



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Componente de la Investigación
Trabajo de Grado II



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Pimenta racemosa* OBTENIDO EN INTERVALOS DE
TIEMPO DE 4 HORAS**

**(Trabajo presentado como requisito para optar al grado de
Licenciadas en Bioanálisis)**

AUTORAS:

Br. Calero Alonso, Maria Gabriela
CI: 19.043.885
Br. Concepción Lorenzo, Nieves M.
CI: 82.285.479

TUTORA:

Profesora Ríos, Nurby

Mérida, Febrero de 2016

VEREDICTO

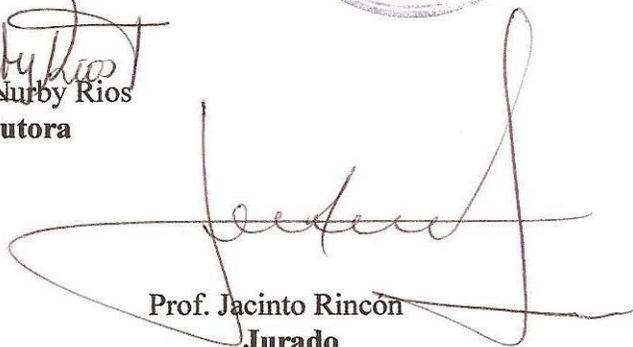
Los suscritos miembros del jurado Profesores, **Nurby Rios, Flor Mora y Jacinto Rincón**, miembros designados por el Consejo de Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, para conocer el trabajo Titulado, **Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa* obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas**, presentado por los bachilleres **Calero Alonso, María Gabriela C.I 19.043.885** y **Concepción Lorenzo, Nieves Monserrat C.I 82.285.479**, como requisito parcial para optar al grado de Licenciado en Bioanálisis, reunidos el día Viernes 12 de febrero de 2016 a las 2:00 p.m., en el en el salón de Química Orgánica de la Cátedra de Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, previo estudio y análisis del Trabajo de Grado de la Escuela de Bioanálisis, nos permitimos **APROBAR** el trabajo, para los efectos que ha sido presentado y **RECOMENDAMOS SU PUBLICACIÓN**.

Mérida, a los 12 días del mes de febrero de dos mil dieciséis.




Prof. Nurby Rios
Tutora


Prof. Flor Mora
Jurado


Prof. Jacinto Rincón
Jurado



DEDICATORIA

A toda mi familia por su apoyo desinteresado y por tanto cariño, una familia como esta es una bendición.

A mi Papá, por ser mi héroe y ejemplo de trabajo, honestidad y respeto.

A mi Mamá, por haber sido el pilar que siempre me sostenía, por haber sido la fuerza que me hacía levantar, por su comprensión, por su constancia y por haber tenido esa varita mágica con la cual me resolvía todos mis problemas, desde el cielo ahora sé que me sigue bendiciendo y cuidando.

A mis hermanos, seres maravillosos que me acompañan día a día y que siempre tienen lo mejor de sí para enseñarme.

A ustedes les debo ese impulso que permitió no renunciar y seguir adelante. ¡Los amo!

María Calero

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme en cada momento de mi formación como profesional y como ser humano.

A mis padres y familiares que de una u otra manera me aconsejaron y apoyaron con mi meta.

A mis profesores que me enseñaron y ayudaron desde el comienzo y hasta el final de esta etapa profesional.

A mis amistades quienes me colaboraron en ocasiones para poder continuar este largo camino con fuerza.

Por ultimo a mí por no dejarme derrotar cuando sentía que ya no podía más, gracias por siempre tener esa energía de continuar.

¡Nada es indispensable en la vida, excepto la vida misma!..

Nieves Concepción

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por ser el que guía e ilumina mi vida, por brindarme la sabiduría para realizar y culminar este trabajo de investigación.

A mis padres, mi familia, hermanos, tíos y primos, por su apoyo incondicional y por siempre estar presentes, este logro también es de ustedes.

A la ilustre Universidad de los Andes, mi casa de estudio, por instruirme, con calidad y formarme profesionalmente.

A la facultad de Farmacia y Bioanálisis por permitirme acceder a sus laboratorios y poder usar sus equipos y suministros para la ejecución de esta investigación.

A la profesora Nurby Ríos por su dedicación, constancia, paciencia y disposición en todo momento para el desarrollo de este trabajo, ya que sin su guía y conocimientos no hubiésemos podido llevar a cabo esta investigación.

A la profesora María Eugenia Lucena y al profesor Luis Rojas por brindarnos sus conocimientos en sus respectivas áreas y asesoría a lo largo de esta investigación.

A mis amigas y amigos por extender sus manos y apoyarme en los momentos difíciles, gracias a personas como ustedes también estoy hoy día aquí.

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA), por financiar este trabajo de investigación n° FA-579-15-08-F y a todos los que de una u otra forma colaboraron con este proyecto.

María Calero

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme la fortaleza, inteligencia y dedicación para vencer cada uno de los obstáculos, que encontré a través de mi viaje y formación profesional, para poder llegar a culminar con éxito esta meta.

A mis padres que siempre han estado ahí de forma incondicional, a mi lado por mas distancia que nos haya separado, a ustedes les debo parte de este logro, ya que me enseñaron a levantar la cabeza y seguir adelante manteniendo presente la educación y valores enseñados en casa por mas difícil que sea la situación.

A mi Mérida querida que muchas experiencias y enseñanzas me diste en eso que llamo la universidad de la vida y que hoy en día forman parte de mi carácter.

A la ilustre Universidad de los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, mi amada casa de estudio que me diste los conocimientos necesarios para ser una profesional de elite.

A todos mis profesores, compañeros y licenciados que me atendieron en las pasantías, que con sus diferentes formas de enseñar contribuyeron a que hoy en día sea una profesional integra y segura de sí misma.

A mi tutora Nurby Ríos, a la profesora María Eugenia Lucena, al profesor Luis Rojas y al técnico José Peña, gracias por su paciencia, dedicación y motivación para que este trabajo de grado fuese posible.

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes, por financiar este trabajo de investigación nº FA-579-15-08-F.

Nieves Concepción

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE FIGURAS	XI
INDICE DE ESQUEMAS	XII
INDICE DE TABLAS	XIII
RESUMEN	XIV
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: EL PROBLEMA	4
Planteamiento del problema	4
Justificación del problema	7
Hipótesis	8
Objetivos de la investigación	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
Limitaciones	9
CAPITULO II: MARCO TEORICO	10
Antecedentes de Investigaciones Previas	10
Composición química y Actividad farmacológica del aceite esencial de <i>Pimenta racemosa</i>	12

Antecedentes Históricos o Epistemológicos	15
Bases Teóricas	18
Características botánicas de la familia <i>Myrtaceae</i>	18
Distribución de la familia <i>Myrtaceae</i> en el mundo	19
Taxonomía de la <i>Pimenta racemosa</i>	20
Características botánicas de la <i>Pimenta racemosa</i>	20
Distribución de la especie <i>Pimenta racemosa</i> en Venezuela	22
Producto natural	22
Aceites Esenciales	22
Composición química de los aceites esenciales	23
Terpenos	23
Monoterpenos	24
Sesquiterpenos	24
Diterpenos	25
Sesterterpenos	26
Triterpenos	26
Biosíntesis de los aceites esenciales	27
Vía shikimato	27
Vía del mevalonato	30
Localización de los aceites esenciales	32
Glándulas monocelulares	32

Glándulas pluricelulares	32
Proceso de obtención de los aceites esenciales	33
1.- La hidrodestilación o destilación por arrastre por vapor de agua	33
2.- La extracción con grasa en caliente y el “enfleurage” en frío	34
3.- La extracción con disolventes derivados del petróleo	34
4.- La extracción con fluidos en condiciones supercríticas	34
5.- La extracción con disolventes no derivados del petróleo	34
Análisis de los aceites esenciales	35
1.- Cromatografía de gases	35
2.- Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC)	36
3.- Cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia de masas (CG-EM)	37
Usos de los aceites esenciales	37
Bacterias	38
Clasificación de las bacterias	38
Bacterias Gram positivas	38
Bacterias Gram negativas	39
Características de las bacterias a usar	39
1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	39
2.- <i>Enterococcus faecalis</i>	39
3.- <i>Escherichia coli</i>	40

4.- <i>Pseudomona aeuriginosa</i>	40
CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO	41
Enfoque de la Investigación	41
Tipo de la Investigación	41
Diseño de la Investigación	42
Sistema de Variables	42
Variables Dependientes	42
Variables Independientes	43
Variables Intervinientes	43
Población y Muestra	43
Población: <i>Pimenta racemosa</i>	43
Muestra	44
Tipo de muestreo	44
Métodos y técnicas de recolección de información	45
Separación e identificación de los componentes volátiles del aceite esencial de la <i>Pimenta racemosa</i>	45
Cálculos de los índices de kovats	45
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	45
Determinación de la actividad antibacteriana del aceite en estudio	46
Preparación de la solución madre del aceite esencial de <i>Pimenta racemosa</i> y las concentraciones para el ensayo a partir de la misma	46
Preparación de medios de cultivo	47

Preparación de los pre-inóculos bacterianos	47
Preparación de las placas	48
Determinación de la actividad antibacteriana por el método de Microdilución	48
Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) y la concentración bactericida mínima (CMB)	48
Materiales	51
Espécie Vegetal	51
Material de Laboratorio	51
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	54
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	72
ANEXOS	79
ANEXO A: <i>Árbol de Pimenta racemosa</i>	79
ANEXO B: <i>Hojas de la Pimenta racemosa</i>	80
ANEXO C: <i>Hojas y flores de la Pimenta racemosa</i>	80
ANEXO D: <i>Voucher Specimen de la especie Pimenta racemosa</i>	81
ANEXO E: <i>Recoleccion, extracción y preparación del aceite de Pimenta racemosa</i>	82
ANEXO F: <i>Preparación de medios de cultivo y pre-inóculos para el ensayo de la actividad antibacteriana con el aceite de Pimenta racemosa</i>	83

ANEXO G: Inoculación de las placas de petri para el ensayo de la actividad antibacteriana con el aceite de <i>Pimenta racemosa</i>	83
ANEXO H: Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de la <i>Pimenta racemosa</i> contra <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i>	84
ANEXO I: Determinación de la concentración mínima bactericida del aceite esencial de la <i>Pimenta racemosa</i> contra <i>E. faecalis</i> y <i>E. coli</i>	84
ANEXO J: Cromatograma del aceite NM1 (8:00 a.m) de la especie <i>Pimenta racemosa</i>	85
ANEXO K: Cromatograma del aceite NM2 (12:00 p.m) de la especie <i>Pimenta racemosa</i>	85
ANEXO L: Cromatograma del aceite NM3 (4:00 p.m.) de la especie <i>Pimenta racemosa</i>	86
ANEXO M: Espectro de masas del Eugenol	86
ANEXO N: Espectro de masas del 1,8-Cineol	87
ANEXO O: Espectro de masas del Limoneno	87
ANEXO P: Espectro de masas del Chavicol	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Distribución de la familia <i>Myrtaceae</i> en el mundo	19
FIGURA 2: Hoja de la <i>Pimenta racemosa</i>	21
FIGURA 3: Ejemplo de estructura del isopropeno	23
FIGURA 4: Ejemplos de estructura de monoterpenos	24
FIGURA 5: Ejemplos de estructura de sesquiterpenos	25
FIGURA 6: Ejemplos de estructura de diterpenos	26
FIGURA 7: Ejemplos de estructura de triterpenos	27
FIGURA 8: Formación del 3-dehidroshikimato	28
FIGURA 9: Formación del corismato a partir del 3-dehidroxishikimato	28
FIGURA 10: Reagrupamiento pericíclico del corismato y formación de aminoácidos aromáticos	30
FIGURA 11: Vía del mevalonato	31
FIGURA 12: Método de microdilución	50
FIGURA 13: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de <i>Pimenta racemosa</i> , NM1 (8:00 a.m.)	56
FIGURA 14: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de <i>Pimenta racemosa</i> , NM2 (12:00 p.m.)	58
FIGURA 15: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de <i>Pimenta racemosa</i> , NM3 (4:00 p.m.)	60
FIGURA 16: Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Pimenta racemosa</i> ; NM1 (8:00 a.m.); NM2 (12:00 p.m.); NM3 (4:00p.m.)	62

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 1: Diseño experimental	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de <i>Pimenta racemosa</i> , NM1 (8:00 a.m.)	55
TABLA 2: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de <i>Pimenta racemosa</i> , NM2 (12:00 p.m.)	57
TABLA 3: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de <i>Pimenta racemosa</i> , NM3 (4:00 p.m.)	59
TABLA 4: Composición química del aceite esencial de <i>Pimenta racemosa</i> obtenido el 13/05/14; NM1 (8:00 a.m.); NM2 (12:00 p.m.); NM3 (4:00 p.m.)	61
TABLA 5: Actividad del aceite ensayado con <i>S. aureus</i> ATCC 25923	64
TABLA 6: Actividad del aceite ensayado con <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	64
TABLA 7: Actividad del aceite ensayado con <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	65
TABLA 8: Actividad del aceite ensayado con <i>E. coli</i> ATCC 25922	65
TABLA 9.- Concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas del aceite esencial de <i>Pimenta racemosa</i> ensayadas con las bacterias de estudio.	66



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS
LINEA DE INVESTIGACION: Productos naturales



COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL OBTENIDA DE *Pimenta racemosa* EN INTERVALOS DE
TIEMPO DE 4 HORAS

Trabajo de Grado

Autoras:

María Gabriela Calero
Nieves Concepción

Tutora:

Prof. Nurby Ríos

RESUMEN

Pimenta racemosa var. *racemosa* (Mill.) J. W. Moore, es una planta caribeña, aromática, perteneciente a la familia *Myrtaceae* y con un especial interés en sus hojas, para la producción del aceite esencial comúnmente conocido como "bayrum". El objetivo de este trabajo fue comparar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa*, obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas. El diseño de la investigación fue de tipo experimental y longitudinal. La destilación por arrastre con vapor de las hojas frescas colectadas en mayo 2014 produjo tres aceites recolectados a las 8:00 am, 12:00 pm y 4:00 pm denominados NM1, NM2 y NM3. El análisis de sus componentes volátiles por cromatografía de gases/espectrometría de masas mostro 18 componentes en NM1, 21 componentes en NM2 y 17 componentes en NM3, de los cuales los mayoritarios fueron *eugenol* (65,33%), *limoneno* (8,65%), *chavicol* (6,03%), *1,8-cineol* (10,24%) y *trans-β-ocimeno* (3,56%). La actividad antibacteriana del aceite esencial evaluada por el método de microdilución contra las cepas *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, dio como resultado que las CMB dieron entre 6400 y 800 ppm y las CMI entre 6400 y 400 ppm.

Palabras clave: *Pimenta racemosa*, aceite esencial, composición química, actividad antibacteriana, microdilución.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido estudiadas con gran interés debido a las propiedades farmacológicas que poseen y los diferentes empleos que tienen los productos naturales que de ellas se extraen. Así pues se debe precisar que los productos naturales son sustancias de origen orgánico o inorgánico que se encuentran en la naturaleza, sintetizados generalmente por las plantas, con una estructura molecular y una acción biológica determinada (Albornoz, 1997).

Una de las familias más importante de plantas medicinales es la *Myrtaceae*, ya que es la que cuenta con mayor número de especies y géneros, los cuales han demostrado tener diferentes usos (Vanegas y col., 2011).

En esta investigación se estudió una de las especies de la familia *Myrtaceae*, la *Pimenta racemosa*, conocida también como "Bayrum" o malagueta, de origen tropical presente en el Norte de Suramérica y en las Antillas. Este árbol puede llegar a medir aproximadamente de 4 a 8 metros de altura, presenta tronco recto y copa frondosa de color verde oscuro y en Venezuela se encuentra localizada en las siguientes entidades: Aragua, Distrito Capital, Lara, Mérida, Nueva Esparta, Sucre, Táchira y Zulia (Hokche y col., 2008; Badillo y col., 1985; Hoyos, 1978; León, 1968; Roig, 1965).

El aceite esencial de la *Pimenta racemosa*, posee diversos componentes como el limoneno, cineol, eugenol, chavicol, entre otros, los cuales tienen olores característicos y gran actividad antibacteriana contra microorganismos patógenos para el hombre (Huelvas, 2009). Varias fueron las razones que justificaron esta investigación, entre ellas: la frecuencia de enfermedades infecciosas asociadas a *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*

y *E. coli*, ya que los aceites de *Pimenta racemosa* podrían llegar hacer una alternativa terapéutica futura y lograr minimizar el nivel de pacientes afectados por bacterias multirresistentes y así colaborar con la solución de un problema de salud pública, no solo en Venezuela, sino a nivel mundial.

Se realizó un estudio de la composición química y de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de hojas frescas de *Pimenta racemosa*, en cuanto a la composición se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones de la facultad de Farmacia y Bioanálisis, por el método de espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases y lo que respecta a la actividad antibacteriana se realizó por el método de microdilución, donde los aceites obtenidos se ensayaron contra las cepas Gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis* y las cepas Gram negativas *P. aeruginosa* y *E. coli*, donde se determinó la concentración mínima bactericida y la concentración mínima inhibitoria en el Laboratorio de Investigación de la cátedra de Bioquímica General ubicado en la misma facultad.

Este proyecto fue estructurado en 5 capítulos. El Capítulo I, titulado: El Problema, está subtítulo de la siguiente manera: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Hipótesis, Objetivos y Limitaciones. El Capítulo II, titulado: Marco Teórico, está organizado en varios subtítulos: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos o Epistemológicos, Bases Teóricas. El Capítulo III, mencionado como Marco Metodológico, está ordenado con los siguientes subtítulos: Enfoque de la Investigación, Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Sistema de Variables y Población y Muestra. Mientras que, el Capítulo IV fue denominado: Resultados y Discusión, y el Capítulo V, fue titulado: Conclusiones y Recomendaciones.

El objetivo de esta investigación fue comparar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa*,

obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas, con la finalidad de colaborar con la sociedad, aportando beneficios para la salud.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Por mucho tiempo se ha practicado el uso de las plantas con fines curativos, sobre todo en las zonas rurales y pequeñas comunidades, lo que aún se mantiene en la actualidad. Por diversas razones los médicos contaban con las plantas medicinales, ya que en épocas remotas fueron el principal e incluso el único recurso del cual se disponía para el uso y consumo humano. Esto hizo que se indagara y se estudiara de manera profunda y constante, el conocimiento de las composiciones químicas de las especies vegetales, que poseen propiedades farmacológicas, y ampliar las diferentes funciones de los productos que de ellas se extraen (Padrón, 2010; Albornoz, 1997).

El reino vegetal está conformado por una infinidad de especies de plantas que contienen principios activos con potencial medicinal aún por descubrir. En la naturaleza existen aproximadamente, entre 250.000 a 500.000 especies vegetales, de las cuales se estima que menos del 10% han sido estudiadas en sus aspectos químicos o farmacológicos (Abreu y col., 2008).

A partir de 1900, la industria farmacéutica desarrolló la producción de gran variedad de novedosos medicamentos naturales. Para la fabricación de muchos de ellos se utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, pretendiendo y asegurando que las acciones atribuidas a dichas sustancias, se verían incrementadas, y por ende, resultarían más efectivas permitiendo así la prescripción de diferentes tratamientos donde la cantidad de principio activo fuera superior al que poseía la planta. Sin embargo, se comprobó que las propiedades que presentaban estos medicamentos, eran menos eficaces y existía un alto porcentaje de riesgos de provocar algunas intoxicaciones e intolerancias, cosa que no ocurría con la utilización de la planta entera (Padrón, 2010).

Los medicamentos a base de plantas medicinales presentan una gran ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se encuentran siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que no se acumulan en el organismo, y sus efectos secundarios son limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen ni se identifican muchos de los principios activos de las plantas, a las cuales le deben sus cualidades (Hernández y col., 2003).

Una de las familias de plantas medicinales más numerosa es la familia *Myrtaceae*, y su importancia radica principalmente en su gran diversidad de compuestos químicos y sus múltiples usos y actividades farmacológicas, esta familia reúne cerca de 130 géneros y aproximadamente 3.000 especies, principalmente árboles y arbustos tropicales, siendo los principales centros de distribución las zonas tropicales de América y Asia, además de Australia (Vanegas y col., 2011; Badillo y col, 1985).

Entre los compuestos más abundantes de esta familia se encuentran: flavonoides, compuestos fenólicos, monoterpenos, sesquiterpenos, carotenoides, triterpenos, compuestos lignanos y taninos. Entre los géneros más conocidos están *Angophora*, *Callistemon*, *Eucalytus*, *Eugenia*, *Feijoa*, *Luma*, *Melaleuca*, *Metrosideros*, *Myrciaria*, *Pimenta*, *Psidium*, *Syncarpia*, *Syzygium*, *Tristania*, caracterizándose por presentar componentes químicos con diferentes propiedades farmacológicas con efecto analgésico, antidiarreico, antifúngico y antibacteriano. En Venezuela, se estima que existen 20 géneros nativos con aproximadamente 130 especies (Guyléne y col, 1998).

Entre estos, se encuentra el *Eucalyptus*, perteneciente a la familia Myrtaceae, que es rico en aceite esencial con alto contenido de Eucaliptol, el cual se utiliza en la medicina popular como analgésico, antiinflamatorio y antipirético (Vanegas y col., 2011).

La *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore (*Myrtales: Myrtaceae*), también es un miembro de la familia de las Mirtáceas, presente en nuestro país y conocida vulgarmente como Pimienta de tabasco, bayrum o Malagueta, se encuentra por todo el Caribe y se localiza mayormente en el Norte de Suramérica, en las Antillas y Cuba. Esta planta es empleada con diversos fines y ha sido cultivada como planta medicinal (Leyva y col., 2007; Aurore y col., 1998).

Por todo lo anteriormente descrito se plantea la siguiente interrogante:

¿Cómo varía la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa* obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas?

Justificación del Problema

Esta investigación se realizó por el alto rendimiento de los aceites esenciales obtenidos de *Pimenta racemosa*, los componentes que contiene y la actividad antimicrobiana que desarrollan. Específicamente, la asociación de la actividad antibacteriana con *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *Escherichia coli*, se justifican porque estos son patógenos que causan un alto porcentaje de infecciones a nivel respiratorio, digestivo, urinario, entre otros. Además los aceites de *Pimenta racemosa* podrían llegar a ser una alternativa terapéutica futura y lograr minimizar el nivel de pacientes afectados por bacterias multirresistentes y así colaborar con la solución de un problema de salud pública. Estas razones, fueron consideradas para llevar a cabo esta investigación.

Así mismo, los aceites esenciales se obtienen de materias primas renovables, como son las plantas, siendo productos naturales que podrían llegar a ser una opción para ser empleado en el campo farmacéutico en la elaboración de medicamentos, con las ventajas de ser ecológicos, económicos y de fácil acceso, siendo estas otras razones por las cuales se realizó esta investigación.

Las aproximaciones teóricas que respaldan a esta investigación también fueron influyentes, ya que permitieron reconocer la composición química y la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Pimenta racemosa* y su relación con los intervalos de tiempo establecidos para la recolección de la planta, como un problema real y actual de investigación.

Igualmente los resultados de esta investigación serán un aporte significativo en posteriores estudios, ya que existiría la posibilidad de que se evaluaran en el mismo intervalo de tiempo de cuatro horas en la recolección

de otras plantas medicinales, abriendo así las puertas a nuevas investigaciones.

Debido a lo anteriormente descrito se plantea la posible respuesta al problema de investigación.

Hipótesis

Es posible que la composición química del aceite esencial de *Pimenta racemosa* pueda variar al ser obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas, así como también su actividad antibacteriana sobre bacterias grampositivas y gramnegativas.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Comparar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa*, obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas.

Objetivos específicos

- Determinar la composición química del aceite esencial de *Pimenta racemosa* a través de cromatografía de gases acoplada a masas.
- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa* a través del método de microdilución, sobre bacterias Gram

positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

- Comprobar la variación de la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa*, obtenido en intervalos de tiempo de 4 horas.

Limitaciones

Las limitaciones de esta investigación estuvieron relacionadas con la disponibilidad de insumos de laboratorio y el tiempo para llevarla a cabo. Específicamente las limitaciones de insumos se presentaron por la carencia de estos en el mercado nacional. Las limitaciones en cuanto al tiempo se enfocan en que se hubiese podido ensayar mayor cantidad de cepas. Sin embargo, durante el proceso de investigación esto no fue impedimento para mantener la vialidad del estudio.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

Antecedentes de Investigaciones Previas

Se ha determinado que los aceites esenciales tienen varias propiedades como: antisépticas, bactericidas, antimicóticas, antirreumáticas y antihelmínticas. Así como también se ha demostrado que varios aceites esenciales, presentan una gran actividad antimicrobiana contra una gran variedad de bacterias (bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas) (Marcano y col., 2002; Albornoz, 1980; Domínguez, 1973).

Entre las investigaciones de la composición química de los aceites esenciales de diversas plantas se ha estudiado las variaciones de estos a distintos intervalos de tiempo.

Dentro de estos estudios tenemos el ensayo realizado por Dugarte y col. en el 2007 en Bogotá-Colombia, donde se estudió la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles del extracto de hojas de *Lippia alba*, cultivada en una parcela experimental del Complejo Piloto del CENIVAM (Centro Nacional de investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales) de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. El material vegetal se recolectó cada 3 horas durante 24 horas, en total fueron 8 recolecciones comenzando a las 3:00 a.m. hasta las 12:00 p.m., su extracto se obtuvo por destilación con

diclorometano como solvente y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se pudo determinar que la composición del extracto de *Lippia alba* varía con respecto a la hora de colecta del material vegetal, presentando mayor concentración de sus componentes químicos en horas de la noche. Los resultados obtenidos del estudio circadiano, demostraron que los mayores contenidos de carvona se presentaron en las horas de la noche (34,3%, 30,7% y 31,8%). La mayor diferencia en composición se observó entre las muestras recolectadas a media noche y al medio día.

Custódio y col. en el 2010 describen la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de las hojas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (1,0% w/w) y *Tynanthus micranthus* (1,1% w/w). GC y el análisis de GC / MS, demostrando que el eugenol fue el único componente en el aceite esencial de *T. micranthus* con un (99,9%) y el componente principal en el aceite esencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* con un (92,59%), que también presenta metileugenol, terpinen-4-ol, *o*-cimeno, entre otros. Así también en las pruebas de ensayos los aceites presentan actividad antimicrobiana contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Las pruebas revelaron que el eugenol fue el componente bioactivo en ambos aceites contra *Cladosporium herbarum*. Este es el primer informe acerca del aceite esencial de *T. micranthus* y la actividad antifúngica del aceite esencial de *P. pseudocaryophyllus*. Los resultados confirmaron el potencial de los aceites esenciales, los cuales son ricos en eugenol, no sólo como una fuente de compuestos de sabor, sino también su uso como agente antimicrobiano en la agricultura y en los alimentos y productos farmacéuticos.

También se ha determinado, la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Pimenta racemosa* var. *Terebinthina* y *Pimenta racemosa* var. *grisea* se ensayó contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Pimenta racemosa var. *Grisea*, demostró una actividad más pronunciada. Estos datos indican la utilidad potencial de la variedad grisea como un agente microbiostático, antiséptico o desinfectante (Sáenz y col., 2004).

Existen diferentes métodos para realizar el estudio microbiológico y determinar la susceptibilidad de las bacterias ante agentes antimicrobianos, estos varían en cuanto a sus fundamentos, así mismo los resultados obtenidos dependerán igualmente de las características taxonómicas de las plantas y aceites esenciales, de los microorganismos y la solubilidad de los compuestos aislados a evaluar, por ende es importante e indispensable seleccionar adecuadamente el método a implementar a fin de lograr los objetivos propuestos (Ramírez y col, 2009).

Estos estudios son evidencia irrefutable acerca del potencial de los aceites esenciales para la medicina moderna; así pues, esto demuestra que la investigación es pertinente y factible, por cuanto el fin último es producir un estudio que busque beneficios para la salud.

Composición química y actividad farmacológica del aceite esencial de *Pimenta racemosa*

Entre las variedades de la *Pimenta racemosa* se ha comprobado la presencia de compuestos aislados distribuidos de la siguiente manera según la variedad: *P. racemosa* var. *Grisea*, metil eugenol (92,6%); *P. racemosa* var. *ozua*, 1,8-cineol (55,93%), limoneno (30,07%), α -terpineol (15,12%); *P. racemosa* var. *hispaniolensis*, 1,8-cineol (0,05-37,96%), metil chavicol (0-22,6%), metil eugenol (0-63,8%), γ -terpineno (0-16,6%), terpinen-4-ol (0,08-28,98%) y timol (0-44,02%); *P. racemosa* var. *terebintina*, α -terpineol acetato (27%), α -terpineol (20%) y 4-metoxi eugenol (12,6%); *P. racemosa* var

racemosa, eugenol (52,7%), mirceno (26,6%) y chavicol (6,3%); *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore, 1,8-cineol (20,42%) y terpinen-4-ol (20,72%). La *P. racemosa* var. *racemosa*, dependiendo de sus componentes presenta tres olores característicos a limón por el neral/geranial (72%); a anís debido a la presencia de metil chavicol y metil eugenol (81%) y a clavo debido a la presencia de chavicol y eugenol (73%) (Tucker y col, 1991; García y col, 2002; Ayedoun y col, 1996; Bello y col, 1995; Abaul y col, 1995).

En el estado Táchira-Venezuela, se realizó un ensayo de los componentes volátiles de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) J.W. Moore. La destilación por arrastre con vapor de las hojas frescas colectadas en el mes abril de 2012 produjo dos tipos de aceites esenciales, uno ligero (AL) y otro más pesado que el agua (AP). El análisis de sus componentes volátiles por cromatografía de gases/espectrometría de masas mostró 17 componentes lo que constituye el 99,9% del AL de los cuales los mayoritarios fueron eugenol (60,4%), mirceno (11,7%), chavicol (6,0%), limoneno (5,4%) y linalool (4,4%); para el AP, 13 componentes fueron identificados (98,3%) de los cuales eugenol (82,9%) y chavicol (9,3%) fueron los mayoritarios (Contreras, 2014).

Los aceites de tres variedades de *P. racemosa* han sido objeto de estudios químicos, algunos presentan mayormente ésteres fenólicos, mientras que otros presentan mayormente monoterpenos acíclicos de oxígeno. Se han reportado algunos estudios sobre las actividades antimicrobianas de dichos aceites (Aurore y col., 1998).

En otro estudio realizado en el Laboratorio de Bacteriología, Virología y Microbiología Industrial, Facultad de Farmacia, *Université Paul Sabatier*, Francia se analizaron 3 tipos de aceites de la *Pimienta racemosa* para determinar sus actividades antimicrobianas contra cinco cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa y *Mycobacterium smegmatis*) y contra cinco levaduras (*Cándida albicans*, *Aspergillus niger*, *Absidia corymbifera*, *Penicillium verrucosum*, *Cladosporium cladosporioides*). Las cepas bacterianas fueron mucho menos sensibles a todos los aceites que las cepas de levaduras. Aunque los aceites eran bacteriostáticos y fungistáticos, no fueron microbicida contra las cepas ensayadas (Guyléne y col., 1998).

En la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela se realizó un estudio sobre análisis y determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa* P. Miller (J. W. Moore) var. *racemosa*. En este estudio se sometió la *Pimenta racemosa* a diversos ensayos con nueve microorganismos donde se demostró que dicha planta presentó actividad antibacteriana con respecto a las diferentes cepas. Esta especie presenta ciertas propiedades farmacológicas, entre las que se puede mencionar: efectos antirreumático, antiséptico, analgésico, antidiarreico, antifúngico y antibacteriano. Entre las variedades de *Pimenta racemosa* se ha comprobado la presencia de compuestos aislados, tales como: metil eugenol, 1,8- cineol, limoneno, alfa-terpineol, metil chavicol, lepinen-4-ol, alfa-terpineol acetato, alfa terpineol, 4-metoxi eugenol. En caso de la *P. racemosa* var. *racemosa* contiene geramial, metil chavicol, metil eugenol, chavicol y eugenol (Huelvas, 2009).

Entre otras actividades farmacológicas presentada por la *Pimenta racemosa* se pueden mencionar antiinflamatoria, analgésica, antipirética, siendo administradas en tratamientos de enfermedades como reumatismo, dolor abdominal, fiebre, neumonía y gripe o influenza. De igual manera, es utilizada en tratamientos contra la diarrea, vómitos, enuresis, higiene íntima, flatulencia. También, se ha demostrado su actividad antiespasmolítica y antihipertensiva. Además, su aceite esencial es utilizado para realizar masajes terapéuticos (Paula y col., 2010; Guyléne y col., 1998).

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

En la época prehistórica el hombre, desde el comienzo de su existencia se ha visto en la necesidad de procurarse alimentos y medicamento, en vista de eso las plantas han sido utilizadas desde hace siglos como agentes terapéuticos (Albornoz, 1997).

En la Edad Antigua, los egipcios (unos 2.300 años a.C.) cultivaban plantas medicinales e importaban desde el Oriente: aloe, sándalo, incienso y ébano, etc. En el documento egipcio más antiguo, el papiro de Ebers, escrito unos 1550 años a.C. se describen diversas enfermedades, enunciando su diagnóstico y tratamiento. El rey asirio Asurbanipal (unos 650 años a.C.), fundó una biblioteca que constaba de unos 30.000 ladrillos de escritura cuneiforme, de los cuales unos 200 se referían a los usos de plantas medicinales. Por otro lado los hindúes practicaban la medicina administrando medicamentos en formas farmacéuticas como extractos, tinturas, elixires y esencias. El Emperador chino Shen-Ming (unos 2.700 años a.C.) publicó un escrito que contiene 365 drogas, una para cada día del año. Los aztecas conocían el uso de más de 1.200 plantas. Los incas desarrollaron la medicina en búsqueda de drogas naturales. Los griegos (unos 450 años a.C.) tuvieron grandes representantes: Teofrasto (Padre de la Botánica) quien cultivó unas 450 especies de plantas en su jardín. Dioscórides (Padre de la *Materia Médica*), hoy en día llamado Farmacognosia que recopila unas 500 plantas en sus escritos. Hipócrates (Padre de la Medicina) y Aristóteles también dejaron grandes aportes. Plinio el antiguo escribió la "*Historia Natural*" citando unas mil plantas que se supone curaban enfermedades. Galeno (Padre de la Farmacia) enunció en más de 200 obras la forma de distinguir las drogas entre sí por la apariencia, el sabor, la fuente geográfica y la potencia de su acción (Romagosa y col., 2001; Servais, 2001; Marcano y col., 1991).

En la Edad Media, los árabes estudiaron la Alquimia o química de las tres quimeras: la *piedra filosofal*, el *elixir de larga vida* y una *panacea*. Ibn Baithar, quien redactó la “*Gran Compilación de Medicamentos simples*”, donde señala unas 1.400 drogas, citando 200 nuevas plantas. Andrómaco (siglo XV) creó la *Triaca*, que era una mezcla de sustancias (unas 70) como antídoto universal contra toda clase de tóxicos. Mientras que en la Edad Moderna (siglo XV al XVIII), el Renacimiento hace que la botánica se transforme en ciencia independiente y adquiera considerable desarrollo. Los largos viajes y los descubrimientos de tierras lejanas, favorecieron las grandes revelaciones botánicas, ya que los conquistadores llevaron a su entorno nuevas drogas, productos y alimentos. Se hizo notable en esta época Paracelso (Padre de la Medicina Moderna y la Farmacoquímica), quien enunció su *Teoría de las Signaturas*. Él hablaba de la *quinta esencia*, una combinación de los 4 elementos de los antiguos: agua, aire, tierra, y fuego y tenía incorporada la virtud de curar. Este concepto es la fundación teórica de la bioquímica, aunque no fue sino a fines del siglo XIX cuando esta disciplina empezó a progresar (Albornoz, 1980; Jácome, 2003; Servais, 2001).

En el siglo XVI fueron publicados una serie de trabajos interesantes tales como: “*Nuevo Herbario*” de William Turner, “*Herbarum*” de Otto Brunfel, “*Historia de las Plantas*” de Valerius Cordus, “*Historia Medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en Medicina*” de Nicolás Monardes, “*Herbario*” de Leonardo Fuchs. Andrés Laguna utilizó el hongo *penicillium* para tratar la artritis ulcerosa con queso enmohecido (Albornoz, 1980).

En el siglo XVII Thomas Sydenham obtuvo fama con la preparación del *Laúdano*, a base de opio. En 1618 apareció la *Farmacopea Londinense* en latín, describiendo 1030 drogas vegetales con 930 preparaciones. Linneo quien publicó “*Genera Plantarum*” y “*Species Plantarum*”, punto inicial de la

Taxonomía vegetal que se ha seguido hasta nuestros días. Nicolás Clemeric se reconoce como Padre de la Fitoquímica (Romagosa y col., 2001).

En la Edad Contemporánea (siglos XIX y XX), Matías Schleiden anunció su teoría de la célula como unidad fundamental de los tejidos vegetales. La Farmacoquímica marcó senderos definitivos con el aislamiento del alcaloide más activo del opio, la morfina, por Federico Seturner en 1817. Teodoro Martius publicó “Tratado de Farmacognosia”, en el clasificó las drogas por su morfología. Favre publicó “*La Sofisticación de las Sustancias Medicamentosas*”, donde trata necesidad de reglamentar el comercio de las mismas (Albornoz, 1980).

En Venezuela, Vicente Marcano fue el pionero de la investigación Fitoquímica en el campo de la Farmacia y la Agronomía venezolanas. En 1844 fundó la primera escuela de estudios farmacéuticos. En 1890 publicó sus trabajos de investigación: “Nueva Teoría sobre el fenómeno de fermentación”, “Circulación de la savia en los vegetales de los trópicos”, “La transpiración de los vegetales en los trópicos”. A comienzos del siglo XX decayó el interés por los productos naturales. Años después, se comenzó la búsqueda de antibióticos derivados de plantas inferiores, luego se dio un giro hacia la búsqueda de tranquilizantes. Hoy en día, la búsqueda de sustancias naturales ha aumentado sobremanera y el interés por recolectar especies vegetales para análisis fitoquímicos es mucho mayor que en décadas pasadas (Marcano y col., 1991).

Bases Teóricas

Características botánicas de la familia *Myrtaceae*

Las *Myrtaceae* son árboles o arbustos, frecuentemente ericoideos, presentan hojas indivisas, de posición variable, glanduloso-punteadas, sin estípulas o raras veces con estípulas muy pequeñas; el follaje nuevo es con frecuencia rosado y se torna luego verde oscuro. Las flores generalmente regulares y hermafroditas, tienen perianto doble, con cáliz y corola de 4 o 5 piezas cada uno; los sépalos son permanentes libres o unidos en la base de prefloración abierta, imbricada o cerrada, los pétalos ausentes o caedizos de 3 a 6, generalmente libres, imbricados a veces concrecentes en forma de gorro. Muestran numerosos estambres, con frecuencia unidos en haces. El ovario es generalmente ínfero de 1–5 lóculos, está completamente unido al hipantio o receptáculo y al desarrollarse forma una estructura carnosa y azucarada, por lo que muchas especies de esta familia tienen valor como frutales. Los óvulos se encuentran de 2 o más en cada celda, anátropos o campilótropos. Sus frutos pueden ser carnosos, en baya o en capsula, raras veces drupáceo o nuciforme. Las semillas sin albumen, raramente con poco albumen y el embrión es recto o curvo. Otra característica de las *Myrtaceae* es la presencia de glándulas de aceite en casi todos sus tejidos, lo que determina su utilización como especias o fuentes de aceites esenciales (Font, 1973; León, 1968; Badillo y col., 1985).

Esta gran familia cuenta con 100 géneros con 3.000 especies, de las cuales 20 son géneros nativos en Venezuela con una distribución muy amplia. Cinco de estos géneros introducidos en cultivo: *Anamomis*, *Aulomyrcia*, (*Callistemon*), *Calycolpus*, *Calycorectes*, *Calyptranthes*, *Campomanesia*, (*Eucalyptus*), *Eugenia*, *Gomidesia*, (*Leptospermum*),

Marlierea, (*Melaleuca*), *Mitropsidium*, *Myrcia*, *Myrciaria*, *Myrcianthes*, *Myrteola*, *Myrtus*, *Pimenta*, *Plinia*, *Psidium*, *Siphoneugena*, (*Syzygium*), (*Tristania*), *Ugni*. Se caracterizan porque en ellos se han encontrado componentes químicos con diversas propiedades farmacológicas: con efecto analgésico, antidiarréico, antifúngico y antibacteriano (Badillo y col., 1985; Nuñez, 1992, Benyahia, 2005).

Distribución de la familia *Myrtaceae* en el mundo

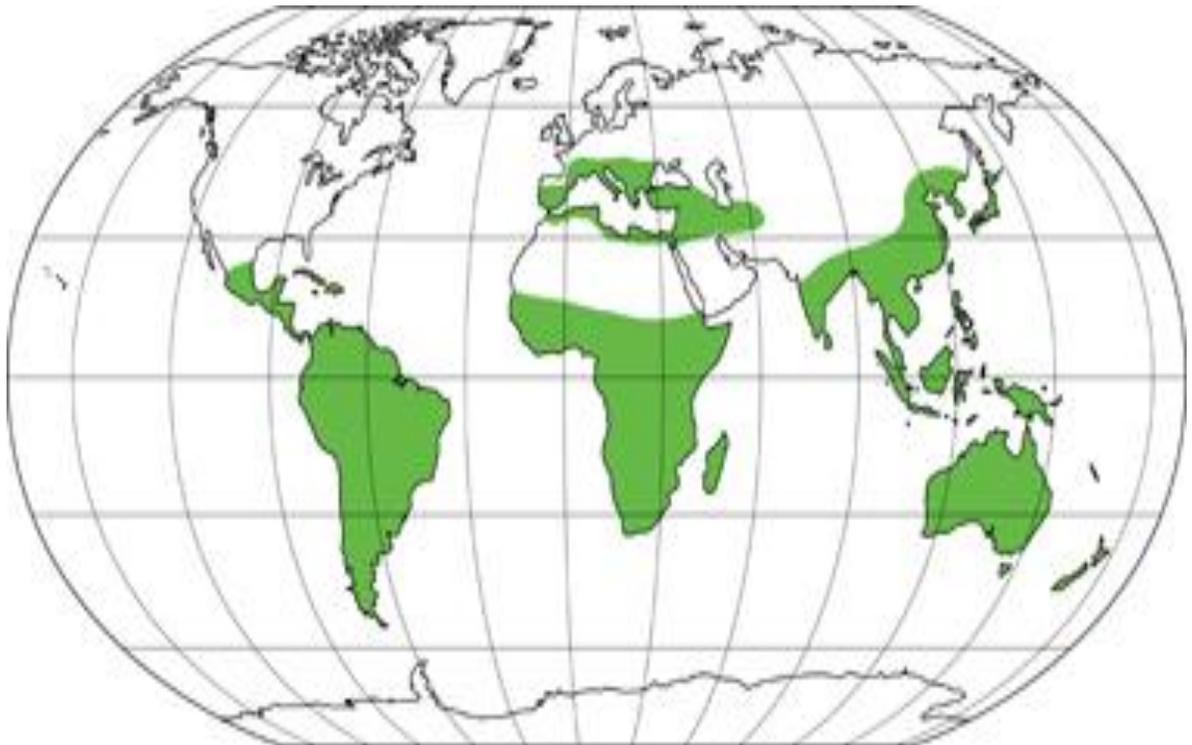


FIGURA 1: Distribución de la familia *Myrtaceae* en el mundo.
(http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/myrtaceae.html)

Taxonomía de la *Pimenta racemosa*

Según el sistema de clasificación del Dr. Arthur Cronquist tenemos:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Myrtaceae*

Género: *Pimenta*

Especie: *racemosa* (Cronquist, 1987)

Características botánicas de la *Pimenta racemosa*

Pimenta racemosa (Mill.) J.W. Moore (*Myrtales: Myrtaceae*), es conocida vulgarmente como Pimienta de tabasco, Bayrum o Malagueta, es un árbol presente en el Norte de Suramérica, en la Antillas, incluida Cuba. Ha sido cultivada puesto que sus hojas pueden ser destiladas para producir un aceite esencial, el cual es conocido con el nombre de bayrum y presenta un olor a especias; asimismo es cultivado como planta medicinal, condimento, por su madera que es muy utilizada en la carpintería y ebanistería. Este árbol crece silvestre, en terrenos de elevaciones moderadas, particularmente en sitios húmedos, se caracteriza por medir hasta 10 metros de altura

aproximadamente, es aromático en todas sus partes especialmente en las hojas, las cuales son opuestas, pecioladas, oblongas o elípticas, duras, lustrosas por encima, con nervaduras reticuladas, poco prominentes de entre 5 a 12 cm de largo y con numerosos puntos pelúcidos, que al ser maceradas desprenden un fuerte olor agradable y volátil, presenta tronco recto y copa frondosa de color verde oscuro. Sus flores son blancas, pequeñas, aromáticas, en cimas flojas de 5 sépalos y 5 pétalos agrupadas en panículas, del largo de las hojas, o mayores. Sus frutos son negros y tienen forma de baya globosa a oviforme de 8 a 10 milímetros con pocas semillas, similares a los de la Jamaica. Esta planta se reproduce por semilla; su crecimiento es lento; su sistema radical profundo; es resistente y de vida bastante larga (Núñez, 1992; Hoyos, 1978; León, 1968; Roig, 1965).



FIGURA 2: Hoja de la *Pimenta racemosa*.

Distribución de la especie *Pimenta racemosa* en Venezuela

En Venezuela la especie *Pimenta racemosa* se encuentra localizada en las siguientes entidades: Aragua, Distrito Capital, Falcón, Lara, Mérida, Nueva Esparta, Sucre, Táchira y Zulia (Hokche y col., 2008).

Producto natural

Es toda sustancia de origen orgánico o inorgánico denominada también metabolito secundario, que se encuentra en la naturaleza y es sintetizado por seres vivos, generalmente plantas, con una estructura molecular y una acción biológica determinadas. Su formación comienza en la fotosíntesis, luego de la cual los fragmentos pequeños se recombinan para generar las grandes moléculas. Estos pueden ser aislados y procesados por el hombre con el fin de realizar medicamentos preparados a partir de drogas crudas mejoradas, exentas de sustancias de origen sintético, libres de aditivos químicos orgánicos o inorgánicos (Marcano y col., 1991; Albornoz, 1997).

Aceites Esenciales

Son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas provenientes las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de las plantas, obtenidas por lo general por arrastre con vapor, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático. De los millones de plantas existentes en nuestro

planeta se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales diferentes, aunque evidentemente, no todas las plantas presentan estas sustancias y existen algunas que presentan una concentración tan baja que hace imposible su obtención práctica (Ortuño, 2006; Domínguez, 1973).

Estos aceites pueden ser líquidos insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, la mayoría incoloros y de carácter volátil, hay otros muy viscosos o semisólidos denominados bálsamos u oleorresinas como la de pimentón, la paprika o el chicle (Ortuño, 2006; Marcano y col., 2002).

Composición química de los aceites esenciales

En los aceites pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos, cetonas, esteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biogeneticamente del ácido shikímico y del acido mevalónico (Bruneton, 1993; Domínguez, 1973; Marcano y col., 2002).

Terpenos

Estos pueden encontrarse en la fuente vegetal solos o formando glicósidos. Su unidad fundamental es el isopreno (Marcano y col., 2002).

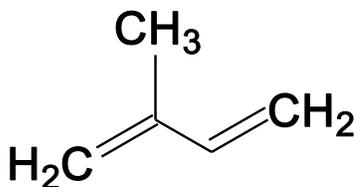


FIGURA 3: Ejemplo de estructura del isopreno (Marcano y col., 2002).

Monoterpenos

Son compuestos bioquímicamente derivados de dos unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos: plantas, microorganismos, insectos; algunos tienen función específica en el individuo productor y varios presentan actividades biológicas de distinta naturaleza. Dentro de los monoterpenos existen varios tipos estructurales los llamados esqueletos regulares e irregulares (Dewick, 2002).

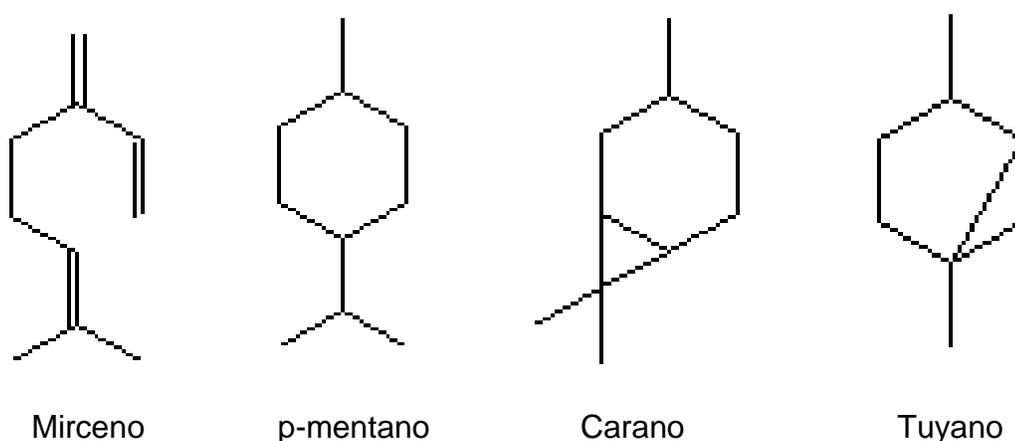


FIGURA 4: Ejemplos de estructura de monoterpenos (Bruneton, 1993).

Sesquiterpenos

Estos compuestos contienen solo 15 átomos de carbono, se caracterizan por ser los aceites volátiles con el punto de ebullición más alto. Son insaturados y están formados por el enlace de tres unidades de isopreno y su fórmula condensada es $C_{15}H_{24}$, pueden ser: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, sesquiterpen-lactonas, azulenos (Albornoz, 1980).

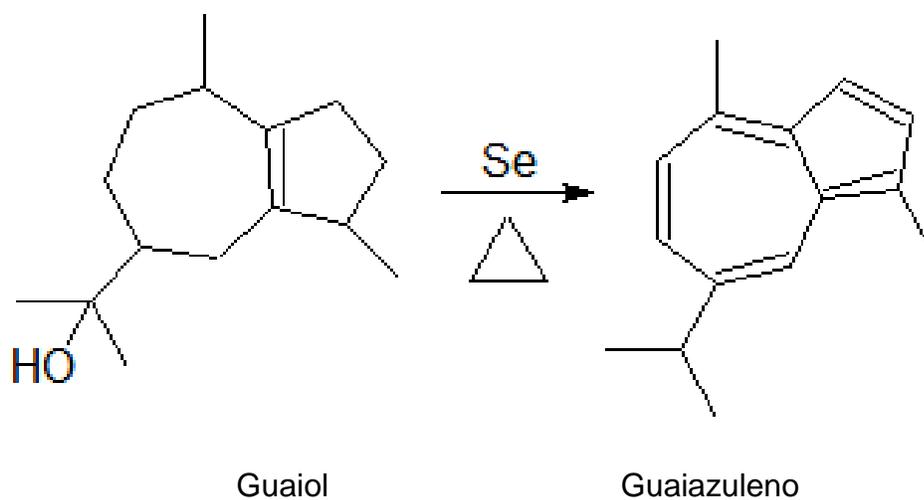
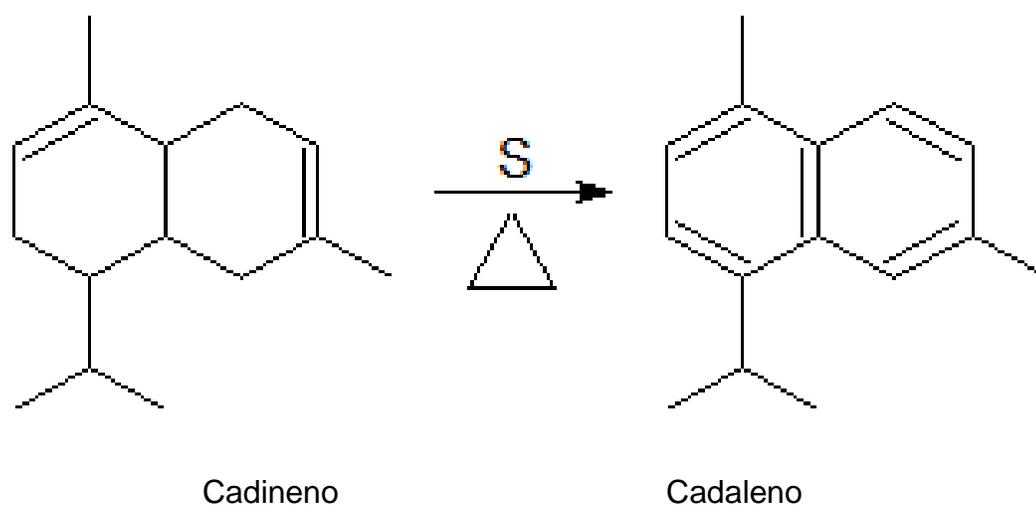


FIGURA 5: Ejemplos de estructura de sesquiterpenos (Marcano y col., 2002).

Diterpenos

Son derivados de hidrocarburos $C_{20}H_{32}$, con puntos de ebullición altos, constituyentes de resinas y sustancias resinosas. En este grupo son relevantes: diterpenos acíclicos, diterpenos monocíclicos, diterpenos bicíclicos, diterpenos tricíclicos, gibberellinas, sesterpenos u ofiobolinas (Albornoz, 1980).

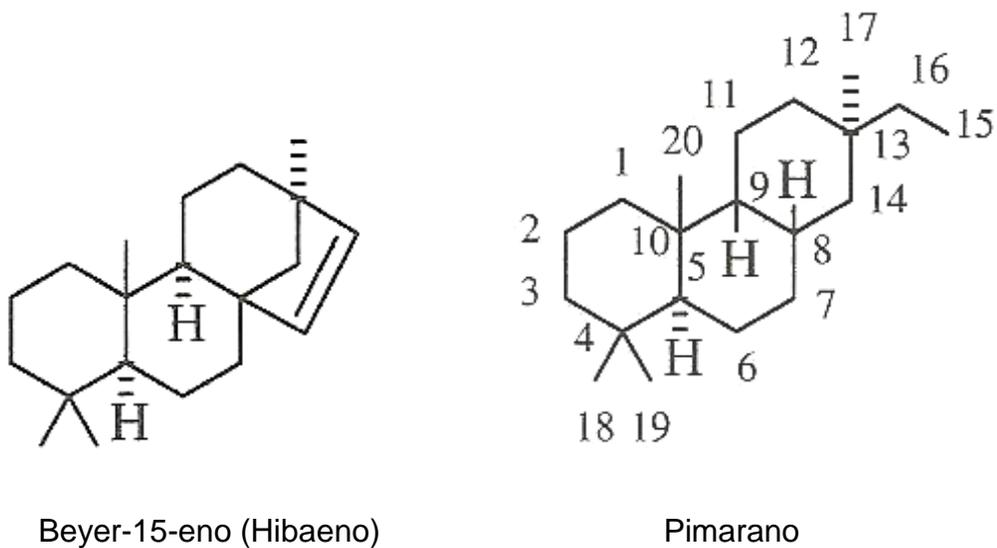


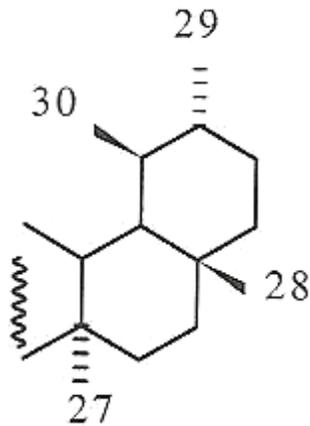
FIGURA 6: Ejemplos de estructura de diterpenos (Marcano y col., 2002).

Sesterterpenos

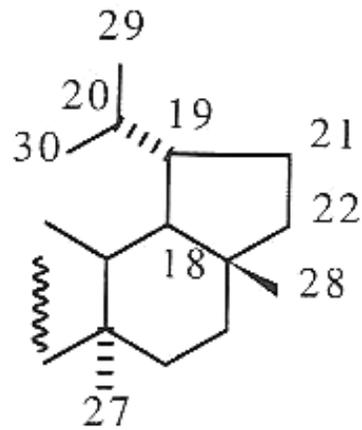
Son los miembros de conocimiento más recientes de la familia terpénica, cuyo esqueleto está conformado por 25 átomos de carbono, tiene su origen en la ciclación del geranilfarnesilpirofosfato: GFPF (Marcano y col., 2002).

Triterpenos

Están ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal en forma libre o como ésteres y glicósidos. Los componentes de esta familia son muy numerosos, pero a pesar del mayor número de átomos de carbono (30, seis unidades de IPPF) del esqueleto básico, las modificaciones esqueléticas son menores que en el caso de los sesquiterpenos. Comprenden varios subgrupos: acíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos, limonoides, meliacinas y simaroubolidos. (Albornoz, 1980).



Taraxasteranos (Ursanos)



Lupanos

FIGURA 7: Ejemplos de estructura de triterpenos (Marcano y col., 2002).

Biosíntesis de los aceites esenciales

La vía más frecuente es la del ácido shikímico, comienza a partir de la formación de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) y después, por desaminación de estos últimos, a la de ácidos cinámicos y de sus numerosísimos derivados: ácidos benzoicos, acetofenonas, lignanos y ligninas, cumarinas, entre otros (Bruneton, 1993).

Vía shikimato

La primera reacción es la condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) con la eritrosa-4-fosfato para formar un compuesto de 7 carbonos, el 3-desoxi-D-*arabino*-heptuloso-7-fosfato (DAHP). La ciclación de DAHP en 3-dehidroquinato es una reacción compleja en la que interviene una condensación aldólica intramolecular participando después la eliminación del fosfato.

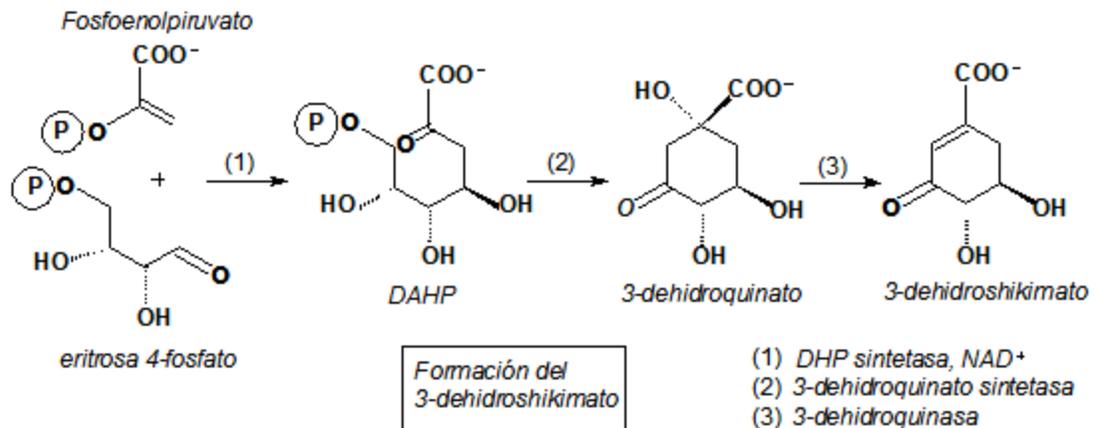


FIGURA 8: Formación del 3-dehidroshikimato (Bruneton, 1993).

La deshidratación del 3-dehidroquinato es catalizada por una enzima que, formando transitoriamente una base de Schiff entre un residuo de lisina y el carbonilo del 3-dehidroquinato, induce una eliminación estereoespecífica de agua. Después de la reducción del 3-dehidroshikimato y la fosforilación del shikimato, se produce la condensación con una nueva molécula del PEP para formar un éter enólico, el 5-enolpiruvilsikimato 3-fosfato (EPSP). Este último conduce, a 1,4-eliminación no habitual, al corismato.

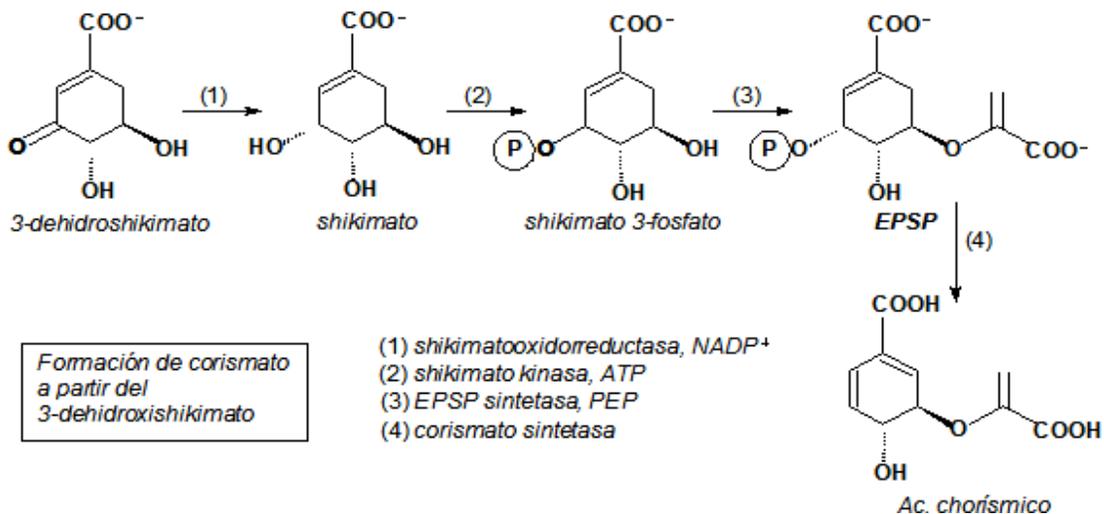


FIGURA 9: Formación del corismato a partir del 3-dehidroxishikimato (Bruneton, 1993).

El ácido chorísmico ocupa una posición clave en el metabolismo y su transformación es múltiple:

- Reagrupamiento pericíclico de tipo Claisen en prefanato. Es la vía que conduce, vía fenilpiruvato, a la fenilalanina y tirosina. Este reagrupamiento se cataliza por una enzima, la corismato mutasa, capaz de transferir la cadena lateral derivada del PEP de tal manera que quede directamente ligada sobre el carbociclo, engendrando así el esqueleto de los fenilpropanos. La enzima ejercería control conformacional, privilegiando un estado de transición “silla” con sustituyentes pseudo-axiales.
- Aminación y formación de antranilato (*o*-aminobenzoato). El antranilato es el intermediario que se encuentra siempre en la biosíntesis del triptófano, el cual es el punto de partida en la formación de todos los alcaloides indólicos. También es el precursor (directo) de la mayoría de los alcaloides quinoleínicos y, en los microorganismos, de los antibióticos.
- Hidroxilación y deshidratación en isocorismato a partir del cual se forman los ácidos fenólicos en C₆-C₁ (ej.: ácido salicílico) y, por intermedio del ácido *o*-succinilbenzoico (OSB), ciertas naftoquinonas.

La descarboxilación del prefanato, su aromatización y su aminación reductora conducen a la formación de L-fenilalanina. Si se conserva el hidroxilo en 4 (formándose el 4-hidroxifenilpiruvato por la prefanato deshidrogenasa) la aminación reductora conduce a la formación de L-tirosina. También se conoce otra vía de formación de aminoácidos aromáticos, en ella la etapa inicial está constituida por la aminación reductora del α -cetoácido; el aminoácido así formado (*L*-arogenato) seguidamente se

descarboxila y aromatiza formando la *L*-fenilalanina (arogenato deshidratasa) o *L*-tirosina (arogenato deshidrogenasa) (Bruneton, 1993).

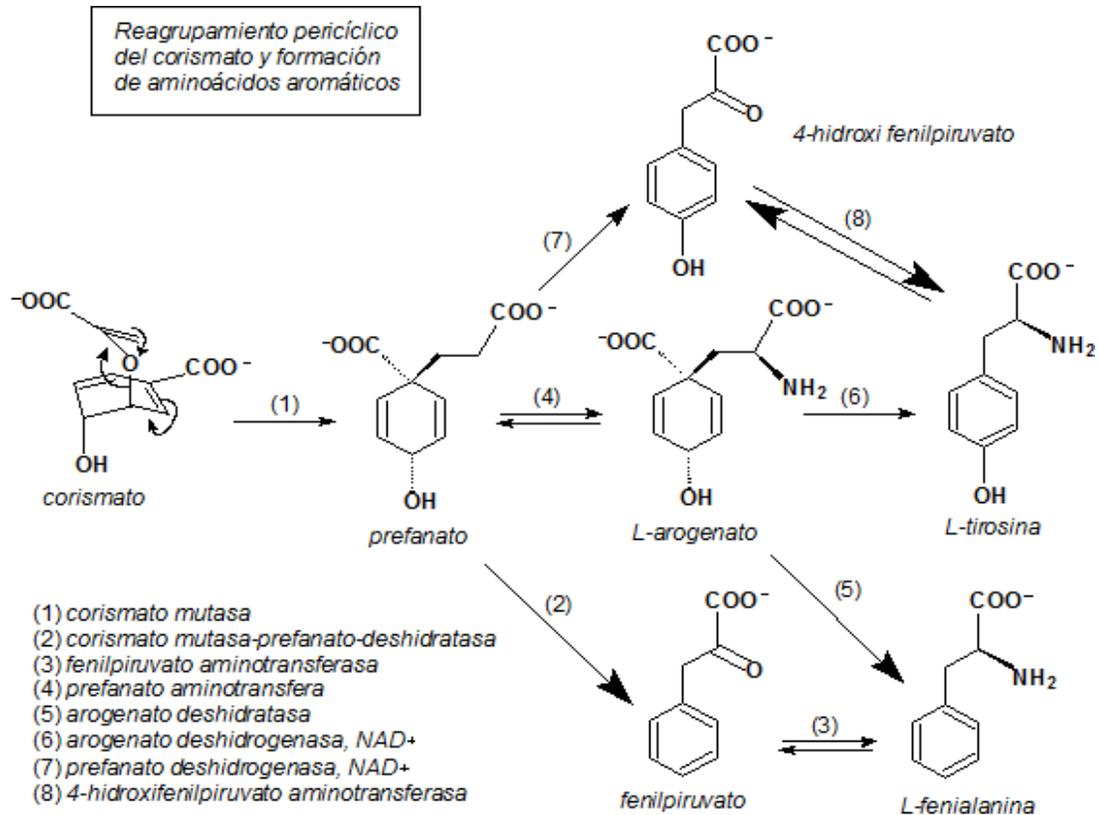


FIGURA 10: Reagrupamiento pericíclico del corismato y formación de aminoácidos aromáticos (Bruneton, 1993).

Vía del mevalonato

La etapa inicial del proceso implica la condensación de los tioésteres del ácido acético: formación del acetato-acetato (Claisen) y condensación (aldólica) de este con una molécula de acetilcoenzima A; la reacción está catalizada por un enzima, hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa. Otra enzima, hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa, efectúa la reducción NADPH dependiente del 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-CoA), a ácido 3*R*-mevalónico (MVA) (se ha comprobado que el otro isómero de este

ácido no se incorpora). La conversión del ácido mevalónico en estructuras hemiterpénicas comienza con una doble fosforilación. Una nueva fosforilación permite introducir un importante grupo de partida -el grupo pirofosfato- cuya eliminación permitirá la descarboxilación: la mevalonato-5-difosfato descarboxilasa induce la formación del pirofosfato de isopentenilo (IPP).

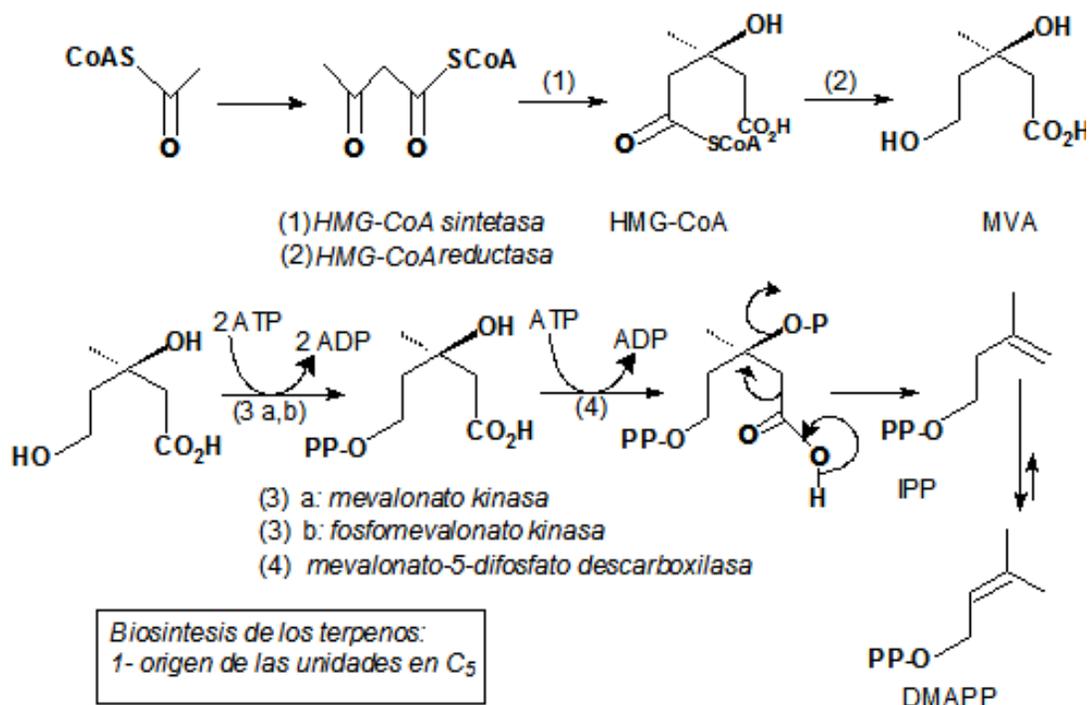


FIGURA 11: Vía del mevalonato (Bruneton, 1993).

El isopentenilpirofosfato se isomeriza mediante la isopentenildifosfato Δ -isomerasa en dimetilpirofosfato (DMAPP). El reagrupamiento alílico 1,3 implica la adición de un protón del medio, eliminación del protón *pro-2R*. Este DMAPP es altamente reactivo: puede sufrir un ataque nucleófilo en C-1 con salida concomitante del grupo pirofosfato; el ataque puede ser debido a una molécula de IPP (*vide infra*) o de cualquier molécula reactiva (de ahí la existencia de metabolitos «mixtos» C- u O- alquilados mencionados anteriormente) (Bruneton, 1993).

Localización de los aceites esenciales

Los aceites pueden encontrarse en un determinado órgano vegetal, flores, hojas, frutos, y hasta raíces o en algunos casos en toda la planta y se depositan en unas glándulas especiales formadas por células secretoras arregladas para formar una bolsa donde se acumula el aceite esencial estas pueden ser: (Domínguez, 1973).

Glándulas monocelulares

Están situadas en tejidos normales o no diferenciados, formadas por una sola célula en la cual la esencia se encuentra bien protegida contra los agentes oxidantes. Ejemplo: en las familias *Magnoliaceae*, *Canelaceae*, *Monimiaceae*.

Glándulas pluricelulares

Están localizadas en tejidos secretores más o menos diferenciados las cuales están formadas por varias células, entre estas tenemos:

Glándulas pluricelulares aéreas o epidérmicas. Ejemplo en las familias *Labitae*, *Solanaceae* y *Compositae*.

Glándulas pluricelulares internas que a su vez se dividen en:

- a) Esquizogéneas: como en las *Coníferas*
- b) Esquizolisígenas: como en la *Rutaceae* y *Myrtaceae*.

Pueden formarse directamente en el protoplasma, por descomposición de la capa resinógena de la pared celular o por hidrólisis de ciertos glicósidos. Algunos aceites se encuentran en la planta en forma de precursores no volátiles frecuentemente glicósidos, la descomposición es

enzimática o en medio ácido diluido. Esto se observa en las almendras amargas, pimienta negra, vainilla (Marcano y col., 2002; Bruneton, 1991; San Martín, 1968).

Proceso de obtención de los aceites esenciales

Entre los métodos utilizados para la obtención de aceites esenciales encontramos los siguientes:

1.- La hidrodestilación o destilación por arrastre por vapor de agua

Consiste en un procedimiento ampliamente utilizado debido al relativamente sencillo equipo necesario y a su gran versatilidad a la hora de aplicarlo a materiales vegetales diferentes. Su principal inconveniente es la alta temperatura de operación, que lo hace inapropiado para aquellos aceites esenciales con componentes sensibles al calor (Otalora, 2012).

En el presente estudio, la técnica a utilizar fue la hidrodestilación usando la trampa de Clevenger. Este aparato está compuesto de un balón de vidrio, donde se deposita la materia prima previamente licuada y una cantidad determinada de agua pura. El balón es calentado constantemente y el aceite esencial con el agua presente se evapora continuamente. El condensador va acoplado al balón a través de una conexión en forma de D que permitirá acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua condensada regresa al balón por el rebose de la conexión (Huelvas, 2009).

2.- La extracción con grasa en caliente y el “enfleurage” en frío

Son métodos antiguos que ya no se emplean. A pesar de la gran calidad del aceite esencial obtenido en el caso del “enfleurage” en frío, este método es muy laborioso, requiere de mucha mano de obra y está ampliamente superado técnicamente (Ortuño, 2006).

3.- La extracción con disolventes derivados del petróleo

Es la principal alternativa actual a la destilación, compitiendo con esta en algunas ocasiones y aplicándose siempre en los aceites más sensibles al calor. Su inconveniente, además del mayor coste de equipos con relación a la destilación, radica en el empleo de disolventes tóxicos que son peligrosos e inflamables en su manejo y que pueden dejar trazas en el producto obtenido, alterando el aroma del aceite esencial (Sandra y col., 1987).

4.- La extracción con fluidos en condiciones supercríticas

Es el desarrollo más reciente y poco a poco va siendo el proceso adoptado por industrias de nueva creación. Tiene la ventaja de no alterar la composición del aceite esencial ni dejar ningún resto de disolventes, pero como contrapartida presenta los inconvenientes derivados del alto coste del equipo necesario así como de un coste de operación también elevado, debido al empleo de altas presiones y equipos con cierres herméticos para trabajos con gases. Además, suele extraer compuestos ajenos al aroma como pigmentos o ceras, que se incorporan al aceite esencial (Ortuño, M. 2006; Sandra y col., 1987).

5.- La extracción con disolventes no derivados del petróleo

Es una alternativa que no se utiliza aunque ha sido sugerida por algunos expertos. Éste método pretende heredar las ventajas de la extracción con disolventes convencional, evitando en cambio el contacto del

material vegetal con disolventes derivados del petróleo (Sandra, y col., 1987).

Luego de haber obtenido estos aceites de sus fuentes naturales, a través de cualquiera de los procesos mencionados, generalmente se purifican por medio de destilación al vacío (Ortuño, M. 2006).

Análisis de los aceites esenciales

Debido al gran interés comercial los métodos de análisis han avanzado rápidamente. Estos métodos son: cromatografía de gases y HPLC y el análisis computarizado de los datos espectroscópicos (UV, IR, RMN de protones y de carbono, y EM). El más usado hoy en día, gracias a la volatilidad, es la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia de masas (CG-EM); la identificación de los aceites esenciales está basada en los datos obtenidos mediante ionización por impacto de electrones de alta energía (Marcano, 2002).

1.- Cromatografía de gases: es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatografía, esto implica que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de

adsorción. Precisamente este proceso de adsorción, que no es lineal, es el que ha provocado que este tipo de cromatografía tenga aplicación limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elución con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmobilizadas sobre la superficie de un sólido inerte. La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector (Barquero, 2006; Valcárcel y col., 1988).

2.- Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): Es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. La separación cromatografía en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria. Tales interacciones esencialmente no existen en la fase móvil para la cromatografía de gases. La HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. El recobro de la muestra es fácil en la HPLC. Las fracciones separadas se recolectan en forma sencilla, colocando un recipiente abierto al final de la columna. El recobro es usualmente cuantitativo (exceptuando la adsorción irreversible en la columna) y los componentes separados son fácilmente aislados del disolvente de la fase móvil. Adicionalmente al tipo usual de compuestos orgánicos, la cromatografía líquida en columna puede manejar separaciones de compuestos iónicos, productos lábiles de origen natural, materiales

poliméricos y compuestos polifuncionales de alto peso molecular (Castro y col., 2004).

3.- Cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia de masas (CG-EM): Se emplea para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles presentes en las diversas muestras ambientales. La técnica analítica se basa en la separación de los compuestos y su posterior identificación y comparando los tiempos de retención y los espectros de masa de un “barrido” previo del estándar específico de cada compuesto (Pimentel y col., 2006).

Usos de los aceites esenciales

Son empleados en las industrias como perfumes, jabones y repelentes de insectos, en alimentación como especias, condimentos o fuentes de materias primas. Sus propiedades antisépticas, bactericidas, antiflogísticas, antirreumáticas, antimicóticas y antihelmínticas se han aprovechado para la medicina natural como tratamiento, especialmente en infecciones bronquiales, urinarias y las causadas por las cortadas y quemaduras, relajan las contracciones intestinales y protegen los tejidos contra la acción de agentes atmosféricos. Asimismo ayudan a la polinización ya que atraen a los insectos por su aroma (Marcano y col., 2002; Albornoz, 1980; Domínguez, 1973).

Bacterias

Son microorganismos procariotas, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división sexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular Gram positiva que contiene una capa gruesa de peptidoglicano una pared celular Gram negativa con una capa delgada de peptidoglicano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y se compensan sobreviviendo tan solo en el interior de células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico (Whitman y col., 1998).

Clasificación de las bacterias

Las bacterias se pueden clasificar según su aspecto macroscópico y microscópico, por el crecimiento y las propiedades metabólicas características, por su antigenicidad y, por último, por su genotipo.

Bacterias Gram positivas: Poseen una pared gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicanos que rodea la membrana citoplasmática. El peptidoglicano es un esqueleto en forma de malla con una función semejante a la del exoesqueleto de los insectos. Sin embargo, el peptidoglucano de la célula es lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a membrana plasmática.

Bacterias Gram negativas: Son más complejas que las células Gram positivas. Desde el punto de vista estructural, su pared celular contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática. Inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una delgada capa de peptidoglicano que representa tan solo un 5% al 10% del peso de la pared celular, además esta pared celular no contiene ácido teicoico ni lipoteicoico. En la parte externa de la capa de peptidoglicano se halla la membrana externa, la cual es exclusiva de dichas bacterias. (Murray y col., 2009).

Características de las bacterias a usar

1.- Staphylococcus aureus

Pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, son cocos Gram positivos, no móviles, que no forman esporas, anaerobios facultativos y catalasa positivos. Se acomodan en pares, tétradas y en cadenas cortas, pero aparecen en forma predominante en grupos como racimos. Aunque forma parte de la microflora humana normal colonizando las narinas en el 20-40% de los adultos, puede causar infecciones oportunistas importantes en condiciones apropiadas, siendo el patógeno humano más importante de los estafilococos. (Koneman y col., 2008).

2.- Enterococcus faecalis

Se caracteriza por ser cocos Gram positivos, anaerobios facultativos y que pueden crecer en condiciones de temperatura, pH y osmolaridad extremas. Es la más importante en patología humana, del 100% de aislamientos de enterococos, el 85-95% se aísla *E. faecalis*. Es causante de infecciones en pacientes hospitalizados y de sepsias postoperatoria. Son

saprofitos habituales del tracto gastrointestinal y ocasionalmente forman parte de la flora vaginal y de la uretra masculina. (Guirao y col., 2006).

3.- *Escherichia coli*

Son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracteriza por su capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas. Además tiene una aptitud para desarrollarse entre 43,5-45,5°C, para crecer en presencia de sales biliares y facultad para producir indol en agua de peptona. Se encuentra en el intestino del hombre y de los animales, pero en otros ambientes también como suelo y plantas. (Pascual y col., 2000).

4.- *Pseudomona aeruginosa*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, bacilo Gram negativo rectos o ligeramente curvos que son aerobios estrictos, son móviles por medio de unos flagelos polares, utilizan glucosa en forma oxidativa y produce un pigmento difusible. Cuando crece en placas aparece como grandes colonias grises con una periferia en expansión, muestra β -hemólisis y muestran un brillo metálico. Es el pseudomonadal que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas, también provoca infecciones óticas, cutáneas, óticas, urinarias y en las vías respiratorias altas, estas dos últimas son graves incluso potencialmente mortales en pacientes inmunodeprimidos. Por otro lado *P. aeruginosa* puede portar plásmidos de multirresistencia y esta característica ha conducido a la aparición de algunas cepas resistentes a todos los antibióticos eficaces (Koneman y col., 2008).

En el proyecto de investigación serán usadas las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la Investigación

La investigación presenta un enfoque de tipo mixto, ya que se determinaron dos variables: una mediante el análisis cualitativo, donde se compararon los componentes químicos del aceite esencial obtenido de las hojas de *Pimenta racemosa*, y otra cuantitativa, donde se tomaron en cuenta los datos y valores obtenidos de la actividad antibacteriana y la composición química del aceite esencial, para realizar el análisis comparativo con respecto a los valores de referencia en el laboratorio, con la finalidad de comprender de forma completa el objeto de estudio y poder reportar resultados confiables y reales (Hernández y col., 2006).

Tipo de la Investigación

Esta investigación estuvo basada en un estudio de tipo explicativo, ya que se fundamentó en responder la causa y el efecto en el aceite esencial de *Pimenta racemosa* recolectado en intervalos de 4 horas, así como también si eso influye en la actividad antibacteriana que este posea. La investigación explicativa es aquella que se encarga de buscar el por qué de los hechos mediante

el establecimiento de relación causa y efecto, y dicha investigación cumple con los parámetros requeridos (Hernández y col., 2006).

Diseño de la Investigación

El diseño de la investigación de tipo experimental, consiste en someter a un objeto o un grupo de individuos a determinadas condiciones o estímulos (variable independiente), para observar los efectos que se producen (variable dependiente). Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, es la razón por la cual el aceite esencial obtenido de *Pimenta racemosa* se sometió a determinadas condiciones y pruebas de laboratorio (Hernández y col., 2006).

Los estudios longitudinales se basan en recolectar datos a través del tiempo en diferentes periodos, para hacer inferencias acerca del cambio, sus causas y sus efectos. Este estudio se realizó en diferentes tiempos, por lo tanto se trata de un tipo de diseño de investigación experimental longitudinal (Hernández y col., 2006).

Sistema de Variables

Variables Dependientes

- a) Composición química del aceite esencial obtenido de *Pimenta racemosa*.
- b) Actividad antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas.

Variables Independientes

Planta *Pimenta racemosa*.

Variables Intervinientes

- Metodología utilizada en la preparación de los cultivos bacterianos.
- Acondicionamiento del laboratorio donde se llevará a cabo el proceso experimental.
- Materiales e instrumentos utilizados, los cuales pueden resultar inadecuados.

Población y Muestra

Población: *Pimenta racemosa*

Las hojas frescas de la planta *Pimenta racemosa*, fueron recolectadas en el Herbario Dr. Luis Ruiz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes del estado Mérida - Venezuela. Se preparó un *Voucher Specimen*, siguiendo el método tradicional de prensado y secado, y una vez etiquetado, el mismo se depósito en el Herbario bajo el N°

01-N. Concepción y M. Calero, la planta fue botánicamente identificada, por el Dr. Pablo Meléndez, Director del Herbario.

Muestra

El ensayo consistió en recolectar 300 gramos de las hojas de la *Pimenta racemosa* a las 8:00 a.m., 12:00 p.m. y 4:00 p.m. del 13 de mayo del año 2014, las hojas fueron pesadas en una balanza digital y depositadas en una licuadora con 1200mL de agua, posteriormente fueron licuadas y sometidas a hidrodestilación por un tiempo aproximado de (4) cuatro horas, usando un aparato llamado Trampa de Clevenger. Al Aceite esencial obtenido le fue agregado un desecante, Sulfato de sodio (Na_2SO_4) para eliminar residuos de agua, luego fue dispensado en tubos de ensayo y se mantuvo bajo refrigeración (4°C) en la oscuridad, para no alterar su composición y tampoco su actividad.

Tipo de muestreo

Corresponde al modelo no probabilístico de tipo interrelacional, ya que la elección de la muestra no depende de la probabilidad, sino que depende de las características de la investigación, es decir, no se realiza con formulas probabilísticas, por el contrario se toma en cuenta los criterios de los investigadores y de la investigación misma (Hernández y col., 2006).

Métodos y técnicas de recolección de información

La obtención del aceite esencial de las hojas de la *Pimenta racemosa*, se realizó en el Laboratorio de Investigaciones “Dr. Ramón Masini Osuna”, perteneciente al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes del estado Mérida - Venezuela; mediante el método de hidrodestilación o arrastre por vapor de agua.

Separación e identificación de los componentes volátiles del aceite esencial de la *Pimenta racemosa*

1.- Cálculos de los índices de Kovats: se determinó por cromatografía de gases empleando dos columnas capilares HP-5 MS.

2.- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM): El estudio por CG/EM de los aceites de la especie *P. racemosa*, se realizó en el (IIFFB) Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes del estado Mérida – Venezuela, en un Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard Modelo GC System HP6890 y Mass Selective detector 5973 serie II, equipado con columna capilar HP-5 MS (30 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno y un espesor de pared de 0,25 μm). La temperatura inicial fue de 60°C hasta alcanzar 260°C a razón de 4°C/min. La temperatura del puerto de inyección fue de 230°C y la del cuadrupolo 150°C. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 0,9 mL/min ajustado a una velocidad lineal de 34 m/s. La energía de la fuente de ionización fue de 70 eV con un rango de barrido de 40-500 amu a 3,9 scans/s. Se inyectó 1,0 μL del aceite diluido al 2% en n-heptano con una relación de split de 1:100.

La identificación de los componentes del aceite se realizó por comparación de sus espectros de masas con los reportados en la base de datos del equipo Wiley MS library data 6ta Edición y los IK reportados en la literatura de Hochmut, D. (2006) (Contreras y col., 2014).

Determinación de la actividad antibacteriana del aceite en estudio

Bacterias de ensayo: Se seleccionaron 4 especies, dos bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y dos bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Preparación de la solución madre del aceite esencial de *Pimenta racemosa* y las concentraciones para el ensayo a partir de la misma

Se hicieron los cálculos necesarios para obtener una solución madre de 50.000 ppm del aceite. Luego se pesó 0,05 gramos del aceite requerido para la solución madre, en una balanza digital y fue trasvasado a un envase de cristal limpio, posteriormente se le agregaron 1000 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Cálculos realizados para obtener la concentración máxima a estudiar de cada muestra:

Para calcular la concentración máxima a estudiar de cada muestra, se utilizo como solución madre la de 50.000 ppm del aceite y se prosiguió de la siguiente manera:

$$V_c \times C_c = V_d \times C_d \quad \Longrightarrow \quad V_c = \frac{V_d \times C_d}{C_c}$$

$$V_c = \frac{V_d \times C_d}{C_c} = \frac{1000 \mu\text{L} \times 12800 \text{ ppm}}{50000 \text{ ppm}} = 256 \mu\text{L}$$

Se tomaron 256 μL de la solución madre los cuales fueron diluidos en 744 μL de caldo nutritivo en un eppendorf, para obtener una solución de 12.800 ppm (doble de la concentración máxima a estudiar).

A partir de esta solución de 12.800 ppm se tomaron 200 μL y se aplicaron a la placa de Elisa y de allí se realizaron las demás diluciones.

Preparación de medios de cultivo

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutriente (BD Difco™), a excepción de *E. faecalis*, que por sus exigencias metabólicas se mantuvo en agar tripticasa soya (Oxoid).

Medios de cultivo líquidos:

- Caldo Nutriente (BD Difco™).
- Caldo Tripticasa soya (Oxoid).

Los medios fueron preparados con respecto a la masa y el volumen, siguiendo las indicaciones ya establecidas en el envase del fabricante y posteriormente esterilizados en autoclave a 121°C y una atmósfera de presión durante 20 minutos.

Preparación de los pre-inóculos bacterianos

A partir de cepas congeladas, se prepararon pre-inóculo en 20 mL de caldo de T. soya y nutriente y 100 μL de las cepas, que fueron incubados a 37°C durante 18 horas en agitación orbital.

Preparación de las placas

En cada una de las placas de Petri desechables se colocaron 10 mL aproximadamente del agar nutritivo previamente preparado y esterilizado, dejándose solidificar a temperatura ambiente, para su posterior utilización.

Determinación de la actividad antibacteriana por el método de microdilución

Se sometieron a estudio las cepas bacterianas de referencia del género *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* las cuales serán aportadas por el departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CMB)

A partir de los pre-inóculos de cada microorganismo preparados en los diferentes medios, se realizaron diluciones (1/10, 1/100, 1/1000) en suero fisiológico hasta obtener una suspensión celular deseada para cada microorganismo (Inoculo) (Fig. 12), esto depende de la capacidad y de las condiciones de replicación del mismo, de tal manera que se obtuvo una densidad celular inicial de 10^5 U.F.C/mL, para comprobar que se inicio el ensayo a esta concentración, se realizo la hora cero al control positivo (Medio de cultivo mas inoculo) de la siguiente manera (Fig. 12): del tubo control, se tomo 100 uL y se colocó en 9,9 mL de solución fisiológica (dilución 1/100) y esta se diluyo 10 veces hasta alcanzar una dilución de 1/1000 y progresivamente una dilución 1/10000. Luego de cada dilución se

tomaron 100 μL y se colocó en una placa con agar nutriente y tripticasa soya, dependiendo del microorganismo y se mezcló con la mano de modo que quedara extendido adecuadamente, luego se llevó a 37°C por 18 horas, y después de las 18 horas se contaron las colonias.

Por medio del método de microdilución se determinó la CIM (concentración inhibitoria mínima), definida como la menor o más baja cantidad del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo y generalmente se expresa en $\mu\text{g/mL}$, y la CMB (concentración bactericida mínima), descrita como la menor concentración del agente antimicrobiano que permite sobrevivir a menos del 0.1% del inóculo original.

Ambas fueron realizadas en una microplaca de poliestireno estéril de 96 pozos, con fondo plano, donde en la primera columna se le agregó 200 μL de caldo nutritivo, en la segunda columna se colocó 200 μL de aceite 1 en los dos primeros pocillos, 200 μL del aceite 2 en dos pocillos siguientes y 200 μL de aceite 3 en los últimos pocillos de esa columna, dicho aceite es el que actúa como antimicrobiano. Luego se procedió a colocar desde la columna número tres 100 μL de caldo nutritivo a cada pocillo, excepto la columna número doce, ya terminada esta etapa se empezó a mezclar desde la columna dos hasta la columna once con la pipeta multicanal. Para finalizar con esta técnica se agregó 100 μL del pre-inóculo desde la columna número dos hasta la número once, y se colocó 200 μL de este pre-inóculo a todos los pocillos de la columna número doce, se tapó la microplaca y se llevó a incubar a 84 rpm por 24 horas. Pasado este tiempo se observaron los pocillos para identificar la turbidez en las diferentes concentraciones para proceder a sembrar en las placas de petri y contar las colonias. (Negroni, 2009).

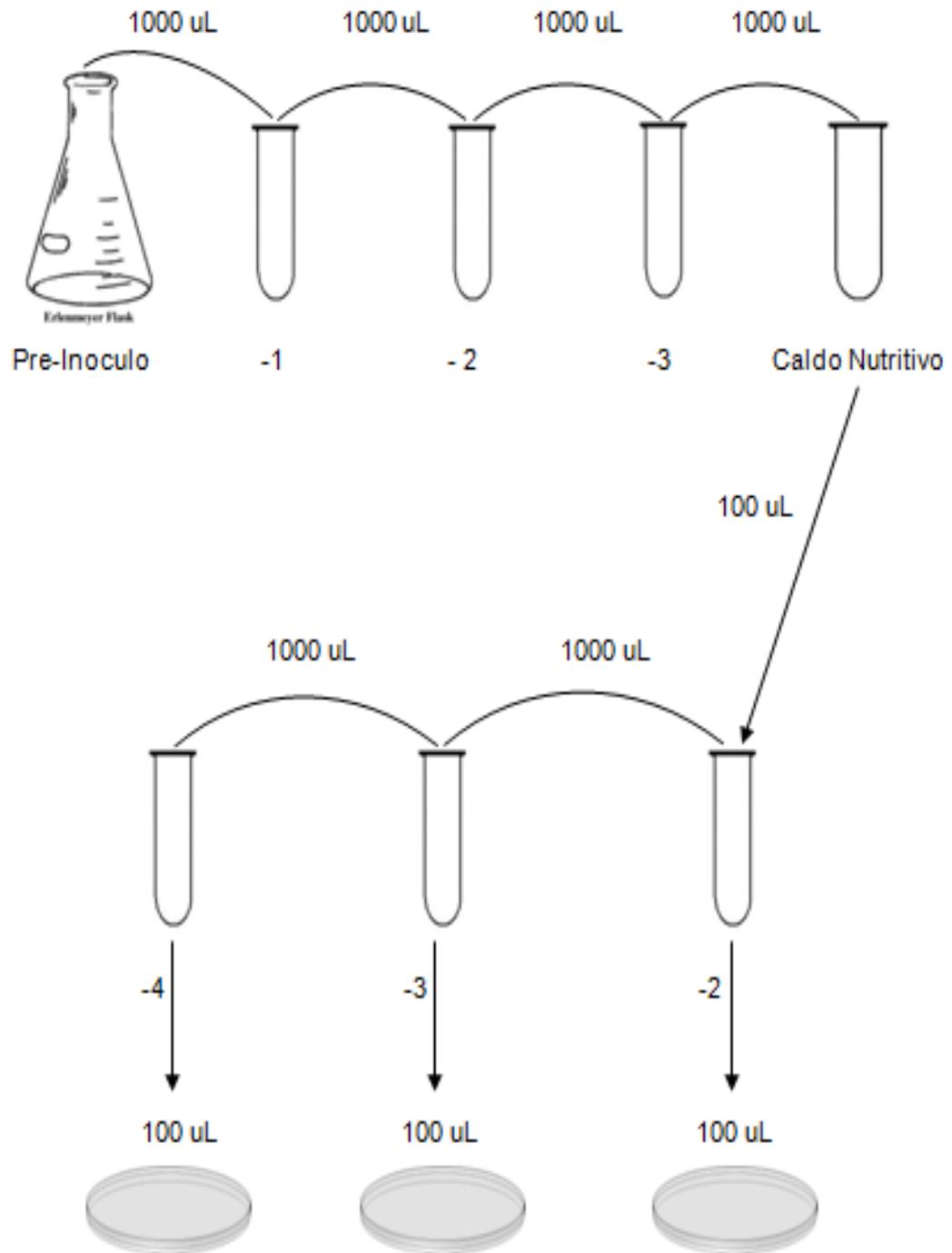


FIGURA 12: Método de microdilución.

Materiales

Espécie Vegetal

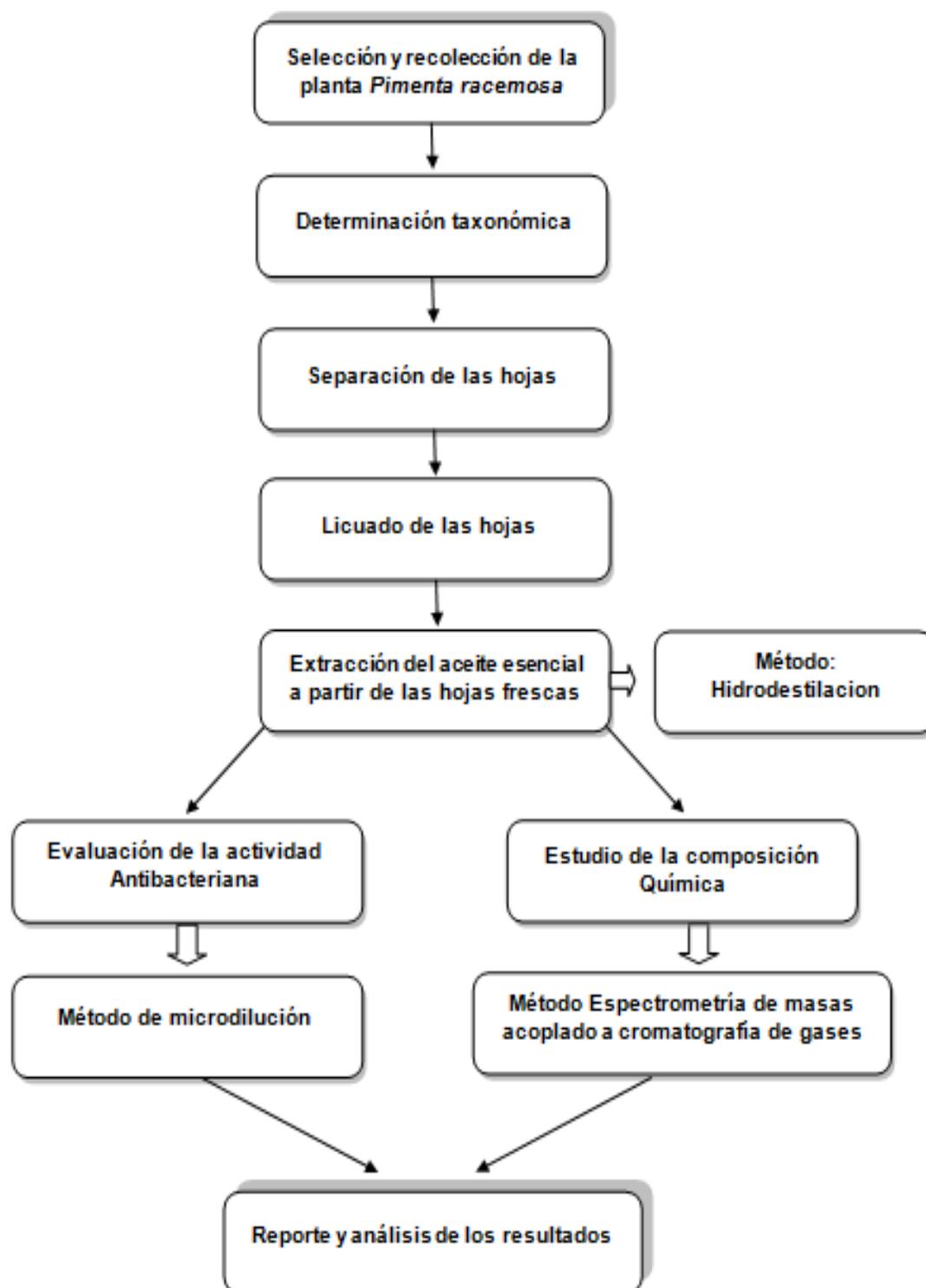
- ✓ Planta *Pimenta racemosa* (900 gr)

Material de Laboratorio

- ✓ Agar y Caldo Nutriente (BD Difco™).
- ✓ Agar y Caldo Tripticasa soya (Oxoid).
- ✓ Agua destilada
- ✓ Algodón
- ✓ Balanza digital
- ✓ Balón de destilación
- ✓ Balones aforados
- ✓ Cápsulas de Petri
- ✓ Cepas Bacterianas
- ✓ Cinta adhesiva
- ✓ Cloro
- ✓ Condensador o refrigerante
- ✓ Conector
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ✓ Embudos
- ✓ Eppendorfs
- ✓ Equipo CG-EM Heweltt Packard
- ✓ Equipo de CG Perkin Elmer
- ✓ Equipo de destilación
- ✓ Espátulas

- ✓ Esterilizador
- ✓ Estufa
- ✓ Etanol
- ✓ Fiolas
- ✓ Fósforos
- ✓ Goteros
- ✓ Gradillas
- ✓ Jabón
- ✓ Kit de Seguridad de laboratorio: guantes, tapa boca y bata.
- ✓ Lápices y marcadores
- ✓ Licuadora
- ✓ Lupa
- ✓ Manta eléctrica
- ✓ Mechero
- ✓ Nevera
- ✓ Papel de aluminio
- ✓ Papel parafilm
- ✓ Pipetas y propipetas
- ✓ Placas de Elisa estériles
- ✓ Puntas para pipetas
- ✓ Regulador de corriente
- ✓ Reloj y cronómetro
- ✓ Solución Salina Fisiológica Estéril
- ✓ Sulfato de sodio (Na_2SO_4)
- ✓ Tijeras
- ✓ Trampa de Clevenger
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Varilla de vidrio
- ✓ Vasos de precipitado
- ✓ Vortex

ESQUEMA 1: Diseño experimental



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se hicieron 3 recolecciones durante el día 13 de mayo del año 2014 de 300 gramos para un total de 900 gramos de hojas frescas de la *Pimenta racemosa*, las cuales fueron sometidas a un proceso de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger, para extraer el aceite esencial. La primera recolección de las hojas de la planta, se realizó a las 8:00 a.m., obteniendo una cantidad de 1,6 mL de aceite de color ligeramente amarillo transparente que denominamos NM1, la segunda recolección de las hojas de la planta, se efectuó a las 12:00 p.m., alcanzando un total de 2,2 mL de aceite de color amarillo turbio, que denominamos NM2 y la tercera recolección de las hojas de la planta, se hizo a las 4:00 p.m., consiguiendo la cantidad de 1,7 mL de aceite de color blanquecino que denominamos NM3, todos los aceites presentaron un olor característico. Los componentes del aceite fueron separados en un Cromatógrafo de Gases marca Hewlett Packard 6890 equipado con una columna capilar HP-5 (difenil-metil-polixiloxano) de 30 metros de largo y 0,25 mm de diámetro y fueron identificados por un Espectrómetro de Masas (CG-EM) Hewlett Packard MSD 5973; empleando la base de datos Willey Ms data library 6th y el cálculo de los índices de Kovats

TABLA 1: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de *Pimenta racemosa*, NM1 (8:00 a.m.).

N°	Compuesto	%
1	α -pineno	0,60
2	1-octeno-3-ol	0,88
3	3-octanona	1,46
4	Mirceno	0,46
5	3-octanol	1,34
6	α -felandreno	1,70
7	<i>p</i> -cimeno	0,71
8	Limoneno	8,65
9	1,8-cineol	10,24
10	<i>trans</i>-β-Ocimeno	3,56
11	Linalol	2,21
12	3-ciclohexeno-1-ol	0,50
13	α -terpineol	2,57
14	decanal	0,45
15	Chavicol	4,97
16	Eugenol	59,18
17	β -cariofileno	0,33
18	δ -cadineno	0,30

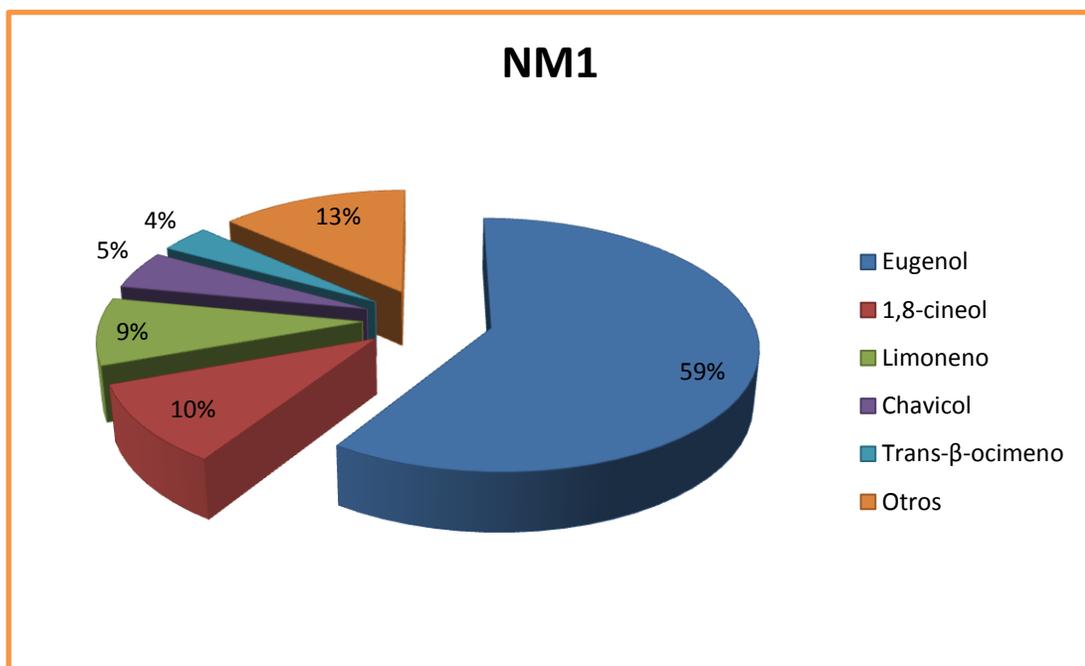


FIGURA 13: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de *Pimenta racemosa*, NM1 (8:00 a.m.).

La Tabla 1 presenta los componentes químicos del aceite esencial de *Pimenta racemosa* recolectado a las 8:00 a.m. (NM1), el aceite resulto contener 18 compuestos químicos, de los cuales se encontraron como componentes mayoritarios: el eugenol 59,18%, 1,8-cineol 10,24%, limoneno 8,65%, chavicol 4,97% y *trans*-β-Ocimeno 3,56%, los cuales se muestran en la figura 13.

TABLA 2: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de *Pimenta racemosa*, NM2 (12:00 p.m.).

N°	Compuesto	%
1	cis-3-hexenol	0,17
2	α -pineno	0,50
3	1-octeno-3-ol	0,90
4	3-octanona	1,47
5	Mirceno	0,29
6	3-octanol	1,28
7	Octanal	0,10
8	α -felandreno	1,31
9	Benceno	0,51
10	limoneno	6,50
11	1,8-cineol	9,98
12	<i>trans</i>-β-ocimeno	2,69
13	γ -terpineno	0,11
14	Linalol	2,24
15	terpineno-4-ol	0,52
16	α -terpineol	2,54
17	decanal	0,36
18	Chavicol	5,93
19	Eugenol	62,24
20	β -cariofileno	0,19
21	δ -cardineno	0,17

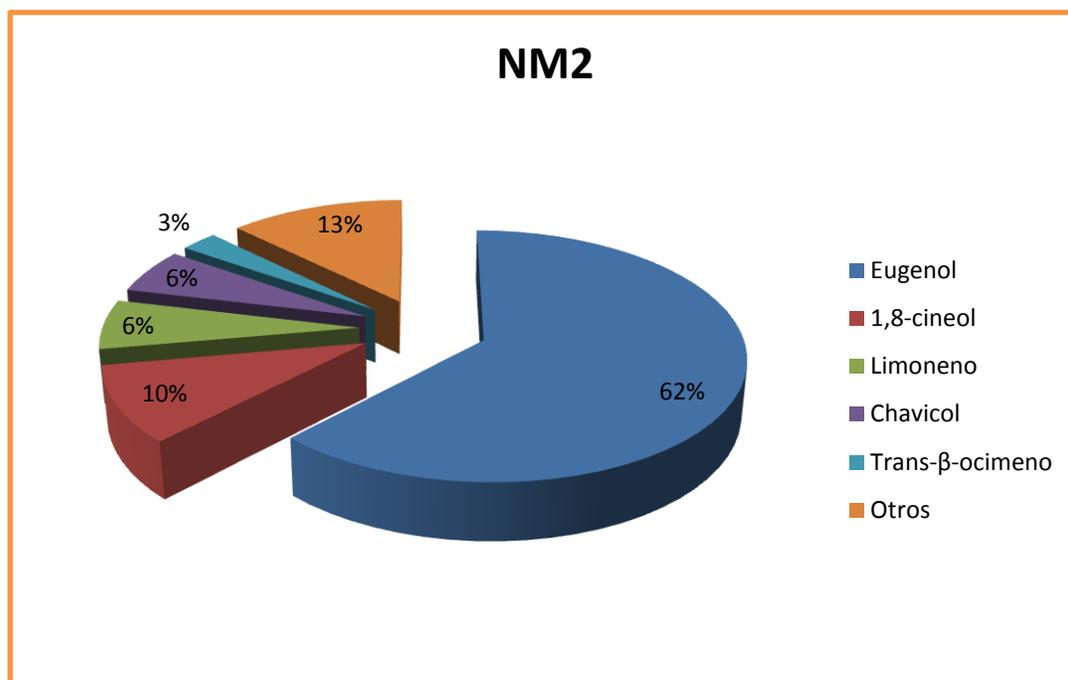


FIGURA 14: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de *Pimenta racemosa*, NM2 (12:00 p.m.)

La Tabla 2 presenta los componentes químicos del aceite esencial de *Pimenta racemosa* recolectado a las 12:00 p.m. (NM2), el aceite resulto contener 21 componentes químicos, de los cuales se encontraron como compuestos mayoritarios: el eugenol 62,24%, 1,8-cineol 9,98%, limoneno 6,50%, chavicol 5,93% y *trans*-β-Ocimeno 2,69%, los cuales se muestran en la figura 14.

TABLA 3: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de *Pimenta racemosa*, NM3 (4:00 p.m.).

N°	Compuesto	%
1	α -pineno	0,35
2	1-octeno-3-ol	0,81
3	3-octanona	1,41
4	Mirceno	0,24
5	3-octanol	1,27
6	α -felandreno	1,23
7	Benceno	0,33
8	Limoneno	5,67
9	1,8-cineol	9,32
10	<i>trans</i>-β-ocimeno	2,56
11	Linalol	2,09
12	terpino-4-ol	0,48
13	α -terpineol	2,37
14	decanal	0,32
15	chavicol	6,03
16	eugenol	65,33
17	β -cariofileno	0,19

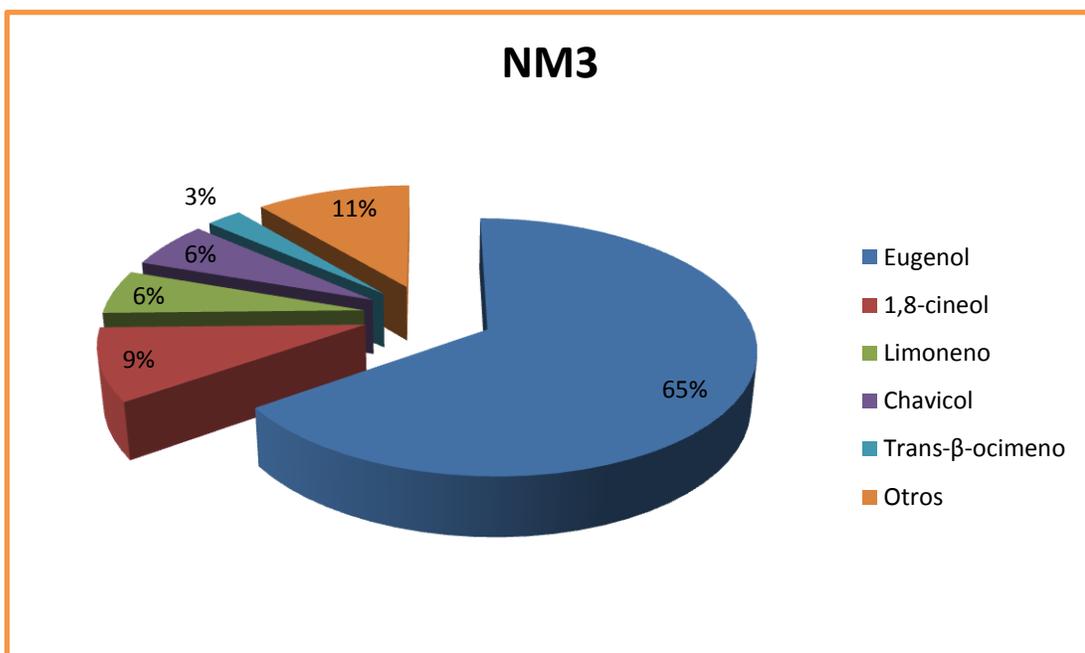


FIGURA 15: Componentes químicos del aceite esencial obtenidos de las hojas de *Pimenta racemosa*, NM3 (4:00 p.m.).

La Tabla 3 presenta los componentes químicos del aceite esencial de *Pimenta racemosa* recolectado a las 4:00 p.m. (NM3), el aceite resulto contener 17 compuestos químicos, de los cuales se encontraron como componentes mayoritarios: el eugenol 65,33%, 1,8-cineol 5,67%, limoneno 5,67%, chavicol 6,03% y *trans*-β-Ocimeno 2,56%, los cuales se muestran en la figura 15.

TABLA 4: Composición química del aceite esencial de *Pimenta racemosa* obtenido el 13/05/14; NM1 (8:00 a.m.); NM2 (12:00 p.m.); NM3 (4:00 p.m.).

N°	Compuesto	TR	% NM1	% NM2	% NM3	IKteo	IKcal
1	cis-3-hexenol	3,5	-----	0,17	-----	850	856
2	α -pineno	4,9	0,6	0,5	0,35	936	930
3	1-octeno-3-ol	5,8	0,88	0,9	0,81	962	964
4	3-octanona	6	1,46	1,47	1,41	979	972
5	Mirceno	6,1	0,46	0,29	0,24	988	975
6	3-octanol	6,2	1,34	1,28	1,27	988	978
7	Octanal	6,4	-----	0,1	-----	998	985
8	α -felandreno	6,5	1,7	1,31	1,23	1002	988
9	<i>p</i> -cimeno	7,1	0,71	0,51	0,33	1020	1006
10	Limoneno	7,2	8,65	6,5	5,67	1024	1009
11	1,8-cineol	7,3	10,24	9,98	9,32	1026	1012
12	<i>trans</i>-β-ocimeno	7,7	3,56	2,69	2,56	1029	1025
13	γ -terpineno	8	-----	0,11	-----	1051	1039
14	Linalol	9,1	2,21	2,24	2,09	1086	1086
15	terpineno-4-ol	11,6	0,5	0,52	0,48	1164	1174
16	α -terpineol	12	2,57	2,54	2,37	1176	1186
17	decanal	12,4	0,45	0,36	0,32	1180	1198
18	Chavicol	14	4,97	5,93	6,03	1219	1249
19	Eugenol	17,5	59,18	62,24	65,33	1331	1361
20	β -cariofileno	19,3	0,33	0,19	0,19	1421	1414
21	δ -cadineno	22,4	0,3	0,17	-----	1520	1520

TR: Tiempo de retención de los componentes; **%NM1:** Porcentaje del aceite esencial primera recolección (8:00 a.m.); **%NM2:** Porcentaje del aceite esencial segunda recolección (12:00 p.m.); **%NM3:** Porcentaje del aceite esencial tercera recolección (4:00 p.m.); **IKteo:** Índice de kováts teórico calculado con temperatura programada en una columna HP-5; **IKcal:** Índice de Kováts calculado.

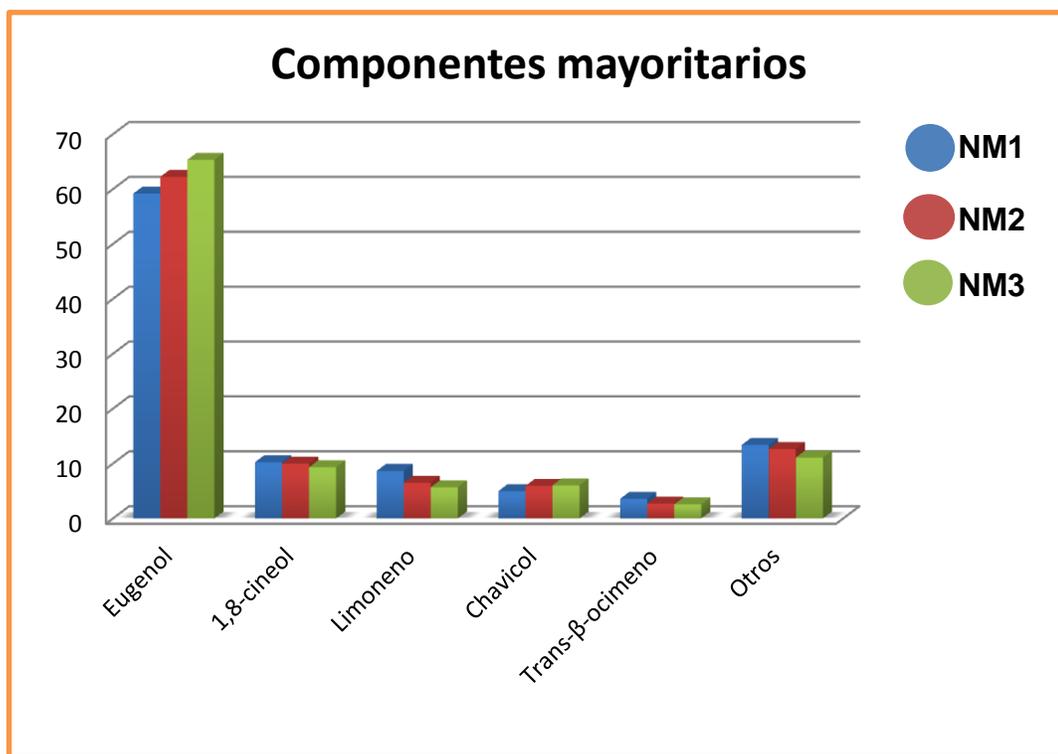


FIGURA 16: Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Pimenta racemosa*; NM1 (8:00 a.m.); NM2 (12:00 p.m.); NM3 (4:00p.m.).

La Tabla 4 presenta los componentes químicos del aceite esencial de *Pimenta racemosa* de todas las recolecciones, con el total de todos los compuestos encontrados en el ensayo sus tiempos de retención, los índices de kovats teóricos y calculados. El aceite resulto tener una coincidencia en varios compuestos químicos, aunque encontramos que hay diferentes compuestos en cada una de las recolecciones, por ejemplo NM1 y NM3 carecen de cis-3-hexenol, octanal y γ -terpineno, NM3 carece también de δ -cadineno, mientras podemos observar que la NM2 contiene más compuestos que las otras, aun así los componentes mayoritarios que son el eugenol, 1,8-cineol, limoneno, chavicol y *trans*- β -Ocimeno, se mantienen iguales en todas las recolecciones, con una leve diferencia en los porcentajes de los mismos, los cuales se muestran en la figura 16.

Los resultados del aceite total obtenidos son similares a los reportados por Huelvas (2009) y Contreras y col (2014), teniendo en cuenta que se trata de la misma especie, pero fueron recolectadas en diferentes épocas y distintos lugares, influyendo así las condiciones climáticas a las que la *Pimenta racemosa* haya sido sometida, sin embargo no es de extrañarse que los componentes mayoritarios en común sean los siguientes: el eugenol, limoneno, chavicol, 1,8-cineol y *trans*- β -ocimeno, por ejemplo: para Huelvas (2009), el eugenol se encontraba en un 66,28%, mientras que para Contreras y col (2014), el eugenol se obtuvo en un 60,4%, en cambio en nuestro ensayo el eugenol está en un 65,33% en NM3; por otro lado para Huelvas (2009), el limoneno reportado es de 52,65%, en Contreras y col (2014), es de 5,4%, en nuestro ensayo es de 8,65% en NM1; por otra parte para Huelvas (2009), el chavicol se encontró en un 4,14%, en Contreras y col (2014), en un 6,0%, en nuestro ensayo esta en un 6,03% en NM3; por otro lado el 1,8-cineol para Huelvas (2009), está presente en un 14,69%, para Contreras y col (2014), en un 2,9%, mientras que en NM1 esta en un 10,24% por último tenemos al *trans*- β -ocimeno que para Huelvas (2009), se identificó en un 20,91%, pero en NM1 esta en un 3,56%, en Contreras y col (2014) no se obtuvo resultados de este componente.

Con respecto al estudio microbiológico existen autores como Ramírez y Castaño, (2009), que señalan que para escoger el método para determinar la actividad antibacteriana se debe tener establecido las condiciones generales de los extractos de las plantas, aceites esenciales y los compuestos aislados de estos, además se recomienda al momento de seleccionar o elegir el material vegetal a utilizar, se debe hacerlo tomando en cuenta sus características químicas y taxonómicas y por último y no menos importante los microorganismos y los medios de cultivo, ya que estos pueden influir con gran relevancia en la actividad de los aceites o extractos evaluados.

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de la especie *Pimenta racemosa* realizada por el método de microdilución en caldo utilizando una microplaca de 96 pocillos frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas de origen ATCC, mostrando actividad contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En las tablas 5, 6, 7 y 8 se describe la lectura de las colonias que crecieron de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *E. coli* a diferentes concentraciones de los aceites evaluados NM1, NM2 y NM3.

TABLA 5: Actividad del aceite ensayado con *S. aureus* ATCC 25923.

Concentraciones	6400ppm	3200ppm	1600ppm	800ppm	400ppm
NM1	269	0	0	31	267
NM2	0	29	59	718	Incontable
NM3	0	incontable	incontable	Incontable	Incontable

NM1: Aceite esencial primera recolección (8:00 a.m.); **NM2:** Aceite esencial segunda recolección (12:00 p.m.); **NM3:** Aceite esencial tercera recolección (4:00 p.m.)

TABLA 6: Actividad del aceite ensayado con *E. faecalis* ATCC 29212.

Concentraciones	6400ppm	3200ppm	1600ppm	800ppm	400ppm
NM1	incontable	incontable	incontable	Incontable	Incontable
NM2	0	1	5	Incontable	Incontable
NM3	0	2	incontable	Incontable	Incontable

NM1: Aceite esencial primera recolección (8:00 a.m.); **NM2:** Aceite esencial segunda recolección (12:00 p.m.); **NM3:** Aceite esencial tercera recolección (4:00 p.m.)

TABLA 7: Actividad del aceite ensayado con *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Concentraciones	6400ppm	3200ppm	1600ppm	800ppm	400ppm
NM1	0	0	incontable	Incontable	Incontable
NM2	251	1148	incontable	Incontable	Incontable
NM3	0	incontable	incontable	Incontable	Incontable

NM1: Aceite esencial primera recolección (8:00 a.m.); **NM2:** Aceite esencial segunda recolección (12:00 p.m.); **NM3:** Aceite esencial tercera recolección (4:00 p.m.)

TABLA 8: Actividad del aceite ensayado con *E. coli* ATCC 25922.

Concentraciones	6400ppm	3200ppm	1600ppm	800ppm	400ppm
NM1	0	0	0	Incontable	Incontable
NM2	0	0	0	Incontable	844
NM3	0	0	0	256	Incontable

NM1: Aceite esencial primera recolección (8:00 a.m.); **NM2:** Aceite esencial segunda recolección (12:00 p.m.); **NM3:** Aceite esencial tercera recolección (4:00 p.m.).

En la tabla 9 observamos las concentraciones mínimas bactericidas e inhibitorias de los aceites NM1, NM2 y NM3, determinando que la CMB de NM1 frente a *S. aureus* es mayor a 1600 ppm, mientras el NM2 y NM3 fue mayor a 6400 ppm para ambos aceites, es decir que demostró que tiene mayor actividad antimicrobiana utilizando una menor concentración el aceite denominado NM1, con respecto al NM2 y NM3. Por otro lado la CMI de NM1 y NM2 está entre 400 y 800 ppm, mientras que la CMI de NM3 está entre 3200 y 6400 ppm.

Con respecto a la otra bacteria Gram positiva *E. faecalis*, la CMB del aceite NM2 y NM3 fue de 3200 ppm, mientras que el aceite NM1 fue mayor a 6400 ppm, demostrando que los dos primeros mencionados acaba con el

99.9 % del crecimiento bacteriano a concentración menor que el NM1, resaltando además que las CMB de los tres aceites fueron diferentes.

Para las bacterias Gram negativas ensayadas, se puede comprobar que los tres aceites tuvieron el mismo comportamiento frente a *E. coli*, ya que la CMB fue de 800 ppm y la CMI entre 400 y 800 ppm, mientras para *P. aeruginosa* se obtuvo que los tres aceites tuvieron diferentes CMB, pero las CMI del NM1 y NM2 fueron similares, pero la CMI del NM3 fue mayor entre 3200 y 6400 ppm.

TABLA 9: Concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas del aceite esencial de *Pimenta racemosa* ensayadas con las bacterias de estudio.

Bacterias	NM1	NM2	NM3
<i>S. aureus</i>	CMB > 1600 ppm. CMI entre 400 y 800 ppm.	CMB > 6400 ppm. CMI entre 400 y 800 ppm.	CMB 6400 ppm. CMI entre 3200 y 6400 ppm.
<i>E. faecalis</i>	CMB > 6400 ppm. CMI > 6400 ppm.	CMB 3200 ppm. CMI entre 800 y 1600 ppm.	CMB 3200 ppm. CMI entre 1600 y 3200 ppm.
<i>P. aeruginosa</i>	CMB 3200 ppm. CMI entre 1600 y 3200 ppm.	CMB > 6400 ppm. CMI entre 1600 y 3200 ppm.	CMB 6400 ppm. CMI entre 3200 y 6400 ppm.
<i>E. coli</i>	CMB > 800 ppm. CMI entre 400 y 800 ppm	CMB > 800 ppm. CMI entre 400 y 800 ppm	CMB > 800 ppm. CMI entre 400 y 800 ppm

NM1: Aceite esencial primera recolección (8:00 a.m.); **NM2:** Aceite esencial segunda recolección (12:00 p.m.); **NM3:** Aceite esencial tercera recolección (4:00 p.m.); **CMB:** Concentración mínima bactericida; **CMI:** Concentración mínima inhibitoria.

Se puede evidenciar una respuesta bactericida e inhibitoria en las cepas Gram positivas y Gram negativas a la mezcla de los componentes volátiles aislados de la especie de *Pimenta racemosa*, existiendo la posibilidad de que la proporción en la que se encuentra los componentes del

aceite NM1, sea la más indicada para que el aceite sea más efectivo, ya que en su mayoría tuvo CMB a menores concentraciones, que los otros dos aceites en estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo con relación al aceite fueron similares a los reportados por Huelvas (2009), donde señala que la mezcla química resultante del aceite esencial obtenido de la *Pimenta racemosa*, genera actividad antibacteriana en las especies *E. faecalis*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, por producir un efecto sinérgico entre los compuestos químicos apolares y polares resultantes de la mezcla de dicho concentrado aceitoso; ya que por ser de naturaleza lipofílica, interaccionan con la membrana celular de las bacterias susceptibles contribuyendo así, con el paso de los compuestos oxigenados como el Eugenol; al cual se le ha atribuido un efecto bactericida. De igual manera existe la posibilidad de que estos componentes desarrollen otro mecanismo de acción actuando en la síntesis de la pared celular provocando así la degeneración de las proteínas presentes en la membrana celular de las bacterias. Sin embargo Huelvas (2009) informó, que el concentrado aceitoso siendo evaluado por el método de difusión en agar, demostró efectividad solo contra microorganismos Gram positivos y los microorganismos Gram negativos *E. coli* y *P. aeruginosa* desarrollaron resistencia y actividad inhibitoria muy baja, igualmente las fracciones 2 y 3 del aceite presentaron actividad antibacteriana escasa o casi nula, mientras que por el método de microdilución, utilizado en esta investigación, el aceite en todas sus fracciones es efectivo y también contra cepas gramnegativas, evidenciando que el método elegido es mejor ya que, se puede determinar tanto la concentración mínima bactericida como la concentración mínima inhibitoria.

Por otra parte existen diversos estudios microbiológicos como la investigación de Sáenz (2004), donde señala la actividad antibacteriana que poseen los aceites esenciales de *Pimenta racemosa*, sobre microorganismos

Gram positivos y Gram negativos. Estos estudios justifican y sustentan el uso de estos aceites en tratamientos contra algunas infecciones.

Los resultados de esta investigación evidencian la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimenta racemosa*, observándose que los componentes de esta especie vegetal poseen principios activos que actúan sobre patógenos resistentes a la terapia antibiótica convencional, puesto que los componentes del aceite de forma combinada ejercen una acción sinérgica potenciando así la actividad antibacteriana.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En este estudio fueron identificados en sus tres recolecciones 21 compuestos volátiles del aceite esencial de *Pimenta racemosa*, en la primera recolección a las 8:00 a.m. (NM1) se obtuvieron 18 compuestos, en la segunda recolección a las 12:00 p.m. (NM2) se obtuvieron 21 compuestos y en la tercera recolección a las 4:00 p.m. (NM3) 17 compuestos, de los cuales los constituyentes fluctuantes fueron eugenol, 1,8-cineol, limoneno, chavicol, y *trans*- β -ocimeno.

Se determino que en la recolección del aceite esencial de *Pimenta racemosa* de las 4:00 p.m. (NM3), fue mayor el rendimiento del eugenol y el chavicol con un 65,33% y 6,03% respectivamente, mientras que el 1,8-cineol, el limoneno y el *trans*- β -ocimeno tienen mejor rendimiento en la recolección de las 8:00 a.m. (NM1) con un 10,24%, 8,65% y 3,56% respectivamente. Con respecto a la cantidad de aceite esencial recolectado, la segunda recolección a las 12:00 p.m. (NM2), fue la más eficiente obteniéndose 2,2 mL de aceite, mientras que en la primera (NM1) y en la tercera (NM3) la cantidad fue similar, puesto que se recolecto 1,6 mL y 1,7 mL respectivamente.

El aceite esencial de *Pimenta racemosa* evidencio actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas de origen ATCC. Los compuestos presentes en el aceite esencial de *P. racemosa* de forma combinada ejercen una acción inhibitoria sobre las cepas ensayadas, las cuales son patógenas para el ser humano, demostrando que este aceite

podría ser usado en preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por dichos microorganismos, siendo una alternativa terapéutica innovadora.

RECOMENDACIONES

Se pudiese sugerir que podría ensayarse un nuevo proyecto para determinar las condiciones ambientales, la época del año y la hora del día más factible para recolectar la planta y así aprovechar el máximo de sus principios activos.

Así como el aceite de *Pimenta racemosa* dio resultados favorables contra las cepas de ensayo de este proyecto, se propone que se siga evaluando con otras cepas bacterianas, para examinar su rendimiento como bactericida.

También se debería evaluar la actividad del aceite de *Pimenta racemosa* bajo el método de microdilución, en contra de hongos de importancia clínica, ya que hay otros estudios que evidencian que esta planta posee dicha propiedad.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

- Abaul, J.; Bourgeois, P. (1995). Chemical Composition of the Essential Oils of Chemotypes of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (P. Millar) J. W. Moore (Bois d'Inde) of Guadeloupe (F.W.I). *Flavour and Fragrance Journal*. 10 pp 319-321.
- Abreu, O.; Cuéllar, A. (2008). Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13 (3).
- Albornoz A. M. (1997). *Medicina tradicional herbaria*. Caracas: Instituto Farmacoterapeutico. Caracas: Latino S.A. pp 6-382.
- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela. pp 212-222.
- Aurore, G., Abaul, J., Bourgeois, P., Luc, J. (1998). Antibacterial and antifungal activities of the essential oils of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* P. Miller (JW Moore) (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 10(2), pp 161-164.
- Ayedoun, A.; Adeoti, B.; Setondji, J.; Menut, C.; Lamaty, G.; Bessiere, J. (1996). Aromatic plants from tropical West Africa. IV. Chemical composition of leaf oil of *Pimenta racemosa* (Miller) J. W. Moore var. *racemosa* from Benin. *Journal Essential Oils Research*, 8(2),pp 207-209.
- Badillo, V.; Schnee, L.; Benitez, C. (1985). *Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela*. 7^{ma} edición. Caracas: Editorial Espasande S.R.L.

- Barquero, M. (2006). *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. 1^{ra} edición. Costa Rica: Comisión Editorial de la Universidad de Costa Rica. pp 1-3.
- Bello, A.; Rodriguez, M.; Castineira, N.; Urquiola, A.; Rosado, A.; Pino, J. A. (1995). Chemical composition of the leaf oil of *Pimenta racemosa* (Mill.) J. Moore from western Brazil. *Journal Essential Oils Research*, 7(4), pp 423-424.
- Benyahia, S.; Benayache, S.; Benayache, F.; Leon, F.; Quintana, J.; Lopez, M.; Hernandez, J. C.; Estevez, F.; Bermejo, J. (2005). Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity. *Phytochemistry*, 66(6), pp 627-632.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza - España: Acribia S.A. p 593.
- Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales*. 2^{da} edición. Zaragoza - España: Acribia, S.A.
- Castro, M.; Landemberger, C.; Walz, R.; Carlotti, G.; Huang, N.; Cunha, R.; Brentani, R. (2004). High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. *Journal of neuroscience methods*, 139(2), pp 263-269.
- Contreras B.; Rojas J.; Celis M.; Rojas L.; Méndez L.; Landrum L. (Mayo 2014). Componentes volátiles de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(3), pp 1-6.
- Cronquist, A. (1987). *The evolution and classification of flowering plants*. 2^a edición. U.S.A.: New York Botanical Garden, Bronx. pp 385, 501.

- Custódio, D., Burgo, R., Moriel, B., Barbosa, A., Rezende, M., Daniel, J., Faria, T. (2010). Antimicrobial activity of essential oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(6), pp 1363-1369.
- Dewick, M. (2002). *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. England: John Wiley & Sons. pp 1-506.
- Domínguez, X. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Editorial Limusa. pp 229-233.
- Dugarte, S.; Cárdenas C.; Martínez J.; Stashenko, E. (2007). Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación-extracción con solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (fam. verbenaceae). *Scientia et Technica*, 1(33), pp 83-85.
- Font P. (1973). *Plantas medicinales: El Dioscórides Renovado*. España, Barcelona: Editorial Labor. p 396.
- Garcia, D.; Alvarez, A.; Tornos, P.; Fernandez, A.; Saenz, T. (2002). Gas Chromatographic- Mass Spectrometry Study of the Essential Oils of *Pimenta racemosa* var. *Terebinthina* and *P. racemosa* var. *grisea*. *Zeitschrift für Naturforsch C.*, 57(5-6), pp 449-451.
- Guirao, X. y col. (2006). *Guía Clínica de Infecciones Quirúrgicas*. España: Aran Ediciones. p 462.
- Guyléne, A.; Abaul, J.; Bourgeois, P. (1998). Antibacterial and antifungal activities of the essential oils of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* P. Miller (J.W.Moore) (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 10(2), pp 161-164.

- Hernández, M.; García, L.; Rojo, D.; Olivares, D. (2003). Almendro de la India: Potencial Biológico Valioso. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22 (1).
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. (2006). *Metodología de la Investigación*. México: McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. pp 1-3, 157-271.
- Hokche, O.; Berry, P.; Huber, O. (2008). *Nuevo catalogo de la flora vascular de Venezuela*. Caracas: Fundación Instituto Botánico de Venezuela. p 525.
- Hoyos, J. (1978). *Flora tropical ornamental*. Toledo: Sociedad de ciencias naturales La Salle, monografía. 24, p 389.
- Huelas, P. (2009). *Análisis y determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la Pimenta Racemosa P. Miller (J. W. Moore) ver. Racemosa*. Tesis de grado. Universidad de Los Andes. pp 1-61.
- Jácobe, A. (2003). *Historia de los Medicamentos*. Bogotá-Colombia: Academia Nacional de Medicina. pp 56-57.
- Koneman E. y col. (2008). *Diagnóstico Microbiológico* (5^{ta} edición). Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A. pp 301-304, 595.
- León, J. (1968). *Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales*. Perú-Lima: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. pp 397, 405.
- Leyva, I.; Tacoronte, E.; Navarro, A.; Montada, D.; Bello, A.; Marquetti, C. (2007). Estudio de laboratorio del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) y su posible utilización para el control de *Muscadomestica* (Diptera: Muscidae). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(1), pp 18-19.
- Marcano, D.; Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Primera edición. Caracas: UCV-CDCHT. pp 1-274.

- Marcano, D.; Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Caracas: UCV-CDCHT. pp 248-325.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. Sexta edición. España: Editorial Elsevier. pp 4-333.
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica*. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A. Segunda Edición. pp 564-565.
- Núñez E. (1992). *Plantas Medicinales de Puerto Rico: floklora y fundamentos científicos*. Río Piedras: Editorial de la Universidad de Puerto Rico. p 221.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. 1^{ra} edición. España: Aiyana Ediciones. pp 7-24
- Otalora V. I. (2012). Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba-Bolivia. Facultad de Ciencias y Tecnología. Extracción por arrastre con vapor, importancia y explicación. [Disponible en línea]. Consultado el 08/07/2014 de <http://es.slideshare.net/RRALO/extraccion-por-arrastre-con-vapor>. pp 4-8
- Padrón M. B. (2010). *Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae*. Tesis doctorado: Universidad Autónoma de Nuevo León, España. p 5.
- Pascual, M., Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria* (2^{da} edición). España: Ediciones Díaz de Santos S. A. p 17.
- Paula, J.; Reis, J.; Ferreira, L.; Menezes, A.; Paula, J. (2010). Género *Pimenta*: aspectos botánicos, composición química y potencial farmacológico. *Revista Brasileira*, 12(3), pp 363-379.
- Pimentel, E., Ortiz, A., Valle, M. (2006). *Tópicos de genética*. 1^{ra} edición. México: Dirección de Difusión y Promoción de la Investigación y los Estudios Avanzados. p 40.

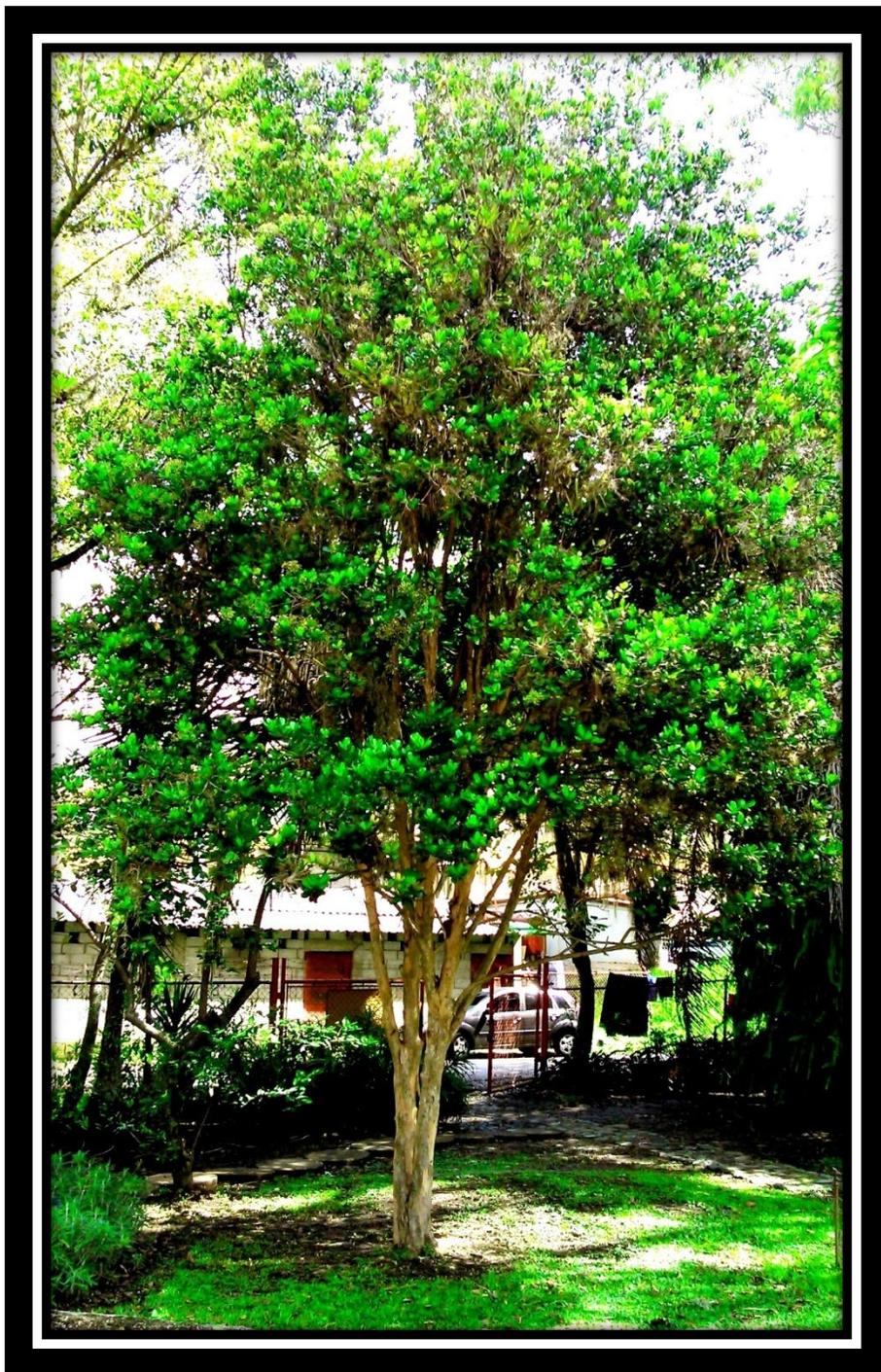
- Ramírez, L., Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, año XV, (42), pp 263-266.
- Roig, J. (1965) *Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos*. 3^{ra} edición. La Habana: Científico-Técnica. p 1142.
- Romagosa, J.; Rosales, S.; Rupérez, F.; Crespo, R. (2001). *Enciclopedia de medicina naturalista y alternativas*. Madrid-España: Cultural. pp 7-13.
- Sáenz, M., Tornos, M., Álvarez, A., Fernández, M., García, M. (2004) Antibacterial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *Grisea*. *Fitoterapia*, 75(6), pp 599-602.
- San Martín C.R. (1968). *Farmacognosia con Farmacodinamia*. España: Ediciones Fortuna. pp 479-485.
- Sandra, P., Bicchi, C. (1987). *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*. Heidelberg, Alemania. pp 1-431
- Servais, P. M. (2001). *Laurousse de la homeopatía*. Mexico Laurosse. pp 12-16.
- Tucker, G.; Maciarello, M.; Adams, R.; Landrum, L.; Zanoni, T. (1991). Volatile Leaf Oils of Caribbean *Myrtaceae*. I. Three Varieties of *Pimenta racemosa* (Miller) J. Moore of the Dominican Republic and the Commercial Bay Oil. *Journal Essential Oils Research*, 3(5), pp 323-329.
- Universidad de la República-Uruguay (2013). Facultad de Ciencias. Departamento de Ecología y Ciencias Ambientales. Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares. *Myrtaceae* en el mundo, [Disponible en línea]. Consultado el 30/11/2015, de http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/curso_spv.html.

Valcárcel, M., Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Primera edición. Barcelona – España: Editorial Revertè S.A. pp 615-620.

Vanegas, G.; Yáñez, X. (2011). Estudio comparativo de la composición química del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) proveniente de cinco regiones de Norte de Santander, Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 9(1), pp 9-15.

Whitman W, Coleman D, Wiebe, W. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A*, 95(12), pp 6578-6583.

ANEXOS



ANEXO A: Árbol de *Pimenta racemosa*.



ANEXO B: Hojas de la *Pimenta racemosa*.



ANEXO C: Hojas y flores de la *Pimenta racemosa*.



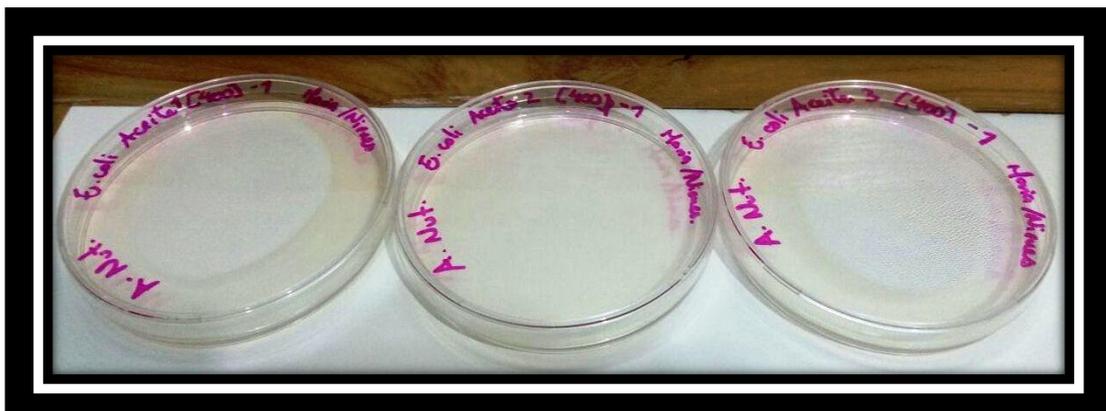
ANEXO D: Voucher Specimen de la especie *Pimenta racemosa*.



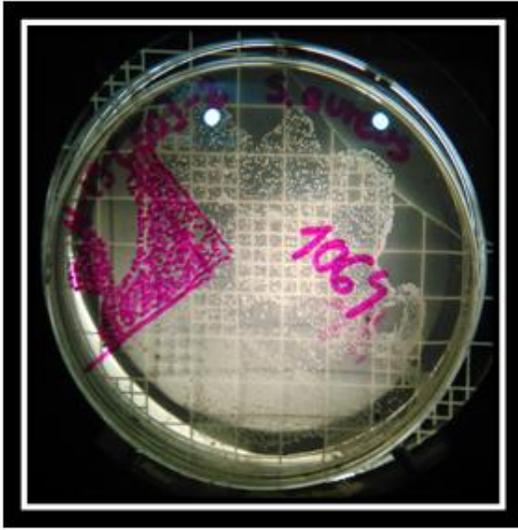
ANEXO E: Recoleccion, extracción y preparación del aceite de *Pimenta racemosa*.



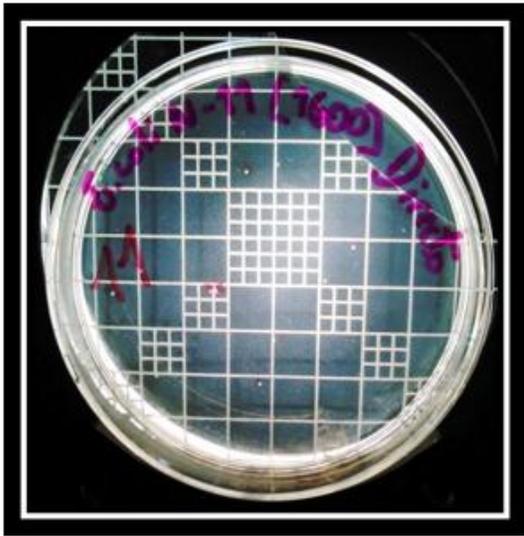
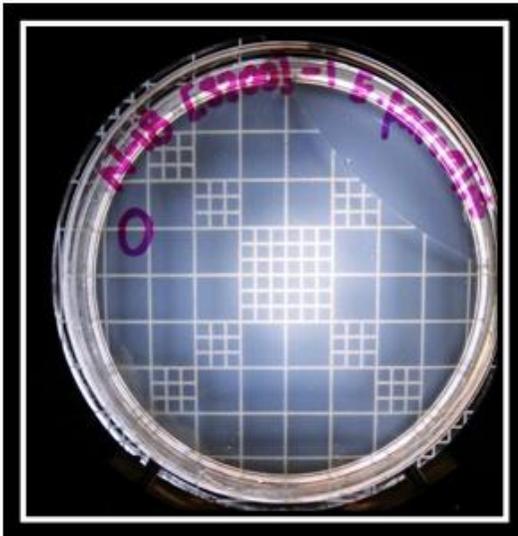
ANEXO F: Preparación de medios de cultivo y pre-inóculos para el ensayo de la actividad antibacteriana con el aceite de *Pimenta racemosa*.



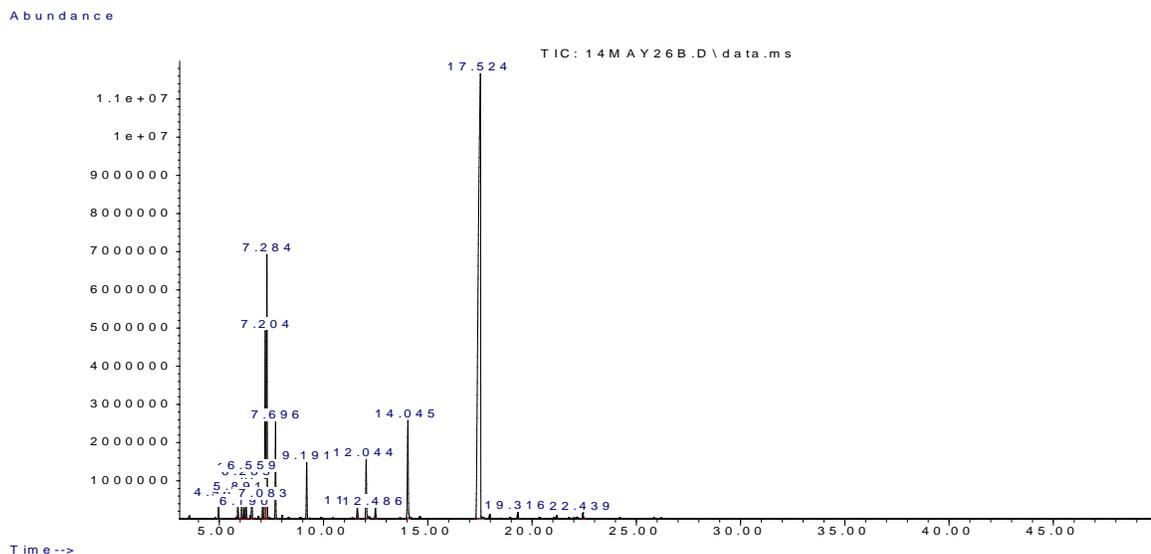
ANEXO G: Inoculación de las placas de petri para el ensayo de la actividad antibacteriana con el aceite de *Pimenta racemosa*.



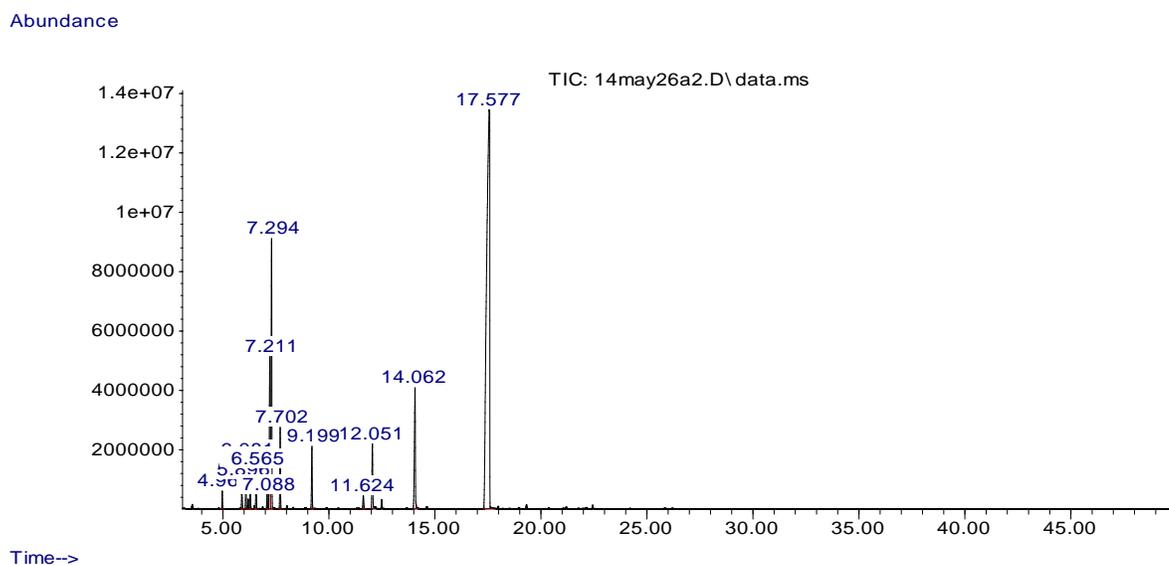
ANEXO H: Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de la *Pimenta racemosa* contra *S. aureus* y *E. faecalis*.



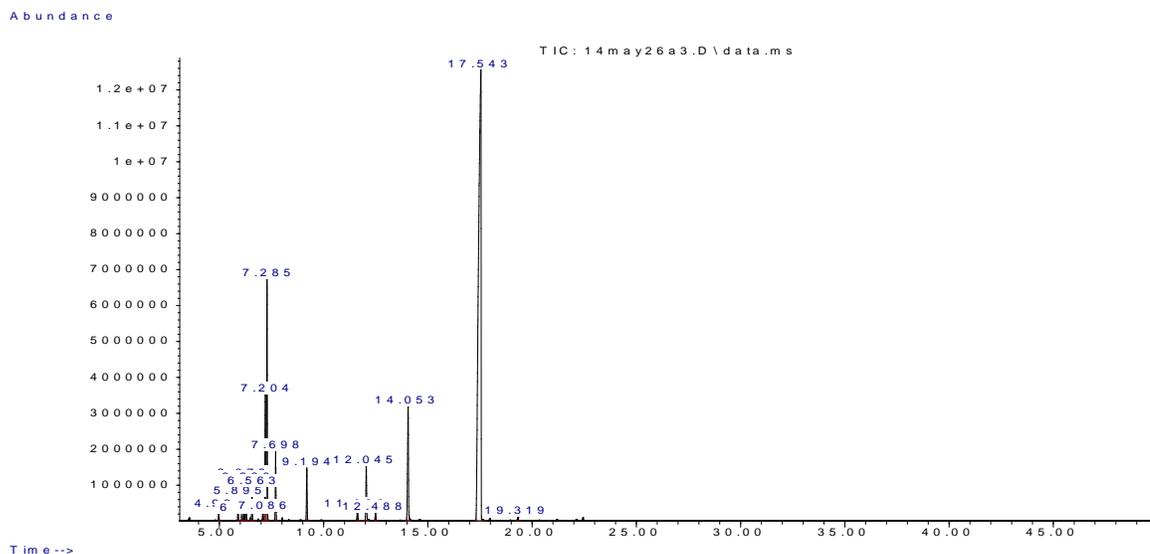
ANEXO I: Determinación de la concentración mínima bactericida del aceite esencial de la *Pimenta racemosa* contra *E. faecalis* y *E. coli*.



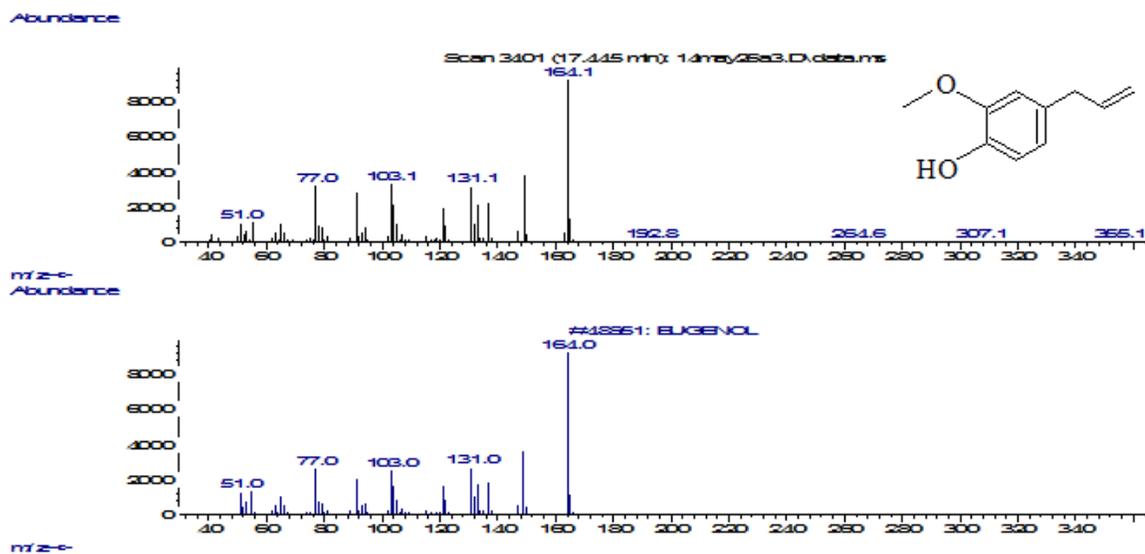
ANEXO J: Cromatograma del aceite NM1 (8:00 a.m.) de la especie *Pimenta racemosa*.



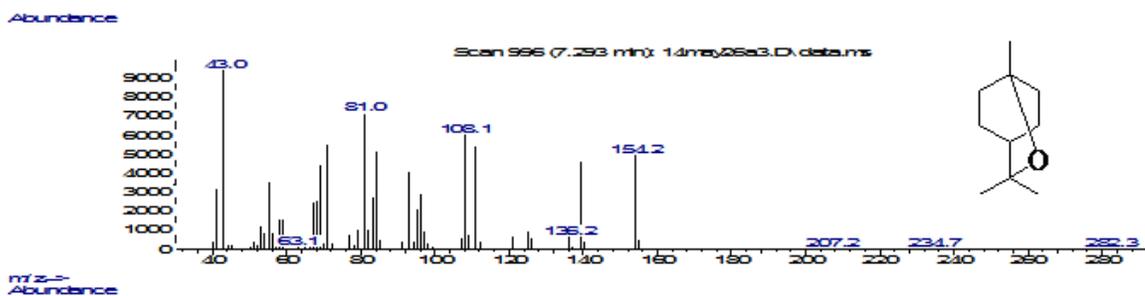
ANEXO K: Cromatograma del aceite NM2 (12:00 p.m.) de la especie *Pimenta racemosa*.



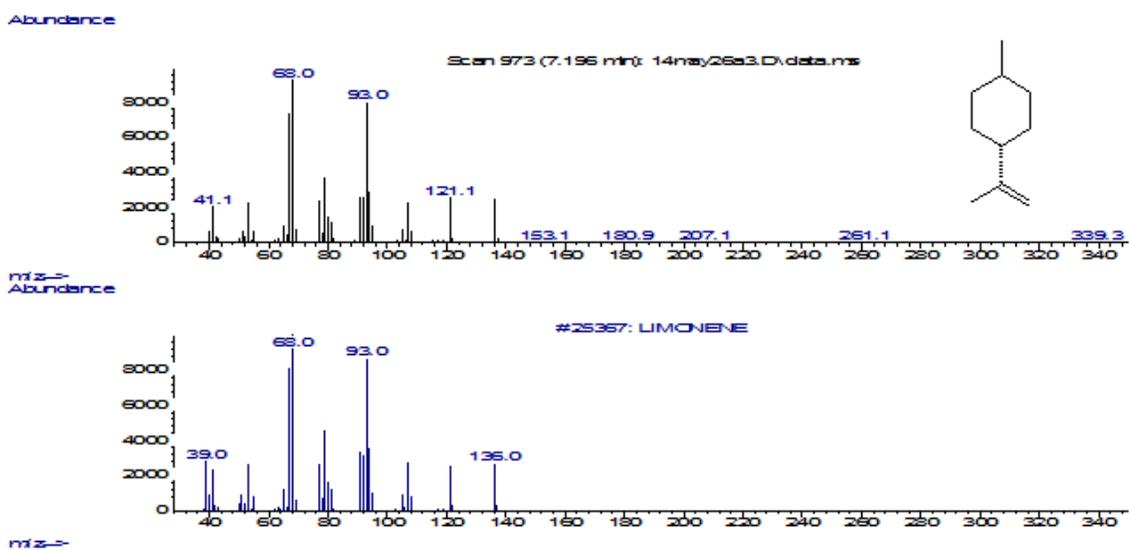
ANEXO L: Cromatograma del aceite NM3 (4:00 p.m.) de la especie *Pimenta racemosa*.



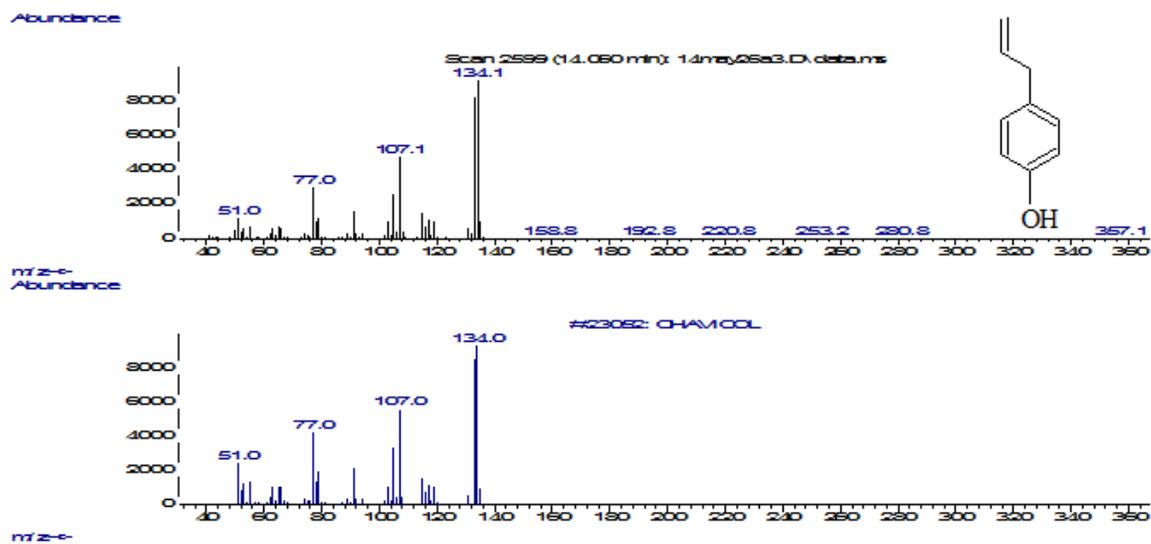
ANEXO M: Espectro de masas del Eugenol.



ANEXO N: Espectro de masas del 1,8-Cineol.



ANEXO O: Espectro de masas del Limoneno.



ANEXO P: Espectro de masas del Chavicol.