



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
TRABAJO DE GRADO



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *FLACOURTIA INDICA* (BURM. F.)
FLACOURTIACEAE

www.bdigital.ula.ve

Autora: Eily Morillo

Tutora: Dra. María E. Lucena

Mérida, febrero 2016



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS
TRABAJO DE GRADO II



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *FLACOURTIA INDICA* (BURM. F.)
FLACOURTIACEAE**

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

Autora: Eily Morillo

Tutora: Dra. María E. Lucena

Mérida, Febrero de 2016

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA:

A MI ABUELO QUE SIEMPRE ME DECIA
PORTESE PARA QUE FIGURE, DEDICO
ESTE TRIUNFO. SE QUE LO COMPARTES
CONMIGO DESDE EL CIELO.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por el don de la vida, y por permitirme lograr esta
anhelada meta.

A mis padres, por su dedicación, amor, confianza este triunfo siempre será
de ustedes mil gracias, Los amo.

A mi hermano Jorge David, quien siempre ha sido mi motivo de inspiración
para seguir adelante y lograr todas mis metas. Gracias por el apoyo
incondicional.

A mis primos (as) que con su inocencia y ternura siempre me dieron un
aliento para no darme por vencida. Que este triunfo sea de ejemplo para que
luchen por sus metas.

A mis abuelos, quienes siempre tuvieron un consejo para no flaquear
gracias. Son parte importante de este triunfo.

A mis tíos, por su confianza en que fuese el ejemplo de los más chicos. Lo
hemos logrado, Gracias.

A los maravillosos amigos que me regalo la universidad de los andes: Heidy,
Celeste, Edymar, Fiore, Diegris, Sarahy, Milagros, Geraldine, Johana, Rafael,
Juvencio, Katherine, Eleazar, Anmary, Isamar, Vanesa, Jesus. Sin ustedes
este recorrido no habría sido tan maravilloso y divertido. Gracias por tanto.

A mi licenciada Favorita Nathaly Andrade, con quien compartí y desarrolle
gran parte de este trabajo

Al personal bibliotecario, por su carisma, dedicación y comprensión. Gracias
por toda la colaboración prestada durante el desarrollo de trabajo de grado.

Sin ustedes no sería lo mismo. Son lo máximo, mil gracias.

A mi tutora Maria Eugenia Lucena, por haberme permitido realizar mi trabajo bajo su tutoria, por toda la paciencia y dedicación, infinitamente agradecida.

Al profesor Luis Rojas por la colaboración y entusiasmo en el desarrollo de la etapa experimental.

A la licda Rosa Aparicio, por su paciencia y dedicación al contribuir en la extracción del aceite esencial.

A la profesora Clara Díaz, quien me permitió realizar los ensayos de actividad antifungica bajo su coordinación.

A la Facultad de Farmacia Y Bioanálisis Por mi formación, para lograr esta meta

A mi ilustre Universidad de los Andes, quien me acogió y me hizo lo que soy hoy en día. No hay forma de agradecer tanto.

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

La especie *Flacourtia indica* (Burm. F.) Flacourtiaceae es un árbol pequeño, al cual se le han realizado algunos estudios de diferentes actividades biológicas, pero el presente estudio tiene como fin evaluar la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Flacourtia indica*. Para ello se extrajo el aceite esencial empleando la técnica de hidrodestilación con trampa de clevenger. La actividad antimicrobiana del aceite se evaluó mediante la técnica de difusión del disco en agar o técnica de Kirby Bauer, esta se realizó frente a cinco cepas ATCC de bacterias de referencia: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. El mismo procedimiento se realizó frente a dos especies de hongos del género *Cándida*: *Cándida albicans* y *Cándida krusei*. Se obtuvo como resultado que el aceite esencial de *Flacourtia indica* presenta actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* siendo su concentración mínima inhibitoria (CIM) 250ug/mL; también presentó actividad antimicrobiana frente a las dos especies del género *Cándida* siendo sus concentraciones mínimas inhibitorias 400ug/uL para *Cándida albicans* e inferior a los 20ug/uL para *Cándida krusei*. Dichos resultados se pueden atribuir a la presencia de compuestos mayoritarios en el aceite esencial.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	14
Capítulo I: Marco Teórico	16
I.1 Historia de las plantas medicinales	16
I.2 Importancia de las plantas medicinales	17
I.3 Familia Flacourtiaceae	17
I.4 Genero Flacourtia	18
I.5 Especie Flacourtia indica	19
I.6 Aceites esenciales	20
I.6.1 Composición Química de los aceites esenciales	21
I.7 Vía del ácido Mevalonico	22
I.8 Clasificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales	23
I.8.1 Terpenoides	23
I.8.2 Monoterpenos	23
I.8.3 Sesquiterpenos	24
I.8.4 Compuestos Aromáticos	25
I.8.5 Compuestos de orígenes diversos	26
I.9 Obtención de los aceites esenciales	26
I.10 Técnicas de evaluación de los aceites esenciales	29

I.10.1 Cromatografía de gases	29
I.10.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	29
I.11 Estructura Bacteriana	30
I.12. Microorganismos Patógenos	32
I.12.1 Cocos Gram positivos	33
I.12.2 Bacilos Gram negativos	34
I.13 Mecanismos de resistencia Bacteriana	35
I.14 Estructura Fúngica	37
I.14.1 Genero Cándida	39
I.15 Antibióticos	40
I.16 Antimicóticos	43
I.17 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	44
I.17.1 Método de difusión en placa	44
I.17.2 Método de dilución en caldo	45
CAPITULO II: EL PROBLEMA	46
II.1 Antecedentes del Problema	46
II.2 Planteamiento del Problema	48
II.3 Justificación de la investigación	50
II.4 Hipótesis	51
II.5 Objetivos	51

II.5.1 Objetivo general	51
II.5.2 Objetivos específicos	51
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS	53
III.1 Recolección del material botánico	53
III.2 Procesamiento de la planta	53
III.3 Identificación de la composición química del aceite esencial	54
III.4 Actividad antimicrobiana	54
III.4.1 Actividad antibacteriana	54
III.4.2 Actividad Antifúngica	57
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
CAPITULO V: CONCLUSIONES	72
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74 ^o

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas	32
Tabla 2: Características de la célula Fúngica	38
Tabla 3: Actividad antibacteriana controles positivos para cada cepa	57
Tabla 4: Controles positivos para los hongos del género Cándida	58
Tabla 5: Composición química del aceite esencial de Flacourtia	60
Tabla 6: Actividad Antibacteriana	64
Tabla 7: Concentración mínima inhibitoria	65
Tabla 8: Actividad antifúngica del aceite esencial frente a las cepas de Candida	67
Tabla 9: Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial contra C. albicans	69
Tabla 10: Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial contra C. krusei	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Principales compuestos presentes en los aceites esenciales	21
Figura 2	Vía del ácido meválonico	22
Figura 3	Terpenoides	23
Figura 4	Monoterpenos	23
Figura 5	Sesquiterpenos	24
Figura 6	Estructuras de compuestos aromáticos	25
Figura 7	Compuestos de orígenes diversos	26
Figura 8	Estructura Bacteriana	31
Figura 9	Mecanismos de Resistencia Bacteriana	37
Figura 10	Célula Fúngica	38
Figura 11	Mecanismos de acción de los antibióticos.	42
Figura 12	Preparación de las placas	55
Figura 13	Ensayos microbiológicos	56
Figura 14	Compuestos mayoritarios del aceite esencial de Flacourtia indica	61
Figura 15	Patrón de fraccionamiento del compuesto mayoritario	61
Figura 16	Espectro infrarrojo del compuesto mayoritario	62
Figura 17	Germacreno B	63
Figura 18	Mirceno	63

Figura 19	Actividad antibacteriana del aceite esencial contra <i>Sthaphylococcus aureus</i>	65
Figura 20	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Flacourtia indica</i> contra <i>Sthaphylococcus aureus</i> .	66
Figura 21	Actividad antifúngica del aceite esencial contra <i>Candida albicans</i>	68
Figura 22	Actividad antifúngica del aceite esencial contra <i>Candida krusei</i>	68
Figura 23	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial contra <i>Candida albicans</i>	71
Figura 24	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Flacourtia indica</i> contra <i>Candida krusei</i>	71

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCION

En la actualidad las enfermedades infecciosas constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Numerosos microorganismos son capaces de colonizar e infectar los tejidos humanos ocasionando patologías que incluso pueden conllevar a la muerte; no obstante a la enorme cantidad de microorganismos patógenos existentes se suman los problemas de resistencia a los antimicrobianos, ya que la población los utiliza indiscriminadamente y no toma conciencia de las afecciones y complicaciones que puede causar el uso inadecuado de la antibioticoterapia, las dosis incorrectas y durante los periodos de tiempo inadecuados.

Todo esto hace posible a los microorganismos, crear mecanismos de resistencia que les permiten burlar a los antimicrobianos comunes y así seguir colonizando e infectando los tejidos humanos y animales. Es por ello que diariamente se buscan nuevas alternativas y se investigan aquellos factores que permitan inhibir el crecimiento bacteriano y disminuir los problemas de resistencia; estas nuevas alternativas proponen el uso de sustancias de origen vegetal, ya que desde la antigüedad nuestros antepasados han usado plantas medicinales y ha sido posible demostrar que extractos y aceites esenciales de plantas contienen compuestos que son capaces de matar microorganismos o inhibir su crecimiento.

Siguiendo los conocimientos de nuestros antepasados se pretende aislar y estudiar nuevos aceites esenciales, para determinar su comportamiento antimicrobiano evaluando la posibilidad de ampliar la gama de antimicrobianos capaces de contrarrestar las enfermedades infecciosas y disminuir el índice de morbilidad.

Por tal razón se propone estudiar la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Flacourtia indica*, frente a

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y hongos del género *Candida*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

I MARCO TEORICO

I.1 HISTORIA DE LAS PLANTAS CON FINES TERAPÉUTICOS

El hombre desde el comienzo de su existencia, se ha visto en la necesidad de procurarse alimentos y medicamentos, lo que comenzó probablemente, probando una y otra vez. No cabe duda de que los humanos han tenido que experimentar situaciones desagradables para conocer las plantas beneficiosas. Cuando una especie se comprobaba que tenía acción beneficiosa en un individuo se le daba a otro, y si se notaba el mismo efecto sobre este, entonces se aceptaba y se generalizaba su consumo (Albornoz, 1980).

En todos y cada uno de los métodos de curación, desde la medicina mágico religiosa hasta la medicina ortodoxa académica, las plantas medicinales juegan el papel preponderante en el proceso curativo, contribuyendo de manera insoslayable a la conservación de la salud; manteniéndose con el transcurrir de los años. La búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal, ha ocupado el interés de farmacognostas y fitoquímicos por muchas décadas. Exploraciones para recolectar especies, y análisis químicos, se han enfocado a la búsqueda de sustancias de probada actividad farmacológica sobre trastornos cardiacos, digestivos, cáncer, artritis, psicosis infecciones, entre otros (Albornoz, 1980).

Los remedios nativos o caseros conocidos en la medicina folklórica, siguen vigentes. Estudios estadísticos muestran que alrededor de las dos terceras de la población mundial se medica con drogas crudas, esto es, con las denominadas comúnmente hierbas curativas (Albornoz, 1980).

I.2 IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES:

Las consideraciones que defienden el uso de las plantas medicinales y sus extractos o derivados en terapéutica, pueden afianzarse en las siguientes premisas:

- Trabajan en la reactivación de funciones o procesos orgánicos alterados.
- Estimulan las defensas de los organismos, no las reemplazan ni las fuerzan a actuar.
- Ajustan el flujo armónico de la energía vital.
- Refuerzan el funcionamiento óptimo de órganos y tejidos en funciones nutritivas y regenerativas.
- Pueden contribuir en la remineralización, en los casos necesarios.
- Eliminan toxinas o sustancias indeseables (depuración y limpieza) favoreciendo la circulación sanguínea (Albornoz, 2001).

I.3 FAMILIA FLACOURTIACEAE:

Descripción Botánica

Árboles: pequeños hasta grandes, inermes hasta armados. Posee hojas simples, alternas, enteras o diversamente dentadas, penninervias hasta palmatinervias, punteado-pelucidas o no, en algunos casos con glándulas grandes en la base de la hoja o en el ápice del peciolo, glabras o con pelos simples, en casos raros con indumento estrellado; estipulas casi siempre presentes, caducas o persistentes (Aristeguieta, 1973).

Flores: hermafroditas o unisexuales formando plantas polígamas hasta dioicas, axilares o terminales, solitarias, dispuestas en grupos paucifloros o en inflorescencias de tipo variado. Perianto simple o doble. Posee cáliz persistente o deciduo, sépalos libres o connados en la base. Pétalos cuando están presentes libres e imbricados. Estambres en número variable, desde 6-100 o más; periginos o hipóginos, libres o ligeramente connados en la base; anteras dehiscentes longitudinalmente (Aristeguieta, 1973).

Fruto: variable, carnoso o seco, del tipo de las bayas o capsulas, en casos raros alado, encerrado una o pocas semillas (Aristeguieta, 1973).

Reproducción: Disco a menudo presente, variable, representado por glándulas, pelos o prolongaciones estaminodiales, en algunos casos disco ausente; ovario supero hasta semi-ínfero, por lo general 1-locular, pero también multilocular, placentación parietal, dos o más placentas, óvulos generalmente numerosos (Aristeguieta, 1973).

La familia *Flacourtiaceae* posee de 78 a 85 géneros y de 800 a 880 especies, distribuidos en la zona pantropical, con algunos miembros en las regiones templadas de América, Asia y África (Stevens C, 2001). Entre los géneros que forman parte de la familia *Flacourtiaceae*, se encuentra el género *Flacourtia* el cual ha sido poco estudiado en nuestro país, por tal razón en el presente trabajo se estudió dicho género.

I.4 GÉNERO *Flacourtia*:

Arbustos o arboles pequeños, generalmente armados. Hojas penninervias, aserradas, generalmente glabras, estipulas presentes. Posee racimos axilares; sus flores son generalmente unisexuales formando plantas dioicas. Perianto simple, cáliz persistente, presenta de cuatro a cinco sépalos ligeramente connados, internamente pilosos. Se caracteriza por fruto bacciforme, indehiscente con cavidades monosperma (Aristeguieta, 1973)

I.5 ESPECIE *Flacourtia indica* (Burm. F.)

Arbusto o árbol pequeño de tres a cinco metros de alto, excepcionalmente puede medir hasta ocho metros. Su tronco es recto con espinas fuertes, ramificadas, o ausentes. Las ramas son flexibles y péndulas (Hoyos, 1994).Hojas: son sencillas, alternas, aovado-lanceoladas, glabras de cinco a diez centímetros de largo por tres a cuatro de ancho, largamente acuminadas en el ápice, redondeadas en la base, crenado-dentadas en las márgenes, verde brillantes en la cara superior y peciolo cortos (Hoyos, 1994).Frutos: son bayas, globosos a redondos, de uno a tres centímetros de diámetro, de color marrón oscuro que se tornan morado negruzco al madurar. Pulpa amarillenta rojiza, jugosa, comestible de sabor agradable, presentan de ocho a diez semillas aplanadas (Hoyos, 1994).Flores: son pequeñas, amarillentas, axilares, generalmente dioicas, a veces monoicas. Presenta de cuatro a cinco sépalos, en forma de escamas, ligeramente unidos en la base. Pétalos ausentes y estambres numerosos (Hoyos, 1994).

Usos: sus frutos son comestibles, cuando se consumen estando verdes; se nota que son bastante astringentes, debido a sustancias tánicas que contiene la concha. Se emplean para elaborar jaleas, mermeladas, conservas y jarabes; macerados en ron y endulzados con jarabe, se obtiene un licor casero (Hoyos, 1994).El árbol se utiliza a menudo como ornamental en jardines y parques (Hoyos, 1994).

Distribución geográfica:

Áreas de distribución natural: Botswana, Burundi, Camerún, República Democrática del Congo, Eritrea, Etiopía, India, Kenia, Malawi, Namibia, Nigeria, Ruanda, Sierra Leona, Sudáfrica, Tanzania, Uganda, Zambia, Zanzíbar, Zimbabwe (Orwa y col, 2009).

Como se trata de un árbol de naturaleza exótica ha sido introducido en numerosos países, ya que desarrolla muy en cualquier clima (Orwa y col, 2009). De las plantas pueden extraerse sustancias tales como los aceites esenciales, utilizados en ensayos de actividad antibacteriana; por tal razón se describen a continuación.

I.6 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales o volátiles constituyen un grupo de sustancias de sumo interés desde el punto de vista académico e industrial. Están constituidos por terpenos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esterés, fenoles, lactonas como se muestra en la fig 1. Producidos por numerosas especies, son particularmente abundantes en las familias: *Labiatae*, *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Mirtaceae*, *Cruciferae* y *Geraniácea* (Albornoz, 1980).

Los aceites volátiles se localizan en determinados sitios de la estructura vegetal, en células normales o modificadas o también en estructuras especializadas tales como las cavidades esquizogenas, vasos secretores, pelos glandulares, canales lisigenos. Pueden asimismo estar depositados en tejidos específicos como en el pericarpio de los frutos cítricos y en los tubos oleíferos de los Umbelíferas y en los pétalos de las rosas, en la corteza del tallo y hojas del canelo (Albornoz, 1980).

Los aceites esenciales son generalmente líquidos aromáticos, miscibles con lípidos y solventes lipófilos: incoloros, particularmente cuando están frescos, ya que al oxidarse se resinifican y toman color oscuro. La mayoría de los aceites volátiles son menos densos que el agua, inmiscibles en ella. Ya que son mezclas de constituyentes diversos, generalmente consisten de una porción líquida, compuesta por hidrocarburos, la cual recibe el nombre de eleopteno; la porción sólida está formada por hidrocarburos oxidados y se denomina esterearopteno (Albornoz, 1980).

Desde el punto de vista farmacodinámico, las propiedades de los aceites esenciales son muy variables debido a la circunstancia. En general, las esencias tienen propiedades antisépticas, bactericidas y antimicóticas, utilizándose en soluciones germicidas, gargarismos y jabones (Albornoz, 1980).

I.6.1 COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES:

Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos caracterizados por orígenes biogénicos distintos; el grupo de los terpenoides y el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano y con menor frecuencia pueden contener productos procedentes de procesos de degradación (Bruneton, 2001).

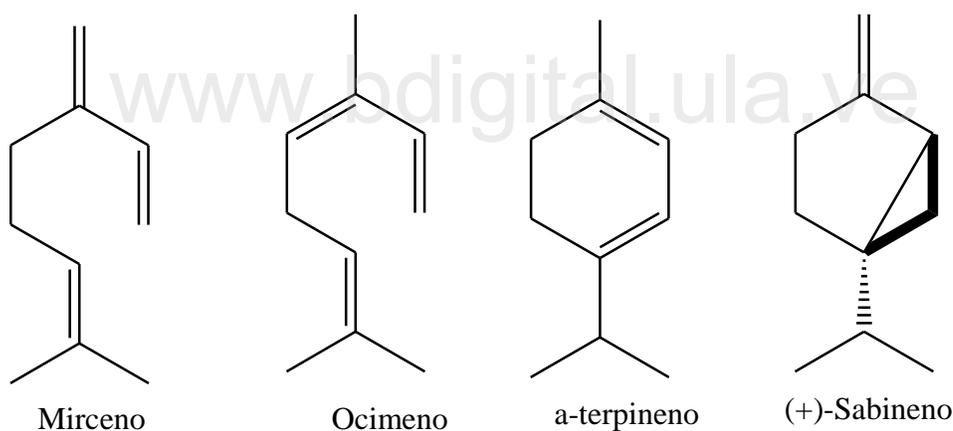


Fig. 1 Principales compuestos presentes en los aceites esenciales.

Los Isoprenoides son compuestos frecuentes en los aceites esenciales, en cuya biosíntesis se ha encontrado que el ácido mevalónico (ácido 3,5-dihidroxi-3metilpentanoico) se convierte en el reactivo pirofosfato de isopentilo o su isómero. Al reaccionar estos, se forma el pirofosfato de geranilo con el esqueleto de un monoterpene. La unión de este con otro pirofosfato de isopentilo forma el pirofosfato de farnesilo (sesquiterpeno).

La unión de este con un isómero alílico origina un triterpeno. La unión similar del pirofosfato de farnesilo con otra de pirofosfato de isopentenilo origina un diterpeno. Las moléculas anteriores se pueden ciclar y oxidar originando muy diversos compuestos policíclicos, como los triterpenoides, tetracíclicos y pentacíclicos o por eliminación de metilos, el importante grupo de los esteroides (Dominguez, 1973).

I.7 VÍA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO:

El ácido mevalónico es el precursor universal de los compuestos terpenicos. El proceso implica la condensación de los tioeteres del ácido acético donde hay formación de acetato-acetona y condensación de este con una molécula de acetilcoenzima A, esta reacción es catalizada por la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa. Mientras que la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa, efectua la reducción de NADPH dependiente del 3-hidroxi-3metilglutarilcoenzima A, a ácido 3R-mevalonico. (Bruneton, 2001). La conversión del ácido mevalónico en estructuras hemiterpenicas comienza con una doble fosforilación como se observa en la figura 2. Una nueva fosforilación permite introducir al grupo pirofosfato cuya eliminación permitirá la formación del pirofosfato de isopentilo.

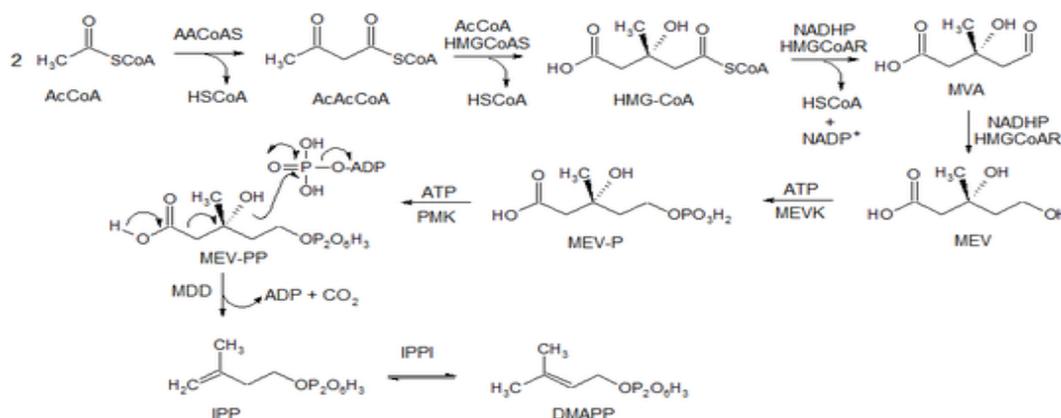


Fig. 2 Vía del ácido mevalonico

I.8 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS ACEITES ESENCIALES:

I.8.1 TERPENOIDES: los compuestos terpenicos proceden de la condensación del isopreno (C₅) y pueden tener o no oxígeno. Los que carecen de este son hidrocarburos; los cuales se clasifican en monoterpenos y sesquiterpenos (Kuklinski, 2000).

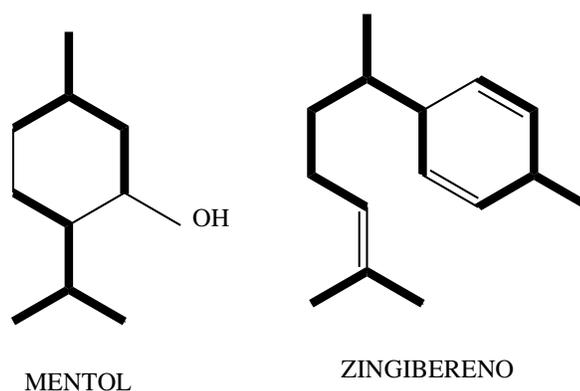


Fig. 3 Terpenoides

I.8.2 MONOTERPENOS: Casi siempre se encuentran hidrocarburos. Estos pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. A veces constituyen más del 90% del aceite esencial. La reactividad de los cationes intermediarios, justifica la existencia de numerosas moléculas funcionalizadas: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, peróxidos y fenoles (Bruneton, 2001).

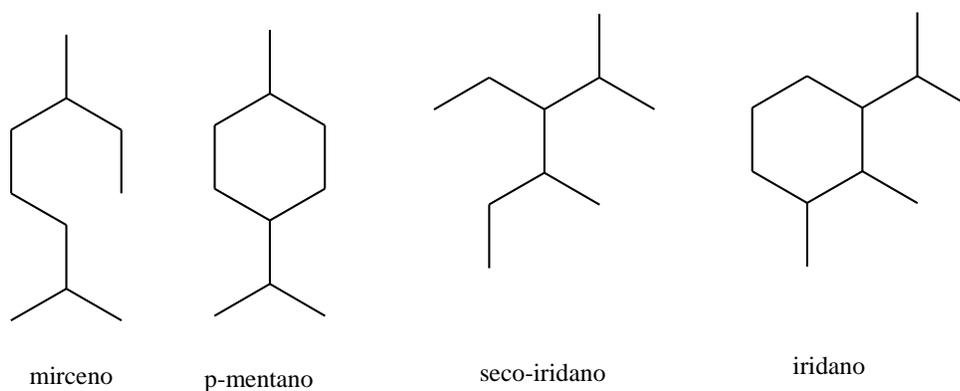
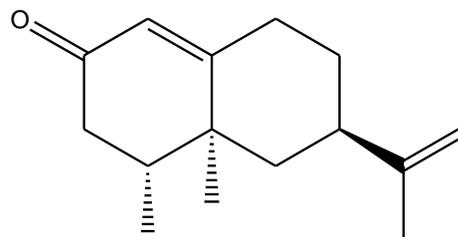
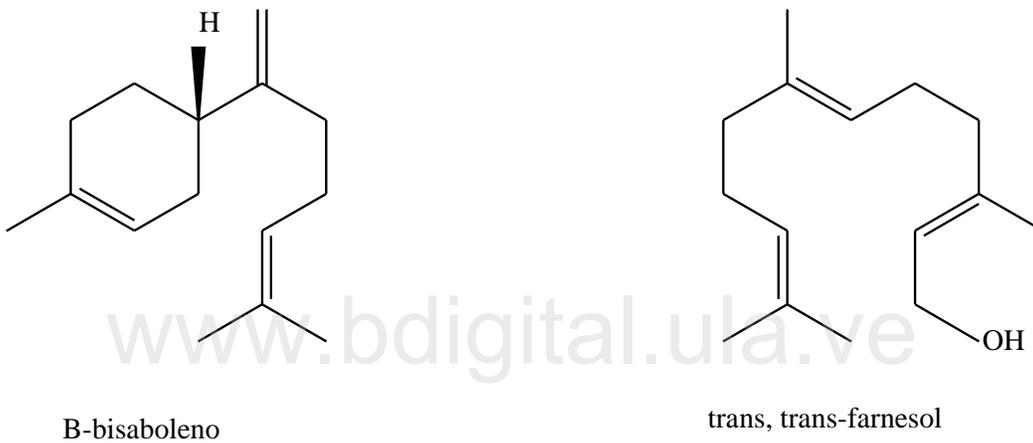


Fig. 4 Monoterpenos

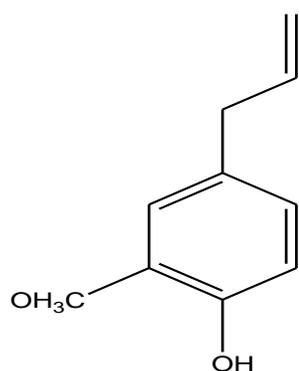
I.8.3 SESQUITERPENOS: las variaciones estructurales son de la misma naturaleza que los monoterpenoides, pero aumenta el número de ciclaciones posibles; de ahí la gran variedad de estructuras. Los sesquiterpenos característicos de los aceites esenciales son: hidrocarburos monocíclicos y policíclicos (Beta-bisaboleno, Beta-cariofileno, longifoleno), alcoholes (farnesol, carotol, B-santalol, patchulol), cetonas (nootkatona) aldehídos (sinensales), ésteres (acetato de cedrilo) (Bruneton, 2001).



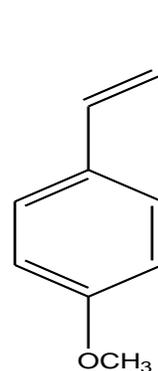
(+)-nootkatona

Fig. 5 Sesquiterpenos

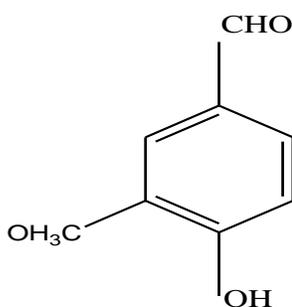
I.8.4 COMPUESTOS AROMÁTICOS: los derivados del fenilpropano son mucho menos frecuentes. Se trata generalmente de alilfenoles y propenilfenoles, característicos de determinados aceites esenciales de Apiaceae. Igualmente se pueden encontrar compuestos como la vainilla o como el antranilato de metilo y en menor proporción están presentes las lactonas (Bruneton, 2001).



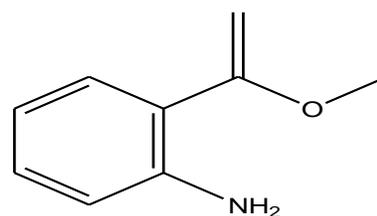
eugenol



E-anetol



vainilla



antranilato de metilo

Fig.6. Estructuras de algunos compuestos aromáticos.

I.8.5 Compuestos de orígenes diversos: Compuestos que resultan de la transformación de moléculas no volátiles. Estos compuestos suelen contribuir a los aromas de los frutos (Bruneton, 2001).

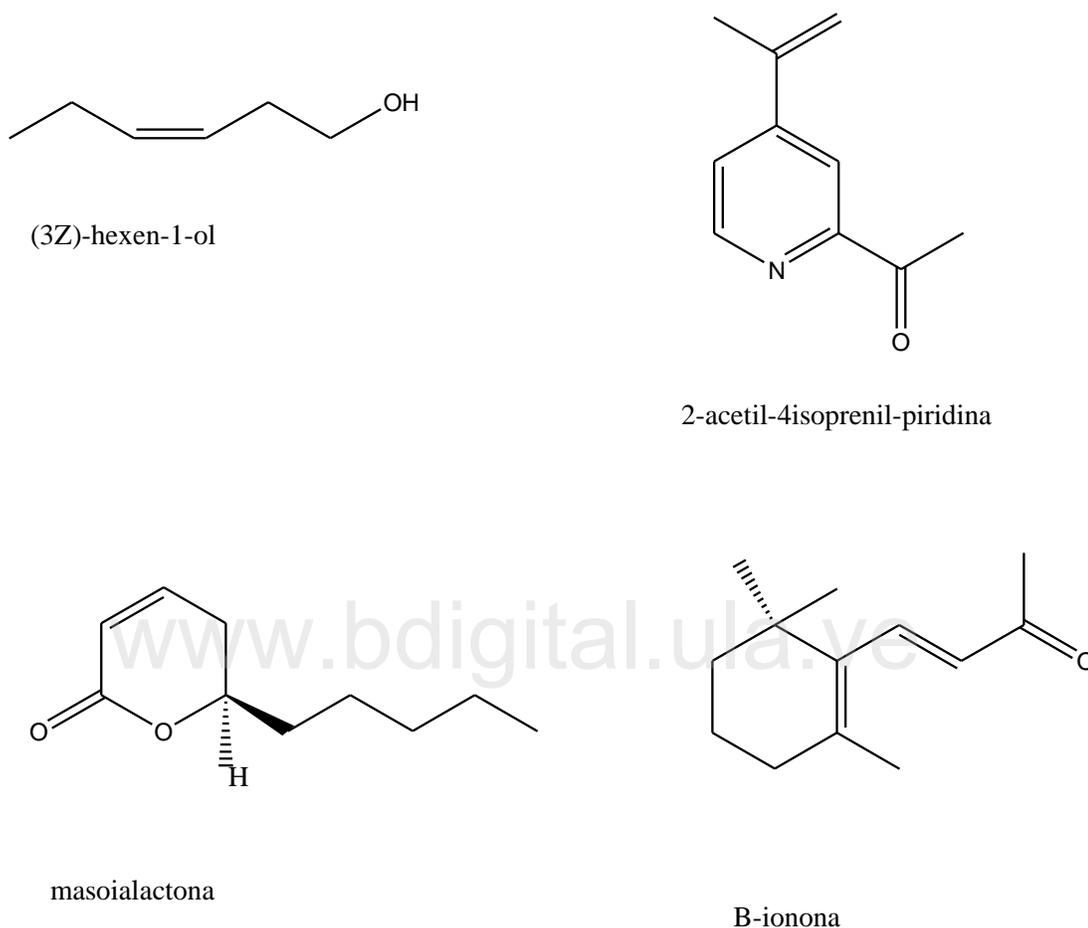


Fig. 7 Compuestos de orígenes diversos

I.9 OBTENCION DE LOS ACEITES ESENCIALES

Dependiendo de la aplicación, la clase de planta y la parte que se utilice para la extracción de los aceites esenciales se tienen varias técnicas de extracción, siendo los obtenidos por arrastre de vapor los de más alta calidad para su uso medicinal y terapéutico por no contener residuos (Olaya, 2003).

I.9.1 MÉTODO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR:

Es el más sencillo de los métodos y se asemeja a la obtención de licores en los antiguos alambiques. Este método aprovecha las propiedades de las moléculas de agua en estado de vapor para asociarse con moléculas de aceite. El equipo es sencillo, requiere un generador de vapor que puede ser una simple olla de presión o una caldera, un reactor o cámara de extracción como recipiente hermético con una entrada y una salida de vapor donde se deposita el material de las plantas (hojas, flores, madera, semillas), un condensador donde el vapor se transforma en líquido nuevamente y se recoge en un recipiente llamado vaso florentino que es un envase con un desprendimiento que facilita la separación del agua y el aceite (Olaya, 2003).

I.9.2 MÉTODO DE DESTILACIÓN POR PRESIÓN DE VAPOR:

La extracción se efectúa cuando el vapor por presión entra en contacto con las células de las partes de las plantas y las rompe liberando la esencia y atrapándola en las gotas de agua del vapor que luego se condensa en el destilador. El aceite obtenido por medio de este procedimiento es de alta pureza y solo requiere una redestilación para acabar de eliminar algunas gotas de agua que puedan quedar atrapadas en el aceite. (Olaya, 2003)

I.9.3 MÉTODO DE EFLEURAGE:

Es una técnica antigua, en la que se emplean grasas animales o vegetales para la extracción de la esencia. Consiste en grandes bandejas untadas de grasa en las que se extiende el material vegetal, que se va cambiando regularmente hasta que la grasa se satura. La grasa así obtenida se trata con alcohol luego se destila para obtener la esencia. Es una buena alternativa aunque no da grandes rendimientos, ya que es una forma simple de extraer el aceite esencial de flores y de algunas plantas que no se pueden obtener con arrastre de vapor (Olaya, 2003).

I.9.4 MÉTODO DE PRENSADO, ESTRUJADO O EXPRESIÓN:

Es el método más empleado para extraer el aceite esencial que se encuentra alojado en la cascara de todos los cítricos (naranja, pomelo, mandarina, lima). El procedimiento consiste en tomar fragmentos de la cascara y exprimirlos entre los dedos contra una esponja. Luego de muchas cascara la esponja se satura del aceite esencial y se puede exprimir en el recipiente que se va a almacenar; La calidad del aceite obtenido es buena. Industrialmente se utiliza una prensa hidráulica y luego se filtra y se destila, pero la calidad del aceite es inferior (Olaya, 2003).

I.9.5 MÉTODO INDUSTRIAL DE EXTRACCIÓN POR DIÓXIDO DE CARBONO:

Es un método similar al de arrastre por vapor pero en lugar de agua se utiliza dióxido de carbono para hacer estallar las células. Los aceites obtenidos de esta manera son de muy buena calidad pero requieren de un equipo, un montaje y una infraestructura grande y costosa por lo que generalmente son usados por la industria farmacéutica (Olaya, 2003).

I.9.6 HIDRODESTILACIÓN:

Destilación de flores u otras partes de las plantas por medio de vapor de agua. El vapor de agua arrastra el aceite esencial que contiene la planta. Se trata de que los aceites esenciales poseen un punto de ebullición superior al del agua, pero la mezcla del aceite esencial más agua presenta un punto de ebullición inferior y por eso puede ser destilada. Al pasar por el condensador, los vapores se enfrían, condensan y se transforman en un líquido formado por fases inmiscibles; una fase orgánica que contiene el aceite esencial y la fase acuosa. Dicha fase orgánica se separa fácilmente de la acuosa al tener distinta densidad y ser inmiscibles, normalmente la fase orgánica es la menos densa y flota sobre la acuosa (Ortuño, 2006).

I.10 TECNICAS DE EVALUACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

I.10.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES: La cromatografía de gases es una técnica, en la cual se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada gas portador. La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta a través de un septo (diafragma de silicona), en un inyector caliente, en cuyo interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador que puede ser helio, nitrógeno o hidrogeno y los analitos después separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o un registrador (Harris, 2007).

I.10.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS: La espectrometría de masas es el mejor detector de la cromatografía de gases. El espectro de masas es extremadamente sensible, y proporciona información cualitativa y cuantitativa. Con detección de iones seleccionados o de una reacción seleccionada, se puede medir fácilmente un componente en un cromatograma complejo de compuestos poco separados (Harris, 2007). En general se trata de una hibridación instrumental del efluente cromatografico al espectrómetro de masas. Así pues, las interfaces CG-EM son en realidad separadores moleculares que además reducen drásticamente la presión del fluido gaseoso que pasa a su través. De los cuales existen tres tipos:

- (a) *Separador de expansión:* consiste en un tubo de vidrio sinterizado de porosidad ultrafina encerrado en una cámara de vacío y conectado con los instrumentos por tubos de diámetro pequeño que actúan como restrictores. Al entrar el fluido cromatográfico se expande dentro del tubo; el helio tiene una extraordinaria difusividad y la mayor parte del mismo pasa al exterior del tubo. Así se consiguen los dos objetivos de la interfase (Gómez y Valcárcel, 1988).
- (b) *Separador tipo jet:* el efluente cromatografico es estrangulado a través de un orificio muy fino y se expande rápidamente en una cámara de

vacío calentada. Durante la expansión, las moléculas de helio más ligeras se difunden hacia afuera del centro del jet supersónico, que se enriquece de moléculas del analito. Un segundo jet recibe el flujo enriquecido y lo introducen en el espectrómetro de masas (Gómez y Valcárcel, 1988).

(c) *Separador de una membrana de silicona*: Se basa en que el paso de compuestos orgánicos a través de una membrana de silicona puede ser de dos órdenes de magnitud superior que el gas inerte. El efluente cromatografico choca contra el lado de la membrana que está a mayor presión; el efluente cromatografico sale de la interfase sin los analitos. El lado de la membrana de baja presión está conectado directamente al espectrómetro de masas (Gómez y Valcárcel, 1988).

Una vez que se han extraído los aceites esenciales, estos pueden emplearse para realizar ensayos microbiológicos frente a los principales microorganismos causantes de diversas patologías y complicaciones al ser humano puesto que cada día son más frecuentes y es más difícil su tratamiento por lo que se describe a continuación su estructura y clasificación.

I.11 ESTRUCTURA BACTERIANA

Mediante el microscopio electrónico ha sido posible en detalle la estructura de una célula bacteriana. Básicamente está formada por componentes estructurales esenciales como membrana citoplasmática, material nuclear, citoplasma y ribosomas; también posee estructuras no esenciales que incluye pared celular, capsula, flagelos, gránulos, fimbrias y esporas (Barrios, 1996).

Las bacterias se clasifican de acuerdo a la composición de su pared celular; siendo gram-positivos y gramnegativos. La pared celular bacteriana de las bacterias gram-positivas es más gruesa y de estructura más sencilla que la de las gram-negativas. Están constituidas por un 60% aproximadamente de

peptidoglucano y un porcentaje relativamente bajo de ácidos teicoico y teicuronicos; mientras que la pared celular gram-negativa es química y estructuralmente más compleja que la de las bacterias gram-positivas. Está compuesta por una capa fina de peptidoglucano por un espacio periplásmico o zona intermedia., la membrana externa consiste de una doble capa de fosfolipidos y lipopolisacaridos (Barrios, 1996) Ver figura 8.

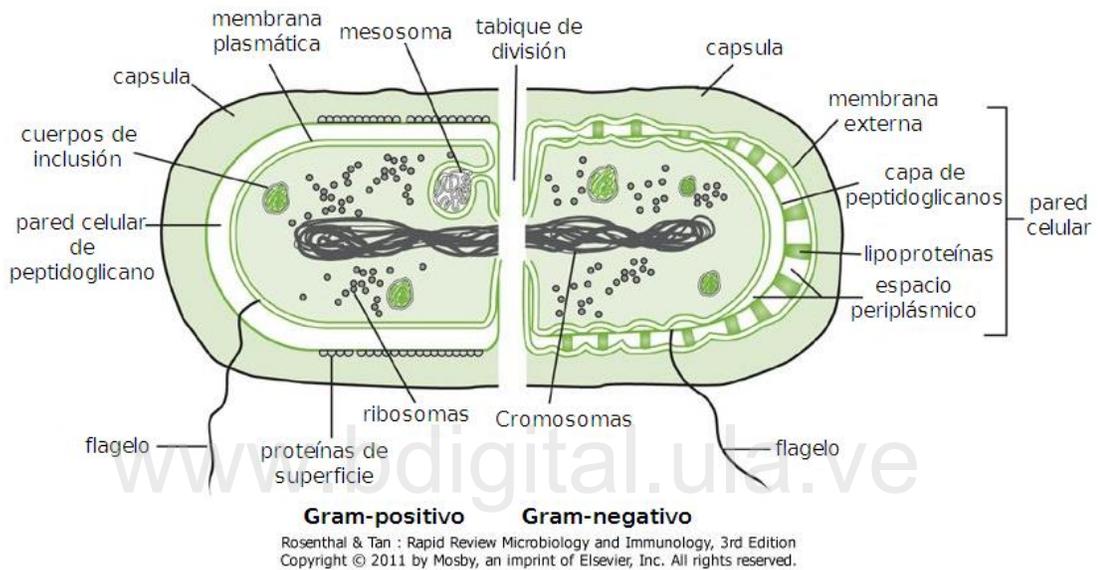


Fig. 8. Estructura Bacteriana

Fuente: Wikipedia org.

Tabla 1

Diferencias entre las paredes celulares de bacterias gram-positivas y gram-negativas:

	GRAM-POSITIVAS	GRAM-NEGATIVAS
Estructura	Más gruesa y químicamente sencilla	Más fina, pero químicamente más compleja
Contenido de lípidos	Bajo (1-4%)	Alto (11-22%)
Peptidoglicano	Mayor cantidad (50%)	Menor cantidad (10%)
Ácidos teicoicos	Presentes	Ausentes
Lipopolisacaridos	Ausentes	Presentes

Fuente: Bacteriología y Virología General. Ada Barrios 1996

I.12 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Las bacterias son células procariotas que se hallan siempre en forma unicelular. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en los ríos y lagos, los mares, la tierra así como en las hojas y las raíces de las plantas y en la piel y el tubo digestivo de animales. Algunos de estos microorganismos forman parte de la microbiota habitual del hombre, sin embargo la mayoría son patógenos causantes de graves patologías (Prats, 2012).

Los agentes infecciosos que afectan más comúnmente al ser humano y objeto de estudio de esta investigación se describen a continuación:

I.12.1 COCOS GRAM-POSITIVOS:

I.12.1.1 Staphylococcus aureus: es un microorganismo que forma predominante de la flora de la mucosa nasal, aunque también puede hallarse en la piel. Tiene la morfología propia de los estafilococos, es hemolítico,

produce la enzima coagulasa y un pigmento carotenoide. Causa procesos patológicos por mecanismo invasivo, toxigenico e inmunitario (Prats, 2012).

I.12.1.2 Procesos invasivos: Staphylococcus aureus posee gran capacidad invasora por producir numerosas enzimas que lesionan los tejidos facilitando su invasión. *S. aureus* causa una infección de los folículos pilosebáceos denominada foliculitis. Las heridas, incluyendo las de las incisiones quirúrgicas, pueden infectarse por *S. aureus* dando lugar a supuración; estas infecciones de la piel cuando profundizan a la dermis y al tejido celular subcutáneo, causan celulitis desde los que el estafilococo puede pasar a la sangre dando lugar a una bacteriemia (Prats, 2012).

I.12.1.3 Procesos toxígenicos: Están producidos por toxinas de actividad específica, diferentes de las enzimas que ocasionan la necrosis tisular en los procesos invasivos. Los procesos toxígenicos más importantes son las gastroenteritis y el síndrome de piel escaldada (Prats, 2012).

I.12.1.4 Procesos inmunopatológicos: El principal es el síndrome de Shock toxico; el cual se trata de un shock producida por la toxina del Shock toxico que es estructuralmente semejante a las enterotoxinas. La mayoría de los casos se producen tras la colonización por cepas de *S. aureus* productoras de esta toxina de tampones vaginales cuyas características facilitan la multiplicación de la bacteria y la producción de la toxina (Prats, 2012).

I.12.1.5 Enterococcus faecalis: Los enterococos son cocos Gram positivos que se disponen en parejas o cadenas cortas. *Enterococcus faecalis* es la especie de este género que produce infecciones con más frecuencia, entre las que destacan infecciones urinarias, las infecciones intraabdominales y de las incisiones quirúrgicas del abdomen. La endocarditis, a diferencia de estas infecciones es poco frecuente, pero posee extraordinaria gravedad (Prats, 2012).

I.12.2 BACILOS GRAM-NEGATIVOS:

I.12.2.1 Escherichia coli: es una especie que se halla en el tubo digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente; sin embargo a principio de la década de 1950 se constató que algunas cepas de esta especie podían causar diarrea y posteriormente se han identificado, como mínimo, cinco patogrupos diferentes de *E. coli*, causantes de enteritis por diferentes mecanismos. Estas cepas poseen factores de virulencia que la hacen enteropatógenas como son adhesinas específicas, sistemas para la penetración intracelular y toxinas (Prats; 2012). *E. coli* también es causante de la mayoría de las infecciones urinarias en la mujer. Asimismo, causa con frecuencia infecciones extra intestinales aparte de las infecciones urinarias, como colecistitis, peritonitis, neumonía y bacteriemia (Prats, 2012).

I.12.2.2 Pseudomonas aeruginosa: Es un bacilo gramnegativo no fermentador de los carbohidratos, de requerimientos nutricionales sencillos. Cuenta con muchos factores de virulencia, incluidos componentes estructurales, toxinas y enzimas. El sistema de transmisión utilizado por *Pseudomonas*, es el sistema de secreción tipo III, resulta especialmente eficaz para la inyección de toxinas dentro de la célula anfitriona. Se ubica en la naturaleza y en los ambientes húmedos de los hospitales; causando diferentes cuadros clínicos (Murray, 2009).

I.12.2.3 Infecciones pulmonares: comprende desde irritación leve de los bronquios (traqueobronquitis) hasta necrosis del parénquima pulmonar (Murray, 2009).

I.12.4.4 Infecciones cutáneas primarias: infecciones oportunistas de heridas existentes a infecciones localizadas de los folículos pilosos. Infecciones del aparato urinario: infecciones oportunistas de pacientes con sondas urinarias permanentes y exposición a antibióticos de amplio espectro (Murray, 2009).

I.12.4.5 Infecciones de oído: comprenden desde una irritación leve del oído hasta destrucción invasiva de los huesos craneanos adyacentes al oído infectado (Murray, 2009).

I.12.4.6 Infecciones oculares: infecciones oportunistas de corneas expuestas que presentan alguna lesión leve (Murray, 2009).

I.12.4.7 Bacteriemia: diseminación de las bacterias desde el foco de la infección primaria hasta otros la circulación sanguínea, afectando otros órganos y tejidos (Murray, 2009).

I.12.5 Klebsiella pneumoniae: Las bacterias de este género poseen una capsula prominente que les confiere el aspecto mucoso a las colonias aisladas y la mayor virulencia de los microorganismos in vivo. *Klebsiella pneumoniae*, puede producir neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad, que produce destrucción necrótica de los espacios alveolares, la formación de cavidades y la producción de esputos hemoptísicos. También está asociada a infecciones de heridas, de tejidos blandos y del aparato urinario (Murray, 2009).

I.13 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA:

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con que esta resistencia surge y se extiende en poblaciones microbianas está determinada por la cantidad de antibióticos concretos usados en un ambiente dado. Existe la posibilidad de retrasar su aparición y limitar su extensión con un juicioso uso de los antibióticos, tanto en humanos y animales.

La resistencia tiene varias consecuencias. Las infecciones por patógenos resistentes tienen más altas tasas de morbilidad y mortalidad, que las causadas por patógenos sensibles. Es necesario recurrir para el tratamiento a antibióticos más caros y más tóxicos. Además, las cepas

resistentes lo son con frecuencia a varios antibióticos (multirresistencia). Cuando se debe al uso inapropiado de antibióticos es, por tanto, una carga adicional innecesaria (Medina, 2000).

Los genes de resistencia no están confinados a especies bacterianas en particular sino que tienen el potencial para una amplia distribución entre especies. Pese al gran número de antibióticos que existen y sus variados mecanismos de acción, las bacterias han encontrado en muchos casos la forma de inactivar o impedir su acción, tanto en antibióticos naturales como parcialmente sintéticos y semisintéticos. Los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos son fundamentalmente de tres tipos:

- Inactivación por destrucción o modificación: Por ejemplo; betalactamasas, enzimas inactivantes de aminoglucosidos.
- Inaccesibilidad al lugar de acción, bien por disminución de la permeabilidad, bien por expulsión activa.
- Alteración del lugar de acción: ejemplo modificación del ribosoma por metilación o producción de una nueva enzima con poca afinidad por el antibiótico (Medina, 2000) ver figura 9.

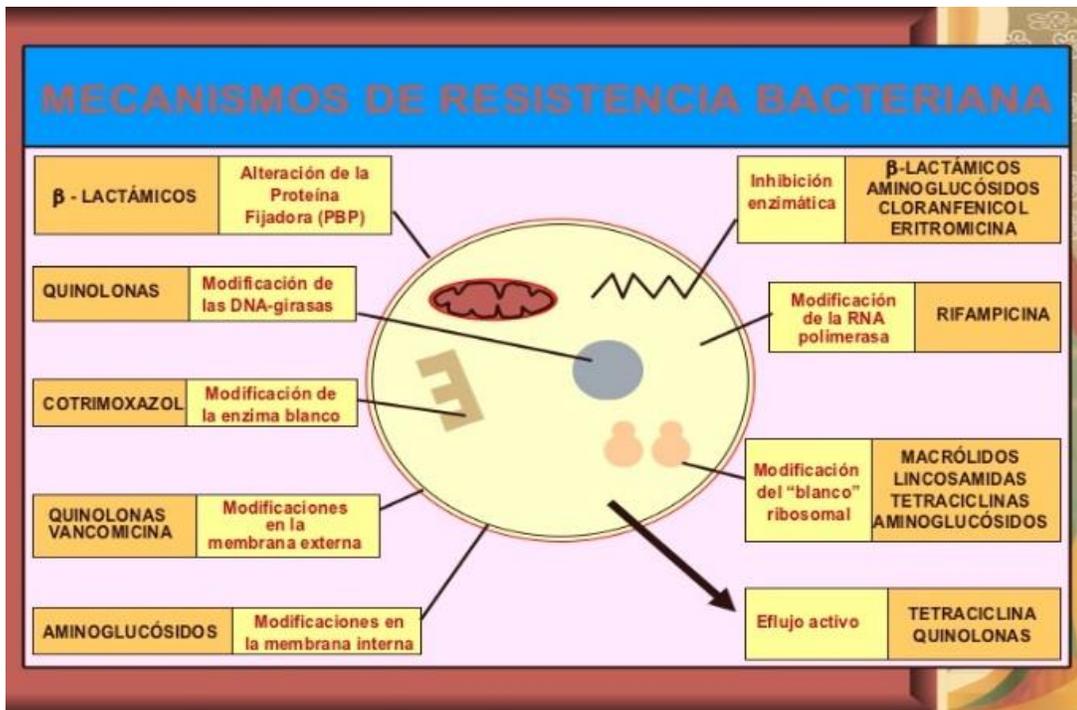


Fig. 9. Mecanismos de resistencia bacteriana

Fuente: es.slideshare.net

1.14 ESTRUCTURA FÚNGICA

Las células fúngicas presentan todos los componentes habituales de las células eucariotas. La primera estructura es la capsula; está cubierta que está situada por fuera de la pared celular y solo se observa en algunas especies de hongos, está compuesta de polisacáridos especiales, habitualmente glucoroxidomananos, como se observa en la tabla número 2 que le brindan a la célula una mayor protección frente a las defensas del hospedero (Negroni, 2009).

ESTRUCTURA FUNGICA

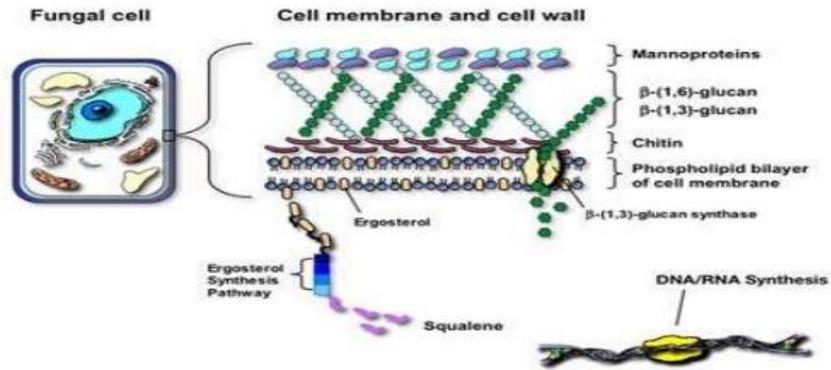


Fig. 10. Célula Fúngica

Fuente: es.slideshare.net

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2.

Características de la célula fúngica

CELULA FUNGICA	
Organización	Más compleja que en el caso de las bacterias
Capsula	Ausente o presente (glucoroxidomananos)
Pared celular	Quitina, mananos, glucanos y proteínas
Membrana celular	Con mesosomas y citocromo p450 para la síntesis del ergosterol
Citoplasma	Ribosomas de 80S, a veces polirribosomas, retículo endoplasmico con microvesiculas, nucléolo, membrana, mitocondrias e inclusiones.

Fuente: Microbiología médica. Kenneth, 2011

1.14.1 GÉNERO Candida

Los hongos del género *Candida* crecen como levaduras redondeadas, ovoides o con forma de yema de cuatro a seis micrómetros; la mayor parte de los hongos de este género crecen con rapidez en agar saboraud y en medios bacteriológicos enriquecidos (Kenneth, 2011).

Las especies del género *Candida* representan los patógenos fúngicos oportunistas más frecuentes. Estos microorganismos colonizan la mucosa digestiva y pasan al torrente circulatorio mediante un proceso de translocación intestinal o a través de catéteres vasculares contaminados, interactúan con las defensas del organismo anfitrión y abandonan el compartimiento intravascular para invadir tejidos profundos de distintos órganos diana, como el hígado, el bazo, el riñón, el corazón y el cerebro (Murray, 2009).

Se cree que la capacidad de adhesión a distintos tejidos y superficies inanimadas es importante en las fases iniciales de la infección por *Cándida*. La capacidad de adhesión de las distintas especies de este género presenta una relación directa con su nivel de virulencia (Murray, 2009).

La candidiasis es una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre; su nivel de profundidad y gravedad no depende tanto del agente etiológico en sí, si no del factor de predisposición con el que se asocia (Bonifaz, 2010).

Se ha demostrado que los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana y antifúngica, semejante a algunos fármacos por ello se considera importante describir los principales antibióticos y su mecanismo de acción.

I.15 ANTIBIOTICOS:

Los antibióticos son sustancias que incluso en pequeñas concentraciones inhiben el crecimiento y la multiplicación de las bacterias y hongos. Se dice que solo influyen sobre la multiplicación de las bacterias tienen acción bacteriostática y si las células blanco mueren tiene acción bactericida. La mayoría de los antibióticos son producidos por microorganismos, sobre todo por bacterias del género *Streptomyces* y ciertos hongos. También existen antibacterianos sintéticos como las sulfonamidas y los inhibidores de la girasa (Koolman y Klaus 2005).

I.15.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS:

I.15.1.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular: El mecanismo más frecuente de actividad antibiótica es la interferencia con la síntesis de la pared celular bacteriana (ver figura 11). Casi todos los antibióticos dotados de este mecanismo de acción se clasifican como Beta-lactámicos por ejemplo penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas carbapenemos, monobactámicos e inhibidores de la Beta-lactamasa, debido a que comparten una estructura común de anillo beta-lactámico (Murray, 2009).

I.15.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS DE ACUERDO A SU BLANCO DE ACCIÓN:

I.15.2.1 Beta-lactámicos: obstaculizan la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la inhibición de la incorporación del ácido N-acetilmurámico a los mucopéptidos en la pared celular de las bacterias gram-positivas, a diferencia de las bacterias gram-negativas, que contienen muy pequeñas cantidades de mucopéptidos. Los antibióticos B-talactámicos se pueden dividir en: penicilinas naturales, penicilinas B-talactamasa resistente, penicilinas de amplio espectro, penicilinas de muy amplio espectro, otras penicilinas, carbapenemos y monobactámicos. (Romero, 2007).

I.15.2.3 Aminoglucósidos: son un grupo de antimicrobianos que reciben su nombre genérico, por su composición química estructural, al estar integrados a bases de azúcares aminados. Su acción sobre la célula bacteriana es destructora (bactericida) por interferencia en la síntesis proteica a nivel de los ribosomas, mediante la unión irreversible de la subunidad 30S. En este grupo de antibióticos se encuentran: *la estreptomycin, gentamicina, amikacina, tobramicina, neomicina, canamicina, paramomicina, sisomicina, dibekacina, netilmicina y estreptomycin* (Romero, 2007).

I.15.2.4 Anfénicoles: el principal representante es el cloranfenicol; es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis de la bacteria, al reprimir la transmisión de aminoácidos activados. Su espectro antimicrobiano incluye: *Haemophilus, Salmonella, Escherichia, Rickettsiae, Mycoplasma, Chlamidiae, Aeromonas, Brucella, Serratia, Shigella, Klebsiella, Proteus, Enterobacter y anaerobios* (Romero, 2007).

I.15.2.5 Polipeptídicos: tienen efecto bactericida al aumentar la permeabilidad de la membrana bacteriana, de forma que esta pierde sustancias de bajo peso molecular. Solo tiene actividad contra microorganismos gram-negativos incluyendo *Pseudomonas* (Romero, 2007).

I.15.2.6 Glucopeptídicos: el principal es la vancomicina, inicialmente obtenido de *Streptomyces orientalis*, interfiere en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular de las bacterias grampositivas en fase de proliferación. Carece de actividad frente a bacterias gram-negativas, ya que la molécula es excesivamente grande para atravesar los poros de la membrana exterior y alcanzar su diana de acción en el peptidoglucano (Murray, 2009).

I.15.2.7 Macrólidos: deben su nombre a que estructuralmente poseen una lactona macrocíclica. Presentan un espectro antimicrobiano entre la penicilina y la tetraciclina, y su mecanismo de acción es por interferencia en la síntesis proteica bacteriana (Romero, 2007).

I.15.2.8 Lincosaminas: son un subgrupo de los macrólidos, se integran por la clindamicina y la lincosamina. Son fármacos que intervienen en la síntesis proteica bacteriana, además de ser especialmente activos contra bacterias Gram positivas, en particular las anaerobias (Romero, 2007).

I.15.2.9 Tetraciclinas: son antibióticos bacteriostáticos que interfieren en la síntesis proteica, al impedir la unión del ácido ribonucleico de transferencia con el ribosomal. Su espectro es amplio, pues incluye a todos los patógenos inhibidos por la penicilina y a muchos gram-negativos (Romero, 2007).

I.15.2.10 Sulfamidas: son derivados de la sulfanilamida. Tienen acción bacteriostática al interferir la síntesis del ácido fólico. Su espectro de acción es muy amplio incluyendo Gram-positivos y Gram-negativos. Son de elección para el género *Nocardia* y su manejo terapéutico queda restringido a infecciones de vías urinarias no complicadas (Romero, 2007).

I.15.2.11 Quinolonas: Actúan bloqueando a nivel de la replicación del ácido desoxirribonucleico en la ADN girasa, en las subunidades alfa y beta. Son de uso, en infecciones de vías urinarias agudas y crónicas sin uropatía.

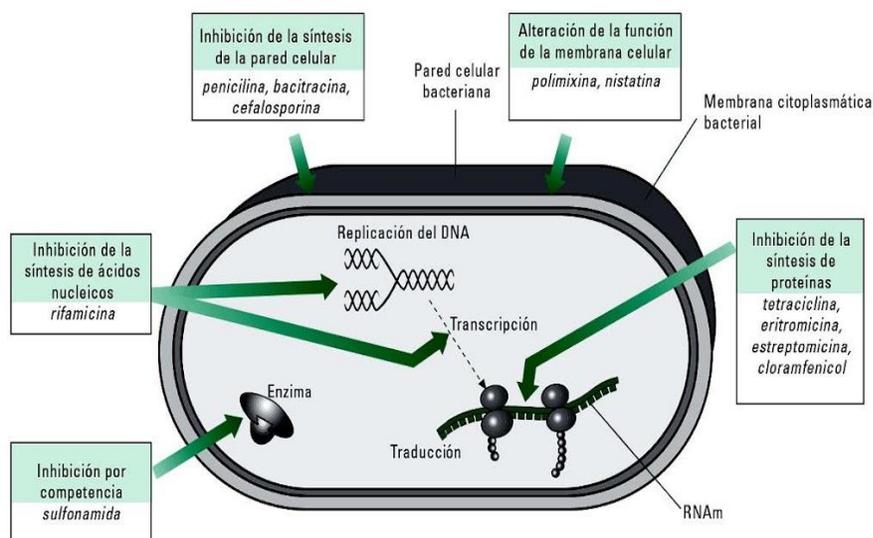


Fig. 11 Mecanismo de acción de los antibióticos.

Fuente: www.blogdebiologia.com

I.16 ANTIMICOTICOS

I.16.1 Polienos: Los polienos como la nistatina y anfotericina B son compuestos lipófilos y se unen al ergosterol, el esteroles dominante en la membrana citoplasmática de las células micóticas. Después de su unión forman conductos anulares que penetran en la membrana y ocasionan la fuga de moléculas pequeñas esenciales desde el citoplasma, con muerte celular (Kenneth, 2011).

I.16.2 Compuestos azólicos: Su actividad se basa en la inhibición de la enzima 14 alfa-desmetilasa, que produce la conversión de lanosterol a ergosterol. Esto ocasiona la acumulación de lanosterol y formación de membrana defectuosa. Los principales compuestos azólicos son; el cetoconazol empleado para el tratamiento de las micosis sistémicas. El fluconazol y el itroconazol para la meningitis micótica. El itoconazol y el voriconazol son empleados para el tratamiento de las infecciones sistémicas (Kenneth, 2011).

I.16.3 Alilaminas: son un grupo de compuestos sintéticos que actúan al inhibir la enzima escualeno epoxidasa en tempranas etapas de la síntesis de ergosterol. Las alilaminas incluyen la terbinafina y la naftifina ambos usados para el tratamiento de infecciones por dermatofitos (Kenneth, 2011).

I.16.4 5-Flucitosina: Es un análogo de la citocina. Es un inhibidor potente de la síntesis de ARN y ADN. Para que la 5-flucitosina (5FC) entre en la célula requiere una permeasa; en el interior de la célula su acción no es directa, si no que se lleva a cabo a través de modificaciones enzimáticas a otros compuestos (5-fluorouracilo, ácido 5-fluorodesoxiuridico, 5-fluorouridina). Estos metabolitos interfieren con la síntesis del ADN y causan transcripción aberrante de ARN (Kenneth, 2011).

I.16.5 Equinocandinas: actúan al inhibir la síntesis de glucanos (1,3-beta-D-glucano sintetasa) necesaria para la síntesis de la pared celular principal de glucanos del hongo. Su acción causa distorsión morfológica e inestabilidad osmótica en levaduras y mohos. El primer fármaco autorizado fue la caspofungina que tiene buena actividad contra *Cándida* y *Aspergillus* (Kenneth, 2011).

I.16.6 Nicomicinas: tienen un mecanismo de acción similar al de las equinocandinas. Inhiben la sintetasa de quitina, que polimeriza subunidades de N-acetilglucosamina para producir quitina. El resultado es la inhibición de la síntesis de quitina (Kenneth, 2011).

I.17 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (sensibilidad) puede determinarse en el laboratorio mediante las pruebas de susceptibilidad. Entre estas pruebas se incluyen las técnicas de difusión en placa, la dilución en caldo y el poder bactericida del suero, que es una variación del método de dilución en caldo. Dichos métodos se aplican casi exclusivamente a bacterias patógenas y drogas antibacterianas (Ingraham ,1998).

I.17.1 Método de difusión en placa: generalmente llamado técnica de kirby Bauer, determina la susceptibilidad a las drogas usando discos de papel filtro impregnado con cantidades conocidas de los agentes antimicrobianos. Para ello se inocula una placa de Petri con una bacteria, los discos impregnados con diferentes agentes antimicrobianos se colocan en su superficie. La droga difunde desde el disco a través del gel; de manera que las concentraciones más altas se encuentran en las proximidades del disco y progresivamente va disminuyendo conforme se aleja del mismo (Ingraham, 1998).

Las placas se incuban durante el tiempo adecuado para que las bacterias crezcan. Después del crecimiento algunos discos de antibióticos

estarán rodeados por un halo claro (sin crecimiento), lo cual indicara una inhibición del crecimiento bacteriano producida por el agente antimicrobiano. Si el crecimiento bacteriano se inhibe por una baja concentración de la droga, el halo será muy grande. Si el crecimiento se inhibe solamente por una concentración elevada de la droga, el halo será más pequeño. El tamaño de cada halo se mide y se compara con patrones de susceptibilidad para cada droga. A partir de esa comparación, los microorganismos se clasifican: en sensible, lo que indica una alta susceptibilidad, intermedios o resistentes frente a cada droga (Ingraham, 1998).

I.17.2 Método de dilución en caldo: estudia la susceptibilidad frente a las drogas mediante el cultivo de las bacterias en medios líquidos que contienen concentraciones progresivamente más altas de un determinado agente antibacteriano. Para ello se inoculan una serie de tubos que contienen concentraciones decrecientes de una droga en solución con la bacteria a estudiar. Después de producirse el crecimiento (algunos tubos estarán turbios) se interpretan los resultados. El crecimiento solo tiene lugar en los tubos que no contengan droga o que poseen una concentración baja, pero no en los tubos con concentraciones altas. El tubo transparente que contenga la concentración de droga más baja (máxima dilución) se corresponderá con la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la droga (Ingraham, 1998).

Esta técnica permite obtener más información si se realiza una siembra a partir de los tubos transparentes (en los cuales se han inhibido el crecimiento) en placas de Petri con un medio sin droga. Si los microorganismos no crecen en los tubos de caldo pero crecen en las placas que no contienen la droga, el agente inhibirá el crecimiento del microorganismo pero no lo matará. Esta concentración de la droga será bacteriostática. Si los organismos no crecen en la placa de Petri quiere decir que ha muerto. Esta concentración de la droga será bactericida (Ingraham, 1998).

CAPÍTULO II

II.EL PROBLEMA

II.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En el año 2014 se llevó a cabo la caracterización de los compuestos fenólicos de los frutos de *Flacourtia indica* (Burm.F.) y *Flacourtia inermis* (Roxb.). Se evaluaron cualitativamente mediante espectrometría de masas en tándem, cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas de alta resolución. Se detectaron treinta y cinco compuestos fenólicos y se caracterizaron sobre la base de su patrón de fragmentación único en el modo de iones negativos. Doce de estos se extrajeron por primera vez a partir de estas fuentes, y cuatro de ellos no fueron reportados previamente en la naturaleza. Además se logró distinguir entre la isobárica compuestos fenólicos, ácidos dicafeolquinico y glucósidos de ácido cafeoylquinic. Este es el primer reporte para la caracterización completa de los compuestos fenólicos de los frutos de *Flacourtia indica* y *Flacourtia inermis* por LC-MSN (Alakolanga y col, 2014).

En el año 2015 Sayasachi y col, describen las recientes actividades farmacológicas realizadas a *Flacourtia indica*.

Actividad hepatoprotectora; se informó que *flacourtia indica* presenta actividad hepatoprotectora en la hepatotoxicidad inducida por el metotrexato. El estudio reveló que el extracto de éter de petróleo de las partes aéreas de *flacourtia indica* en una dosis de 350mg por kilogramo de peso vía oral durante cinco días mejora significativamente el nivel de enzimas para la función hepática y estrés oxidativo (Varkey y Thomas, 2011).

Además se investigó la actividad hepatoprotectora en la hepatotoxicidad inducida por paracetamol. Se evaluó los extractos de las partes aéreas de *Flacourtia indica* usando solventes, como metanol, éter de petróleo, acetato de etilo. Obteniéndose que dichos extractos lograron reducir el nivel de ácido oxaloacético y transaminasas en suero, frente a la hepatotoxicidad inducida por paracetamol (Nazneen y col, 2009).

Actividad antioxidante; *Flacourtia indica* muestra la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, glucósidos, compuestos fenólicos, terpenoides y esteroides. Y sus extractos acuoso y metanólico presentan radicales libres y actividad antioxidante; por lo tanto se demostró que *Flacourtia indica* es un importante agente terapéutico en envejecimiento, estrés oxidativo y enfermedades degenerativas relacionadas (Tyagi y col, 2010).

Actividad antiasmática; se demostró que el extracto etanólico de las hojas de *Flacourtia indica* poseen prominente potencial contra el asma, ya que sus extractos contienen compuestos farmacológicamente activos y sus propiedades broncodilatadoras de las células de estabilización. El estudio se realizó in vitro comparando la actividad del extracto etanólico de *Flacourtia indica* y la actividad del ketotifeno fumarato (tyagi y col, 2011).

Actividad antimalárica; se informó que la antera de *Flacourtia indica* poseen una fuerte actividad antimalárica debida principalmente al poliothryoside que muestra actividad antiplasmódica contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina (Kaou y col, 2010).

Actividad diurética; se evaluó el extracto etanólico de *Flacourtia indica*, comprobándose que muestra un incremento significativo en la cantidad de orina y concentración de los iones de sodio, potasio y cloro (Ancy y col, 2013).

Actividad ansiolítica; se evaluó el extracto alcohólico de flacourtia indica mediante el método de la escalera y el método de exploración de luz y oscuros en ratones para estudiar su actividad ansiolítica. En ambos casos el extracto mostro actividad ansiolítica significativa, al ser comparado con una droga comercial; el diazepam (Gnanasekar y col, 2014).

II.2 Planteamiento del Problema

Los aceites esenciales son productos de composición generalmente muy compleja que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación. Los aceites esenciales no se encuentran prácticamente más que en vegetales superiores: existen alrededor de 17500 especies aromáticas. Los aceites esenciales pueden almacenarse en todos los órganos vegetales: en las flores, hojas, y aunque sea menos habitual en cortezas, leños, raíces, rizomas y frutos. Aunque todos los órganos de una misma especie pueden contener aceite esencial, la composición de este puede variar según su localización (Bruneton, 2001).

Desde hace medio siglo se conoce la actividad antibacteriana de los aceites esenciales; estudios demuestran que varios aceites esenciales presentan efectos antibacterianos significativos. Un aceite esencial puede variar considerablemente en su composición química, originándose, así la correspondiente carencia de uniformidad en la actividad antimicrobiana. Algunos aceites esenciales, tales como el tomillo y el clavo muestran buena actividad antimicrobiana, que generalmente se atribuye a su elevado contenido fenólico, es decir timol y eugenol (Bruneton, 2001).

Kellner y Kober en 1955 examinaron la acción antibacteriana de 175 aceites esenciales frente a 9 microorganismos y clasificaron 21 de los aceites más activos según composición química. También se encontró que los terpenos tenían buena actividad antimicrobiana (Wilkinson y Moore, 1990).

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados; alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biogenéticamente del ácido mevalónico; se les catalogan como monoterepenoides y sesquiterpenoides. Se han aislado alrededor de 12000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen solo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee actividad frente a los microorganismos; las plantas tienen una capacidad limitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados, cada uno presentando actividad antimicrobiana, frente a distintos microorganismos. Los principales compuestos con actividad antimicrobiana son: fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides (Cázares 2006).

Existe una amplia gama de plantas que han sido objeto de estudio y evaluación de actividad antimicrobiana; sin embargo miles siguen sin estudiar, siendo esta una gran alternativa a los problemas de resistencia bacteriana. En el grupo de las angiospermas la familia Flacourtiaceae es considerada como la más dificultosa, es una familia heterogénea que consiste en aproximadamente 880 especies, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en regiones tropicales del mundo. Aunque la familia Flacourtiaceae es considerada pariente de las familias Passifloreaceae y Salicaceae y comprende tantas especies como estas familias, la misma no ha sido bien estudiada y son muy pocos los botánicos que pueden identificarla, dentro de esta familia se encuentra una especie particular que recibe el nombre de Flacourtia indica o comúnmente se le conoce como ciruelo del gobernador (Bailey, 2003).

Haciendo referencia a lo descrito anteriormente se plantea la siguiente interrogante:

¿Cuál será la composición química del aceite esencial de las hojas de Flacourtia y dicho aceite tendrá actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y hongos del género Candida?

II.3 Justificación de la Investigación

Desde la antigüedad nuestros antepasados han usado plantas con fines medicinales, pues han demostrado tener sustancias capaces controlar diferentes afecciones, en la actualidad aún se emplean las plantas como alternativa para tratar un gran número de enfermedades; ya que los médicos modernos no solo se limitaron a traducir, depurar, criticar y ordenar el saber heredado acerca de los remedios vegetales, sino que lo enriquecieron ampliamente, llevando a cabo una extensa labor de herborización, recopilando nuevos remedios y ordenándolos en nuevos herbarios. Lo que permitió de esta manera estudiar con mayor exactitud las características de cada una de las plantas, y así identificar sus componentes y que beneficios presentaba cada uno de ellos. Dentro de los componentes aislados de las plantas se encuentran los aceites esenciales.

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados aromáticos oxigenados, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas, monoterpenoides y sesquiterpenoides entre otros compuestos. De los cuales se ha demostrado que tienen capacidad antimicrobiana, antifúngica y citotóxica. Por tal razón, se considera de importancia relevante aislar sustancias de plantas poco estudiadas y evaluar la composición de sus aceites y extractos para emplearlos en ensayos microbiológicos con el fin de ampliar la cantidad de antimicrobianos naturales que puedan combatir en amplio espectro a los microorganismos causantes de enfermedades, evitando los problemas de resistencia a los antibióticos y disminuyendo las enfermedades infecciosas que afectan a la comunidad en general.

II.4 Hipótesis

La especie *Flacourtia indica*, es un arbusto tropical cuyos estudios fitoquímicos y farmacológicos no son muy numerosos; sin embargo se ha demostrado sus efectos hepatoprotectores, actividad ansiolítica, actividad antimalarica y poder antiasmático. Por tal razón se considera que el aceite esencial de *Flacourtia indica* contiene metabolitos activos capaces de inhibir el crecimiento de grupos de bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas y hongos del género *Candida*.

II.5 Objetivos de la Investigación

II.5.1 Objetivo General:

Determinar la composición química y evaluar actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Flacourtia indica*. Burm. M (Flacourtiaceae).

II.5.2 Objetivos específicos:

- Recolectar e identificar la planta *Flacourtia indica*.
- Aislar el aceite esencial de las hojas de *Flacourtia indica* por hidrodestilación.
- Examinar la composición química del aceite esencial de *Flacourtia indica* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases.
- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Flacourtia indica* frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Flacourtia indica* frente a hongos del género *Candida*.
- Interpretar la actividad antimicrobiana del aceite esencial frente a grupos específicos de microorganismos: *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis.

- Hallar la concentración mínima inhibitoria en caso de que el aceite esencial de Flacourtia indica presente actividad antimicrobiana en las cepas evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

III MATERIALES Y METODOS

III.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BOTÁNICO

Se recolecto las hojas de la especie Flacourtia indica a tempranas horas de la mañana; en el jardín de plantas de medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. La misma fue identificada por el Ingeniero Juan Carmona.

III.2 PROCESAMIENTO DE LA PLANTA

Una vez recolectada la muestra hojas frescas de Flacourtia indica (aproximadamente un kilogramo) en el jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, fueron procesadas de la siguiente manera: Las hojas fueron licuadas con agua para lograr romper los órganos contentivos del aceite esencial. Una vez licuadas se colocaron en el balón de destilación, empleándose la técnica de hidrodestilación empleando la trampa de clewenger que consiste en: Un balón de destilación el cual se encuentra conectado a una manta eléctrica la cual se encargara de aportar la temperatura para lograr la ebullición, un aparato de destilación y una trampa de clewenger.

El proceso de hidrodestilación tiene un tiempo de duración aproximado de dos horas en el cual se logra obtener una fase acuosa y una fase orgánica (aceite esencial) este proceso se inicia a una temperatura de 90 grados centígrados, tomando como precaución que dentro del balón deben encontrarse las perlas de ebullición, para evitar que el proceso de ebullición sea violento.

Una vez iniciado dicho proceso el cual ocurre alrededor de los treinta minutos se disminuye la temperatura a 70 grados centígrados, permitiendo que transcurra el resto del proceso. Una vez culminado en la trampa de clewenger se observó el producto oleoso y una pequeña cantidad de agua, empleando un gotero se extrajo el aceite se leyó el volumen total que fue de 2,5mL y se almaceno en un recipiente estéril, con tapa y se llevó a refrigeración.

III.3 IDENTIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL:

Fue realizado en un cromatógrafo de gases Hewlett Parckard modelo 6980 acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Parckard modelo 5973 de columna de fenilmetil-polixisilosano de 30m de largo x 0,25 mm (HP-5). La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición. Se preparó una solución al 2% del aceite (20 uL del aceite en 1 ml de eterdietílico. Se comenzó con una temperatura inicial de 60 grados centígrados con un incremento de cuatro grados centígrados por minuto hasta 260 grados centígrados con un Split 100:1; el tiempo total de la corrida fue de 50 minutos.

III.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA:

III.4.1 Actividad antibacteriana:

III.4.1.1 Preparación de las placas

Bajo estrictas condiciones de esterilidad se preparó el medio de cultivo agar Muller Hinton empleando 7,6 gramos de agar, para la obtención de 150 mililitros; de los cuales se depositaron 15mL en cada placa de Petri (observar figura 12), las cuales permanecieron a temperatura ambiente para su solidificación teniendo en cuenta un control de esterilidad, posteriormente fueron refrigeradas.



Fig. 12. Preparación de las placas.

III.4.1.2 Preparación de los pre-inóculos

Empleando cepas conocidas american type culture collection (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) se prepararon los pre inóculos en medios de cultivo Muller Hinton a excepción de *Enterococcus faecalis* que por sus condiciones de crecimiento se repico en agar tripticosa soya.

III.4.1.3 Preparación de los inóculos

Aproximadamente 18 horas después de haber preparado los pre inóculos bacterianos, se procedió a preparar los inóculos tomando una asada de las colonias bacterianas del medio sólido y disolviéndolas en solución salina fisiológica estéril (0,85%), se comparó con el patrón de Mac Farland 0,5 que contiene aproximadamente de 6-8 unidades formadoras de colonias por cada mililitro.

III.4.1.4 Ensayos microbiológicos

Se empleó la técnica de difusión de disco en agar o método de Kirby-Bauer, para lo cual se tomó de los inóculos bacterianos material con un hisopo estéril; evitando los excesos de humedad haciendo rotar el mismo por las paredes del tubo de ensayo. Posteriormente se sembró la muestra mediante la técnica de césped o agotamiento. Una vez sembradas todas las placas con los distintos microorganismos a ensayar se colocaron los discos de papel filtro Nro 1 de manera equidistante, los mismos se impregnaron con 10 microlitros del aceite esencial y sus diluciones. Tomando en cuenta como control positivo el antibiótico respectivo para cada cepa y como control negativo un disco impregnado de dimetilsulfoxido (DMSO). Las placas posteriormente se refrigeran durante dos horas a 4 grados centígrados y luego se incuban en estufa a 37 grados centígrados durante 24 horas, como se observa en la figura 13.

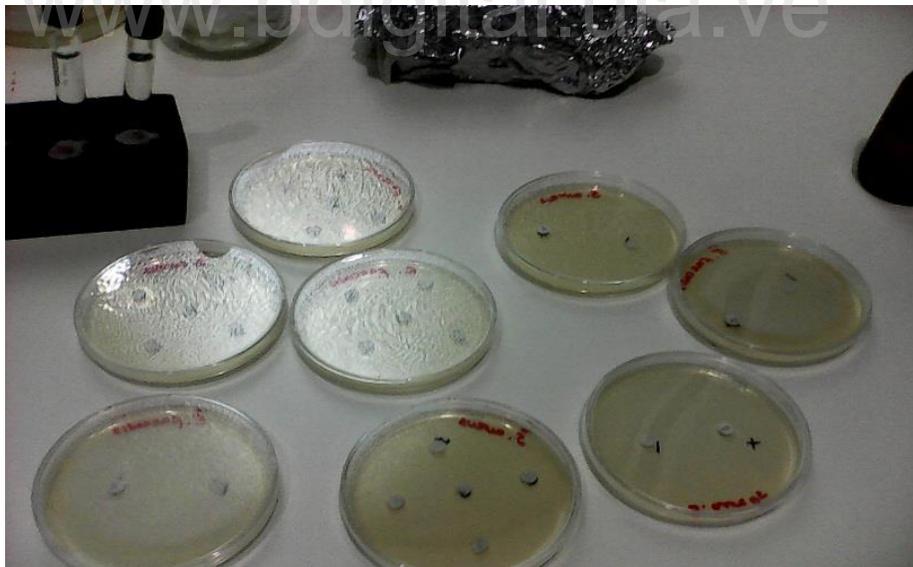


Fig. 13. Ensayos microbiológicos

En la tabla 3 se puede observar los antibióticos comerciales para cada bacteria según las indicaciones del manual del CLSI.

Tabla 3

Actividad antibacteriana controles positivos para cada cepa

Cepa ATCC	Control positivo
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Erytromicina 15 microgramos
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Ampicilina 10microgramos
Escherichia coli ATCC 25922	Amikacina 30 microgramos
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	Amikacina 30 microgramos
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Amikacina 30 microgramos

III.4.2 Actividad Antifúngica:

III.4.2.1 Preparación del medio de cultivo:

Se empleó medio de cultivo Muller-Hinton el cual fue modificado previamente con azul de metileno. Para la determinación de la actividad antifúngica la cepa repicada 12 horas antes proveniente de un agar saboraud dextrosa, fue utilizada para preparar el inóculo el cual fue comparado con el patrón 1 de Mc Farland; una vez obtenido este inóculo se procede a mezclar directamente con 15 mL del medio fundido, siguiendo las condiciones de esterilidad se envasa en una placa de Petri.

III.4.2.2 Ensayos microbiológicos:

Una vez solidificado el medio de cultivo se procede a colocar e impregnar los discos de papel filtro Nro. 1 con el aceite puro y sus respectivas diluciones, los controles positivos y el control negativo Se incuban en estufa durante 24 horas a 37 grados centígrados; una vez transcurrido este tiempo se leen los halos de inhibición y se compara con los controles positivos.

En la tabla Nro. 4 se muestran las cepas ATCC empleadas y sus respectivos controles positivos.

Tabla 4.

Controles positivos para los hongos del género *Cándida*

Microorganismo	<i>Cándida albicans</i> (ATCC 10231)	<i>Cándida krusei</i> (ATCC 6258)
Control Positivo	Fluconazol 100ug	Voriconazol 400 ug

III.3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se realizó para conocer cuál es la menor concentración del aceite que posee actividad antimicrobiana; para ello se realizan diluciones del aceite esencial de *Flacourtia indica* partiendo de una concentración inicial de 1000 microgramos por microlitro.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

IV RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 Características del aceite esencial de *Flacourtia indica*:

- Peso de las hojas: 592gramos.
- Volumen del aceite: 2,5ml
- Rendimiento del aceite: 0,42%
- Color: Amarillo.
- Olor: característico
- Aspecto: oleoso

IV.2 Composición química del aceite esencial de *Flacourtia indica*

La composición química del aceite esencial se analizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas obteniéndose un compuesto mayoritario que no logro ser identificado por las bases de datos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA representando un 22,91%; seguido de los compuestos siguientes: la atractylona (9,31%), el germacreno B (9,17%) y el mirceno (9,15%).

En la tabla Nro. 5 se muestra la totalidad de los compuestos identificados por el cromatógrafo de gases y su proporción:

Tabla 5.**Composición química del aceite esencial de Flacourtia**

PICO	T.R	% Área	Nombre Químico	IKTAB	IKCAL
1	3,91	1,45	CIS HEXENOL	859	868
2	6,72	9,15	MIRCENO	988	1004
3	7,80	6,78	SABINENO	969	1048
4	7,99	3,09	CIS-BETA-OCIMENO	1032	1055
5	8,29	6,49	TRANS-BETA-OCIMENO	1044	1066
6	18,12	1,30	EUGENOL	1356	1376
7	19,25	2,87	BETA-ELEMENO	1389	1407
8	20,13	4,63	BETA-CARIOFILENO	1417	1440
9	21,40	1,02	AROMADENEDRENO	1439	1484
10	22,01	4,25	GERMACRENO-D	1484	1504
11	22,50	22,91	NO IDENTIFICADO		1520
12	22,76	2,49	NO IDENTIFICADO		1529
13	24,28	9,17	GERMACRENO-B	1559	1575
14	24,87	5,68	ESPATULENOL	1577	1593
15	25,06	1,76	VIRIDIFLOROL	1592	1597
16	28,13	9,31	ATRACTILONA	1657	1723
17	28,23	3,35	GERMACRONA	1693	1727

Leyenda: T.R: Tiempo de retención, IKCAL: Índice de Kovats calculado,
IKTAB: Índice de Kovats tabulado

En la fig. 14 se puede observar la distribución de los componentes mayoritarios, observándose que el de mayor proporción con un porcentaje de 22,91% es el compuesto no identificado, seguido de la Atractylona con un 9,31%, el Germacreno B 9,17% y el Mirceno con un 9,15%.

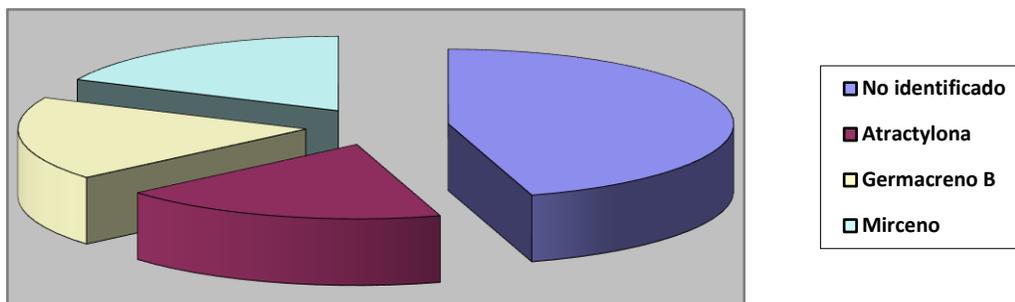


Fig. 14 Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Flacourtia indica*.

El compuesto mayoritario (no identificado) presenta el siguiente patrón de fraccionamiento: 108 (100%), 121 (42%), 93 (37%), 148 (31%) y su espectro de masa se muestra en la siguiente figura:

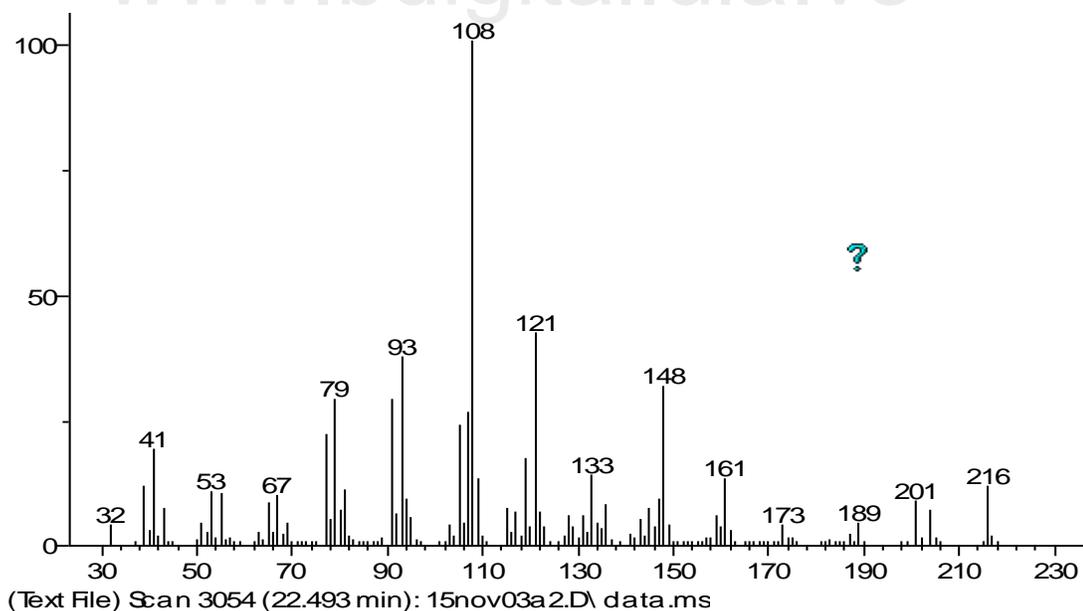


Fig. 15 Patrón de fraccionamiento del compuesto mayoritario

Evaluación del compuesto mayoritario por espectro infrarrojo: Se realizó el análisis del compuesto mayoritario por la técnica de infrarrojo, obteniéndose que es un hidrocarburo; pero el mismo no logro ser identificado. En la figura 16 se observa el espectro infrarrojo.

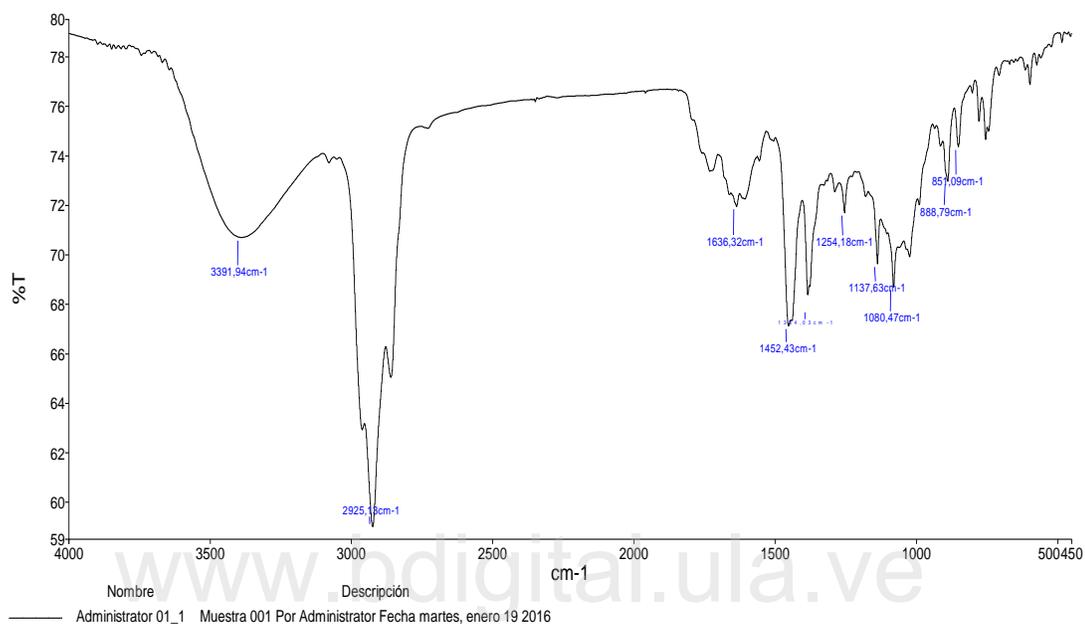
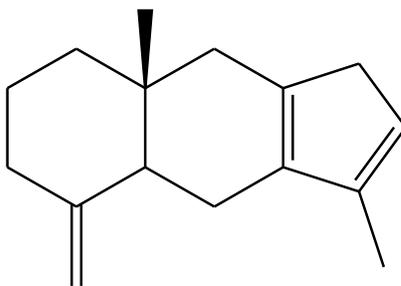


Fig. 16. Espectro infrarrojo del compuesto mayoritario.

Estructuras de los compuestos mayoritarios identificados:



Atractylona

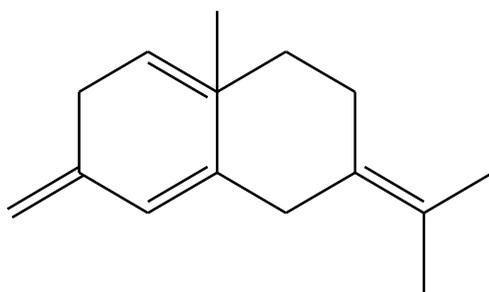


Fig. 17. Germacreno B

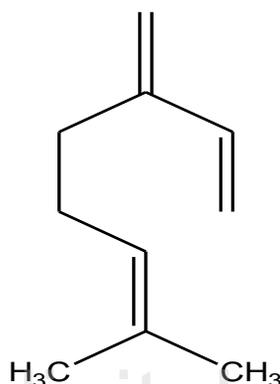


Fig. 18. Mirceno

IV.3 Actividad Antimicrobiana del aceite esencial de *Flacourtia indica*

El aceite esencial de *Flacourtia indica* fue sometido a dos estudios biológicos; se le realizó actividad antibacteriana y actividad antifúngica. Las cuales se describen a continuación:

IV.3.1 Actividad antibacteriana:

La actividad antibacteriana fue realizada contra cinco especies: 2 especies de bacterias Gram positivas y 3 Gram negativas, comúnmente causantes de infecciones nosocomiales y a nivel general. El mismo se realizó mediante la técnica de difusión del disco en agar; obteniéndose actividad antimicrobiana sólo en una cepa evaluada: *Staphylococcus aureus*.

Como se observa en la fig. 19. A la misma se le evaluó su concentración mínima inhibitoria. La tabla número 6 muestra los resultados de los ensayos antibacterianos cuando se ensayó con el aceite puro y con una concentración de 1000 ug/uL.

Tabla 6.

Actividad antibacteriana

Microorganismo	Halos de inhibición (mm)			
	Aceite concentrado	Concentración 1000ug/UI	Control Positivo	Control Negativo
Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	15mm	12mm	17mm	0mm
Klebsiella pneumoniae (ATCC 23357)	0mm	0mm	28mm	0mm
Enterococcus faecalis (ATCC 29212)	0mm	0mm	26mm	0mm
Escherichia coli (ATCC 25922)	0mm	0mm	32mm	0mm
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	0 mm	0 mm	24 mm	0 mm

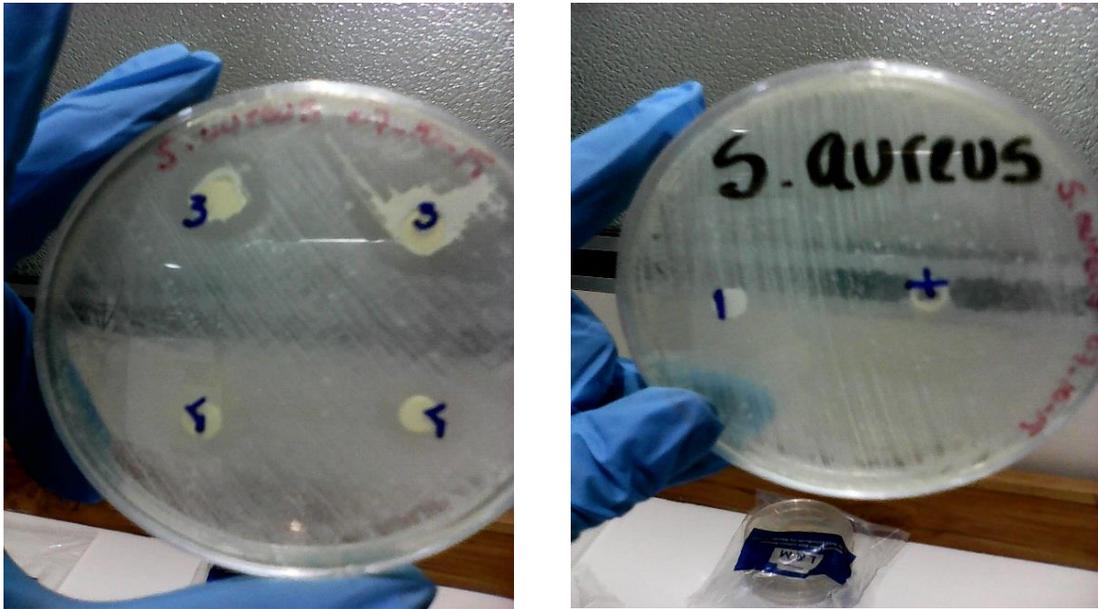


Fig 19. Actividad antibacteriana del aceite esencial de Flacourtia indica contra Staphylococcus aureus. Controles positivo y negativo.

IV.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se realizó solo a *Staphylococcus aureus* ya que fue la única cepa sensible al aceite puro de *Flacourtia indica* obteniéndose los resultados expresados en la tabla 7

Tabla 7.

Concentración mínima inhibitoria

Staphylococcus aureus	Concentraciones (ug/uL)					
	1000	500	250	125	62,5	Control positivo
Halos de inhibición (mm)	12	11	9	0	0	19

Concentración mínima inhibitoria (CMI): 250 ug/uL.

El aceite es activo frente a *Sthaphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 15 mm, siendo su concentración mínima inhibitoria de 250 ug/uL como se observa en la figura 9. En 2006 Manguna y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides en el cual se demostró que el mirceno es inactivo frente a *Sthaphylococcus aureus*, por lo que la actividad antibacteriana frente a dicho microorganismo es posible atribuirla al germacreno B. Al respecto, Mojica y colaboradores (2011) realizaron el estudio titulado “Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*”; en dicho estudio el germacreno B formo parte de los compuestos mayoritarios siendo el aceite activo frente a *Sthaphylococcus aureus* con una concentración inhibitoria mínima de 836 ug/uL, que si compara con la concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de *Flacourtia indica* presenta mayor actividad siendo su CIM menor. Puesto que en dicho estudio no se evaluó la actividad antimicrobiana de cada uno de los componentes del aceite esencial no se puede afirmar que la actividad se deba solo al germacreno B o al sinergismo de todos los compuestos que constituyen el aceite esencial.



Fig. 20. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Flacourtia indica* contra *Sthaphylococcus aureus*.

IV.4 Actividad antifúngica del aceite esencial de Flacourtia indica:

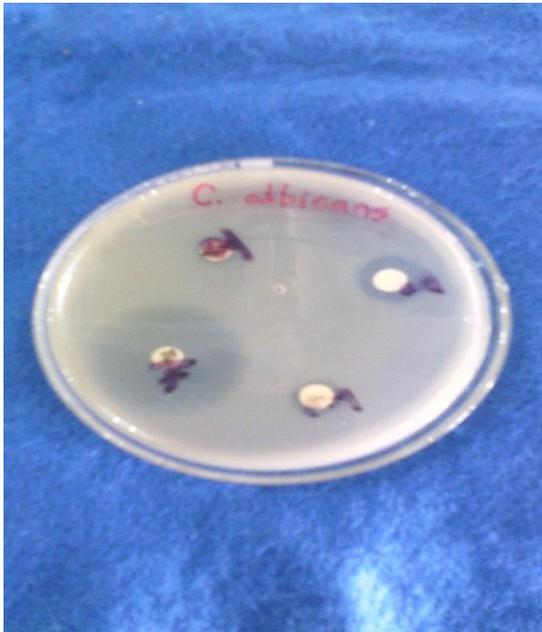
El segundo ensayo consistió; en evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de Flacourtia indica contra dos especies del género Candida. Obteniendo los resultados siguientes:

En la Tabla 8. Se puede observar que el aceite esencial de Flacourtia indica presento actividad antifúngica contra las dos cepas de Candida estudiadas siendo más sensible la cepa de Candida krusei donde se observó un halo de inhibición de 11mm, como se muestra en las figuras 10 y 11.

Tabla 8.

Actividad antifúngica del aceite esencial frente a las cepas de Candida

Hongos evaluados	Halos de inhibición (mm)	
	Aceite concentrado	Control positivo
Candida albicans ATCC 10231	9 mm	Fluconazol (100ug) 28mm
Candida krusei ATCC 6258	11mm	Voriconazol (400ug) 21mm



**Fig 21. Actividad antifúngica del aceite esencial de flacourtia indica
contra Candida albicans.**



**Fig 22. Actividad antifúngica del aceite esencial de Flacourtia indica
contra Candida krusei.**

Determinación de la concentración mínima inhibitoria:

Se realizó para las dos especies del género *Cándida* obteniéndose los resultados que se expresan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9.

Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Flacourtia indica* contra *Candida albicans*.

	Concentración	Halos de inhibición (mm)
Candida albicans	900 ug/uL	8 mm
	800 ug/uL	8 mm
	700 ug/uL	8 mm
	600 ug/uL	8 mm
	500 ug/uL	8 mm
	400 ug/uL	8 mm
	300 ug/uL	0 mm
	200 ug/uL	0 mm
	100 ug/uL	0 mm
	50 ug/uL	0 mm
	20 ug/uL	0 mm

TABLA 10.

Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Flacourtia indica* contra *Candida krusei*

	Concentración	Halos de inhibición
Candida krusei	900 ug/uL	8 mm
	800 ug/uL	8 mm
	700 ug/uL	8 mm
	600 ug/uL	8 mm
	500 ug/uL	8 mm
	400 ug/uL	8 mm
	300 ug/uL	8 mm
	200 ug/uL	8 mm
	100 ug/uL	8 mm
	50 ug/uL	8 mm
	20 ug/uL	8 mm

Frente a las especies del genero *Candida* el aceite esencial de *Flacourtia indica* se mostró activo presentando halos de inhibición de 9mm para *Candida albicans* y de 11 mm para *Candida krusei*, mostrando una buena actividad antifúngica para esta última especie puesto que es una cepa multiresistente.

Las concentraciones mínimas inhibitorias determinadas por la técnica de difusión del disco en agar como se aprecia en la figura muestra que el aceite frente a los géneros de *Candida* posee un comportamiento poco usual, ya que al realizar los ensayos de concentración mínima inhibitoria se espera que a medida que las concentraciones del aceite esencial disminuyen los halos de inhibición también lo hagan hasta que ya no se presenten; sin embargo en los ensayos realizados y comprobados debido a la incertidumbre de los resultados obtenidos se demostró que el diluyente DMSO no era el causante de los halos iguales ya que el mismo no presento ningún tipo de actividad (halo de inhibición).

Las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas fueron de 400ug/uL para *Candida albicans* e inferior a los 20 ug/uL para *Candida krusei*, como se muestra en las figuras 12 y 13. Debido a que es la primera vez que se reporta ensayos de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Flacourtia indica* no existe literatura para comparar dichos resultados por lo que se asume que este comportamiento es producto de la composición química del aceite esencial.

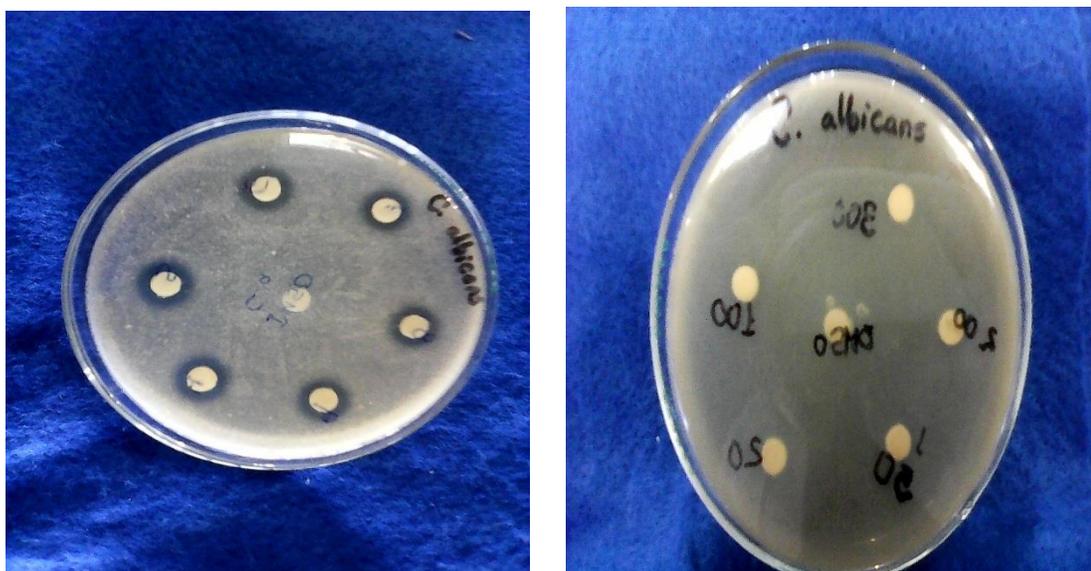


Fig. 23. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Flacourtia indica contra Candida albicans.

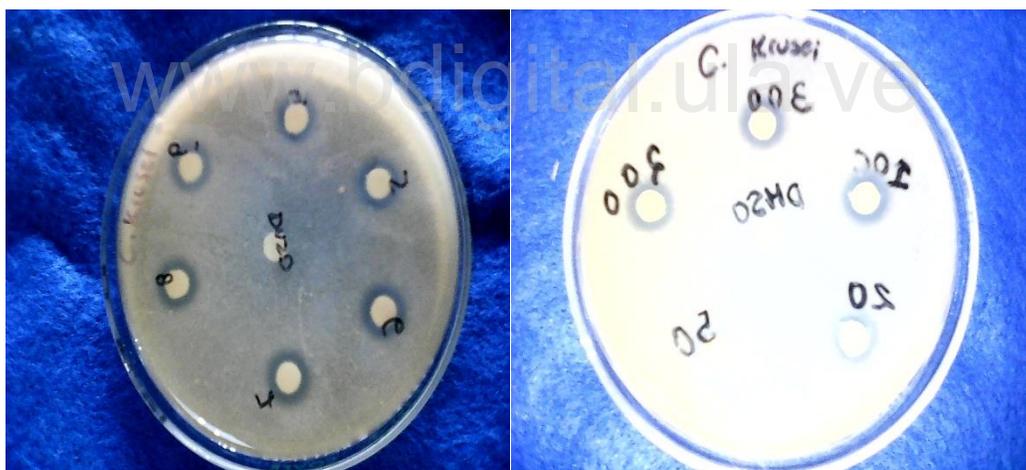


Fig. 24. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de Flacourtia indica contra Candida krusei

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Flacourtia indica* obtenido por la técnica de hidrodestilación tuvo un rendimiento de: 0.422%
- Mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se obtuvo la composición química del aceite esencial, sin embargo el compuesto mayoritario no logro ser identificado por las bases de datos de la facultad.
- El aceite esencial presento actividad frente a *Sthaphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Candida krusei* con una concentración inhibitoria mínima de 0.25 mg/mL, 400 ug/uL y menor a 20 ug/uL respetivamente.
- El aceite esencial de *Flacourtia indica* presentó un comportamiento inusual frente a las cepas del genero *Candida*, por lo que se recomienda continuar la evaluación del mismo.
- Se considera que el aceite esencial de *Flacourtia indica* posee buena actividad antimicrobiana y además es primera que se reporta dicha actividad.
- El aceite esencial de *Flacourtia indica* puede ser empleado como una fuente natural de antimicrobianos.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

- Debido a que el compuesto mayoritario no logro ser identificado por las bases de datos de la facultad ni por el espectro infrarrojo, se recomienda realizar otros ensayos que permitan su identificación.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alakolanga, A. (2014). Identificación y caracterización de los compuestos fenólicos de los frutos de *Flacourtia indica* y *Flacourtia inermis*. Revista de investigación de comida internacional, volumen 62. pag 388-396

Albornoz, A. (1980). Productos naturales (3ra edición) Pág. 5 Caracas: UCV.

Albornoz, A. (2001). Medicina tradicional herbaria (3ra edición) pág. 7 Caracas: instituto farmacoterapico latino.

Ancy, P. (2013). Actividad antidiurética de las raíces de *Flacourtia indica*. Pág. 79 Hygeia j.d med.

Aristeguieta, L. (1973). Familias y géneros de los árboles de Venezuela. Pág. 267-274. Caracas: instituto botánico.

Bailey, L. (2003). Clave para los géneros de Flacourtiaceae de Perú y del nuevo mundo. Pág. 19. Nueva York: Cornell university.

Barrios A. (1996). Bacteriología y virología básicas. Pag 32-34. Venezuela: Editorial venezolana C.A.

Bonifaz, A (2010). Micología medica básica. (3ra edición). Pag 280-281. Mexico: editorial Mc Graw Hill.

Bruneton, J. (2001). Fitoquímica de las plantas medicinales. (2da edición). Pág. 482-486. Zaragoza: editorial Acribia S.A.

Cazares, J. (2006). Actividad en *Drhosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais* de aceites esenciales de plantas para combatir insectos en Hidalgo. Pag 13-14. Pachuca de soto hidalgo.

Dominguez, X. (1973). Metodos de invesitigacion fitoquimica. Pag 229-233. Mexico: editorial limosa.

Gnanasekar N, Uma C, Narayanan N, Chamundeeswari C, Gopal T. (2014). Actividad ansiolítica de *Flacourtia indica* usando el método de la escalera y método de luz y oscuros en ratones. Pág. 29-32. Revista de química y ciencias farmaceuticas

Gomez, A y Valcarcel, M. (1988). Técnicas analíticas de separación. (3ra edición) pag 732-733. : reverté

Harris, D. (2007). Análisis químico cuantitativo. (3ra edición). Pág. 518-532. Barcelona: Reverte.

Hoyos, J. (1994). Guía de árboles de Venezuela. (3ra edición). Pág. 122. Caracas: la sallé.

Ingraham,J. (1998) Introducción a la microbiología. Barcelona: editorial reverté.

Kaou A, Mahiou-leddet V, Canlet C, Debrauwer L y Hutter S. (2010). Actividad antimalarial de las partes aéreas de *Flacourtia indica*. Revista de etnofarmacología.

Kenneth, R. (2011). Microbiología médica. (5ta edición). Pág. 539-541-542. México: Mc Graw Hill.

Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Pág. 135. Barcelona: editorial omega.

Koolman, J. (2012). Bioquímica humana (4ta edición). Pág. 252. Madrid: editorial medica panamericana.

Manguna, F. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Pág. 3. Universidad nacional del nordeste.

Medina,J. (2000). Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones. (2da edición). Pág. 59-60. Madrid: ediciones Díaz santos.

Mojica, S. (2011). Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes de *Calycolpus moritzianus*. Revista de la facultad de ciencias básicas (vol 9). Pag 9.

Murray, P. (2009). Microbiología médica (7ma edición).199-208, 333. España: elsevier.

Nazneen M, Mazid M, kundu J, Bachar S, Rashid M y Datta B. (2009). Efectos protectores de los extractos obtenidos de las partes aéreas de *Flacourtia indica* en la hepatotoxicidad. inducida por paracetamol. Pag 1-6. Revista JTUSCI, volumen 2.

Negrón, M. (2009). Microbiología estomatológica. Pág. 79. Buenos aires: editorial medica panamericana.

Olaya, M. (2003). Guía de plantas y productos medicinales. Pág. 17-18 Bogota: serie de ciencia y tecnología.

Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales aromas y perfumes. (1era edición). Pág. 24: copyright Aiyama.

Prats, G. (2012). Microbiología y parasitología médicas. Pág. 146-154. Madrid: Editorial medica panamericana.

Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana (3ra edición). Pág. 1091-1094. México: editorial medica panamericana.

Stevens, C. (2001). Flora de Nicaragua. Pág. 108. San Luis: Missouri Botanical Garden Press.

Tyagi S, Rakshit, Singh A, Raghvendra, Saxena y Patel B. (2010). Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de *Flacourtia indica*. Pág. 201-206. Revista

Tyagi S, Singh D, Yadav I (2011). Potencial antiasmático de *Flacourtia indica*. Pág. 201-201. Revista.

Varkey, J y Thomas J, (2011). Efectos protectores de *Flacourtia indica* en la hepatotoxicidad inducida por metotrexate. Pág. 112-123. Revista internacional de avances en ciencias farmacéuticas.

Wilkinson, J y Moore, J. (1990). *Cosmetología de Harry*. Pág. Madrid: ediciones Díaz Santos.

www.bdigital.ula.ve



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CATEDRA DE BIOQUÍMICA

La Bachiller Eily Llibeht Morillo Martínez, C.I: 20.766.612 y el jurado nombrado y aprobado por Consejo de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis para evaluar el Trabajo de Grado "Composición Química y Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de *Flacourtia indica* (Burm. F.) Flacourtiaceae" presentado por la Bachiller anteriormente mencionada, expresamos **ser responsables de la sistematización metodológica del mismo.**

Para tal efecto, firmamos en Mérida, 06 de octubre del 2016.

Dr. Luis Rojas (Jurado)

Magister por la Universidad de Los Andes, Doctor por la Universidad De Bordeaux, Francia. Actualmente Director del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Autor de más de 120 publicaciones nacionales e internacionales. Responsable de proyectos Nacionales e Internacionales (Fonacit, CDCHT). Tutor de tesis de pregrado de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y de la Facultad de Ciencias, Tutor de tesis de maestrías y Doctorado (PQM- ULA, PIQA-ULA). Reconocimiento Científico por el PEI-Oncti, nivel C, PEI-ULA.

Dra. Diolimar Buitrago (Jurado)

Magister por la Universidad de Los Andes, Doctora por la Universidad de Los Andes. Actualmente Coordinadora (E) del postgrado de Química de Medicamentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. (ULA). Autora de más de 20 publicaciones nacionales e internacionales. Responsable de proyectos Nacionales (CDCHT-ULA y ONCTI). Tutora de tesis de pregrado de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis desde el año 1997, Tutora de tesis de maestrías (PQM-ULA). Reconocimiento Científico por el PEI-Oncti, nivel B, PEI-ULA.

Dra. María Eugenia Lucena (Tutora y jurado)

Magister por la Universidad de Los Andes, Doctor por la Universidad de Oviedo, España. Autora de más de 20 publicaciones nacionales e internacionales. Responsable de proyectos Nacionales (CDCHT-ULA y ONCTI). Tutor de Tesis de pregrado de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Co-tutora de tesis de Doctorado (Ciencias Aplicadas. Facultad de Ingeniería). Reconocimiento Científico por el PEI-Oncti, nivel A 2 PEI-ULA.

Br. Eily Llibeht Morillo Martínez (Autora)

