

Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxylo* de Pamplona (Colombia)

Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Myrcianthes leucoxylo of Pamplona (Colombia)

Yáñez R. Xiomara^{1*}, Granados C. Clemente², Durán L. Marlene²

¹ Grupo en Productos Verdes (GPV), Universidad de Pamplona, Extensión Villa del Rosario, Vía Los Álamos, Autopista Internacional, Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.

² Docentes Ingeniería de Alimentos, Universidad de Cartagena. Grupos de Investigación: Ingeniería, Innovación, Calidad Alimentaria y Salud (INCAS) y Nutrición, Salud y Calidad Alimentarias (NUSCA).

Recibido 07 de Diciembre 2012; aceptado 3 de Enero 2013

RESUMEN

La familia Myrtaceae agrupa especies productoras de aceites esenciales, los cuales se han estudiado a nivel mundial, porque poseen comprobada actividad antibacteriana, entre ellas, *Melaleuca alternifolia* y *Eucalyptus globulus*. Por ello, se han venido investigando especies de esta familia, que son endémicas de la región oriental de Colombia. El aceite esencial de hojas secas de *Myrcianthes leucoxylo* (Ortega) Mc Vaugh recolectadas en Pamplona (Norte de Santander, Colombia) se obtuvo mediante destilación por arrastre con vapor de agua. Se determinaron el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas del aceite. La identificación de los componentes mayoritarios se hizo por Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR). La actividad antimicrobiana del aceite del arrayán se realizó por el método de dilución en caldo y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial. Los componentes mayoritarios del aceite fueron: α -Pino (28,40%), Eucaliptol o 1,8-Cineol (15,70%) y Z-Cariofileno (8,79%). La actividad in vitro del aceite fue evaluada mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) utilizando el método de macrodilución seriada realizada en caldo tripticasa de soja, frente a las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. El aceite fue activo frente a la cepa *S. aureus* ATCC 25923 con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 512 $\mu\text{g/mL}$ y no fue activo frente a *E. coli*.

Palabras clave: *Myrcianthes leucoxylo*, aceite esencial, composición química, actividad antibacteriana.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: xiomarayanez@unipamplona.edu.co

ABSTRACT

The Myrtaceae family has some species that produce essential oils of great interest because of his antibacterial activity (e.g. *Melaleuca alternifolia* y *Eucalyptus globulus*). We have researched some species growing in East Region of Colombia in the last years. The essential oil was obtained by steam distillation from the dried leaves of *Myrcianthes leucoxylla* collected in Pamplona (North of Santander, Colombia). Yield and physicochemical properties were measured. The identification of main components was determined by Gas Chromatography High Resolution (HRGC). The antimicrobial activity was performed by the method of broth dilution and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil was determined. The major components of the oil were: α -Pinene (28.40%), Eucaliptol o 1,8-Cineole (15.70%) y Z-Caryophyllene (8.79%). The oil was active against the strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with the MIC of 512 $\mu\text{g/mL}$ and the oil was not active against *E. coli*.

Keywords: *Myrcianthes leucoxylla*, oil essential, chemical composition, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con diversidad de ecosistemas y microclimas, lo cual hace que su vegetación sea muy variada, con la presencia de especies endémicas, entre las cuales se tienen algunas que poseen aceites esenciales con principios activos con potencial actividad biológica, de interés para la investigación y desarrollo de nuevos productos naturales. Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, en cosmética y en productos de aseo y para el hogar, así como también, para dar sabor y conservar una variedad de productos alimenticios (González, 2003). Las mirtáceas son una familia de árboles o arbustos perennifolios con importancia económica a nivel mundial, por abarcar plantas de interés, ya sea por sus frutos comestibles, como en el caso de la feijoa (*Brazilian guava*) y la guayaba (*Psidium guava*), o por la obtención de esencias, las cuales son usadas en perfumería o medicina, como en el caso del eucalipto y el TTO (Tea Tree Oil), éste último extraído de *Melaleuca alternifolia*, o por ser especies ornamentales, como el mirto (*Mirtus comunis*). En las últimas décadas, se ha

investigado el TTO por su actividad antimicrobiana, la cual es atribuida a la presencia de Terpinen-4-ol y α -Terpineol, aunque este último es minoritario en la composición del aceite. Otros componentes, que incluyen α -Pineno, β -Pineno y Linalol, facilitan la solubilidad en las membranas biológicas por sus grupos funcionales oxigenados. Otro aceite, el de eucalipto, que es usado como agente saborizante y conservante, según la Food Chemical Codex de Estados Unidos, debe contener no menos del 70% de 1,8-Cineol o Eucaliptol, para contrarrestar microorganismos patógenos (Yáñez y Cuadro, 2012). Actualmente, la tendencia de los consumidores se inclina a los alimentos libres de productos de síntesis y aditivos químicos (Bakkali, 2008), por lo que resulta interesante estudiar la composición química y la actividad antimicrobiana de extractos y aceites vegetales, que podrían ser usados como ingredientes naturales en la industria alimentaria (Vila, 2010). La especie *Myrcianthes leucoxylla* es un árbol endémico de nuestra región, el cual crece en los humedales, en las regiones boscosas y

generalmente bajo sombra. Se conoce comúnmente como “arrayán de clima frío” y se encuentra en la región andina, entre los 2000 y 3000 msnm. Puede alcanzar hasta 15 m de altura, presenta ramas densas y retorcidas, y posee un tallo de color rojizo, que es bastante escamoso. Las flores son blancas. El fruto es en baya, comestible, muy usado por el campesino para preparar jaleas, refrescos y vinos. Son coriáceas si están expuestas al sol y lanceoladas si están a la sombra, con un

agradable olor a guayaba. Esta especie se considera bioindicador de alta humedad atmosférica, lo cual también potencia su uso en la restauración de los ecosistemas nativos andinos (Colmenares, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación es evaluar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial *Myrcianthes leucoxylla* producido en Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del aceite esencial

Las hojas de la especie *Myrcianthes leucoxylla* (arrayán de clima frío) fueron recolectadas en Marzo de 2012, cerca al casco urbano de la ciudad de Pamplona, en Norte de Santander (Colombia), la especie fue identificada por el director del Herbario Regional Catatumbo-Sarare de la Universidad de Pamplona, Luis Roberto Sánchez Montaña, y posteriormente se sometieron a la operación de secado en bandeja durante 15 días. Las hojas secas se colocaron en un balón de 4 litros y se realizó la extracción del aceite en un equipo de destilación por arrastre con vapor de agua. El aceite se separó de la capa acuosa en un recipiente tipo Dean Stark, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Luego se determinó el rendimiento, la solubilidad en etanol, la densidad específica en picnómetro, el índice de refracción en refractómetro marca ABBE y la rotación óptica en un polarímetro.

Muestra para el análisis químico

Una alícuota de 30 μL del aceite se diluyó en 1 mL de Diclorometano y fue utilizada para determinar su composición química, en el equipo para Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR) HP6890 Series, en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network, conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2005. Se inyectó 1.0 μL de la muestra, modo split (10:1). Temperatura inyector 250°C. Columna capilar HP-5MS (30

m x 0.25 mm diámetro interno x 0.25 μm de espesor). Helio (Aga-Fano) como gas de arrastre, presión del gas 150 pKa, flujo constante de 1 ml/min y velocidad lineal de 36 cm/seg. Temperatura inicial 50°C. Temperatura de la cámara de ionización y línea de transferencia de 180 y 280°C, respectivamente. Energía de la fuente de electrones 70 eV. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron por Ionización Electrónica, barrido automático en el rango de masas m/z 50-550 u.m.a., a 2.4 scan/s. Para identificar los componentes se obtuvieron los índices de Kováts (IK) relativos a los patrones de alcanos C₈-C₃₂, y el análisis se realizó en un CGAR HP 6890A Series II con detector FID a 250°C. Flujos de aire y de hidrógeno para el detector FID de 300 y 30 mL/min. Cada EM fue comparado con los estándares de la base de datos y los datos reportados en la literatura (Adams, 2005).

Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana

La actividad *in vitro* del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxylla* (arrayán) fue evaluada mediante la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), utilizando el método de macrodilución seriada, realizada en caldo tripticasa de soja (Rota *et al.*, 2004), frente a las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. El ensayo consistió en adicionar las colonias a 5 mL de caldo de tripticasa de soja e incubar a 37°C por

2-5 horas hasta obtener una turbidez apreciable, la cual se ajustó a una concentración estándar de 0,5 de la escala de Mc Farland. Se preparó una solución madre de 1024 µg/ml del aceite esencial y a partir de ésta, se realizaron diluciones seriadas. 1 mL de cada una de estas diluciones fue inoculada con 1 mL de la suspensión bacteriana y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se realizó un

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se observan el rendimiento del aceite esencial (mL de aceite por cada 100 g de hojas), obtenido por destilación con arrastre de vapor de agua y las constantes físicoquímicas que fueron medidas. Los valores son un promedio de tres repeticiones. El rendimiento del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxylla* (arrayán) fue de 0.3% (p/v), encontrándose que es un valor bajo, si se tiene en cuenta que el resultado promedio, a nivel general, debe estar entre el 1 y el 3%.

Tabla 1
Rendimiento y propiedades físicas del aceite esencial obtenido de *Myrcianthes leucoxylla* (arrayán)

| ANÁLISIS | AE de <i>Myrcianthes leucoxylla</i> |
|---------------------------|-------------------------------------|
| Rendimiento del aceite | 0.3 % |
| Densidad específica 20°C | 0.92 g/ml |
| Índice de refracción 20°C | 1.4774 |
| Rotación óptica a 20°C | -6° a +4° |
| Solubilidad en etanol | Positiva |

n=3

Las propiedades físicas características, tales como, un olor intenso, ser líquido a temperatura ambiente, arrastrable por vapor de agua e insoluble en agua, color amarillo de pálido a intenso, densidad de 0.92 g/mL y el índice de refracción de 1.477, son similares a la mayoría de aceites esenciales (Biocomercio sostenible, 2003), entre ellos, al aceite esencial de otra especie de arrayán, *Luma chequen*, que aunque tuvo un rendimiento mayor del 1.25% (p/v), sus propiedades fueron: Rotación óptica, +6 a -8; densidad 0.90 g/mL e índice de refracción, 1.470 (Vallverdú *et al.*, 2006). De acuerdo con la tabla 2, del análisis del perfil

control positivo compuesto por 1 mL del inóculo y 1 mL de caldo tripticasa de soja. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Los resultados de cada ensayo se reportaron como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir, la menor concentración de aceite esencial que inhibió completamente el desarrollo bacteriano, detectado por la falta de turbidez del caldo en los tubos de ensayo.

cromatográfico del aceite de *M. leucoxylla* se lograron identificar 11 componentes mayoritarios, entre los que se encuentran, en concentraciones superiores al 3%, los monoterpenos α -Pineno (28,40 %) y Eucaliptol o 1,8-Cineol (15.70 %) y los sesquiterpenos Z-Cariofileno (8.79 %) y Espatulenol (3.30%).

Tabla 2
Componentes mayoritarios y concentración (%) del AE de *Myrcianthes leucoxylla* (arrayán)

| No. | t_R | Compuesto | IK Teór. ⁽¹⁾ | IK Exp. ⁽²⁾ | Conc. % ⁽³⁾ |
|-----|--------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 7.159 | α -Tuyeno | 924 | 927 | 1.60 |
| 2 | 7.355 | α -Pineno ⁽⁴⁾ | 939 | 935 | 28.40 |
| 3 | 8.916 | β -Mirceno | 990 | 991 | 1.71 |
| 4 | 9.889 | Eucaliptol | 1031 | 1033 | 15.70 |
| 5 | 19.797 | α -Cubebeno | 1345 | 1346 | 1.51 |
| 6 | 22.607 | Z-Cariofileno | 1408 | 1415 | 8.79 |
| 7 | 22.816 | β -Humuleno | 1436 | 1430 | 2.95 |
| 8 | 24.787 | (-)-Espatulenol | 1577 | 1575 | 3.30 |
| 9 | 24.929 | Óxido Cariofileno | 1583 | 1590 | 3.04 |
| 10 | 25.534 | Guaiol | 1600 | 1610 | 3.13 |

⁽¹⁾ Índice de Kováts teórico según: Adams, R. P. (2005).

⁽²⁾ Índice de Kováts experimental calculado por CGAR-FID en columna HP-5.

⁽³⁾ Concentración relativa, promedio de extracciones realizadas por triplicado.

⁽⁴⁾ Se confirmaron comparando con patrones puros.

Del aceite esencial de *Luma chequen* A. Gray (Molina) también se ha publicado un alto contenido de hidrocarburos monoterpénicos, entre ellos, α -Pineno (57.3%) y β -Pineno (6.2%), así como, hidrocarburos oxigenados, entre los que se destacan 1,8-Cineol o Eucaliptol (7.5%), Linalol (3.7%) y trans-Verbenol (2.2%) y los sesquiterpenos, β -Selineno (1.3%) y óxido de β -Cariofileno (0.9%) (Vallverdú *et al.*, 2006).

De acuerdo con la figura 1, la CMI del aceite esencial de *M. leucoxylla* (arrayán) fue de 512

$\mu\text{g/mL}$ frente a la bacteria Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, observándose leve actividad a concentraciones más bajas del aceite entre 256 y 56 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que el mismo aceite frente a la bacteria Gram (-) *Escherichia coli* ATCC 25922 mostró poca sensibilidad antibacteriana, según se observa en la Figura 2.

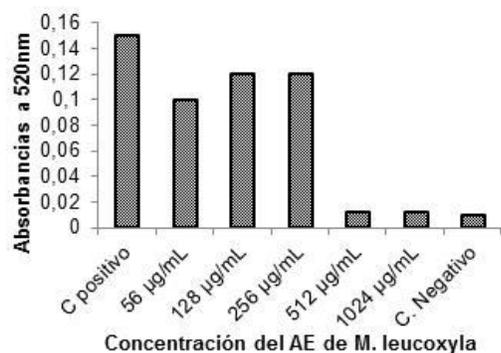


Figura 1. Absorbancias a las 24 horas de incubación del cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en presencia del aceite esencial de *M. leucoxylla*

La actividad observada contra la bacteria *S. aureus*, presenta similitud con estudios realizados con el aceite de otras mirtáceas, tales como *Myrcianthes pseudo-mato* (Demo, 2002) y guayabo (De Souza Prestes et al., 2011), los cuales mostraron amplio espectro contra bacterias Gram (+), así como el de *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) recolectado en Mérida (Venezuela), el cual presentó una CMI de 60 $\mu\text{g/mL}$ (Díaz, 2010), atribuyendo la actividad biológica a la presencia de los componentes mayoritarios: β -Cariofileno (21.9%) y α -Pinoeno (10.9%). De igual manera, estudios con *C. moritzianus*, recolectado en 5 regiones del Norte de Santander (Mojica et al., 2011); con *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* recolectados en Pamplona

CONCLUSIONES

El aceite de hojas secas de *Myrcianthes leucoxylla* (arrayán) recolectado en el municipio de Pamplona y extraído por el método arrastre con vapor de agua, presentó como principales

(Yañez y Cuadro, 2012), con *E. oleosa* (Rahimi-Nasrabadi et al., 2013) y con otras siete especies de mirtáceas de Brasil (Silva et al., 2010) determinaron que los componentes mayoritarios a los cuales se les podría atribuir gran influencia sobre la inhibición frente a los microorganismos estudiados, fueron entre otros componentes, al α -Pinoeno y el 1,8-Cineol o Eucaliptol.

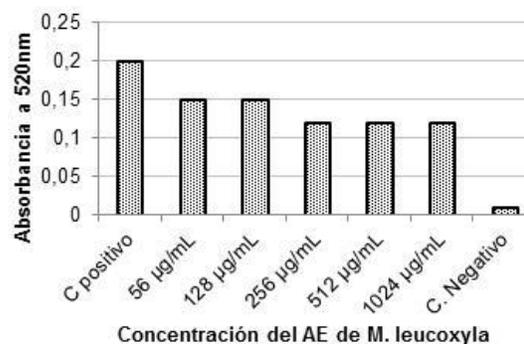


Figura 2. Absorbancias del cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 en presencia de las concentraciones de AE de *M. leucoxylla*

Está demostrado que estos compuestos actúan en sinergia con otros principios activos y que, la mayoría de las veces, el aceite total tiene una mayor actividad, que la mezcla de sus componentes principales, porque los componentes minoritarios también pueden ejercer una influencia potenciadora, la cual influye sobre la actividad antimicrobial. Se ha propuesto que los aceites son más activos frente a las bacterias Gram (+) que a las bacterias Gram (-), debido a que en aquellas no existe una cubierta de lipopolisacáridos que evite la difusión de los compuestos hidrofóbicos presentes en los aceites (Cristani et al., 2007).

compuestos identificados por CGAR, los monoterpenos α -Pinoeno (28.40%) y 1,8-Cineol o Eucaliptol (15.7%), junto a los sesquiterpenos Z-Cariofileno (8.79%) y Eudesmol (3.30%). En las condiciones del estudio, el aceite presentó actividad

antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* con una CMI de 512 µg/mL y no resultó activo

frente a *Escherichia coli*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, USA. 2005. 469p.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils. (2008). A review. *Food Chem.Toxicol*, 46:446–75.
- Biocomercio sostenible. Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt: Bogotá, Colombia. 2003. 109 p.
- Vallverdú C, et al. Composition of the essential oil from leaves and twigs Luma chequen. (2006). *Flavour and Fragrance J.* 21(2):241-43.
- Colmenares SL, Melgarejo LM, Romero HM. Ecophysiological studies of two andean forest contrasting species *Abatia parviflora* and *Myrcianthes leucoxylla* under Bogotá conditions, Colombia. (2011). *Braz. J. Plant Physiol*, 23(4):305-12.
- Cristani M, et al. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes, Implications for Their Antibacterial Activity. *Agric.* (2007). *Food Chemistry*, 55(15):6300–8.
- Demo MS, Oliva MM, Zunino MP, López ML, Zygadlo JA. Aromatic plants from Yungas. Part IV: Composition and antimicrobial activity of *Myrcianthes pseudo-mato* essential oil. (2002). *Pharmaceutical Biol.*, 40(7):481-4.
- De Souza Prestes L, et al. Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. (2011). *Rev. Cubana Plant Med*, 16(4):324-30.
- Díaz T, et al. Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) Burret from Mérida, Venezuela. *Nat. Products Communications*, (2008). 3(6):937-40.
- González DV. Los Productos Naturales No Maderables: Estado del arte de la investigación y otros aspectos. Bogotá: Biocomercio Sostenible, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; 2003. 120p.
- Mojica RD, Cajiao AM, Yáñez X. Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*. (2011). *Bistúa*, 9 (2):9-14.
- Rahimi-Nasrabadi M, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus oleosa*. (2013). *Int. J. Food Properties*, 16:1080-91.
- Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. (2004). *J. Food Prot.*, 67(6):1252-6.
- Silva C, et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. . (2010). *Quim. Nova*, 33(1):104-8.
- Vila R, et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. (2010). *Bioresource Technol*, 101:2510-14.
- Yáñez X, Cuadro OF. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). (2012). *Bistúa*, 10(1):52-61.

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS y la UNIVERSIDAD DE PAMPLONA por la financiación del Proyecto de Investigación, Código del proyecto 112134119361, Contrato 226 de Diciembre de 2006 y a la Universidad de Cartagena por la financiación de los ensayos microbiológicos.