fisicoquímicos

Los resultados físicoquímicos realizados a las hojas de *C. xanthocarpa* fueron los siguientes:

Tabla 1. Resultados fisicoquímicos del análisis de las hojas de *C. xanthocarpa*

Determinación	Resultados	Método
Humedad antes del secado:	22%	N° 984.25; AOAC, 1997
Humedad después del secado:	2,54%	N° 984.25; AOAC, 1997
Azúcares reductores (cualitativo)	+++	Fehling
pH (8:1;agua:hojas)	5,8	potenciometría directa
Proteínas	2,2	N° 928.65; AOAC, 1997
Cenizas	6,8%	N° 940.26; AOAC, 1997
Triterpenos	++	Liebermann-Bouchard para terpenoides.

3.2. Actividad inhibitoria de extractos sobre los microorganismos

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de *C. xanthocarpa* frente a los diferentes microorganismos se detallan a continuación:

Tabla 2. Resultados de actividad inhibitoria de los extractos.

Concentraciones	n	S. aureus \bar{x} (mm)	S. agalactiae \bar{x} (mm)	E. faecalis \bar{x} (mm)	E. coli \bar{x} (mm)	DS
Hidroalcohólico al 50%	5	7	6	7	5	0,1
Hidroalcohólico al 60%	5	9	7	8	7	0,1
Hidroalcohólico al 70%	5	14	7	10	10	3
Aceite esencial por arrastre de vapor	5	0	0	0	0	0
Glicólico	5	4	4	3	0	2
Alcohol 50%	5	0	0	0	0	0
Alcohol 60%	5	0	0	0	0	0
Alcohol 70%	5	2	0	0	0	1
Glicerina 87%	5	0	0	0	0	0

Observándose que hubo una inhibición de 14 mm de las cepas de Staphylococcus aureus frente a el extracto hidroalcohólico de C. xanthcarpa 70° catalogándose como sensible frente a él según la tabla del CLSI. (15) Mientras que las demás cepas denotaron susceptibilidad intermedia y resistente frente a los extractos.

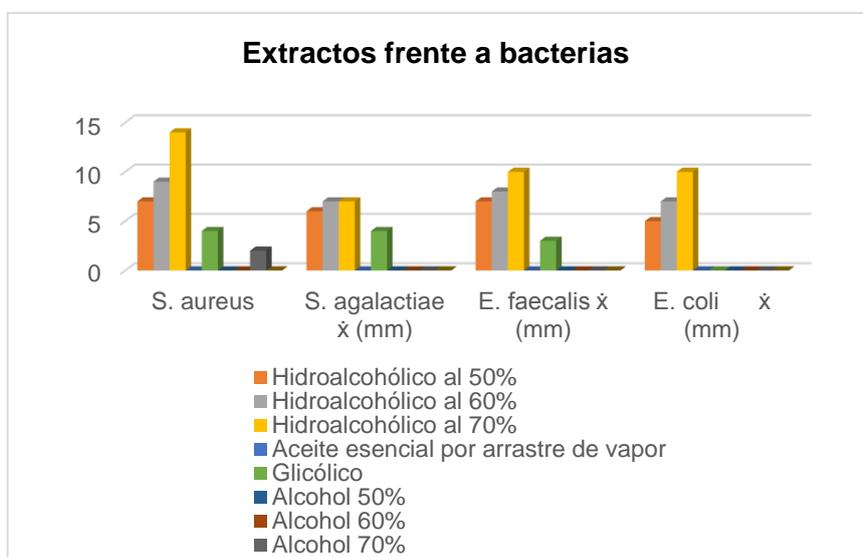


Gráfico 1. Media de la medida de los halos frente a los extractos.

*Media del diámetro del halo en mm a diferentes concentraciones de los extractos y controles.

3.3. Análisis estadísticos

Fueron realizados análisis de ANOVA de dos factores teniendo en cuenta a los microorganismos y a los extractos y comparaciones múltiples con la prueba de Tukey en el programa estadístico R, para comparar los diferentes tratamientos de acuerdo al promedio obtenido de las medias de los halos.

Tabla 3. Análisis de varianza de las concentraciones de todos los extractos utilizados:

Factores	Hidroalcohólico al 50%	Hidroalcohólico al 60%	Hidroalcohólico al 70%	Arrastre de vapor	Extracto Glicólico
S. aureus (mm)	7	9	14	0	4
S. agalactiae (mm)	7	8	10	0	4
E. faecalis (mm)	5	7	10	0	3
E. coli (mm)	6	7	7	0	0

*Tabla de datos computados

Tabla 4. Promedio y Varianza de acuerdo al factor extracto y al factor microorganismo.

Factores	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
S. aureus	5	34	6,8	27,7
S. agalactiae	5	29	5,8	15,2
E. faecalis	5	25	5	14,5
E. coli	5	20	4	13,5
Hidroalcohólico al 50%	4	25	6,25	0,91666667
Hidroalcohólico al 60%	4	31	7,75	0,91666667
Hidroalcohólico al 70%	4	41	10,25	8,25
Aceite esencial por arrastre de vapor	4	0	0	0
Glicólico	4	11	2,75	3,58333333

*Análisis de promedios y varianza entre los halos de inhibición entre los microorganismos y varianza de los mismos.

Se observa que el microorganismo *S. aureus* obtuvo un mayor promedio y una mayor varianza (6,8 y 27,7 respectivamente) de crecimiento entre los extractos que los demás microorganismos. Mientras que el extracto hidroalcohólico a 70% por su parte obtuvo un mayor promedio y varianza (10,25 y 8,25 respectivamente) que los demás extractos.

Tabla 5. Aplicación de ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Microorg.	21,2	3	7,06666667	4,28282828	0,028443348	3,490294819
Extractos	263,8	4	65,95	39,969697	7,62171E-07	3,259166727
Error	19,8	12	1,65			
Total	304,8	19				

Según la aplicación del análisis ANOVA podemos deducir que entre los microorganismos hubo una diferencia significativa entre algunas de las medias de los microorganismos en cuanto al crecimiento con todos los extractos aplicados, debido a que el cociente de dispersión (F) es mayor a la variabilidad de las observaciones dentro de los grupos, como el valor de diferencia es pequeño (0,792533464) podemos decir que no todas las medias son diferentes significativamente.

En cuanto a los extractos podemos observar un cociente de dispersión (F) mucho mayor (36,710530273), donde si podemos afirmar que no todas las medias son iguales, es decir existen diferencias significativas en todos los extractos.

4. Conclusiones

En su caracterización preliminar, el estudio fitoquímico foliar demuestra gran congruencia con estudios realizados en otros países donde los principales componentes de las partes aéreas frescas de *C. xanthocarpa* son los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, compuestos lactónicos, triterpenos o esteroides, terpenos y ácidos orgánicos los que pueden estar relacionados con la actividad antiinflamatoria y antibacteriana que se describe en los estudios farmacológicos consultados.

Las cepas de *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* y *E. coli*, demostraron una susceptibilidad intermedia y resistente frente a los extractos de aceite esencial por arrastre de vapor, hidroalcohólico de *C. xanthocarpa* 50°, 60°, 70° y glicólico, mientras que la cepa de *Staphylococcus aureus* resultó sensible frente al extracto hidroalcohólico de *C. xanthocarpa* 70°. En el Brasil, se llevó a cabo el estudio del aceite esencial de *C. adamantium* en el cual se verificó actividad antibacteriana para la fracción de hexano, mientras que se observó actividad antifúngica para la fracción acuosa y fracción de taninos acuosa concentrada y para el ácido vanoleico (16).

En la ciudad de Bogotá, Colombia se realizó un trabajo donde fue analizado el extracto de champa (*Campomanesia lineatifolia*), como antioxidante en albóndigas de bagre donde concluyeron que la champa posee efectos antioxidantes en la matriz analizada por lo que puede ser utilizada como antioxidante natural para matrices cárnicas en general, lo que también deja un importante precedente sobre el género *Campomanesia* (17).

Por lo expuesto se puede concluir que el extracto hidroalcohólico de *C. xanthocarpa* 70° posee una actividad bacteriostática frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para investigaciones posteriores se recomienda estudiar los metabolitos que contiene el *C. xanthocarpa* para conocer los compuestos presentes en las hojas, y también formular películas que sirvan como recubrimiento y puedan contener los compuestos de interés para resguardar los alimentos.

Conflicto de interés: La autora declara que no existe ningún conflicto de interés con respecto a la publicación de este artículo.

Agradecimientos: A la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa por financiar esta investigación.

Bibliografía

1. MERELES, F. Recursos Fitogenéticos: plantas útiles de las cuencas del Tebicuary-mi y Capiibary, Paraguay Oriental. *Rojasiana*. 2001. Vol. Especial, p. 144.
2. SCUTTI, A.B. (*Campomanesia xanthocarpa* Berg .). . 1999. Vol. 14, no. 1, p. 1-8.
3. VALLILO, M.I., MORENO, P.R.H., OLIVEIRA, E. de, LAMARDO, L.C.A. y GARBELOTTI, M.L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008. Vol. 28, p. 231-237. DOI 10.1590/s0101-20612008000500035.
4. BERG, O. Recuperación de frutos nativos de sudamérica : *Campomanesia*. . 2001. P. 113-118.
5. MCVAUGH, R. *The genera of American Myrtaceae - an interim report*. 1968.
6. LANDRUM, L. *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhynium* and *Luma* (Myrtaceae). *The New York Botanical Garden*. 1986. P. 1-178.
7. CONAP. El estado de la biodiversidad para la alimentación y la agricultura. Informe de país: Guatemala. . 2019. P. 500.
8. HERZOG, N.F.M., DE MATOS MALAVASI, M. y MALAVASI, U.C. Morfometría dos frutos e germinação de sementes de *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG. *Semina: Ciências Agrárias*. 2012. Vol. 33, no. 4, p. 1359-1366. DOI 10.5433/1679-0359.2012v33n4p1359.
9. ARGOTE-VEGA, F.E., SUAREZ-MONTENEGRO, Z.J., TOBAR-DELGADO, M.E., PEREZ-ALVAREZ, J.A., HURTADO-BENAVIDES, A.M. y DELGADO-OSPINA, J. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Capacidade de avaliação inibitório de óleos essen. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 2017. No. 2, p. 52-60.
10. PRAKASH, B. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - potentials and challenges. *Food Control*. 2015. Vol. 47, p. 381-389.
11. STASHENKO, E.E. Aceites Esenciales. *División de Publicaciones UIS*. 2009. P. 180.
12. PEÑA, A., ALARCÓN, L. y RANGEL, Y. Aceites esenciales. *Aceites esenciales* [en línea]. 2016. Disponible en: <http://jabonesartesanalesecosoap.blogspot.com/2016/08/aceites-esenciales.html>
13. FUER. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis* [en línea]. 2018. P. 1-57.

Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

14. VOIGT, R. *Tratado de tecnología farmacéutica*. España, 1982.
15. RAPOPORT, M. Novedades 2020 Clinical and Laboratory Standards Institute (Clsi). *Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos – INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” NOVEDADES*. 2020. P. 1-18.
16. SÁ, S., CHAUL, L.T., ALVES, V.F., FIUZA, T.S., TRESVENZOL, L.M.F., VAZ, B.G., FERRI, P.H., BORGES, L.L. y PAULA, J.R. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea]. 2018. Vol. 28, no. 3, p. 303-311. DOI 10.1016/j.bjp.2018.02.008. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.02.008>
17. BARRIOS RODRÍGUEZ, J.J. y YANQUEN PARRA, V.E. *Evaluación del efecto antioxidante de extracto de champa (Campomanesia lineatifolia) en albóndigas de bagre* [en línea]. 2018. Disponible en: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/183