

Artículo de investigación

<https://doi.org/10.33789/talentos.10.2.192>

Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de guayusa (*Ilex guayusa* L.) obtenidos mediante técnicas de alta presión y solventes polares

Antibacterial and antifungal activity of guayusa (*Ilex guayusa* L.) Extracts obtained by high pressure techniques using polar solvents



Santiago Esmiro Cadena Carrera

Universidad Técnica de Ambato, Ambato - Ecuador

sant_cadena@yahoo.com

Deise Parolo Tramontin

Instituto Federal Catarinense, Santa Catarina - Ecuador

Lorena de los Ángeles Núñez-Villacís

Universidad Técnica de Ambato, Ambato - Ecuador

Alexandre Bella-Cruz

Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina - Ecuador

Resumen: La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa unos de los problemas más importantes de salud mundial. En regiones en desarrollo, como América Latina, la RAM provoca miles de muertes cada año debido al bajo o limitado acceso a antibióticos y/o cuidado básico de salud. En esta región, la Amazonía alberga una gran biodiversidad que podría ser fuente para el descubrimiento de nuevas sustancias antimicrobianas que podrían ayudar a enfrentar la RAM. Entre las especies de esta región, la guayusa (*Ilex guayusa* L.) ha sido reportada como fuente de compuestos bioactivos. Sin embargo, los compuestos bioactivos obtenidos, han sido mediante la aplicación de técnicas convencionales, pocas investigaciones han aplicado técnicas no convencionales como extracción con fluido supercrítico (ESC) o extracción con líquido presurizado (ELP). En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de guayusa obtenidos mediante técnicas convencionales Soxhlet y maceración y comparándolas con técnicas no convencionales ESC y ELP aplicando solventes/cosolventes polares. Los solventes/cosolventes usados en las extracciones fueron: CO₂/agua, CO₂/etanol/agua, etanol/agua o agua. A partir de la evaluación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos, se evidenció la presencia de actividad antifúngica contra diferentes dermatofitos: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* en el rango 1.0 mg mL⁻¹ a 0.0625 mg mL⁻¹. El presente estudio demostró el potencial de los extractos de hojas de guayusa obtenidos mediante baja y alta presión para combatir problemas asociados a dermatofitos.
Palabras Clave: Actividad antifúngica, Técnicas no convencionales de extracción, *Ilex guayusa* L., Dermatofitos, Concentración inhibitoria mínima.

Abstract: Antimicrobial Resistance (AMR) represents one of the most challenging worldwide health problems. In developing countries, such as Latin America, ARM causes thousands of fatalities every year due to low access to antibiotics and/or basic health care. In this region, the Amazonian rainforest hosts a rich biodiversity which could be a source for discovery of new antimicrobial drugs which might help to combat ARM. Among the Amazonian rainforest species, guayusa (*Ilex guayusa* L.) has been reported as a source of bioactive compounds. However, the antimicrobial potential of guayusa's bioactive molecules present in extracts obtained have been obtained by conventional techniques, and non-convectional extraction techniques, such as supercritical fluid (SFE) and pressurized liquid (PLE) has been scarcely explored. Here, the antibacterial and antifungal activities of guayusa extracts obtained by conventional extraction techniques Soxhlet and maceration and compared with non-conventional techniques SFE and PLE, using polar solvents/cosolvent. The solvent/cosolvent used in extraction were CO₂/water, CO₂/ethanol/water, ethanol/water or water. The minimal inhibitory concentration (MIC) was evaluated for each extract and was found antifungal activity against dermatophytes: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* in the range of 1.0 mg mL⁻¹ a 0.0625 mg mL⁻¹. The present study demonstrates the potential of guayusa leaves extracts obtained by high- and low-pressure techniques to combat the problem associated to dermatophytes.

Keywords: Antifungal activity, Non-conventional extraction techniques, *Ilex guayusa* L., Dermatophytes, Minimal inhibitory concentration.

Citación sugerida: Cadena Carrera, S., Tramontin, D., Núñez-Villacis, L., & Bella-Cruz, A. (2023). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) obtenidos mediante técnicas de alta presión y solventes polares. *Revista de Investigación Talentos*, 10(2), 80-91. <https://doi.org/10.33789/talentos.10.2.192>

I. Introducción

Datos muestran que la resistencia antimicrobiana (RAM) representa un problema, especialmente en América Latina, pues provoca miles de muertes cada año debido al uso indiscriminado, mal uso de antibióticos, así como también debido al poco acceso a antibióticos y/o servicios de salud básicos. Según Aguilar et al. (2019) la RAM provocó 710000 muertes en América Latina en 2019; y el impacto económico de este problema, puede provocar una caída de 3.8 puntos en el PIB mundial para el 2030, de ahí la importancia en descubrir nuevas fuentes de antimicrobianos que permita enfrentar este problema (Aguilar et al., 2023; Banco mundial apud WHO, 2023).

La Amazonía alberga una gran biodiversidad que podría ser fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos para combatir la RAM. Entre las especies de la amazonia, destaca la guayusa (*Ilex guayusa* L.), que ha sido usada durante milenios por los indígenas nativos de la región, principalmente del sur de Colombia, Ecuador y el norte del Perú, por sus efectos benéficos y estimulantes (Dueñas et al., 2013).

El género *Ilex* ha sido ampliamente investigado, a nivel mundial, por sus propiedades benéficas y actividad biológica (Hao et al., 2013), y para el caso específico de la guayusa, se han reportado propiedades como: estimulante, antioxidante, anti-

obesidad, antiinflamatoria y antimicrobiana (Garcia-Ruiz et al., 2017; Hao et al., 2013; Jacques et al., 2007; Villacís-Chiriboga et al., 2018; Yi et al., 2016). El efecto antioxidante en esta especie puede estar asociada a la presencia de compuestos como: taninos, fenólicos, flavonoides, esteroides, entre otros (Garcia-Ruiz et al., 2017; Jara et al., 2013; Pardau, 2016; Villacís-Chiriboga et al., 2018). El efecto estimulante está asociado con la presencia de metilxantinas, principalmente cafeína, teobromina y teofilina (Cadena-Carrera, et al., 2019; Garcia-Ruiz et al., 2017; Villacís-Chiriboga et al., 2018; Yi et al., 2016).

Hasta ahora, sin embargo, las investigaciones existentes han evaluado la actividad antimicrobiana de extractos (brutos) de guayusa, aplicando métodos convencionales de extracción (Garcia-Ruiz et al., 2017; Ruiz & Roque, 2009; Villacís-Chiriboga et al., 2018), y muy pocos o casi ninguno aplicando técnicas no convencionales con solventes/cosolventes polares, como extracción supercrítica (ESC) o extracción con líquido presurizado (ELP). Las técnicas ESC y PLE representan una alternativa a las técnicas convencionales de extracción, pues usan solventes que pueden ser considerados ambientalmente amigables (Azmir et al., 2013; Diaz-Reinoso et al., 2006; Espinosa-Pardo et al., 2016; Gil-Chavez et al., 2013; Piantino et al., 2008; Rosa et al., 2009). La ESC con CO₂ como solvente tiene muchas propiedades positivas ampliamente reportadas en la literatura, como selectividad, no representa riesgo para el medio ambiente, permite la separación del extracto únicamente con la despresurización y no deja residuos

de solvente, sin embargo, el CO₂ como solvente presenta atributos apolares que limitan el campo de aplicación, pero este particular puede ser solventado mediante el uso de cosolventes polares como etanol o agua (Azmir et al., 2013; Diaz-Reinoso et al., 2006; Espinosa-Pardo et al., 2016; Gil-Chavez et al., 2013; Piantino et al., 2008; Rosa et al., 2009). Una alternativa a la ESC es la ELP, que permite incrementar las tasas de extracción, y, por lo tanto, reducir los tiempos de extracción y cantidad de solvente usado. Dependiendo del solvente usado, esta técnica también puede ser considerada amigable con el medio ambiente (Azmir et al., 2013; Gil-Chavez et al., 2013; Osorio-Tobón & Meireles, 2013). Sin embargo, pocas o casi ninguna investigación se han desarrollado para la obtención de extractos de guayusa y evaluación de actividad biológica aplicando técnicas de extracción no convencionales con solventes/cosolventes polares, como ESC o ELP (Cadena-Carrera, et al., 2019, Cadena-Carrera et al., 2023).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de hojas de guayusa obtenidos mediante la aplicación de técnicas no convencionales de extracción usando solventes polares.

II. Materiales y Métodos

Materiales

Reactivos

Etanol, acetato de etilo, éter fueron adquiridos de Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). El estándar de cafeína, los medios de cultivo para bacterias y hongos Mueller-Hinton Agar (MHA) y Sabouraud Dextrosa Agar 4 % (SDA), así como los compuestos antibacteriano y antifúngico ciprofloxacina y ketoconazol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Microrganismos

Cepas de microorganismos fueron obtenidos de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA), e aislados clínicos fueron proporcionados por el Centro de Referencia de Micología CEREMIC (C) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Rosario, Santa Fé, Argentina) y por el *Laboratory Control Lab* (CL) (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Fueron usadas las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 23858), así como las Gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 11775) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Se usaron las cepas de hongos *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934), *Epidermophyton floccosum* (C 114), *Microsporium canis* (C 112), *Microsporium gypseum* (C 115), *Rhizopus*

spp. (CL 35), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9972), y *Trichophyton rubrum* (C 137) y la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231).

Métodos

Extractos de Hojas de Guayusa

Las hojas fueron adquiridas de forma comercial de productores locales de la provincia del Napo, cantón Archidona y fueron lavadas, secas y molidas. Los extractos de hojas de guayusa fueron obtenidos mediante técnicas de alta y baja presión como se describe en Cadena-Carrera et al. (2019) y Cadena-Carrera et al. (2023). De forma resumida, se usaron técnicas convencionales o a baja presión: Soxhlet y maceración. Para estas extracciones se usaron 5g de hojas secas y 150 mL de solvente. Para Soxhlet se usaron una mezcla de etanol/agua (50-50% en peso) o agua, durante 6 h en ciclo continuo a la temperatura de ebullición del solvente. Para la maceración, se usaron hexano, acetato de etilo, etanol, mezcla de etanol/agua (50-50% en peso) o agua, colocados en vasos Becker, protegidos de la luz durante 94 h a temperatura ambiente. Para las técnicas no convencionales a alta presión ESC con cosolvente y ELP se usó mezcla de etanol/agua (50-50% en peso) o agua.

Las condiciones para la ESC con cosolvente fueron definidas mediante un diseño factorial completo 2^2 , las condiciones de temperatura seleccionadas fueron 45 y 75 °C y presión 15 y 25 MPa, el cosolvente fue etanol en una concentración de 7 % (en peso), según experimentos preliminares. El flujo másico

de CO₂ fue mantenido constante en 0.5 kg h⁻¹. Para la ELP se usó un diseño factorial completo 2^2 , considerando la influencia de la temperatura y el tipo de solvente, las condiciones de temperatura seleccionadas fueron 45 y 73 °C y solvente agua o etanol. Se usó una masa de 5 g de hojas de guayusa, con una relación entre masa de solvente y masa de muestra mantenida constante e igual a 20 kg de solvente por kg de hojas; la presión de extracción también fue mantenida constante en 10 MPa.

De los extractos obtenidos, el solvente/cosolvente fue removido en un evaporador rotativo, manteniendo una temperatura de evaporación de 40 °C para evitar degradación térmica, y un vacío entre 500 y 600 mm Hg. Posteriormente, los extractos fueron colocados en frascos ámbar y mantenidos en congelamiento a -10 °C hasta realizar los análisis.

Actividad Antimicrobiana

El inóculo fue preparado removiendo las células esporuladas de hongos/bacterias del tubo con agar con un asa microbiológica y suspendiéndolas en 10 mL de agua estéril. Las suspensiones de hongos fueron filtrados a través de una gasa para remover las hifas. Las suspensiones celulares fueron ajustadas para alcanzar una concentración final de 1×10^6 a 1×10^5 células mL⁻¹, comparado con el estándar de McFarland.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos fue determinada

mediante el método de dilución en agar según el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) con algunas modificaciones (Gasparetto et al., 2017).

Fueron preparadas diluciones seriadas de los extractos con concentraciones variando de 1.0 mg mL^{-1} a $0.062.5 \text{ mg mL}^{-1}$ y mezcladas con MHA para bacterias o SDA para hongos, y colocados en microtubos tipo tubo (1 mL).

Un volumen de la suspensión de inóculo de $1 \text{ } \mu\text{L}$ fue adicionado a cada microtubo, excepto para el control estéril. Los agentes antibacterianos y antifúngicos, ciprofloxacina y ketoconazol fueron adicionados en el ensayo como control positivo, y soluciones sin extracto como blanco. Cada ensayo fue repetido tres veces. Posterior a la adición del inóculo, las cepas fueron incubadas según las especificaciones para cada tipo, para bacterias $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h, para levaduras $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 - 48 h, y temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 5 a 15 días para hongos filamentosos. El crecimiento de los microorganismos fue verificado visualmente después de 24 h para las bacterias, 48 h para las levaduras, y según el tipo de hongo en el tiempo correspondiente, y la CIM fue definida como la menor concentración de extracto o compuesto que no presentó crecimiento visible del microorganismo después del periodo de incubación.

Como los resultados obtenidos para al CIM coincidieron y no presentaron desviación estándar, no fue usado análisis ANOVA.

III. Resultados y Discusión

En las Tablas I y II se muestra la actividad antimicrobiana para extractos de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* L.) evaluados mediante CIM.

Algunos extractos presentaron actividad antifúngica (Tabla I) contra dermatofitos *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. No fue detectada actividad contra las otras cepas de hongos (Tabla I) o bacterias evaluadas (Tabla II) hasta la concentración máxima evaluada ($\text{CIM} > 1.00 \text{ mg mL}^{-1}$).

Actividad antifúngica moderada ($\text{CIM} = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$) (Tabla I) fue obtenida contra *M. canis* and *T. rubrum* para extractos obtenidos con ELP usando etanol como solvente y contra *T. rubrum* para extractos obtenidos con ESC usando agua como cosolvente ($45 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 MPa). Algunos extractos presentaron baja actividad antifúngica ($\text{CIM} = 1.0 \text{ mg mL}^{-1}$) contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

Los resultados están en concordancia con los reportado por Cadena-Carrera et al. (2019) que describieron actividad antifúngica para extractos de guayusa usando ESC y etanol como cosolvente, así como con los resultados obtenidos por Ruiz & Roque (2009) que encontraron actividad antifúngica contra *Microsporum canis* para extractos obtenidos con agua/metanol como solvente a partir de

hojas de guayusa, esto sugiere que compuestos polares presentes en los extractos presentan actividad contra esas cepas de hongos. Sin embargo, en la presente investigación no fue detectada actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, aunque Ruiz & Roque (2009) sí detectaron actividad antimicrobiana contra esta cepa para extractos agua/metanol y metanol como solventes.

Al comparar la actividad biológica de otras especies *Ilex*, la actividad antifúngica obtenida en la presente investigación difiere de lo reportado para extractos obtenidos a partir de *Ilex paraguariensis* usando agua como solvente. Esos extractos presentaron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Helicobacter pylori* y *Malassezia furfur* (Hao et al., 2013; Yi et al., 2016).

Estas variaciones pueden ser atribuidas a las diferentes metodologías empleadas para la determinación de la actividad antimicrobiana. Por ejemplo, Ruiz & Roque (2009) usaron concentraciones de los extractos 25 veces más altas. También pueden atribuirse a los diferentes solventes y técnicas aplicadas en cada estudio, así como la región geográfica o tiempo de recolección de las muestras. Esto, debido a que los metabolitos secundarios presentes en los vegetales dependerán de las condiciones y/o estrés al que esté sometida la planta.

Con relación al solvente usado y/o técnica de extracción, el perfil químico obtenido será

diferente y afectará la actividad biológica, como lo expuesto por Ruiz & Roque (2009) que usaron metanol, y encontraron actividad biológica para cepas que en el presente estudio no fue encontrado, sin embargo, el presente estudio se enfocó en el uso de técnicas alternativas con solventes con características polares y que sean amigables con el medio ambiente, como es el caso del agua y el etanol. El perfil de extractos de guayusa usando solventes polares ha presentado elevadas concentraciones de polifenoles y cafeína (Cadena-Carrera et al., 2019; Cadena-Carrera et al., 2023), la cafeína es la responsable del efecto estimulante de la guayusa, y adicionalmente en el presente estudio, presentó actividad antifúngica contra *A. fumigatus*, *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *C. albicans*, sin embargo, no fue detectada actividad antibacteriana.

Es importante resaltar que en el presente estudio se usaron extractos brutos, y no componentes aislados de los extractos, en estas condiciones se debe considerar que se pueden producir efectos sinérgicos o antagónicos entre los diferentes componentes presentes en los extractos, y de esta manera afectar la actividad biológica de los mismos.

Tabla I

Concentración inhibitoria mínima CIM (mg mL⁻¹) contra hongos para extractos de guayusa

Técnica de extracción		Solvente/ Cosolvente	P [MPa]	T [°C]	<i>A. fumigatus</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. rhizopus</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. albicans</i>
Baja presión	Soxhlet	Etanol/Agua	0.1	73	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0	1.0	0.5	> 1.0
		Agua	0.1	79	> 1.0	> 1.0	1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
	Maceración	Hexano	0.1	18	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
		Acetato de etilo	0.1	18	> 1.0	> 1.0	0.5	0.5	> 1.0	0.5	1.0	> 1.0
		Etanol	0.1	18	> 1.0	> 1.0	1.0	> 1.0	> 1.0	0.5	1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	0.1	18	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0	0.5	1.0	> 1.0
		Agua	0.1	18	> 1.0	> 1.0	1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
Alta presión	ESC	CO ₂ /Agua	15	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	0.5	> 1.0
		CO ₂ /Agua	25	45	> 1.0	> 1.0	1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
		CO ₂ /Agua	15	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
		CO ₂ /Agua	25	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	> 1.0
		CO ₂ /Etanol/Agua	20	60	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
	ELP	Etanol	10	45	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0	1.0	0.25	> 1.0
		Etanol	10	60	> 1.0	> 1.0	0.5	1.0	> 1.0	> 1.0	0.5	> 1.0
		Etanol	10	75	> 1.0	> 1.0	0.5	1.0	> 1.0	> 1.0	0.5	> 1.0
		Etanol/Agua	10	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	10	60	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	10	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Agua	10	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	1.0	> 1.0
		Agua	10	60	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Agua	10	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Cafeína			1.0	0.5	0.25	0.5	> 1.0	0.5	-	1.0
		Ketoconazol			0.008	0.00005	0.008	0.006	0.008	0.008	0.004	0.007

Tabla II

Concentración inhibitoria mínima CIM (mg mL⁻¹) contra bacterias para extractos de guayusa

Técnica extracción		Solvente/Cosolvente	P [MPa]	T [°C]	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Baja presión	Soxhlet	Etanol/Agua	0.1	73	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Agua	0.1	79	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
	Maceración	Hexano	0.1	18	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Acetato Etilo	0.1	18	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol	0.1	18	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	0.1	18	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
	Agua	0.1	18	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0	
Alta presión	ESC	CO ₂ /Agua	15	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		CO ₂ /Agua	25	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		CO ₂ /Agua	15	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		CO ₂ /Agua	25	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		CO ₂ /Etanol/ Agua	20	60	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
	ELP	Etanol	10	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol	10	60	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol	10	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	10	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	10	60	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Etanol/Agua	10	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Agua	10	45	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Agua	10	60	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
		Agua	10	75	> 1.0	> 1.0	> 1.0	> 1.0
	Cafeína			-	> 1.0	> 1.0	> 1.0	
	Ciprofloxacina			0.00025	0.00025	0.000015	0.0005	

IV. Conclusiones

Se evidenció que extractos obtenidos a partir de hojas de guayusa aplicando técnicas de alta presión ESC y ELP con solventes polares, presentaron actividad antifúngica contra dermatofitos *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Estos resultados pueden indicar el potencial de investigaciones con el objetivo de aislar o concentrar fracciones de compuestos con potencial actividad antimicrobiana.

V. Agradecimientos

Los autores expresan agradecimientos a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT), por el apoyo económico y beca; a YURAKUNA *Food Research Centre*, Quito-Ecuador; Laboratorio de Termodinámica y Extracción por Fluido Supercrítico LATESC y al Centro de Análisis Químico, del Departamento de Química e Ingeniería en Alimentos, de la Universidad Federal de Santa Catarina UFSC - Brasil.

VI. Referencias Bibliográficas

- Aguilar, G. R., Swetschinski, L. R., Weaver, N. D., Ikuta, K. S., Mestrovic, T., Gray, A. P., Chung, E., Wool, E. E., Han, C., Hayoon, A. G., Araki, D. T., Abdollahi, A., Abu-Zaid, A., Adnan, M., Agarwal, R., Dehkordi, J. A., Aravkin, A. Y., Areda, D., Azzam, A. Y., ... Naghavi, M. (2023). The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Regional Health - Americas*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100561>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D., Bella-Cruz, A., Bella-Cruz, R., Miguel, J., & Hense, H. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes .) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *The journal of supercritical fluids*, 152, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>

- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D., Jacques, R., Scapin, E., Müller, J. M., & Hense, H. (2023). Green-based methods to obtain bioactive compounds from *Ilex guayusa* L. using polar solvent. *Natural Product Research*, 37(18). <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2140802>
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard — Eighth Edition, 29–320 (2009).
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajo, J. (2006). Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2441–2469. <https://doi.org/10.1021/jf052858j>
- Dueñas, J., Logan, E., Stimola, M., Montagnini, F., Humanate, A., & Melican, N. (2013). Runa Guayusa – Desarrollo de un sistema de cultivo agroforestal de *Ilex guayusa* L. *Primer Encuentro de Bosques, Recursos Genéticos Forestales y Agroforestería*, 269–277.
- Espinosa-Pardo, F. A., Mayumi, V., Alves, G., Alves, J., & Martínez, J. (2016). Food and Bioproducts Processing Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents. *Food and Bioproducts Processing*, 101, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.002>
- García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez-González, A., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A., Moreno, D. A., & Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of Science Food Agriculture*, 97(12), 3929–3936. <https://doi.org/10.1002/j>
- Gasparetto, A., Bella-Cruz, A., Wagner, T., Bonomini, T. J., Correa, R., & Malheiros, A. (2017). mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. *Industrial Crops & Products*, 95, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.030>
- Gil-Chavez, G. J., Villa, A., Ayala-Zavala, J. F., Heredia, J. B., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(Harvey 2008), 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- Hao, D., Gu, X., Xiao, P., Liang, Z., Xu, L., & Peng, Y. (2013). Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources.

- Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(1), 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.12.008>
- Jacques, R. A., Santos, J. G., Dariva, C., Oliveira, J. V., & Caramão, E. B. (2007). GC / MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. *J. of Supercritical Fluids*, 40, 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.07.023>
- Jara, A., Rodriguez, Y., Cornejo, J., Cazar, M. E., Gutierrez, M., & Astudillo, L. (2013). Antioxidant activity and total phenolics of plants used in traditional medicine in Ecuador. *The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, 1–30. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-17-b001>
- Osorio-tobón, J. F., & Meireles, M. A. A. (2013). Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction : Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. *Food and Public Health*, 3(6), 289–303. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20130306.05>
- Pardau, M. (2016). *Antioxidant and anti-inflammatory properties of Ilex guayusa tea preparations : a comparison to Camellia sinensis teas*. (Dissertation) University of Pretoria.
- Piantino, C. R., Aquino, F. W. B., Follegatti-Romero, L. A., & Cabral, F. A. (2008). Extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.07.012>
- Rosa, P. T. V., Parajó, J. C., Domínguez, H., Moure, A., Díaz-Reinoso, B., Smith Jr., R. L., Toyomizu, M., Florusse, L. J., Peters, C. J., Goto, M., Lucas, S., & Meireles, M. A. A. (2009). *Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to the Food Industry*. In M. A. A. Meireles (Ed.), *Extracting Bioactive Compounds for Food Products Theory and Applications* (pp. 269–402). CRC Press.
- Ruiz, J., & Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación*, 12(1), 41–47.
- Villacís-Chiriboga, J., García-Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D. A., Meléndez-Martínez, A., Stinco, C., Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Ortiz-Ulloa, J., & Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and. *Journal of Science Food Agriculture*, 98, 1927–1934. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8675>
- World Health Organization WHO. (2023). *Antimicrobial resistance*. available

in <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=The%20misuse%20and%20overuse%20of,and%20at%20all%20income%20levels.>

Yi, F., Zhao, X., Peng, Y., & Xiao, P. (2016). Genus *Ilex* L.: Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Pharmacology. *Chinese Herbal Medicines*, 8(3), 209–230. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(16\)60044-8](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(16)60044-8)

Recibido: 7 de diciembre, 2023

Revisado: 18 de diciembre, 2023

Aceptado: 29 de diciembre, 2023