



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Libanothamnus occultus***

(ASTERACEAE)

www.bdigital.ula.ve

REALIZADO POR:

BR. OLMEDILLO, MARÍA D.

C.I.: V- 19.101.986

TUTOR: PROF. ROJAS, LUIS

MÉRIDA, SEPTIEMBRE DE 2016



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL *Libanothamnus occultus*

(ASTERACEAE)

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de

Licenciada en Bioanálisis

REALIZADO POR:

BR. OLMEDILLO, MARÍA D.

C.I.: V- 19.101.986

TUTOR: PROF. ROJAS, LUIS

MÉRIDA, SEPTIEMBRE DE 2016

DEDICATORIA

A Dios y a mi abuelita Lina Aura, por ser mis guías espirituales en este camino.

A mis padres, por ser mi apoyo incondicional. Los Amo.

A mis hermanos, primos, sobrinos y tíos, por estar siempre en cada momento.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Investigación Dr. Alfredo Nicolas Usubillaga Del Hierro de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por abrirme las puertas para realizar esta investigación.

A los Laboratorios de Micología Dr. Cortado Capetti y Microbiología por las cepas aportadas.

Al Prof. Luis Rojas y Dra. Rosa Aparicio, por su ayuda incondicional, paciencia y disponibilidad en ayudarme.

A las Profesoras María Eugenia Lucena y Clarita Díaz, por su colaboración brindada.

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL *Libanothamnus occultus* (ASTERACEAE)

Mérida – Venezuela

Trabajo de Grado

Realizado Por:

Br. Olmedillo, María D.

C.I.: V- 19.101.986

Tutor: Prof. Rojas, Luis

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la extracción, análisis y determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Libanothamnus occultus*. Estudios fitoquímicos y farmacológicos han revelado que esta especie presenta efecto antimicrobiano. La planta utilizada para el estudio fue recolectada en la localidad del Páramo El Batallón, ubicada en la vía a la localidad de Bailadores, estado Mérida.. La extracción del aceite se realizó utilizando la técnica de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger. Los componentes del aceite fueron separados en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, marca Hewlett Packard 6890 equipado con una columna capilar HP-5, y fueron identificados empleando la base de datos Willey Ms data Library 6 th, y con el cálculo de los índices de Kováts. Los compuestos químicos mayoritarios del aceite esencial resultaron ser: α -pineno (34,84 %), mircenolol (16,56 %), β -pineno (13,16 %), α -felandreno (10,77 %), *p*-cimeno (5,44 %), α -tujeno (5,15 %), germacreno D (4,23 %), Δ -3-careno (2,29 %). La evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite se realizó mediante la técnica de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer). De las seis cepas ensayadas resultaron ser sensibles al aceite esencial *E. coli* y *S. aureus*. Se atribuyó la actividad antimicrobiana de dicho aceite a su compuesto mayoritario, el α -pineno, ya que el mismo posee reportada actividad inhibitoria contra hongos y bacterias.

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, aceite esencial, *Libanothamnus occultus*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	iii
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO TEÓRICO	3
Aceites Esenciales	3
Técnicas de extracción	4
Técnicas de análisis	6
Fundamento	9
Cálculo de índice de retención de Kováts	9
Micosis Oportunistas	10
Candidiasis	10
Taxonomía del género Cándida	11
Morfología	11
Epidemiología	12
Enfermedades clínicas	14
Diagnóstico del laboratorio	15
Tratamiento, prevención y control	15
Mecanismo de acción de los antifúngicos	16
Acción de los antifúngicos sobre la membrana celular del hongo	16
Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo	17
Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica	18
Bacterias	19
Acciones patógenas de las bacterias	21

Pruebas de susceptibilidad	22
Métodos para determinar la actividad antimicrobiana	22
Susceptibilidad por difusión en disco	24
Método de difusión en pozo	25
Familia Asteraceae	25
Estudios Previos Realizados	25
Distribución característica de las Asteraceae	26
Clasificación Botánica	28
La Sub-familia de las Asteraceae	29
Tribu de las Helenieae (trasladado a Heliantheae)	30
Tribu de las Heliantheae	30
Importancia de las Asteraceae	30
Constituyentes químicos de la familia Asteraceae	31
Los Flavonoides	32
Lactonas sesquiterpénicas	34
Diterpenos	35
Triterpenos	36
Poliacetilenos	37
Derivados del ácido cafeico	38
Los alcaloides	38
Los aceites esenciales en la familia Asteraceae	39
Género <i>Libanothamunus</i>	40
3.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	42
4.- FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	45
5.- JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	46
6.- HIPÓTESIS	47
7.- OBJETIVOS	48
Objetivo General	48

Objetivos Específicos	48
8.- MATERIALES Y MÉTODOS	49
Materiales	49
Material vegetal	49
Cepas microbiológicas	49
Reactivos	49
Equipos e instrumentación	50
Metodología	51
Identificación y preparación del material vegetal	51
Separación e identificación de los componentes volátiles del aceite esencial de <i>Libanothamnus occultus</i> (Asteraceae)	51
Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial <i>Libanothamnus occultus</i> (Asteraceae)	52
Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial <i>Libanothamnus occultus</i> (Asteraceae)	53
Preparación de la dilución madre del aceite esencial a utilizar en el ensayo	55
9.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
10.- CONCLUSIONES	62
11.- BIBLIOGRAFÍA	63
12.- ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	Técnica de Hidrodestilación	6
2	Cromatógrafo de gases	8
3	Estructura de las bacterias	21
4	Capítulo de las compuestas (Asteraceae)	27
5	Flavonoides y flavonas encontrados en la familia Asteraceae	33
6	Flavonoles metoxilados aislados de Asteraceae	34
7	Biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas	35
8	Diterpenos aislados de Asteraceae	36
9	Triterpenos aislados de Asteraceae	37
10	Poliacetilenos encontrados en numerosas especies	38
11	Derivado del ácido caféico, ácido chicórico	38
12	Alcaloides encontrados en Asteraceae	39
13	Terpenos encontrados en Asteraceae	40
14	Representación de la ubicación de los discos impregnados	54
15	Estructura química de los componentes mayoritarios aislados	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Pág.
1	Mecanismo de acción de los antifúngicos	19
2	Situación de la familia Asteraceae en la sistemática botánica	28
3	Sub-familias y tribus de la familia Asteraceae	29
4	Uso terapéutico de algunas Asteraceae	31
5	Taxonomía de los <i>Libanothamus</i>	41
6	Componentes Químicos Aislados Del Aceite Esencial <i>Libanothamnus occultus</i> (Asteraceae)	60
7	Actividad antibacteriana del aceite esencial <i>Libanothamnus occultus</i> (Asteraceae)	61

www.bdigital.ula.ve

1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son especies vegetales cuya aplicación se deriva de un definido resultado que corrige una patología presente en el organismo humano, la milenaria experiencia sobre su uso, enseña que la efectividad no depende exclusivamente del producto; es decir, no solo de sus principios activos según la química, sino también y con la misma importancia, de su separación y posibles combinaciones [1].

Dependiendo de la familia a la que pertenece la planta, los aceites volátiles pueden estar presentes en estructuras secretoras especializadas tales como pelos glandulares, células parenquimales modificadas, vasos secretores, canales lisígeros, o encontrarse en las resinas [2].

Los aceites esenciales cumplen una labor de gran importancia en las plantas. Se dice que estos compuestos han sido creados en el laboratorio químico de la naturaleza para proteger y prolongar la vida de la planta, ya que a menudo constituyen un medio de defensa frente a depredadores, actuando como repelentes de insectos, microorganismos, hongos y animales herbívoros, previniendo así la destrucción de flores y hojas; otras veces, las esencias de flores y del polen actúan como hormona de polinización, atrayendo a las abejas y otros insectos, ayudando en la fertilización cruzada de ciertas plantas [3].

En la actualidad, el mercado mundial de los aceites esenciales (AE) ha experimentado un aumento, como consecuencia del cambio de patrones en el consumo debido a la tendencia de la utilización de productos naturales [4].

El término aceite esencial (AE) o esencia, es utilizado para referirse a sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, (productos de composición generalmente muy complejas), que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación, las cuales presentan

características lipofílicas, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, que se producen y se almacenan en los canales secretores de las plantas que son obtenidos a partir de diferentes partes de la misma a través de métodos como destilación en corriente de vapor de agua, y que llevan en sí misma la huella, olor y sabor, del material vegetal del que proceden. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire [5].

En el caso de *Libanothamnus occultus* no se han realizado investigaciones previas sobre la acción antimicrobiana de dicho aceite esencial, por lo que es importante establecer la actividad farmacológica, para lograr pronosticar su utilización en el desarrollo de medicamentos.

www.bdigital.ula.ve

2.- BASES TEÓRICAS

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son utilizados para referirse a sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, que se encuentran en los vegetales y están constituidos por alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas, estos son obtenidos por diferentes métodos, como destilación en corriente de vapor de agua, y que llevan en sí el mismo olor y sabor, del material vegetal del que proceden. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición de aire [6]. Estos aceites poseen una química que consiste en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas como: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400Da y presión de vapor suficientemente alta para volatizarse a temperatura ambiente. Por lo general los aceites volátiles son incoloros, en especial son frescos, pero con el tiempo pueden oxidarse y resinificarse. Su color se oscurece y por esta razón debe almacenarse en lugares frescos, secos y en recipientes de vidrio color ámbar, herméticamente cerrados [7].

Según la familia de plantas que se trate, los aceites esenciales están en estructuras secretorias especializadas, como pelos glandulares (Labiadas), células modificadas del parénquima (Piperáceas), tubos oleíferos, llamados vitas (Umbelíferas), o canales lisígenos o esquizógenos (Pináceas, Rutáceas). Pueden formarse directamente en el protoplasma, por descomposición de la capa resinógeno de la pared celular, o por hidrólisis de ciertos glucósidos [5].

Técnicas de extracción de aceites esenciales

- **Extracción por presión:** Generalmente se utilizan prensas de rosca con las que se obtienen mayor rendimiento en aceite que con las antiguas prensas hidráulicas. Antes de ser prensadas, las semillas oleaginosas ricas en proteínas sufren una cocción a 90 °C que libera aceite al romper las estructuras celulares y coagular las proteínas. La cocción suele ir seguida de un secado rápido [5].

- **Extracción por disolventes:** Este tipo de extracción se puede aplicar tanto a las semillas intactas como a las desengrasadas parcialmente mediante prensado. El disolvente generalmente hexano (65 °C) se vierte sobre las semillas limpias, decorticadas y groseramente trituradas. Se recupera así una fase orgánica, disolución del aceite en el disolvente –la miscela- y una harina desengrasada embebida de disolvente. Las instalaciones industriales generalmente funcionan según un esquema de contracorriente. La proporción de recuperación del aceite varía del 95 al 99 % [5].

- **Método de Enflourage:** En el método de enflorado o enflourage, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa [5].

- **Método de extracción con fluidos Supercríticos:** El método de extracción con fluidos supercríticos, es una de las técnicas más recientes. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico. Las esencias son solubilizadas y arrastradas, donde el líquido supercrítico actúa como solvente extractor, eliminándose por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, finalmente obteniendo una esencia pura [5].

- **Por hidrodestilación:** Es un proceso muy limpio, de alto rendimiento, que permite obtener un aceite de alta pureza y no requiere tecnología sofisticada, por lo que es muy utilizado a nivel industrial, además permite trabajar con volúmenes grandes de materia prima y la extracción se realiza a temperatura de ebullición. Esta técnica sirve fundamentalmente para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otros productos no volátiles presentes en la mezcla [8] (Ver Figura 1).

- **Por vapor de agua:** Es una técnica aplicada en la separación de sustancias poco solubles en agua. La destilación por arrastre de vapor se emplea para separar una sustancia de una mezcla que posee un punto de ebullición muy alto y que se descomponen al destilar. También se emplea para purificar sustancias contaminadas por grandes cantidades de impurezas resinosas y para separar disolventes de alto punto de ebullición de sólidos que no se arrastran [6].

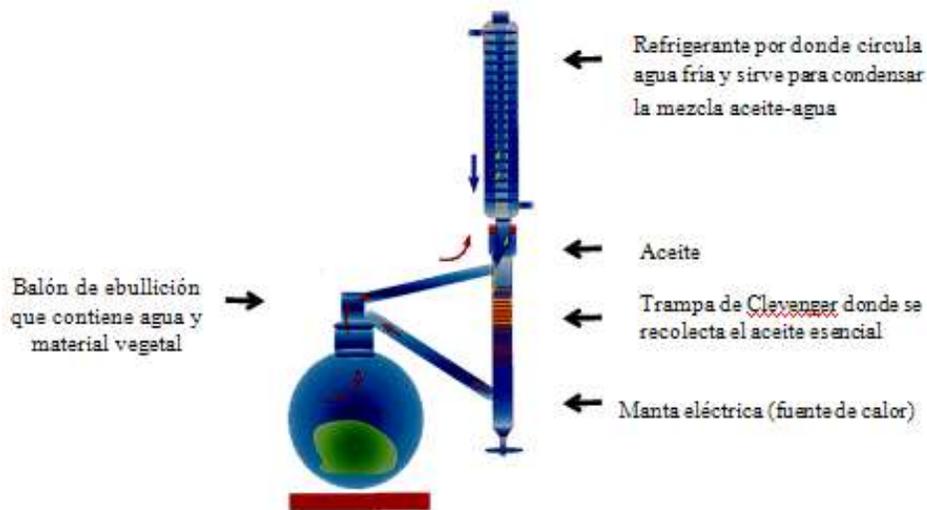


Figura 1. Técnica de Hidrodestilación [8].

Técnicas de análisis

- **Cromatografía en capa fina (TLF)**: Es una variante de la cromatografía en columna o en papel; la fase fija está formada por una capa uniforme de adsorbente, que sirve como soporte de la fase estacionaria, es uniformemente esparcida sobre una placa de vidrio, plástico o aluminio sobre la cual es aplicada la muestra y ésta se moverá a través de la placa mediante un disolvente (fase móvil), produciéndose la separación de los componentes según su mayor o menor afinidad por cada una de las fases. Tiene como ventaja la rapidez del desarrollo y versatilidad de las operaciones que sobre el estrato fino pueden hacerse. Por esta técnica pueden ponerse en práctica cromatografía de intercambio iónico, permeación de gel y la bioafinidad. La fase fija se adhiere a una placa rígida, generalmente de vidrio [9].

Las placas para capa fina se pueden obtener de fuentes comerciales o preparadas en el laboratorio. El espesor de la capa del disolvente varía entre 100-250 μm , con un tamaño de partículas entre 5-20 μm . los sólidos adsorbentes más utilizados son: Silica gel: la cual se emplea para la

separación de alcaloides, esteroides, aminoácidos, aniones, cationes inorgánicos, terpenos, ácidos grasos, etc; alumina: utilizada para alcaloides, esteroides, vitaminas; y otros como polvo de celulosa, almidón, sephadex, etc [9].

El tipo de disolvente a usar en la fase móvil es determinante para lograr una buena separación, la regla general al elegir un disolvente de la misma polaridad al de la sustancia a separar. Para facilitar la elección del disolvente, se ha clasificado en una serie eluotrópica, tomando en cuenta su poder de elución, constante dieléctrica y capacidad para formar puentes de hidrogeno [9].

- Cromatografía de gases (CG): Es una técnica apropiada para la separación de gases y líquidos volátiles o sólidos en estado gaseoso [10].

Una pequeña muestra del material a separar se inyecta en la corriente de un gas inerte tal como: nitrógeno, hidrógeno, dióxido de carbono, argón o helio, que corre hasta una columna conteniendo un medio apropiado capaz de ir retardando el flujo de manera gradual de cada uno de los componentes individuales de la muestra que fluye a través de la columna [10] (Ver Figura 2).

Los componentes separados emergen a intervalos discretos (especifico de cada componente) y pasan al detector. Los análisis de gases se llevan a cabo en columnas de adsorción o en columnas de reparto (cromatografía gas-sólido) [10].

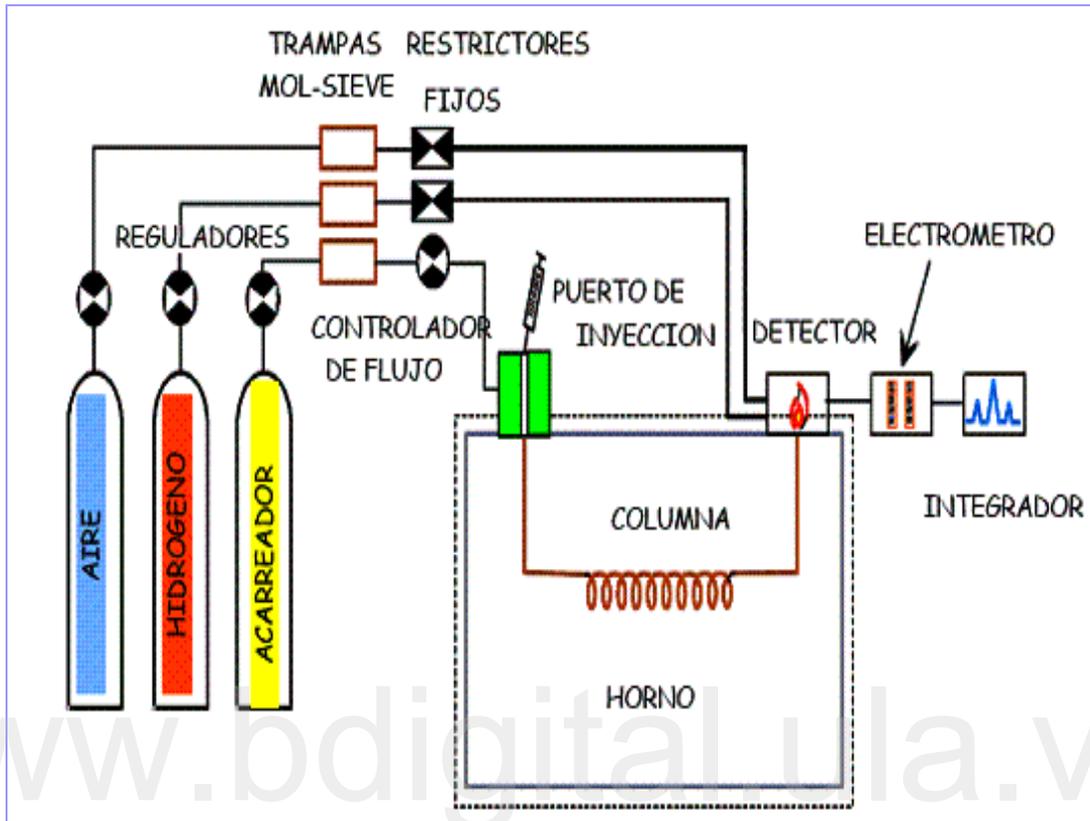


Figura 2. Cromatógrafo de gases. [10]

- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM): Esta cromatografía es exactamente igual a la descrita en el párrafo anterior pero es acoplada a un detector de masa los cuales son obtenidos por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa carga. Los espectros que salen de la columna cromatográfica, son almacenados en un ordenador para el subsiguiente procesado. La ventaja de esta técnica es la identificación de los componentes con ayuda de bases de datos, como por ejemplo, la base de datos de Wiley. Esta técnica es llevada a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas [11].

Fundamento

El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara que ionización de un espectrómetro de masas. Sin embargo, en el caso de columnas rellenas así como en las columnas megacapilares ha de emplearse un separador de chorro, para eliminar la mayor parte del gas portador que acompaña al analito. En este dispositivo, la salida de gases fluye a través de la boquilla de un separador de chorro de vidrio, el cual aumenta el momento lineal de las moléculas más pesadas del analito, de tal forma que el 50 por 100 o más de éstas se desplazan aproximadamente en línea recta hacia el conducto colector de salida. Por el contrario, los átomos de helio ligeros se desvían por el vacío y son succionados hacia el exterior. [11].

La mayoría de los espectrómetros de masas cuadrupolar y de sector magnético se suministran con los accesorios necesarios para ser acoplados a un equipo de cromatografía de gases [11].

Cálculo de índice de retención de Kováts:

El índice de retención de Kováts o índice de retención es un método de cuantificación de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla [12].

El método aprovecha la relación lineal entre los valores del logaritmo del tiempo de retención, $\log (t_r')$, y el número de átomos de carbono en una molécula. El valor del índice de Kováts suele representarse por (I) en las expresiones matemáticas. Su aplicación se limita a los compuestos orgánicos [12].

Para la cromatografía isotérmica, el índice de Kováts viene dado por la ecuación:

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{desconocido})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

Dónde:

I = índice de retención de Kováts

n = número de átomos de carbono en los alcanos más pequeños

N = número de átomos de carbono en los alcanos más grandes

tr' = tiempo de retención ajustado [12].

Micosis Oportunistas

Candidiasis

Se ha determinado que las especies del género *Candida* conforman el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas. Las especies de este género constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas (adquiridas en el hospital) superan a cualquier patógeno gramnegativo individual, caso clínico en la actualidad la frecuencia de infecciones nosocomiales septicémicas por *Candida* se ha incrementado a un ritmo constante en hospitales de cualquier tamaño y en todos los grupos de edades [13].

Se encuentran descritas más de 100 especies del género *Candida*, aunque tan sólo un pequeño número de ellas se han implicado en infecciones clínicas. *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa un 90 % y un 100 % de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50 % y 70 % de las cepas procedentes de pacientes de infecciones nosocomiales septicémicas. Alrededor de un 95 % de estas últimas corresponde a cuatro especies:

C. albicans, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*. De ellas, *C. glabrata* es la única especie que se considera “emergente” como causa de infecciones nosocomiales septicémicas, debido, en parte, a su resistencia intrínseca y adquirida a los azoles y otros antifúngicos empleados de forma frecuente. El 5 % restante de infecciones nosocomiales septicémicas por *Candida* engloba entre 12 y 14 especies diferentes, como *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* y *C. rugosa*. Aunque estas especies se consideran causas “infrecuentes” de candidiasis, se ha observado que varias de ellas se reúnen en grupos nosocomiales o bien presentan una resistencia innata o adquirida a uno o más fármacos antifúngicos conocidos [13].

Taxonomía: Del género: *Candida*

Reino: Fungi
Filo: Deuteromiceta
Subfilo: Saccharomycotina
Clase: Saccharomycetes
Orden: Saccharomycetales
Familia: Saccharomycetaceae
Género: *Candida*
Especie: *C. albicans*

Morfología

Todas las especies del género *Candida* se desarrollan como células levaduriformes ovaladas o redondas (3 a 5 micras) que forman yemas o blastoconidias. Con excepción de *C. glabrata*, las especies de *Candida* producen también pseudohifas e hifas verdaderas. Por otra parte, *C. albicans* genera tubos germinales y clamidoconidias terminales de pared gruesa. *C. glabrata*, la segunda especie más frecuente de *Candida* en numerosas

situaciones, carece de capacidad de originar pseudohifas, tubos germinales o hifas verdaderas en la mayoría de las condiciones. En los cortes histológicos, las especies de *Candida* se tiñen débilmente con hematoxilina-eosina (H-E) e intensamente con las tinciones de ácido periódico de Schiff (PAS), metenamina argéntica de Gomori (GMS) y Gridley [13].

En condiciones *in vitro*, casi todas las especies de este género dan lugar a colonias lisas en forma de domo de color blanco a crema. *C. albicans* y otras especies pueden sufrir modificaciones fenotípicas, en las que una cepa de *Candida* se transforma de manera reversible en alguna de varias morfologías diferentes que comprenden desde la típica colonia lisa blanca formada principalmente por células levaduriformes de gemación a colonias muy “peludas” o “vellosas” compuestas fundamentalmente por pseudohifas o hifas. La frecuencia del fenómeno de cambio fenotípico es excesivamente alta para deberse a mutaciones génicas y demasiado baja para serlo a conversiones en masa en las que la totalidad de la población modificaría su fenotipo como respuestas a señales ambientales [13].

Epidemiología

Las especies del género *Candida* colonizan al ser humano y otros animales de sangre caliente, por lo que se encuentra tanto en personas como en los ambientes naturales. El lugar primario de colonización es el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la vagina, uretra, piel, bajo las uñas de pie y la mano. Se ha detectado la presencia de *C. albicans*, el principal agente etiológico de enfermedad en el ser humano, en el aire, en el agua y el suelo, además en el ser humano y los animales [13].

La principal fuente de infección causada por *Candida* (desde la enfermedad mucosa cutánea superficial hasta la diseminación hematógene) es el propio paciente. Es decir, la mayoría de los tipos de candidiasis

representa una infección endógena en que la microflora comensal aprovecha la “oportunidad” para producir una infección. Para ello, debe existir una deficiencia en las barreras de anfitrión frente a *Candida*, la transferencia del microorganismo desde la mucosa digestiva hasta el torrente circulatorio exige la proliferación excesiva de las levaduras en su nicho comensal junto a un fallo de la integridad de la mucosa digestiva [13].

Entre las distintas variedades de *Candida* con capacidad de infectar al ser humano, *C. albicans* predomina en casi todos los tipos de infección. Esta especie suele estar implicada en casi todas las infecciones en localizaciones genitales, cutáneas y bucales [13].

El abanico de especies capaces de producir infecciones nosocomiales septicémicas es más amplio y, aunque *C. albicans* suele ser el género más predominante, la frecuencia de aislamiento de cada especie de *Candida* varía considerablemente en función de la edad del paciente y la situación local, regional o global. Mientras que *C. albicans* y *C. parapsilosis* son imperantes en la etiología de infecciones nosocomiales septicémicas en lactantes y niños, en las personas de mayor edad se observa una disminución de las infecciones por ambas especies en paralelo a un notable incremento a *C. glabrata* [13].

El número y los tipos del género que producen infecciones pueden verse influidas por numerosos factores, como pueden ser por ejemplo la edad del paciente, el aumento de la inmunodepresión, la exposición a fármacos o las diferencias existentes en los procedimientos de control de las infecciones. Cada uno de estos factores, tanto de forma independiente como combinada, puede incidir en la prevalencia de las distintas especies de *Candida* en cada centro hospitalario. Por ejemplo, la utilización de azoles (p.ej., fluconazol) como profilaxis antimicótica puede elevar la probabilidad de infecciones por *C. glabrata* y *C. krusei*, las cuales presentan menor sensibilidad a esta clase de antifúngicos [13].

Enfermedades Clínicas

Las variedades del género *Candida* pueden producir una infección clínica en prácticamente cualquier sistema orgánico. El espectro de infecciones abarca desde la enfermedad mucosa y cutánea superficial hasta la diseminación hematológica extensa con afectación de órganos diana como hígado, el bazo, el riñón, el corazón y el cerebro [13].

Las especies de género *Candida* pueden originar infecciones cutáneas localizadas en zonas en las que la superficie cutánea está obstruida y húmeda (por ejemplo, ingle, axilas, espacios interdigitales de los pies, pliegues mamarios) [13].

La candidiasis mucocutánea crónica es un trastorno infrecuente caracterizado por una deficiencia en la capacidad de la respuesta de los linfocitos T frente a *Candida*, entre las que se encuentran la afectación ungueal extensa y la vaginitis. Las lesiones pueden adoptar un tamaño relativamente grande y un aspecto granulomatoso deformante [13].

La candidiasis hematológica puede ser aguda o crónica, su comportamiento afecta por la diseminación de la infección a tejidos profundos, como las vísceras abdominales, el corazón, los ojos, los huesos y las articulaciones, y el cerebro. La candidiasis hepatoesplénica crónica se produce con posterioridad a un episodio de fungemia inadvertida y se manifiesta por fiebre, la elevación de fosfatasa alcalina y la presencia de numerosas lesiones en el hígado y en el bazo [13].

La candidiasis del sistema nervioso central (SNC) puede tener lugar como consecuencia de una enfermedad hematológica o bien asociarse a intervenciones neuroquirúrgicas y derivaciones ventriculoperitoneales. Este proceso puede remedar la meningitis bacteriana y su evolución puede ser indolente o crónica [13].

Diagnóstico del laboratorio:

Para el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis es necesaria la obtención de material clínico adecuado para su estudio mediante microscopia directa y cultivo. Las muestras de raspado de las lesiones de mucosas o cutáneas se pueden examinar directamente después de ser tratadas con hidróxido de potasio (KOH) al 10 % o al 20 % que contenga blanco cal o flúor. Las formas levaduriformes de gemación y las pseudohifas se detectan con facilidad por medio de la microscopia de fluorescencia [13].

Los cultivos en medios microbiológicos estándares se emplean con la finalidad de aislar el microorganismo para su posterior identificación a nivel de especie. Con una frecuencia constante, estas muestras se inoculan directamente en un medio cromogénico selectivo, como CHRO-Magar, el cual hace posible la detección de la presencia de varias especies de *Candida* en la muestra y su rápida identificación en función a sus características morfológicas [13].

Los marcadores inmunológicos, bioquímicos y moleculares no son todavía adecuados para la utilización en el diagnóstico clínico de rutina [13].

Tratamiento, prevención y control:

Las infecciones mucosas y cutáneas se tratan por medios de diversas cremas tópicas, lociones, pomadas y supositorios que contienen diversos fármacos antifúngicos del grupo de los azoles. Los tratamientos sistémicos por vía oral se basan en la administración de fluconazol o itraconazol [13].

Fluconazol es un fármaco eficaz cuando se administra por vía intravenosa en el tratamiento de la candidemia en pacientes no neutropénicos. Los sujetos que sufren una candidemia durante la prolapia con fluconazol y las personas con una infección comprobada con *C. krusei* y *C. glabrata* resistente a fluconazol necesitan un tratamiento con anfotericina B

(formulación convencional o lipídica) o una equinocandida (anidulanfungina, caspofungina o micafungina) [13].

Al igual que sucede en la mayoría de los procesos infecciosos, la prevención es preferible que el tratamiento de una infección establecida por *Candida*. Es preciso evitar los antimicrobianos de amplio espectro, manipular cuidadosamente los catéteres, y cumplir de forma rigurosa las directrices de control de infecciones. Se ha comprobado que la disminución de la colonización asociada a la proxis con fluconazol es eficaz cuando se emplea en grupos específicos de altos riesgos, como los pacientes receptores de un trasplante hepático [13].

Mecanismo de Acción de los Antifúngicos

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro están relacionadas con hongos patógenos [14].

El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico [14] (Ver Tabla 1).

Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo

La membrana citológica de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana citológica. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de

esteroles ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas [14].

Polieno. Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular [14].

Azoles. Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-a-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo [14].

Alilaminas. Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol [14].

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo [14].

Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo

Lipopéptidos. La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas, participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica [14].

Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo protéico y polisacárido cuya composición varía

en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular, los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-*beta*-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere [14].

Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica

Antimetabolitos. Un clásico antimetabolito es la flucitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico [14].

Agentes misceláneos. En esta clase se encuentra el griseofulvin, el cual inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular [14].

Tabla 1. Mecanismo de acción de antifúngicos [14].

Fármacos	Tipos	Mecanismo de acción
Azoles	Imadazol, Miconazol, Clotrimazol	Antifúngicos que interactúan en membrana celular
Polienos	Nistatina, Natamicina, Anfotericina B	
Alilaminas	Terbinafina, naftifina	
Lipopéptidos	Papulacandinas Triterpenos glicosilados Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina	Antifúngicos que interactúan en la pared celular
Piramidas Fluoradas	Flucitosina	Antifúngicos que interactúan en núcleo
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin.	Interacciona con la respuesta inmune del huésped

Bacterias

Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplasmático que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una capa delgada de peptidoglucano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo tan solo en el interior de las células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico. Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño (de 1 a 20 micras o más), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas y formando acumulos); mientras que su

clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas [15].

La distinción inicial entre las bacterias se puede realizar en función de las características de crecimiento en distintos nutrientes y medios de cultivos selectivo. La suma de sus características condiciona los rasgos que definen a una colonia, como su olor, tamaño, forma. La capacidad de resistir frente a determinados antibióticos, de fermentar azúcares específicos, de lisar los eritrocitos o de hidrolizar los lípidos [15].

El aspecto microscópico, incluido el tamaño, la forma y la configuración de los gérmenes (cocos, bacilos, curvos, espirales), y la capacidad de captar el colorante Gram (grampositivos o gramnegativos) son el principal modo de distinguir las bacterias) [15].

Las bacterias grampositivas se tiñen de morado porque el colorante queda atrapado en una gruesa capa de peptidoglucanos a modo de malla entrelazada, que rodea a la célula. Las bacterias gramnegativas tienen una capa de peptidoglucanos más delgada, que no retienen el violeta cristal, de forma que las células se tiñen con la safranina empleada como contraste y se ven rojas, ver figura 3 [15].

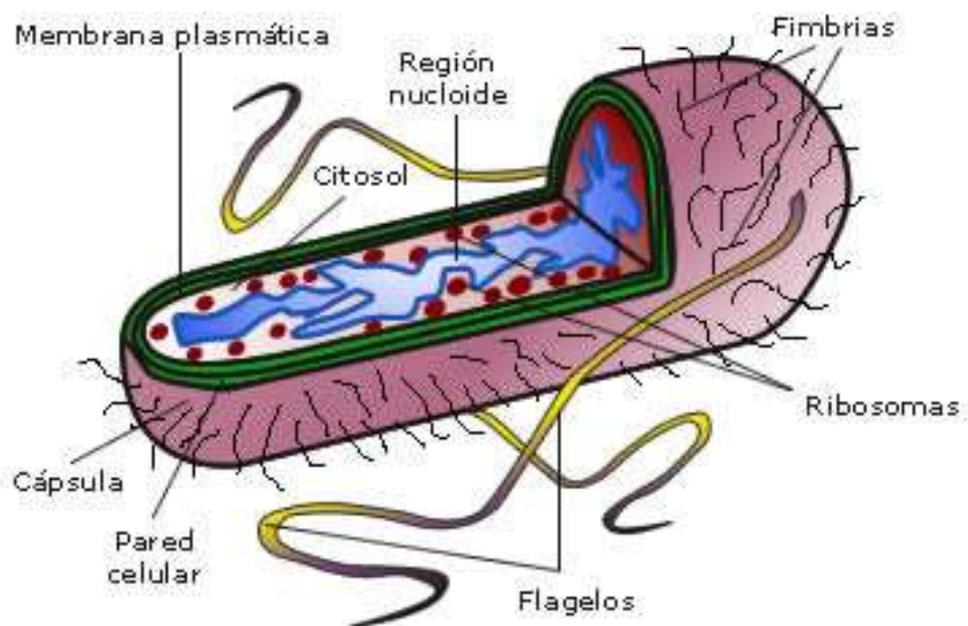


Figura 3. Estructura de las bacterias.

Acciones patógenas de las bacterias

- **Destrucción tisular:** Los productos generados como consecuencia del crecimiento bacteriano, especialmente de la fermentación, dan lugar a la producción de ácidos, gases y de otras sustancias que son tóxicas para los tejidos [15].
- **Toxinas:** Las toxinas son componentes bacterianos que dañan directamente los tejidos o bien ponen en marcha actividades biológicas destructivas [15].
- **Exotoxinas:** Tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas son capaces de fabricar exotoxinas, entre las que se encuentran enzimas citolíticas y proteínas de unión a receptores que alteran una función o destruyen la célula [15].

Pruebas de susceptibilidad:

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* son útiles para elegir los quimioterápicos activos frente al microorganismo responsable de la infección [15].

Se realizan dos tipos generales de pruebas de susceptibilidad frente a los antimicrobianos en los laboratorios clínicos: pruebas de dilución del medio de cultivo y difusión de agar. Para las primeras se preparan diluciones seriadas de un antibiótico en un medio con nutrientes y posteriormente se inoculan a una concentración estandarizada de la bacteria en estudio. Tras incubarlo toda la noche, la menor concentración de antibiótico que consigue inhibir el crecimiento de la bacteria se llama la concentración inhibidora mínima (CIM). En las pruebas de difusión en agar se dispersa una concentración estandarizada de la bacteria sobre la superficie de un medio con agar y a continuación se colocan disco o tiras de papel impregnada en antibiótico sobre la superficie del agar. Tras incubarlos toda la noche se observa el área de inhibición del crecimiento que rodea a las tiras o discos de papel. El tamaño del área de inhibición se corresponde con la actividad del antibiótico, de forma que cuanto más susceptible sea el microorganismo frente al antibiótico, más amplia será la zona de crecimiento inhibido. Al estandarizar las condiciones de prueba para estas pruebas de difusión en agar, el área de inhibición se corresponderá con el valor de CIM [15].

Métodos para determinar la actividad antimicrobiana

Para los ensayos antimicrobianos de aceites esenciales usualmente se aplican métodos convencionales que miden la capacidad antibiótica. Hay dos técnicas básicas usadas en los ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales:

1. Método de difusión en agar (disco de papel o agujero): es la técnica para la medición de la actividad antimicrobiana más ampliamente usada. El

método se conoce por ser preciso, confiable y aun así genera resultados semicuantitativos, de acuerdo a algunos autores solamente cualitativos y no siempre repetibles. Sin embargo este método hace posible la estimación del grado de inhibición de microorganismo y sus cambios morfológicos de una forma más sencilla. De acuerdo a este método se usan placas de Petri de 5 a 12 cm de diámetro (usualmente 9 cm) los cuales se llenan con 10 a 20 mL de caldo de agar y se inoculan con microorganismo. La incorporación del aceite esencial puede hacerse sobre un disco de papel o dentro de un hoyo que se hace en el medio del agar [15].

La efectividad del aceite esencial viene demostrada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento de los microorganismo alrededor del disco o agujero en esta zona en mm o cm los resultados son presentados con 0, +, ++, entre otros [15].

El método de difusión de agar no se considera apropiado para aceites esenciales ya que los componentes volátiles pueden evaporarse junto con el solvente durante el periodo de incubación. Además de que los componentes solubles no se disuelven en el agar [15].

Aunque es el método más usado porque es fácil y se utiliza poca cantidad de aceite [15].

2. Método en dilución en caldo o en agar (concentración mínima inhibitoria):

El método de dilución en serie en agar es usado para bacterias y para hongos, pero su modificación con el caldo líquido se aplica principalmente para hongos. Los cultivos de agar se realizan en cajas de petri o en tubos, mientras que los cultivos líquidos se realizan en frascos cónicos con un volumen de 100 mL de medio. Para el caldo líquido en frascos cónicos el índice de crecimiento inhibitorio se calcula (% de los cambios en la biomasa comparado con el cultivo control) [15].

Los resultados pueden expresarse de dos maneras:

- El índice de control de inhibición de crecimiento viene definido como el cociente entre el índice de crecimiento de control, sin aceite esencial y el índice de crecimiento con aceite esencial.
- La concentración mínima inhibitoria (MIC) o la máxima dilución inhibitoria (MID) que restringe el crecimiento de los microorganismos (ensayos de actividad bacteriostática y fungistática) o la concentración mínima letal (MLC) (análisis de la actividad bactericida y fúngica) [15].

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C [15].

Susceptibilidad por difusión en disco:

El principio básico del método de difusión en disco es utilizado para la comprobación de la susceptibilidad antimicrobiana. Tan pronto como el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel filtro y el antibiótico difunde al medio que lo rodea. El promedio de extracción del antibiótico del disco es mayor que su difusión hacia el medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder a la del mismo [16].

Sin embargo, a medida que aumenta la distancia del disco, se produce una reducción logarítmica de la concentración de antibiótico. Si la placa ha sido previamente inoculada con una suspensión bacteriana, se produce un crecimiento simultáneo de bacterias en la superficie del agar, cuando se alcanza una masa de bacterias críticas, la actividad inhibitoria del antibiótico es superada y se produce el crecimiento bacteriano el tiempo (tiempo critico) necesario para alcanzar la masa celular critica (4-10 horas en las bacterias

estudiadas habitualmente) es característico para cada especie, pero es influido por la composición del medio y la temperatura de incubación [16].

La amplitud lateral de la difusión antimicrobiana antes que sea alcanzado el tiempo crítico será afectada por la profundidad del agar, porque la difusión ocurre en tres dimensiones. El punto en el cual se alcanza la masa celular crítica aparece como un círculo marginado bien marcado de crecimiento bacteriano, con el centro del disco formando el centro del círculo si la prueba ha sido realizada correctamente [16].

La concentración de antibiótico difundido en esta interface de crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) puede calcularse con razonable exactitud si se conocen las características de la difusión antimicrobiana y el crecimiento bacteriano [16].

Método de difusión en pozo:

En este método, para cada caja de petri se agregan 20 (mL) de agar Tripticasa soya (TSA) o agar Müeller Hinton, inoculado previamente con el microorganismo a evaluar. Al solidificarse el agar, se abren pozos de un diámetro de 0,5 mm con ayuda de una pipeta de Pasteur esterilizada. Posteriormente se agregan las sustancias a evaluar en cantidades de 10, 20 o 40 micro litros. Las cajas de petri se incuban a 37 °C por 24 a 72 horas. Al cabo de este tiempo se evidencia la actividad antimicrobiana, por medio de la presencia de halos de inhibición alrededor de los pozos [16].

Familia *Asteraceae*.

Estudios Previos Realizados del Género *Libanothamus*

En el año 2001, A. Usubillaga y colaboradores realizaron en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, una

investigación sobre los constituyentes volátiles de las hojas de las cuatro especies *Libanothamus* de los Andes de Venezuela, tomando en cuenta el aceite esencial de las hojas de *Libanothamus humbertii* Cuatr, *Libanothamus lucidus* (Aristeg) Cuatr., *Libanothamus nerifolia* (ex B. H) Ernst, y *Libanothamus occultus* (Blake) Cuatr, recogido en Mérida, se obtuvieron por hidrodestilación. El rendimiento de aceite varió entre 0,05 % y 0,13 % e hidrocarburos monoterpenos constituían 83,6 a 90 % de los aceites. Limoneno (19,4 %) es el componente más abundante en *L. humbertii*, α -tujeno (30,2 %) en *L. lucidus*, sabinene (25,6 %) en *L. nerifolia* y α -pineno (31,3 %) en *L. occultus*. [17].

Los hidrocarburos monoterpenos constituyeron el principal fracción de aceite de la especie estudiada *Libanothamus*, que van de 83,6 % a 90 % del aceite, mientras que los monoterpenos que contienen oxígeno (2,0-6,3 %) y sesquiterpenos (5,0-7,1 %) se produjeron en proporciones relativamente pequeñas. Kaur-16-eno-19-al, también está presente en las cuatro especies de *Libanothamus* estudiadas [17].

Distribución característica de las Asteraceae

De todas las especies de Angiospermas (plantas con flores), la familia de las Asteraceae (anteriormente llamadas Compositae) es la más grande y ha sido objeto de numerosos estudios. Esta familia está dividida en más de 1.500 géneros y posee más de 25.000 especies reconocidas, que están repartidas por toda la tierra desde las regiones polares hasta los trópicos. En Venezuela se conocen cerca de 760 géneros y 210 especies. [18].

Las características botánicas de esta familia son las siguientes:

-Las especies son generalmente plantas herbáceas, arbustos o menos frecuentemente árboles.

-Las inflorescencias son en capítulos con brácteas estériles formando el involucre y de brácteas fértiles sobre las cuales se encuentran las flores arregladas en espiral

-La fórmula floral es 5-5-5-2, lo que quiere decir 5 sépalos que forman el cáliz, 5 pétalos que forman la corola 5 estambres y 2 carpelos.

-La corola esta soldada, sea en forma de tubo (flores tubuladas) o en forma de lengüeta dirigida al exterior (flores linguales).

-Las anteras están soldadas y forman un tubo alrededor del estilo.

-El pistilo comprende un estilo terminal con dos estigmas y un ovario ínfero unilocular y uniovulado.

-El fruto se denomina aquenio: es un fruto seco, raras veces carnosos por la naturaleza del epicarpo.

-Ciertas especies poseen canales y pelos secretores (*Artemisia vulgaris*, *Chamaemelum nobile*) otras especies tienen canales laticíferos (*Taraxacum dens-leonis*, *Lactuca virosa*) [18].

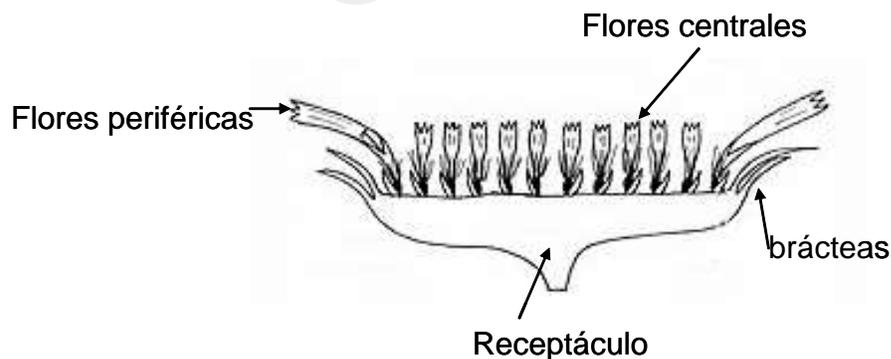


Figura 4. Capítulo de las compuestas (Asteraceae) [18].

A nivel de la sistemática botánica, la familia de las Asteraceae está ubicada de la siguiente manera (Tabla 2) [18].

Tabla 2. Situación de la familia Asteraceae en la sistemática botánica [18].

División	Spermatophytes (plantas con granos)
Sub-división	Angiospermas (plantas con flores)
Clase	Dicotiledoneas
Sub-clase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae

Clasificación Botánica.

La primera clasificación botánica de la familia Asteraceae data de principios del siglo XIX. Fue realizada por el botánico francés Henri Cassini, quien describió numerosos géneros y la mayoría de las tribus reconocidas en la actualidad. La primera obra que trata de las Asteraceae fue publicada en 1832 por Lessing. Posteriormente otro botánico como Candolle propone, en 1836, su propia clasificación. Luego en 1873, Bentharm establece una clasificación muy cercana a la de Cassini, la cual es retomada por Hoffmann en 1890, con ligeras modificaciones. Después de esta fecha la clasificación realizada por Hoffmann sobre las Asteraceae es aceptada por cerca de 100 años. Hoffmann dividió la familia en dos sub-familias (Linguliflorae y Tubuliflorae) y trece tribus [19].

En los últimos 20 años y después de numerosos trabajos realizados por Cronquist (1955), Wagenitz (1976) y Jeffrey (1978), la clasificación fue modificada nuevamente. En Venezuela se han reconocido solo 13 tribus [20].

Tribus encontradas en Venezuela. En la actualidad y según la última “Lista de las Especies de la Familia Compositae (Asteraceae) de Venezuela” elaborada por Badillo. El género Helenieae está contenido o incluido dentro del género Heliantheae [19].

Tabla 3. Sub-familias y tribus de la familia Asteraceae [20].

Sub-familia	Tribus
Asteroideae	Inuleae
	Plucheeae*
	Gnaphalieae*
	Calenduleae
	Astereae*
	Anthemideae*
	Senecioneae*
	Helenieae
	Heliantheae*
	Eupatorieae*
Cichorioideae	
	Mutisieae*
	Cardueae*
	Lactuceae*
	Vernonieae*
	Liabeae*
	Arctoteae
Barnadesioideae	Barnadesieae*

La Sub-familia de las *Asteroideae*

La sub-familia de las *Asteroideae* reúne más de la mitad de las Asteraceae incluye 10 tribus, 57 sub-tribus, 1135 géneros y aproximadamente 16200 especies. Las tribus de las Astereae y las Senecioneae son las más importantes y las más cosmopolitas. Las siguientes son las Gnaphaliae, las Anthemidae, las Helenieae, las Heliantheae y las Eupatorieae. Las tres últimas tribus son las más pequeñas, las Inuleae, las Plucheeae y las Calenduleae. En Venezuela encontramos 7 tribus (Astereae, Senecioneae, Gnaphaliae, Anthemidae, Heliantheae, Eupatorieae y Plucheeae) [18].

Las plantas de las sub-familias de las *Asteroideae* son hierbas o arbustos, raramente árboles; no poseen tejidos laticíferos. Polen generalmente

espinoso. La mayoría de las veces las hojas son alternas, raramente opuestas o en rosetas. La mayoría de las Asteroideae poseen una corola de color amarillo, a excepción de las especies pertenecientes a la tribu Eupatorieae [18].

Tribu de las Helenieae (trasladado a Heliantheae).

La tribu de las Helenieae es pequeña con sus 8 sub-tribus, 110 géneros y 830 especies; la mayoría se encuentra en América del Norte, particularmente en México y al sur de EEUU. Algunos géneros cultivados como plantas ornamentales: entre ellas *Tagetes*, *Gaillardia* y *Helenium*. El género *Árnica*, están bien distribuidos por el hemisferio norte. El género *Pectis* es el más grande de la tribu [20].

Tribu de las Heliantheae.

La tribu Heliantheae con 35 sub-tribus, 300 géneros y 3000 especies [13]. Contiene un gran número de plantas muy conocidas de la familia Asteraceae. *Helianthus annuus* L. (El girasol), *Helianthus tuberosus* L., *Echinacea purpurea* (L) *Monenck* y *Dahlia* sp., forman parte de esta tribu. Las Heliantheae son de distribución mundial, pero principalmente en América del Norte y del Sur. Los géneros *Verbesina*, *Bidens* y *Vigueira* son los más grandes de la tribu con sus 300, 240 y 180 especies respectivamente. En Venezuela existen 73 géneros y alrededor de 280 especies [20].

Importancia de las Asteraceae.

La familia contiene un número impresionante de plantas de gran importancia a nivel económico. Estas se encuentran en los países en vías de desarrollo y en los desarrollados; estas plantas sirven de reserva de alimento, como medicamentos o materia prima para usos diversos [19].

Las Asteraceae están bien representadas en el mundo de las plantas medicinales. En la farmacopea Helvetica VII (1987), se pueden encontrar algunas monografías de drogas aisladas de esta familia: *Artemisia absinthium* L. (ajenjo), *Árnica montana* L. (árnica), *Calendula officinalis* L. (caléndula), *Anthemis nobilis* L., *Matricaria chamomilla* L. (manzanilla), *Achillea millefolium* L [19] (Ver Tabla 4).

En otras Farmacopeas de los países Europeos podemos encontrar la *Bardanea radix*, la hoja de la *Cynarae folium* (alcahofa) o las flores de la *Pyrethri flos* [19].

Tabla 4. Uso terapéutico de algunas Asteraceae [21]

Nombre latín	Nombre común	Uso terapéutico
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) D.C.	Vira vira	Cáncer, diabetes
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Rompezareguella	Fiebre, dolor
<i>Ambrosia cumanensis</i> H.B.K.	Artemisa	Dolor de estómago
<i>Baccharis tricuneata</i> (L.F.) Pers.	Sanalotodo	Propiedades diversas
<i>Bellis perennis</i> L.	Margarita de los prados	Antitusígeno
<i>Bidens pilosa</i> L.	Cadillo rocero	Fiebre, problemas de estomago
<i>Calendula officinalis</i> L.	Caléndula	Antiinflamatorio
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Cártamo	Hipocolesterolémico
<i>Chamaemelum nobilis</i> (L.) All.	Manzanilla romana	Infecciones, inflamaciones

Constituyentes químicos de la familia Asteraceae

Las especies de la familia de las Asteraceae producen un gran número de componentes químicos. Estos metabolitos tienen importancia a nivel de química, botánica y medicinal, así mismo muestran una complejidad superior a las otras familias vegetales [22].

Los Flavonoides

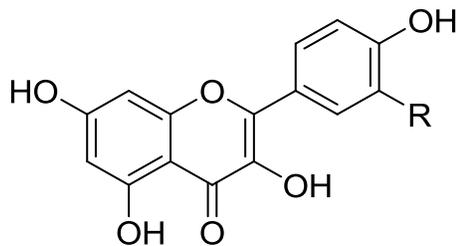
Los flavonoides son una clase de compuestos muy numerosos de origen natural. Se encuentran prácticamente en casi todas las familias vegetales y en ocasiones sirven de criterio taxonómico muy aceptables [22].

Los flavonoides presentan numerosas propiedades farmacológicas, entre las que podemos señalar: disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y refuerzan su resistencia. Ellos son utilizados como antioxidantes, ya que capturan radicales libres. Algunos son utilizados como antiespasmódicos, hepatoprotectores, antibacteriales [22].

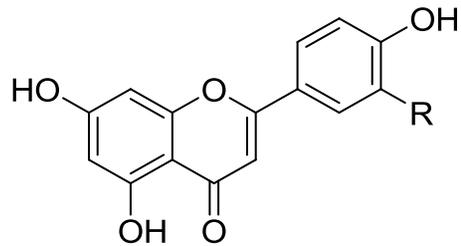
El análisis de flavonoides y su aislamiento necesita de numerosos métodos cromatográficos. Los métodos de cromatografía en capa fina (TLF) y cromatografía en columna (CC) son todavía utilizados. Otros, métodos más adecuados son actualmente utilizados, por ejemplo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [23].

El origen de los flavonoides es bien conocido y demostrado por el marcaje radioactivo de precursores y también por estudios enzimáticos. Las rutas biosintéticas utilizadas son la del ácido Shíquímico y la del acetato malonato. En efecto, el núcleo de los flavonoides resulta de la condensación de 3 unidades de acetato y de una unidad de cinamato y es confirmado por las posiciones clásicas de oxidación del núcleo flavónico [23].

Los flavonoides son muy numerosos en la familia de las Asteraceae. Los flavonoles kaempferol, quercetina y las flavonas apigenina, luteolina están ampliamente distribuidas. También están representados por numerosos glicósidos, derivados de los núcleos anteriores [22]. (Ver Figura 5)



R = H: Kaempferol
 R = OH: quercetina



R = H: apigenina
 R = OH: luteolina

Figura 5. Flavonoides y flavonas encontradas en la familia Asteraceae [22].

Los derivados de flavonoides metoxilados, libres o con glucósidos, han sido aislados de diversas especies de la familia Asteraceae. Ciertos flavonoides metoxilados son conocidos por presentar actividad citotóxica, como la eupatorina aislada del *Eupatorium altissimum* L. y la centaureidina de la *Centaurea jacea* L [24]. (Ver Figura 6)

Los flavonoides metoxilados artemetina y casticina aislados de la *Artemisia annua* (refuerzan la actividad antimalárica durante un test de crecimiento *in vitro*. Por el contrario estos flavonoles no afectaron la actividad antimalárica de la cloroquina en el mismo test [25].

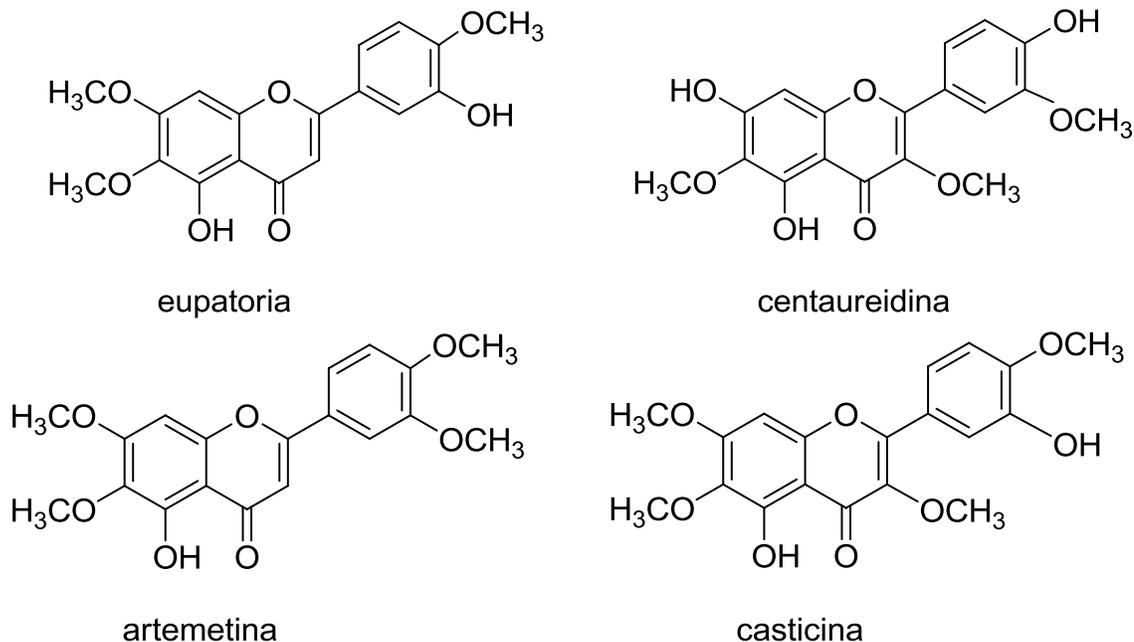


Figura 6: Flavonoles metoxilados aislados de Asteraceae [25].

Lactonas sesquiterpénicas.

La clase de las lactonas sesquiterpénicas son las más estudiadas en la familia de las Asteraceae. Es en ésta familia en donde se han aislado el mayor número de compuestos que fueron llamados “principios amargos”. Lo amargo está, casi siempre, ligado a la presencia de la lactona sesquiterpénica. Debido a la gran cantidad estructural de lactonas sesquiterpénicas, es difícil de imaginar que un solo precursor biosintético de origen a todas estas moléculas. Ellas provienen de la vía del ácido mevalónico y derivan todas del farnesil-pirofosfato, producto de la condensación de 3 unidades de isoprenos, 2 isopentenil-pirofosfato (IPP) y 1 dimetilalil-pirofosfato (DMAP) El farnesil-pirofosfato se cicla para formar el catión germacreno, luego por diversas reacciones que incluyen la lactonización y se forma el germacranólido [26] (Ver Figura 7).

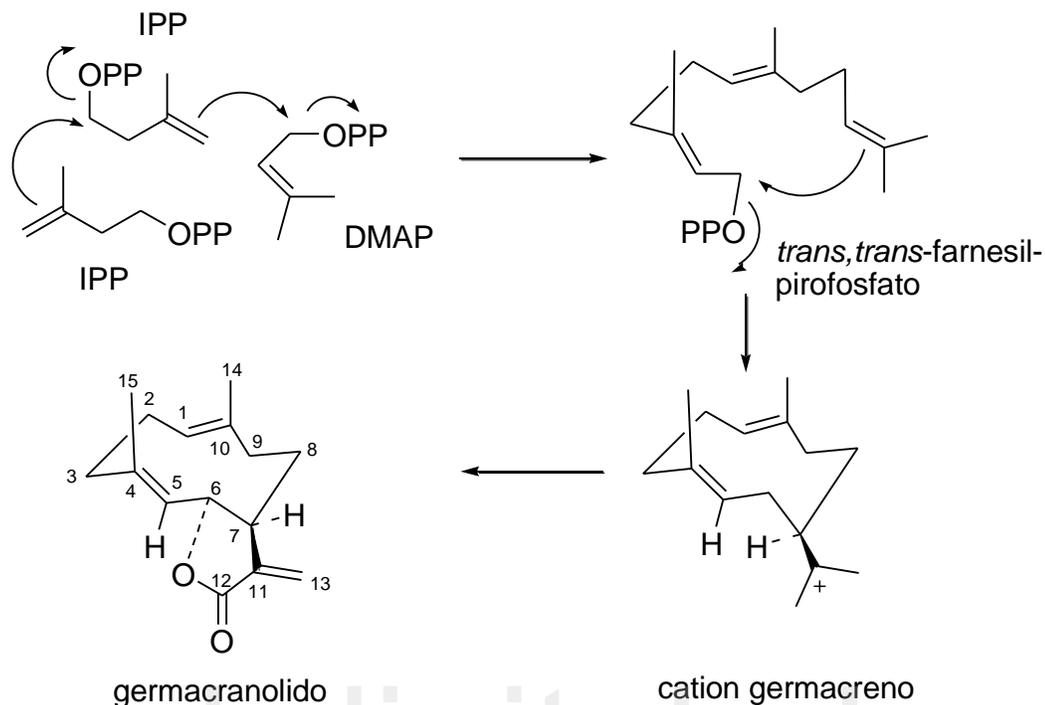


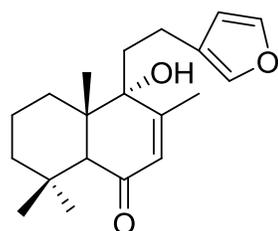
Figura 7. Biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas [26].

Diterpenos.

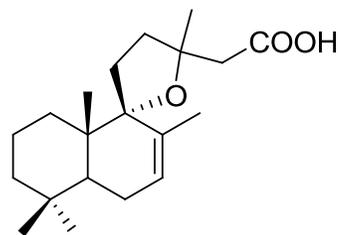
Los diterpenos se forman por la misma vía biosintética que las lactonas sesquiterpénicas, la del ácido mevalónico. Ellos resultan de la condensación de dos moléculas de genilpirofosfato y son clasificados según el número de ciclos, sin tener en cuenta su estereoquímica en: diterpenos di, tri, tetra o pentacíclicos. Es a ésta clase de sustancias naturales que pertenecen las giberilinas, que son las hormonas de crecimiento vegetal [27].

Más de 1200 diterpenos han sido identificados de aproximadamente 500 especies de Asteraceae. Pocos han sido estudiados a nivel farmacológico y la mayoría son sustancias tóxicas particularmente peligrosas. Entre estos podemos mencionar Solidagenona y ácido grindélico extraídos de *Solidago canadensis* L., y *Grindelia robusta* Nutt., respectivamente y el ácido kaurénico, encontrado en numerosas especies de Asteraceae y el

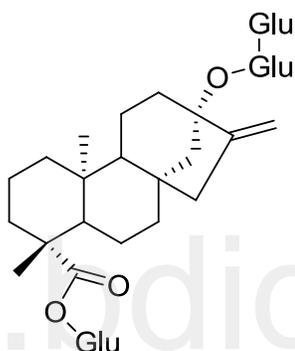
esteviosido extraído de una planta del Paraguay, la *Stevia rebaudiana* Bertoni [28]. (Ver Figura 8).



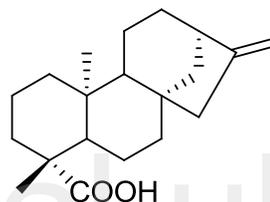
solidagenona



ácido grindélico



esteviosido



ácido kaurénico

Figura 8. Diterpenos aislados de Asteraceae [28].

Triterpenos

Al igual que las lactonas sesquiterpénicas y los diterpenos, los triterpenos son formados por la vía biosintética del ácido mevalónico. La condensación de dos unidades de farnesil-pirofosfato produce el escualeno que por ciclación luego de una epoxidación de origen a los triterpenos. Estos están divididos en tres categorías, los esteroides, las saponinas y los cardenolidos [29].

Las especies de la familia Asteraceae producen esteroides, ciertas sapogeninas y ningún cardenólido. Los esteroides en las Asteraceae derivan, la mayoría, de tres tipos de núcleos triterpénicos, el oleanol, ursanol y el

lupeol. Se encuentran de forma libre, acetilados o esterificados por ácidos grasos. Las saponinas de las Asteraceae son derivadas principalmente del ácido oleanólico y son muy escasas [29]. (Ver Figura 9).

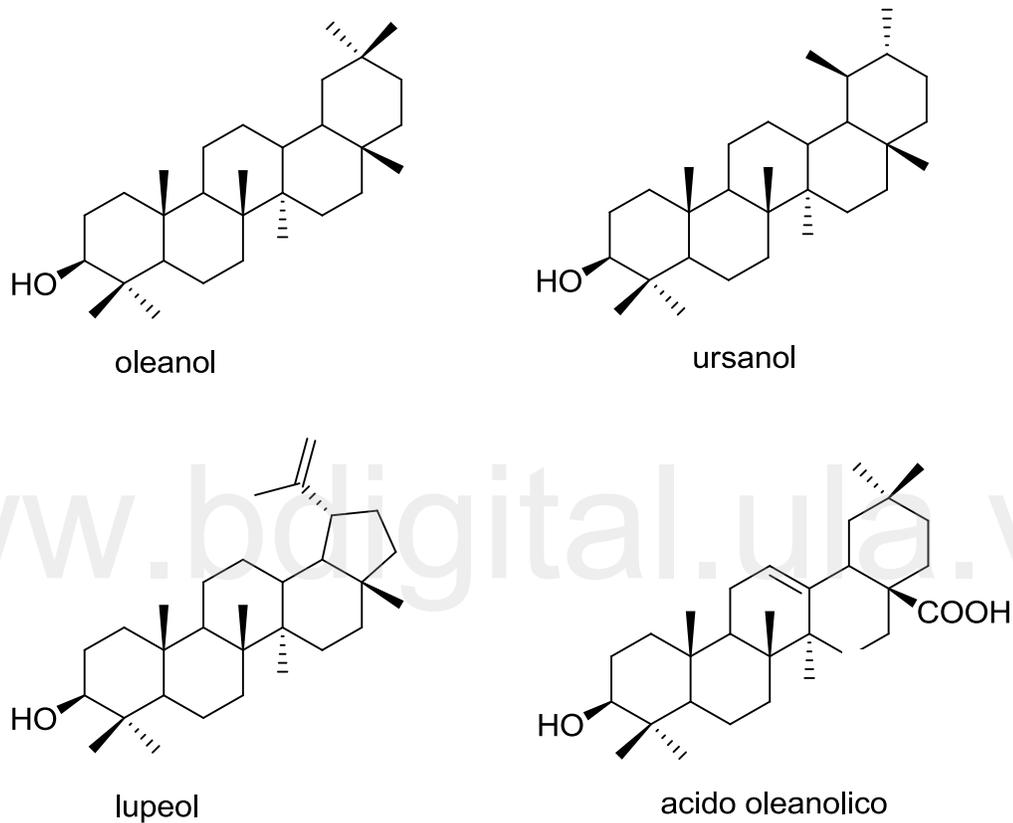


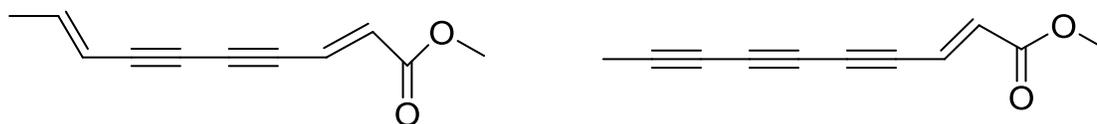
Figura 9. Triterpenos aislados de Asteraceae [29].

Poliacetilenos

Los poliacetilenos, al igual que las lactonas sesquiterpénicas, son un grupo de compuestos característicos de la familia Asteraceae. Ellos son igualmente considerados como marcadores quimiotaxonómicos [30].

Actualmente un número impresionante de poliacetilenos han sido aislados de la familia Asteraceae, principalmente de las tribus Cynaraceae,

Heliantheae, Astereae y Anthemideae. La matricaria éster y la deshidromatricaria éster han sido identificados en numerosas especies [31]. (Ver Figura 10).



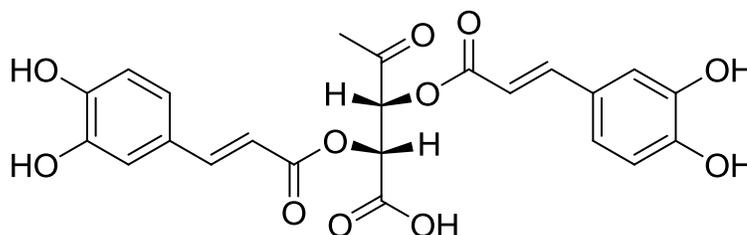
éster de matricaria

éster de deshydromatricaria

Figura 10. Poliacetilenos encontrados en numerosas especies [31]

Derivados del ácido caféico.

El ácido caféico es uno de los principales compuestos fenólicos encontrados de las Asteraceae. Se puede localizar en diferentes formas, por ejemplo como ésteres, combinado con el ácido quínico o con ácido tartárico, para formar el ácido clorogénico o el ácido chicórico (ver Figura 11). También se pueden encontrar derivados con los ácidos: cinámico, ferúlico, isoferúlico, sinápico y ácidos hidroxicinámicos [32].



ácido chicórico

Figura 11. Derivado del ácido caféico, ácido chicórico [32]

Los alcaloides:

Los alcaloides característicos de ésta familia son los que contienen el anillo Pirrolizidínico. Se encuentran únicamente en 2 y 17 tribus, las

Senecioneae y las Eupatorieae, Principalmente en los géneros *Senecio*, *Petasites* y *Tussilago* [29].

Los alcaloides pirrolizidínicos frecuentemente en las Asteraceae son la senecionina presente en numerosas especies, principalmente en el género *Senecio*; la emilina de la *Emilia flammea*, es un ejemplo de pirrolizidina abierto por oxidación; la echnatina encontrada en dos especies de *Eupatorium* (*E. cannabinum* L. y *E. maculatum* L.) es un monoéster y la sarracina presente en diversas especies de *Senecio* (*S. sarracenicus* L.) no son tóxicos [33] (Ver Figura 12).

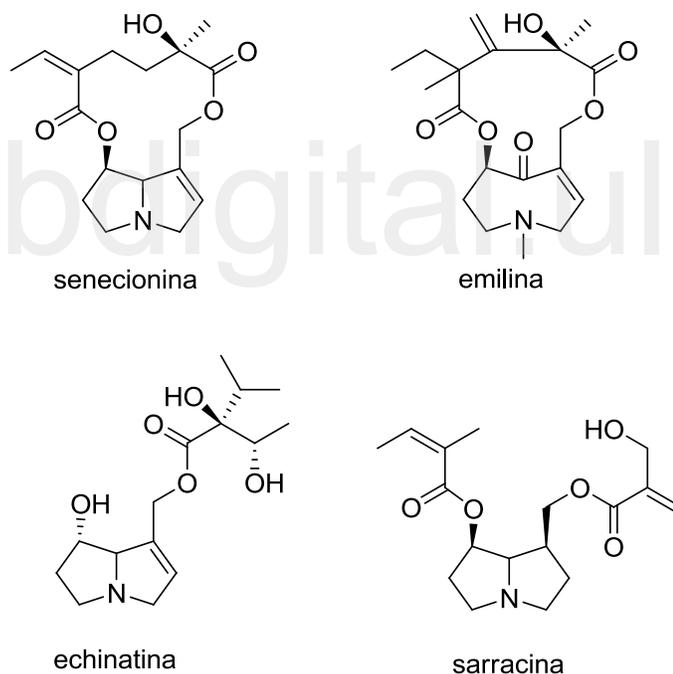


Figura 12. Alcaloides encontrados en Asteraceae [33].

Los aceites esenciales en la familia Asteraceae.

Algunos géneros han sido estudiados encontrándose el monoterpeno fenólico timol y sus derivados esterificados y libres, especialmente en especies de *Eupatorium* (Eupatorieae), *Inula* (Inuleae), *Helenium* y *Gaillardia*

(Helenieae). Especies de *Arnica* y *Doronicum* producen derivados del fenol junto con poliacetilenos [32].

Monoterpenos irregulares con esqueleto de artemisil, santolinil o crisantemil, ácido crisantémico son encontrados en Anthemideae, pero también han sido reportados en Astereae (*Cyathoclade*) [32] (Ver Figura 13).

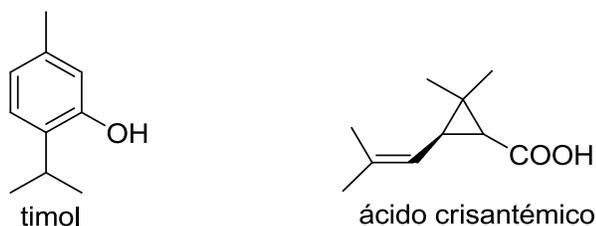


Figura 13. Terpenos encontrados en Asteraceae [32].

Furano sesquiterpenos han sido aislados de diferentes géneros de especies de Africa del Sur, tales como: *Asaemia*, *Athanasia*, *Eumorphia*, *Laiospermum*, *Phymaspermum*, *Stilpnophytum* y *Ursinia*, todas clasificadas dentro de las Astereae [32].

Género *Libanothamnus*

Es un género de plantas con flores, perteneciente a la familia Asteraceae. Comprende 18 especies descritas y de estas, solo 14 aceptadas [34].

- *Libanothamnus arboreus* (Aristeg.) Cuatrec.
- *Libanothamnus banksiaefolius* (Sch.Bip. & Ettingsh. ex Wedd.) Cuatrec.
- *Libanothamnus divisoriensis* Cuatrec.
- *Libanothamnus granatesianus* (Cuatrec.) Cuatrec.
- *Libanothamnus griffinii* (Ruíz-Terán & López-Fig.) Cuatrec.
- *Libanothamnus liscanoanus* (Cuatrec.) Cuatrec.
- *Libanothamnus lucidus* (Aristeg.) Cuatrec.
- *Libanothamnus neriifolius* (Sch.Bip. ex Sch.Bip.) Ernst

- *Libanothamnus occultus* (S.F.Blake) Cuatrec.
- *Libanothamnus parvulus* Cuatrec.
- *Libanothamnus spectabilis* (Cuatrec.) Cuatrec.
- *Libanothamnus subneriifolius* (Cuatrec.) Cuatrec.
- *Libanothamnus tamanus* (Cuatrec.) Cuatrec.
- *Libanothamnus wurdackii* (Ruíz-Terán & López-Fig.) Cuatrec [34].

Tabla 5. Taxonomía de los *Libanothamnus* [19].

División	Spermatophytes (plantas con granos)
Sub-división	Angiospermas (plantas con flores)
Clase	Dicotiledoneas
Sub-clase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Sub-familia	Asteroideae
Tribu	Heliantheae
Sub-tribu	Espeletiinae
Género	<i>Libanothamnus</i>
Especie	<i>Libanothamnus occultuss</i>

3.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La naturaleza sigue siendo la fuente principal de materia prima del hombre para encontrar respuestas a sus males físicos, a través de los siglos y basados en un conocimiento empírico, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en las preparaciones tradicionales o en fármacos. Desde la antigüedad, nuestros antepasados se han encargado de estudiar el presente y futuro de las plantas medicinales como drogas crudas, que presentan propiedades biológicas potenciales, así como una fuente para los compuestos naturales que actúan como agentes nuevos contra la infección. En pasadas décadas, la búsqueda para combatir infecciones ha ocupado a muchos grupos de investigación en el campo de la etnofarmacología [1].

Hipócrates (460 años a.C.), considerado el padre de la medicina, fue un auténtico herbalista. De acuerdo con la historia de la botánica, solo 235 hierbas eran conocidas en la Isla de Rodas, en la Turquía Asiática, pero apenas con unas cuantas seleccionadas de éstas Hipócrates curaba a toda su nación y a los países circundantes [35].

En Europa, la materia médica del Griego Dioscórides (I siglo d.C.) tuvo impacto durante mucho tiempo. Dioscórides fue un médico farmacólogo y botánico que viajó por Grecia e Italia con la armada como médico. Esto le permitió estudiar las propiedades de las plantas medicinales y utilizarlas para la preparación de remedios [35].

Se puede decir que, históricamente, los productos de origen vegetal, particularmente drogas y extractos, han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico, a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las dos últimas décadas una presencia cada vez mayor en la terapéutica. No solo las bacterias han adquirido resistencia a través de los

años, los hongos, que son organismos que se caracterizan por presentar una gran plasticidad ante los cambios ambientales, también han desarrollado mecanismos de resistencia a los principales grupos antifúngicos [36].

Esta puede ser debida a una resistencia intrínseca, a la cepa adquirida durante el tratamiento o a una resistencia clínica; esta última se asocia con numerosos factores relacionados con el huésped, el agente antifúngico o la cepa responsable de la infección [36].

Debido a esto, la incidencia de las infecciones fúngicas han crecido significativamente en el paso de las décadas, particularmente entre individuos inmunocomprometidos. Aunque *Candida albicans* continúa siendo la especie más comúnmente implicada en la forma invasiva y no invasiva de Candidiasis, el número de infecciones humanas causadas por *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* ha incrementado en los años recientes [36].

En la actualidad, el mercado mundial de los aceites esenciales (AE) ha experimentado un aumento, como consecuencia del cambio de patrones en el consumo debido a la tendencia de la utilización de productos naturales [4].

Según la familia de plantas que se trate, los aceites esenciales están en estructuras secretorias especializadas, como pelos glandulares (labiadas), células modificadas del parénquima (piperáceas), tubos oleíferos, llamados vitas (umbelíferas), o canales lisígenos o esquizógenos (pináceas, rutáceas). Pueden formarse directamente en el protoplasma, por descomposición de la capa resinógeno de la pared celular, o por hidrólisis de ciertos glucósidos [5].

Por otra parte, las bacterias son células procariotas que se hallan siempre en forma unicelular. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en los ríos, lagos, los mares, la tierra así como en las hojas y las raíces de las plantas y en la piel, 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 [37].

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con que esta surge y se extiende en poblaciones microbianas está determinada por la cantidad de antibióticos concretos usados en un ambiente dado. Existe por ello la posibilidad de retrasar su aparición y limitar su extensión con un juicioso uso de los antibióticos, tanto en humanos como en animales [38].

La resistencia tiene varias consecuencias. Las infecciones por patógenos invulnerables 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 fuertes lo son con frecuencia a varios antibióticos (multirresistencia). Cuando se debe al uso inapropiado de antibióticos es, por tanto, una carga adicional innecesaria [38].

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 [38]

En el presente trabajo se estudiará la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido del *Libanothamnus occultus* recolectado en el Páramo el Batallón en Los Andes Venezolanos.

4.- FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Debido a la gran cantidad de infecciones causadas por microorganismos y a la resistencia que han adquirido frente a una variedad de fármacos que algunas veces resultan tóxicos, nos motivó a plantearnos la siguiente interrogante:

¿Presentará actividad antimicrobiana el aceite esencial obtenido de *Libanothamus occultus*?

www.bdigital.ula.ve

5.- JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En la actualidad las enfermedades por microorganismos son muy comunes en los seres humanos ya que estamos expuestos a estos debido a que están presentes en el aire los mismos producen irritaciones en la piel, uñas y en las partes íntimas. Existen un gran número de fármacos para atacarlos como son el ketanazol, fluconazol, miconazol, eritromicina, ampicilina, entre otros; estos pueden ser altamente tóxicos hasta incluso producir efectos secundarios, con la presente investigación se pretende llegar a buscar otra alternativa de manera natural, no tóxica para combatir estos microorganismos reduciendo los riesgos de irritaciones y otros efectos secundarios [39].

El avance de la fitoterapia como disciplina médica es cada vez mayor. Esto se evidencia en que las plantas medicinales representan casi el 25 % del total de las prescripciones médicas en países industrializados [40].

Los fármacos disponibles actualmente, tienen una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando el uso de nuevos agentes antimicrobianos más potentes pero sobretodo más seguros que los existentes [40].

El uso principal de este aceite esencial sería de uso externo, por tratarse de un producto natural se espera evitar efectos secundarios.

6.- HIPÓTESIS

En vista que estudios realizados con anterioridad demuestran que las especies del género *Libanothamnus* biosintetizan determinados tipos de productos naturales (pinenos, entre otros) los cuales presentan actividad antimicrobiana, es de esperar que *Libanothamnus occultus* (Asteraceae) resulte ser una fuente de metabolitos secundarios estructuralmente relacionados con los hasta ahora aislados de otras especies de este género, y sean sustancias potencialmente activas.

www.bdigital.ula.ve

7.- OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana y los componentes del aceite esencial obtenido de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae).

Objetivos Específicos

Extraer el aceite esencial *Libanothamnus occultus* (Asteraceae) mediante hidrodestilación.

Identificar los componentes del aceite esencial mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial en estudio sobre las cepas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinar el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial *Libanothamnus occultus* (Asteraceae), sobre cepas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

8.- MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La Planta *Libanothamnus occultus* (Asteraceae) fue recolectada en la localidad del Páramo El Batallón, ubicada en la vía a la localidad de Bailadores, estado Mérida. La cantidad recolectada tuvo un peso aproximado de 1065 g. Las plantas fueron botánicamente identificadas por el Ing. Juan Carmona Arzola.

Cepas Microbiológicas:

Las cepas utilizadas fueron aportadas por el Laboratorio de Microbiología Dr. Cortado Capretti de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. Correspondiendo a las siguientes cepas de microorganismos:

- *E. coli*. ATCC 25922
- *S. aureus*. ATCC 25923
- *E. fecalis* ATCC 29212
- *K. pneumoniae*. ATCC 23357
- *P. auriginosa*. ATCC 27853
- *Candida albicans* ATCC 1023.

Reactivos:

- Solución salina fisiológica estéril.
- Agar Sabouraud dextrosa sin antibiótico.
- Agar Sabouraud dextrosa con antibiótico (Cloranfenicol).
- Caldo Sabouraud.
- Agar Müeller Hinton.
- Estándar de Mcfarland.

- Dimetilsulfóxido.
- Fluconazol 100 mg.
- Eritromicina 15 µg.
- Ampicilina 10 µg.
- Amikacina 30 µg.
- Agua destilada.
- Aceite puro volumen total 1,2 mL.

Equipos e instrumentación:

- Campana de flujo laminar.
- Esterilizador.
- Refrigerador.
- Mechero de bunsen.
- Balanza analítica.
- Agitador. Vortex-mixer. Modelo VM-2000.
- Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger.
- Licuadora.
- Asa de platino.
- Gradilla.
- Estufa
- Lámpara Ultravioleta
- Material de vidrio estéril: tubos de ensayo, beakers, placas de petri, pipetas, canoas de vidrio diseñadas en el laboratorio para tomar muestra.
- Pipetas automáticas.
- Puntas estériles.
- Pinzas estériles.
- Propipeta automática.

- Marcador indeleble.
- Placas de petri de vidrio y desechables

METODOLOGÍA.

Identificación y preparación del material vegetal.

La determinación botánica de la especie fue realizada por el Ing. Juan Carmona Arzola del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela).

Las hojas fueron separadas del material vegetal fresco recolectado, luego se licuó y se sometió dicho licuado a hidrodestilación durante 3 horas, empleando la trampa de Clevenger, para coleccionar el aceite esencial extraído.

Este aceite obtenido se dispuso en un frasco de vidrio con sulfato de sodio para favorecer el secado de dicho aceite, y guardándose bajo refrigeración a una temperatura de 4-6 °C.

Separación e identificación de los componentes volátiles del aceite esencial de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae)

Cromatografía de Gases acoplada a Masas: se realizó en un equipo Hewlett-Packard modelo 6890, provisto con columna capilar HP-5 (5 % fenil-95 % metil silicona) de 30 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,33 μm y acoplado a un espectrómetro de masas Hp 5973. Los espectros de masas que se obtuvieron mostraron información sobre el patrón de fragmentación del compuesto, su masa molecular y porcentaje de similitud con los compuestos contenidos en la sexta edición de la base de datos Wiley Ms. Para el análisis se preparó una solución de 20 μL de aceite en 1 mL de éter dietílico. De la muestra se inyectó 1,0 μL . El programa de temperatura que se utilizó es el siguiente: iniciándose en 60 °C durante cero minutos, luego se incrementó la temperatura a razón de

4°C/min hasta 260 °C. El inyector se mantiene a 200 °C y el detector a 280 °C. La relación de reparto fue de 1:100. La identificación de los componentes se realizó por medio de la base de datos computarizada Wiley MS Data (Sexta Ed.)

Cálculo de los Índices de Kováts: el cálculo de los Índices de Kováts se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosystem. Se comparó los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial con una serie de *n*-parafinas (C7-C22). Los valores obtenidos se comparó con los valores publicados en la literatura.

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial *Libanothamnus occultus* (Asteraceae)

Preparación de los inóculos de ensayo: para evaluar la sensibilidad de las cepas en estudio frente al aceite esencial extraído, se preparó una suspensión de cada una de las cepas, tomando una pequeña cantidad de las mismas con un asa de platino y suspendiéndola en 5 mL de solución salina fisiológica estéril (0,9 %) contenida en un tubo de ensayo. Las suspensiones se compararon con el patrón McFarland 1 que equivale a 10^{10-12} .UFC

Preparación de las placas e inoculación: se replicó la cepa de *Candida albicans* ATCC 1023 en el agar Sabouraud dextrosa con antibiótico (Cloranfenicol), se incubó a 37 °C por 24 horas. Se calentó el medio Sabouraud dextrosa sin antibiótico, para realizar las placas, se tomó un inóculo de la cepa con 1 mL de solución salina y se comparó con el patrón de McFarlan #1, luego se mezcló el inóculo con el medio para realizar la placa se dejaron solidificar a temperatura ambiente, agitando la misma con suaves

movimientos con el fin de esparcir la suspensión por toda la superficie de la placa.

Evaluación de la actividad antifúngica por el método de difusión de disco en agar: se impregnaron los discos de papel de filtro de 4 mm de diámetro con 10 μ L del aceite esencial puro de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae). De la misma manera se impregnó un disco con el control positivo (Fluconazol). Una vez impregnados los discos se colocó un disco de aceite esencial y uno de control positivo en cada placa. Posteriormente se procedió a incubar las placas a temperatura ambiente (37 °C) durante 24-48 horas.

Lectura de resultados: transcurrido el tiempo de incubación, se observó cada una de las placas para corroborar la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos; de estar presentes se consideró como un resultado positivo y se registró su diámetro. En caso contrario, la ausencia de halos de inhibición se interpretó como un resultado negativo (sin actividad antifúngica).

Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial *Libanothamnus occultus* (Asteraceae)

Método de difusión del disco en Agar: es empleado para determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico o aceite esencial. Sobre la superficie de una placa (medio de cultivo) se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas de forma uniforme para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos o aceites esenciales. El antibiótico difundirá desde el

papel filtro al agar de forma radial. Se incuba la placa durante 18-24 horas a 37 °C, y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo (Ver figura 14).

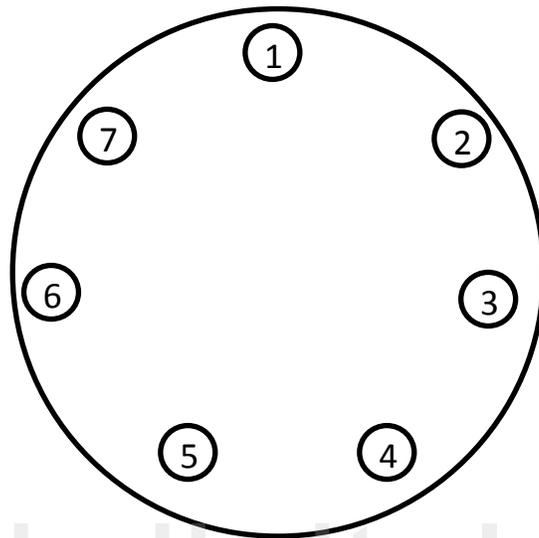


Figura 14. Representación de la ubicación de los discos impregnados.

Dónde:

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1.- 1 g/mL del aceite | 2.- 0,5 g/mL del aceite |
| 3.- 0,25 g/mL del aceite | 4.- 0,125 g/mL del aceite |
| 5.- 0,6 g/mL del aceite | 6.- Control positivo (antibiótico) |
| 7.- Control negativo (DMSO) | |

Microorganismos de ensayo: para la realización del análisis de la actividad antibacteriana se seleccionaron cinco (05) cepas bacterianas que se realizaron en duplicado para un total de diez (10) placas, dichas especies son representativas de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas.

Las bacterias grampositivas seleccionadas fueron:

- *Staphylococcus aureus*.
- *Enterococcus faecalis*.

Por otra parte las bacterias gramnegativas elegidas:

- *Escherichia coli*.

- *Klebsiella pneumoniae*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.

Preparación de la solución madre del aceite esencial a utilizar en el ensayo:

Se realizó una solución madre de 1 g/mL y a partir de allí se realizaron las diluciones de 0,5 gr/mL, 0,25 g/mL, 0,125 g/mL y 0,6 g/mL y se procedió a ensayar la actividad antibacteriana a través del método de difusión en disco en agar para determinar la CMI.

Como control positivo se utilizaron los antibióticos recomendados para cada bacteria en estudio según el manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, publicado en el año 2005 para *S. aureus* ATCC 25923 se utilizó Eritromicina 15 µg. Por otra parte, para la cepa de *E. fecalis* ATCC 29212 se utilizó Ampicilina 10 µg. Para las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 23357 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se utilizó para el control positivo Amikacina 30 µg.

Preparación de los inóculos de ensayo: para evaluar la sensibilidad de las cepas en estudio frente al aceite esencial extraído, se preparó una suspensión de cada una de las cepas, tomando una pequeña cantidad de las mismas con un asa de platino y suspendiéndola en 5 mL de solución salina fisiológica estéril (0,9 %) contenida en un tubo de ensayo. Las suspensiones se compararon con el patrón 0,5 McFarland que equivale a $1,5 \times 10^{6-8}$ células por mL.

Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión de disco en agar: se impregnaron los discos de papel de filtro con la solución madre y sus diluciones. De la misma manera se impregnó un disco

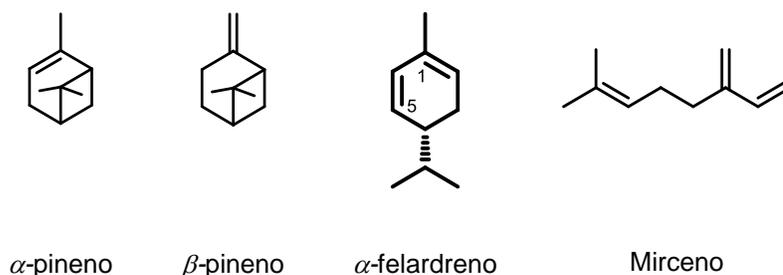
con el control positivo (antibiótico). Una vez impregnados los discos se colocó un disco de aceite esencial, de cada dilución y uno de control positivo en cada placa. Posteriormente se procedió a incubar las placas a temperatura ambiente (37 °C) durante 24 horas. Para lectura de resultados.

www.bdigital.ula.ve

9.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

- **Obtención del Aceite Esencial:** A partir de los 1,065g de hojas frescas de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae), se obtuvieron 1,2 mL de aceite esencial que corresponde a un 0,08 % de rendimiento, a su vez dicho aceite presentó color amarillento y olor característico. Los componentes del aceite esencial fueron separados por cromatografía de gases, arrojando diferentes tiempos de retención y sus respectivas áreas, así como también lograron ser identificados mediante la base de datos Willey Ms data library 6th. Dichos resultados se tabularon para calcular de esta manera los correspondientes índices de Kováts y corroborar la identificación de los compuestos.
- **Análisis Cromatográfico del Aceite Esencial:** La tabla 6 muestra los compuestos químicos del aceite esencial de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae), con sus tiempos de retención, porcentajes e índices de Kováts calculados y tabulados en la literatura. Según la identificación los compuestos mayoritarios se observa que el aceite presenta diecisiete (17) compuestos, siendo los mayoritarios: α -pineno (34,84 %), mirceno (16,56 %), β -pineno (13,16 %), α -felandreno (10,77 %), *p*-cimeno (5,44 %), α -tujeno (5,15 %), germacreno *D* (4,23 %), Δ -3-careno (2,29 %) (Ver Figura 15).

Figura 15. Estructura química de los componentes mayoritarios aislados



- Entre los compuestos encontrados en mayor porcentaje en el aceite esencial se encuentra el α -pineno (34,84 %) y el β -pineno (13,16 %), los cuales poseen una amplia actividad antibiótica, incluso frente a patógenos resistentes a los antibióticos. El pineno es el nombre común que se utiliza para referirse a dos monoterpenos bicíclicos isómeros, el α -pineno y el β -pineno, que son componentes principales de la resina de pino y de otras coníferas, y justo por esta razón tiene este nombre, aunque es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza. De hecho, no solo se encuentran en el reino vegetal, ya que los dos compuestos forman parte del sistema químico de comunicación de los insectos y actúan como repelentes para los insectos. Una de las mayores actividades terapéuticas que tienen es la de anti-inflamatorio, de manera similar al mirceno. También tienen actividad como bronco-dilatador en humanos cuando vienen inhalados a bajas concentraciones [41].
- El mirceno, o β -mirceno, es un monoterpeneo lineal que resulta el principal componente del aceite esencial de tomillo silvestre, siendo el 40 % de su composición. Se encuentra en altas concentraciones en otras plantas como el lúpulo, el mango y el limoncillo, entre otras. El mirceno actúa como anti-inflamatorio interfiriendo en la vía de señalización inflamatoria de las prostaglandinas. El *mirceno* es el

principio activo sedante del lúpulo, este se utiliza en herboristería y en las terapias naturales para conciliar el sueño [41].

- **Actividad Biológica:** El aceite esencial de *Libanothamus occultus* (Asteraceae) fue sometido a dos estudios biológicos; se le realizó actividad antibacteriana y actividad antifúngica. Las cuales se describen a continuación:
- En el primer ensayo se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de *Libanothamus occultus* (Asteraceae) contra la especie *Candida albicans* ATCC 10231, el cual su resultado fue negativo (sin actividad).
- El segundo ensayo fue realizado contra cinco especies bacterianas 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 solo en las cepas de: *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. A las cuales se le evaluó su concentración mínima inhibitoria dando como resultado 0,5 g/mL y 1,0 g/mL respectivamente, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 6. Componentes Químicos Aislados Del Aceite Esencial <i>Libanothamnus occultus</i> (Asteraceae)					
N°	COMPONENTE	TR	%	IKCal	IKtab
1	α-tujeno	4,72	5,15	926	924
2	α-pineno	4,92	34,84	937	932
3	sabineno	5,73	0,59	974	0969
4	β-pineno	5,83	13,16	978	0974
5	mirceno	6,13	16,56	991	0988
6	α-felardreno	6,48	10,77	1005	1002
7	Δ-3-careno	6,61	2,29	1010	1008
8	<i>p</i>-cimeno	6,98	5,44	1025	1020
9	limoneno	7,09	1,63	1029	1024
10	trans- β - ocimeno	7,59	0,62	1049	1044
11	α -terpinoleno	8,77	0,77	1090	1086
12	<i>Cis</i> -verbenol	10,49	1,09	1147	1137
13	mirtenal	12,12	0,60	1197	1195
44	germacreno D	21,10	4,23	1482	1484
15	biciclogermacreno	21,56	0,69	1496	1500
16	Δ -3-cardineno	22,35	0,82	1523	1522
17	kaurenal	40,90	1,46	2209	-
Total de % de identificación			93,90		

Tabla 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial *Libanothamnus occultus* (Asteraceae)

Microorganismos	Aceite diluido					Control +			Control -	CMI
	1 g/mL	0,5 g/mL	0,25 g/mL	0,125 g/mL	0,6 g/mL	Eri 15 µg	Amp 10 µg	Ami 30 µg	DMSO	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14,5 mm	10,5 mm	-	-	-	17 mm			-	0,5 gr/mL
<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-		26 mm		-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5 mm	-	-	-	-			32 mm	-	1 gr/mL
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	-			26 mm	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-			24 mm	-	-

Eri=Eritromicina

Amp= Ampicilina

Ami= Amikacina

10. CONCLUSIONES.

- El rendimiento del aceite esencial fue de 1,2 mL de 1065 g de hojas, lo cual equivale a un 0,08 % de rendimiento.
- El aceite esencial de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae), resultó ser rico en compuestos de naturaleza terpénica, entre ellos, los que se encuentran en mayor proporción en el aceite, son: α -pineno (34,84 %), mirceno (16,56 %), β -pineno (13,16 %), α -felandreno (10,77 %), *p*-cimeno (5,44 %), α -tujeno (5,15 %), germacreno *D* (4,23 %), Δ -3-careno (2,29 %).
- El aceite esencial diluido mostró actividad antibacteriana, determinándose de esta manera la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada una de las cepas ensayadas: *S. aureus*, obtuvo una CMI de 0,5 g/mL y *E. coli*, obtuvo una CMI de 1 g/mL.
- Según los resultados obtenidos en las concentraciones mínimas inhibitorias, se puede establecer que el aceite posee una actividad antibacteriana menor sobre la especie *E. coli* puesto que necesita mayores concentraciones para generar inhibición, a diferencia de la especie *S. aureus* que requiere de concentraciones más bajas.
- Se demostró que el aceite esencial de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae), posee actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli*, por lo que puede considerarse como una nueva fuente de tratamientos terapéuticos para dichas patologías.
- Se determinó que el aceite esencial de *Libanothamnus occultus* (Asteraceae), no tiene actividad antifúngica contra la especie *Candida albicans* ATCC 10231 por lo que no puede considerarse como un antimicótico..

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ríos, R. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 100 (1-2): 80-84.
2. Gheno, Y. (2011). *Biología Vegetal*. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; 46: 8-9
3. Morris, C (1984). *Medical botany. A study of herbalism in Southern Malawi*. Monograph from the International African Institute. LIT Verlag, 2.
4. Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. (2001). Plantas medicinales de uso en Chile. 2da edición. Santiago de Chile: editorial Universitaria, 42-44.
5. Bruneton, J. (2001). *Fitoquímica y Farmacognosia. Plantas medicinales*. 2da edición. Acribia; 75-76.
6. Claus, T. (1965). *Farmacognosia*. 5ta edición, 164-165.
7. Klaus, M. (2010). *Farmacología: texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana, 245-247.
8. Albornoz A. (1997). *Medicina Tradicional Herbaria*. Edi. Instituto Farmacoterápico Latino, S.A. Caracas-Venezuela:64-73.
9. Marcano D y Hasegwa M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas-Venezuela; 69-279.
10. Pérez M, Segura A, García R, Colinas T, Pérez M, Vázquez A, Navarro H. (2009). Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brocoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*; 25, 2.
11. Alleman D, Borquin D. (1984). Computer-Aided GC/MS Analysis of Essential oils in Complex Vegetable Drugs for Quality Control. *Planta Médica*, 633.
12. Castello G, Moretti P, Vezzani S. (2008). Retention models for programmed gas chromatography. *Journal Chromatography*; 10, 1607–1623.

13. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. (2006). Microbiología Médica. 5ta Edición. Madrid. Elsevier.
14. Gregori Valdés Bárbara. (2005). Estructura y Actividad de los antifúngicos. Revista cubana de Farmacia. [Sede Web]. Cuba. [Acceso 08 de diciembre 2009]. Disponible en: <http://Scielo.sld.cu/>.
15. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. (2009). Microbiología Medica. 6ta Edición. Madrid. Elsevier, 4-9.
16. Kalembe D. y Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Revista Medicinal Chemistry. Vol. 10, N° 10, 813-829.
17. A. Usubillaga, R. Aparicio, M. Romero, L. B. Rojas y N. Khouri (2001). Volatile constituents from the leaves of four *Libanothamnus* species from the Venezuelan Andes. Flavour and fragrance journal, 16 209-211.
18. Badillo, V.M. (1997). Los géneros de las compositae (Asteraceae) de Venezuela, Clave para su determinación. Ernstia 6: 51-168.
19. Heywood, V.H, Harborne J.B y Turner B.L. (1997). An overture to the Compositae. In The Biology and Chemistry of the Compositae 1-20.
20. Badillo, V.M. (2001). Lista actualizada de las especies de la familia compuesta (Asteraceae) de Venezuela. Ernstia 11.
21. Warner H. (1977). Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. In the Biology and the chemistry of the Compositae; 411-433.
22. Abdala, L.R. (2000). Flavonoids of *Tagetes stenophylla* robinso (Asteraceae) as taxonomic markers. Biochemical systematics and ecology. 28: 717.
23. Dewick P. (1991). The biosynthesis of shikimate metabolites. Natural Product Reports; 8: 149-170.
24. Harborne J. (1977). Flavonoid profiles in the compositae. In the biology and chemistry of the compositae 359-384.

25. Yang S y Phillipson J. (1989). Methoxylated flavones from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 18: 1509-1511.
26. Dewick P. (2002). *Medicina Natural Products*.
27. Seaman F, Bohlmann F, Zdero C, and Mabry T. (1990). *Diterpenes of Flowering Plants. Compositae (Asteraceae)*. New York
28. Bruneton J. (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. 2da edición.
29. Paiva J, Barata L, and Trigo J. (2004). Pyrrolizidine alkaloids in three *Senecio* species from southern Brazil, *Biochemical Systematics and Ecology*; 32, 1219.
30. Ferreira Z and Gottlieb O. (1982). Polyacetylenes as systematic markers in dicotydedons. *Biochemical Systematics and Ecology*; 10:155.
31. Cristensen L. (1991). Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry*; 31: 7-49.
32. Hegnauer R. (1977). The chemistry of the Compositae. In the biology and chemistry of the Composite; 283-335.
33. Middleton M, Cox P, Jaspars M, Kumarasamy Y, Nahar L, Rid R, and Sarker S. (2003). Dibenzylbutyrolactone ligans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*; 31, 653.
34. Luteyn, J. L. 1999. Páramos, a checklist of plant diversity, geographical distribution, and botanical literature. *Mem. New York Bot. Gard.* 84: viii–xv, 1–278.
35. Mangiaterra P. (2004). Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos “carqueja” [tesis de pregrado]. Buenos aires (Argentina). Universidad de Belgrano.
36. Mesa A, Bueno G y Betancur L. (2004). *Productos Natuales con actividad antimicótica*. Universidad de Antioquia. Medellin – Colombia; 325-331.

37. Prats, G. (2007). Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España. 17-29.
38. Medina, M. (2010). Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Medigraphic. Literatura Biomédica. 83-90.
39. Delascio, F. 1985. Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana. Litopar
40. Haumani M, Ruiz R. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Lima Perú. 2005.
41. Fundación Canna. (1999). Los Terpenos. [Artículo en línea]. España. [Acceso 14 de septiembre 2016]. Disponible en: <http://www.fundacion-canna.es/los-terpenos>

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Anexo 1. *Libanothamnus occultus*



Anexo 2. Resultado de la placa antifungica.



Anexo 3. Cromatograma del Aceite esencial

