

Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) contra bacterias asociadas a la mastitis bovina (*in vitro*).

Antibacterial activity of guava leaves (*Psidium guajava*) hydroalcoholic extract against bacteria associated with bovine mastitis (*in vitro*).

Tonatiuh Gil Monterros^a, Nallely Rivero-Pérez^a, Ana Lizet Morales-Ubaldo^a, Yesica Anayanci Morales-Ubaldo^a, José Esteban Aparicio-Burgos^b, Adrián Zaragoza Bastida^{a*}

Abstract:

Bovine mastitis of bacterial origin remains one of the major challenges for the global dairy industry, and the inappropriate use of antibacterial agents has contributed to the emergence of multidrug-resistant bacteria. In this context, plant-derived extracts have emerged as a promising alternative for the prevention and management of this disease. The aim of the present study was to evaluate the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *Psidium guajava* leaves against bacteria associated with bovine mastitis, using standardized microbiological methods, including agar diffusion. The hydroalcoholic extract was obtained by maceration, and its antibacterial activity was assessed using the disk diffusion method. The results demonstrated a dose-dependent inhibitory effect, with higher activity against Gram-positive bacteria. The hydroalcoholic extract of *Psidium guajava* exhibited a significant, dose-dependent inhibitory effect against *Staphylococcus* spp. associated with bovine mastitis, highlighting its potential as a natural alternative, although further studies are required to assess its safety and mechanism of action.

Keywords:

Psidium guajava, hydroalcoholic extract, antibacterial activity, bovine mastitis

Resumen:

La mastitis bovina de origen bacteriano es uno de los principales desafíos para la producción lechera a nivel mundial, y el uso inadecuado de agentes antimicrobianos ha favorecido la aparición de cepas multirresistentes. En este contexto, los extractos vegetales han sido estudiados como posibles alternativas terapéuticas frente a patógenos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* contra bacterias asociadas a la mastitis bovina mediante técnicas *in vitro* estandarizadas. El extracto se obtuvo mediante la técnica de maceración hidroalcohólica y su actividad antibacteriana se determinó mediante el ensayo de difusión en disco. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio dosis-dependiente, con actividad antibacteriana únicamente frente a cepas del género *Staphylococcus* spp. Los resultados demuestran el potencial antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* frente a bacterias grampositivas. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para caracterizar su composición fitoquímica y profundizar en su mecanismo de acción antes de considerar aplicaciones en modelos *in vivo*.

Palabras Clave:

Psidium guajava, extracto hidroalcohólico, actividad antibacteriana, mastitis bovina

^aUniversidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero-Hidalgo, México, Tonatiuh Gil Monterrosa, <https://orcid.org/0009-0000-8458-5752>, Email:gi435315@uaeh.edu.mx, Nallely Rivero-Pérez, <https://orcid.org/0000-0002-6154-9983>, Email:nallely_rivero@uaeh.edu.mx, Ana Lizet Morales-Ubaldo, <https://orcid.org/0000-0001-9542-8242>, Email:ubaldolizet8@gmail.com, Yesica Anayanci Morales-Ubaldo, <https://orcid.org/0000-0002-0756-3514>, Email:mo319517@uaeh.edu.mx, *Adrian Zaragoza Bastida, <https://orcid.org/0000-0002-8537-5025>, Email:adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx.

^bUniversidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Escuela Superior de Apan, Apan-Hidalgo, México, José Esteban Aparicio-Burgos, <https://orcid.org/0000-0002-7611-7825>, Email:jose_aparicio@uaeh.edu.mx.

1. Introducción

En medicina veterinaria, la mastitis bovina representa uno de los principales desafíos sanitarios que afectan a la industria lechera a nivel mundial. Esta enfermedad, caracterizada por la inflamación del tejido mamario, se asocia comúnmente con infecciones bacterianas que reducen la productividad del hato y afectan la calidad de la leche, lo anterior se asocia directamente a pérdidas económicas significativas [1]. Aunado a lo anterior, repercute negativamente en el bienestar animal y en la sostenibilidad de los sistemas de producción [2].

El tratamiento convencional de la mastitis se basa en el uso de antimicrobianos sintéticos; sin embargo, su uso excesivo ha favorecido el desarrollo de la resistencia a los antibacterianos, lo que dificulta el control efectivo de la enfermedad y representa un riesgo para la salud pública [3]. En este contexto, se ha propuesto el uso de terapias alternativas sostenibles, inocuas y respetuosas con el medio ambiente, como los extractos vegetales con propiedades antimicrobianas.

Las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional; se ha documentado su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana, especialmente en extractos hidroalcohólicos [4,5]. Estudios como el de Ramírez y colaboradores, así como el de Hernández-Pérez y colaboradores, confirman que el extracto hidroalcohólico de hojas de guayaba puede inhibir el crecimiento de diversos patógenos incluyendo bacterias de importancia en medicina veterinaria [6,7].

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* frente a bacterias asociadas a la mastitis bovina mediante técnicas microbiológicas estandarizadas (in vitro), a fin de proponerlo como candidato para la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

2. Método

2.1. Colecta

Se recolectaron hojas de *Psidium guajava* en el municipio de Ixtapan del Oro, Estado de México, México (19°15'41"N 100°15'46"O).

Para la identificación de la planta se consultó el herbario de la Universidad Nacional Autónoma de

México (UNAM), y se verificó que la planta correspondiera a *P. guajava* (IBUNAM: MEXU: 818928).

2.2. Obtención del extracto

La obtención del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* (EHA-Pg) se realizó según la metodología reportada por Rivero-Pérez y colaboradores [8]. El material colectado se secó a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se maceraron 1000 g del material seco en una solución hidroalcohólica (60:40, agua:etanol) durante 24 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo de maceración, el extracto líquido se filtró con papel filtro (Whatman® 42) y con algodón, con la finalidad de eliminar la mayor parte posible del material vegetal. El líquido residual obtenido fue concentrado a presión reducida en un rotavapor a 45–50 °C (Büchi R-300); el extracto resultante se conservó en refrigeración hasta su evaluación.

2.3. Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus*⁶⁵³⁸ y *Escherichia coli*³⁵²¹⁸ de la colección americana de cultivos tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) y aislamientos clínicos multirresistentes de *S. aureus*⁰¹, *S. chromogenes*, *E. coli*⁰¹ y *Pseudomonas aeruginosa* aislados de casos clínicos de mastitis pertenecientes al laboratorio de bacteriología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

2.4. Actividad antibacteriana

Para determinar la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en disco en agar Müller–Hinton (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), de acuerdo con la metodología descrita por Rangel-López et al. [9], se agregaron 100 µL de una solución bacteriana previamente ajustada al 0.5 del patrón de turbidez McFarland (Remel, R20421, Lenexa, KS, USA) de cada una de las cepas bacterianas, procurando distribuir uniformemente la muestra.

Una vez inoculadas, cada una de las placas de Petri se dejó secar durante aproximadamente 15 minutos en completa esterilidad. Transcurrido el periodo, se colocaron los discos de papel filtro impregnados con las concentraciones a evaluar: 400 mg/mL, 200 mg/mL y 100 mg/mL de EHA-Pg. Como control positivo, se utilizó levofloxacino (10 µg/mL), y como control negativo, agua destilada. Las

concentraciones y los controles se evaluaron en cuádruple.

Las cepas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se midieron los halos de inhibición y se compararon con las medidas establecidas por el CLSI (2012) [10].

La sensibilidad bacteriana se clasificó de la siguiente manera: no sensible (menor de 8 mm), sensible (de 8 a 14 mm), muy sensible (de 14 a 20 mm) y extremadamente sensible (mayor de 20 mm) [11].

3. Análisis estadístico

Los resultados de la actividad antibacteriana se normalizaron (log10) y se analizaron mediante un diseño completamente al azar (ANOVA). Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante un análisis estadístico de comparación por Tukey con un nivel de significancia del 95% (P=0.05), se determinó el efecto y la tendencia del tratamiento mediante un análisis de polinomios ortogonales. Los análisis se realizaron con el programa SAS, versión 9.0.

4. Resultados.

Los resultados indican variación en la actividad antibacteriana del EHA-Pg con diferencias en las concentraciones y las cepas evaluadas ($p < 0.0001$). Las cepas Gram positivas fueron altamente sensibles a 400 mg/mL de EHA-Pg. *S. chromogenes* presentó la mayor zona de inhibición (17.75 mm), seguida por *S. aureus*⁶⁵³⁸ (16.00 mm) y *S. aureus*⁰¹ (15.25 mm), a 200 mg/mL las cepas de *S. chromogenes* y *S. aureus*⁰¹ se mantuvieron como muy sensibles al EHA-Pg y *S. aureus*⁶⁵³⁸ a esta concentración únicamente fue sensible coincidiendo con los resultados de la concentración de 100 mg/mL con las tres cepas evaluadas. Con respecto a las cepas Gram negativas, no se determinaron halos de inhibición a las concentraciones evaluadas (Tabla 1).

El análisis mediante polinomios ortogonales mostró que la concentración del EHA-Pg ejerce un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición en las bacterias Gram positivas evaluadas en la presente investigación. El modelo ajustado, que incorpora los componentes lineal y cuadrático de la concentración, explicó el 79 % de la variabilidad total de la respuesta ($R^2 = 0.79$), lo que indica un ajuste sólido y una relación bien representada por el modelo. Asimismo, el contraste fue estadísticamente significativo ($p < 0.0001$), confirmando que la concentración influye de forma importante en el tamaño del halo de inhibición

Tabla 1. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* a diferentes concentraciones (400 mg, 200 mg y 100 mg) contra diferentes bacterias asociadas a mastitis.

Cepas	EHA-Pg (mg/mL)			Levofloxacino (µg/mL)
	400	200	100	10
<i>S. aureus</i> ⁶⁵³⁸	16.00±1.4 Ab	12.50±1.2 Bb	10.00±0.81 Ca	9±1.41
<i>S. aureus</i> ⁰¹	15.25±0.5 Ab	14.75±0.9 Aa	10.50±0.57 Ba	11±0.81
<i>S. chromogenes</i>	17.75±0.9 Aa	14.75±0.9 Ba	8.50±1.29 ^C b	9±1.41
<i>E. coli</i> ³⁵²¹⁸	0.00	0.00	0.00	16.75±1.5
<i>E. coli</i> ⁰¹	0.00	0.00	0.00	14.5±0.57
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	30±2.44
Valor de P	0.0001			

A,B,C diferentes literales en mayúsculas indican diferencias significativas entre concentraciones; a,b,c. diferentes literales en minúsculas indican diferencias significativas entre las cepas evaluadas.

Al descomponer el efecto del factor cuantitativo mediante polinomios ortogonales, se observó un efecto lineal altamente significativo ($p < 0.0001$). Esto indica que, a medida que la concentración aumenta, el halo de inhibición tiende a incrementarse de manera consistente. En contraste, el efecto cuadrático no fue significativo ($p = 0.0630$), sin embargo, se observó que la curvatura muestra una ligera tendencia a la no linealidad en la respuesta.

El modelo confirma una relación positiva y esencialmente lineal entre la concentración del extracto y la magnitud del halo de inhibición.

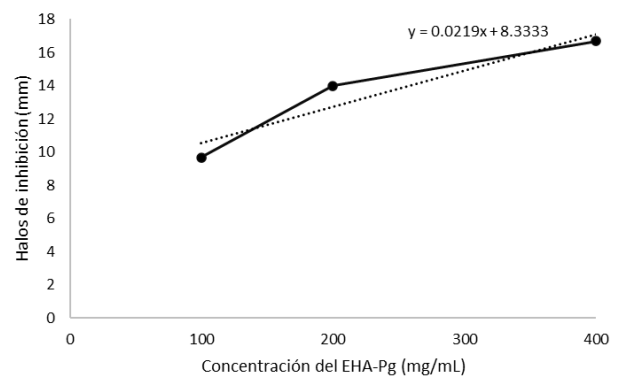


Figura 1. Promedio de los halos de inhibición generados por las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* sobre las tres cepas Gram positivas evaluadas.

5. Discusión

Diversos estudios han documentado la actividad antibacteriana de *Psidium guajava* frente a patógenos asociados a mastitis bovina, particularmente sobre bacterias Gram positivas. Liu et al. [12] reportaron que extractos acuosos, etanólicos y de acetona de hojas de *P. guajava* presentan una elevada actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, mientras que se observó menor actividad frente a *E. coli*, con valores de concentración mínima inhibitoria entre 39 y 125 µg/mL [12]. De manera consistente, en el presente estudio se observó una mayor inhibición sobre bacterias Gram positivas, incluyendo *S. aureus* y *S. chromogenes*, mientras que las cepas Gram negativas, no mostraron sensibilidad a las concentraciones evaluadas.

Efectos antibacterianos comparables han sido reportados para extractos hidroalcohólicos de *P. guajava* con halos de inhibición de 21 ± 3.2 mm contra *S. aureus* y de 15 ± 2.3 mm frente a *Streptococcus* spp. [13]. Asimismo, investigaciones realizadas en Perú señalaron que extractos etanólicos de hojas de guayaba a una concentración del 30 % fueron efectivos frente a *S. agalactiae*, pero no mostraron actividad frente a *E. coli*, patrón consistente con los resultados del presente estudio [14].

Como se mencionó anteriormente, en este estudio se evaluaron cepas aisladas de casos clínicos, que fueron clasificadas como multirresistentes. En este contexto, los resultados sugieren que el EHA-Pg conserva su actividad inhibitoria incluso frente a cepas con perfiles de multirresistencia a antibacterianos. Esto concuerda con lo reportado por Gutiérrez-Montiel et al. [15], quienes describieron un efecto inhibitorio significativo frente a cepas extensamente resistentes a antibacterianos (XDR, por sus siglas en inglés) de *Acinetobacter baumannii*, así como una reducción de la CMI al combinar el extracto con gentamicina, si bien los mecanismos específicos de resistencia o las interacciones sinérgicas no se evaluaron en el presente estudio, estos hallazgos respaldan el potencial antibacteriano del extracto.

La actividad antibacteriana de los extractos de *P. guajava* se ha atribuido principalmente a su composición fitoquímica. Al-Rimawi et al [16] identificaron compuestos fenólicos como ácido gálico, catequina, ácido cafeico, rutina y ácido clorogénico, compuestos ampliamente asociados con actividad antibacteriana. Estos compuestos pueden actuar mediante la desestabilización de membrana citoplasmática, provocando daño estructural y lisis celular, lo que podría explicar la

inhibición del crecimiento bacteriano observada en este estudio [17].

Las diferencias en la actividad antibacteriana reportadas entre estudios pueden estar influenciadas por factores como sitio de colecta, la época de muestreo, la variedad de *P. guajava*, el método de extracción de metabolitos y sobre todo la susceptibilidad específica de las cepas bacterianas evaluadas [13,18]. Adicionalmente, la falta de una caracterización química detallada, estudios de citotoxicidad y análisis mecanísticos específicos son una limitante en el presente estudio, evidenciando la necesidad de investigaciones adicionales previo a su aplicación clínica.

6. Conclusión

Los resultados evidencian el potencial antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* contra bacterias Gram positivas; sin embargo, se requieren estudios adicionales que permitan caracterizar su metabolitos secundarios, evaluar su seguridad biológica y profundizar en su mecanismo de acción antes de considerar aplicaciones en modelos in vivo.

7. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por el apoyo brindado para la realizar la presente investigación.

8. Conflicto de intereses

Lo autores no tienen conflicto de intereses

8. Referencias

- [1] Pineda-Burgos BC, Catalán Nájera JC, Espinosa-Rodríguez M, Sabino López JE, Vázquez Villamar M. El impacto económico de la mastitis bovina en México. Rev. Bio. Agr. Tux 2024; 12(1):51-60. <https://revistabioagro.mx/index.php/revista/article/view/539>
- [2] Martínez GM, Suárez VH, Ghezzi MD. Bienestar animal en bovinos de leche: selección de indicadores vinculados a la salud y producción. RIA. Rev. Investig. agropecu 2016; 42(2):153-60. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142016000200007&lng=es&tlng=es
- [3] Martínez-Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. EnferM. Infec. Microbiol. Clín 2010; 28:4-9. [10.1016/S0213-005X\(10\)70035-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70035-5)
- [4] Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J. Ethnopharmacol 2008; 117(1): 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.025>
- [5] Chechani B, Roat P, Hada S, Yadav DK, Kumari N. *Psidium guajava*: An Insight into Ethnomedicinal

- Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. Comb Chem High Throughput Screen. 2024;27(1):2-39. <https://doi.org/10.2174/1386207326666230426093315>
- [6] Mendoza C de J, Gutiérrez Olvera L, Alfonseca Silva E, Gracia Mora J, Tapia-Pérez G, Sumano López HS, Sanchez Portilla Z. Antibacterial activity of plant extracts obtained by two methods against pathogens of clinical importance in veterinary medicine. Vet Mex OA 2025;12. <https://veterinariamexico.fmvz.unam.mx/index.php/vet/article/view/1466>
- [7] Silva-Vega M, Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Gallegos-Flores P, Meza-López C, Valladares-Carranza B, Echavarría-Chaires F. Caracterización química de extracto alcohólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) y su efecto como inhibidor de movilidad para *Escherichia coli* O157: H7. Abanico Vet 2020;10. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.26>
- [8] Rivero-Perez N, Hernández-Alvarado JL, Valladares-Carranza B, Delgadillo-Ruiz L, Ojeda-Ramírez D, Sosa-Gutiérrez CG, Morales-Ubaldo AL, Vega-Sánchez V, Zaragoza-Bastida A. *Salix babylonica* L. as a Natural Anticoccidial Alternative in Growing Rabbits. Evid. Based. Complement. Alternat. Med 2019; 2019: 2107231. <https://doi.org/10.1155/2019/2107231>
- [9] Rangel-López L, Zaragoza-Bastida A, Valladares-Carranza B, Peláez-Acero A, Sosa-Gutiérrez CG, Hetta HF, Batiha GE-S, Alqahtani A, Rivero-Perez N. *In Vitro* Antibacterial Potential of *Salix babylonica* Extract against Bacteria that Affect *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis* spp. Animals 2020; 10(8):1340. <https://doi.org/10.3390/ani10081340>
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (Approved Standards; CLSI document M7-A5). CLSI 2012.
- [11] Imane NI, Fouzia H, Azzahra LF, Ahmed E, Ismail G, Idrissa D, Nouredine B. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. EuJIM 2020; 35: 101074. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101074>
- [12] Liu C, De Araújo JC. Ethnobotany, phytochemistry, and biological activities of *Psidium guajava*. Front Pharmacol 2024; 15: 1459066. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1459066>
- [13] Durand-Chávez GL. Efecto del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el Alto Hualлага. Universidad Nacional Agraria de la Selva 2009. <https://www.sidalc.net/search/Record/dig-unas-pe-20.500.14292-892/Description>
- [14] Tuesta Panduro RI. Extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.) en el tratamiento de la mastitis subclínica en Naranjillo. Universidad Nacional Agraria de la Selva 2011. <https://hdl.handle.net/20.500.14292/773>
- [15] Gutierrez-Montiel D, Guerrero-Barrera AL, Ramírez-Castillo FY, Galindo-Guerrero F, Ornelas-García IG, Chávez-Vela N A, de O. Costa M, Avelar-Gonzalez FJ, Moreno-Flores AC, Vazquez-Pedroza E, Arreola-Guerra JM, González-Gámez M. Guava Leaf Extract Exhibits Antimicrobial Activity in Extensively Drug-Resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii*. Molecules 2025; 30(1):70 <https://doi.org/10.3390/molecules30010070>
- [16] Al-Rimawi F, Imtara H, Abbadi J. Evaluation of antimicrobial efficacy of *Psidium guajava* L. leaf extract in ketoconazole shampoo. *Sci Rep* 2025. 15: 39460. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-22965-5>
- [17] Olatunde A, Shrestha K. Phytochemical constituent and antimicrobial properties of guava (*Psidium guajava*) collected from Nepal. *Clin. Phytosci* 2021; 7(31). <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00268-2>
- [18] Martínez MJ, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1917; 2(1): 12–14.

Recuperado de https://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847961997000100003&script=sci_arttext