



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



**Estudio del Aceite Esencial y Determinación de la
Actividad Antibacteriana de la Especie Botánica *Persea
caerulea* (Ruíz & Pav.) Mez Recolectada en
Mérida-Venezuela.**

Trabajo de grado para optar a la Licenciatura en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Br. Pabón Johana C.I. 20.608.875

Br. Quero Carmen C.I. 22.686.159

Tutor:

Dra. María E. Lucena De Ustáriz

Cotutor:

Dr. Luis Rojas

Mérida, octubre de 2016

DEDICATORIA

La vida se encuentra llena de retos, y uno de ellos es la Universidad. Tras verme dentro de ella, me he dado cuenta que más allá de ser un reto, es una base no solo para mi entendimiento del campo en el que me he visto inmersa, si no para lo que concierne a la vida y mi futuro.

Dedico este logro a:

Mis Padres, porque ellos siempre están a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mis Hermanos y demás familiares en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi Carrera Universitaria

Carmencita...

Este proyecto de investigación lo dedico principalmente a mis fieles y siempre mejores amigos, la Santísima Trinidad y la Virgen María, quienes han estado a mi lado siendo mi roca y sustento, fortaleciéndome, animándome y demostrándome en cada momento que no estoy sola. La gloria y honor es para ellos.

A la familia que Dios me obsequió, Aracelis Belén, Yovani Pabón, Elmer Pabón Belén y Ericson Pabón; ellos, que me brindan apoyo, seguridad y amor para asumir cada objetivo que trazo en mi vida.

A aquellas personas que estuvieron a mi lado al momento de emprender esta experiencia, escuchándome, transmitiéndome positividad y sembrando amor en mi corazón para enfrentar cualquier adversidad.

Katherine

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis fieles y siempre mejores amigos, la Santísima Trinidad y la Virgen María, quienes han estado a mi lado siendo mi roca y sustento, fortaleciéndome, animándome y demostrándome en cada momento que no estoy sola. La gloria y honor es para ellos.

A la familia que Dios me obsequió, Aracelis Belén, Yovani Pabón, Elmer Pabón Belén y Ericson Pabón; ellos, que me brindan apoyo, seguridad y amor para asumir cada objetivo que trazo en mi vida.

A aquellas personas que estuvieron a mi lado al momento de emprender esta experiencia, escuchándome, transmitiéndome positividad y sembrando amor en mi corazón para enfrentar cualquier adversidad.

A mi amiga Carmen Quero, porque sin su ayuda esta meta no hubiese sido palpable, por compartir con alegría y disposición cada una de las actividades necesarias para culminar esta investigación.

A la profesora María Eugenia Lucena y al profesor Luis Rojas, por aceptar ser parte de este proyecto, por el tiempo que dedicaron para que esto hoy sea realidad, por su excelencia como profesionales y por ser fuente de inspiración al transmitir vocación y entrega por lo que se hace.

A la Ilustre, ejemplar y orgullosa Universidad de los Andes.

Katherine

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios, por haberme Acompañado y Guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi Fortaleza en los momentos de debilidad y angustia, por brindarme una Vida llena de Aprendizajes, Experiencias y sobre todo de Felicidad.

Le doy gracias infinitas a mis padres Edilia y Francisco, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida y sobre todo por ser un ejemplo a seguir. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos, por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar. A Ennys y Angela por ser un ejemplo de superación profesional a seguir; a Francisco Javier por ser ese hermano varón que Dios nos mandó en último momento y que llena nuestras vidas de alegrías con cada logro que igual ha ido superando.

Le agradezco la confianza, apoyo y cariño a Najah Amer, por abrir las puertas de su casa y hacerme sentir como en mi propia casa.

A Oscar por ser parte importante en mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, por la paciencia y palabras de aliento y de fe.

A Johana, por haber sido una excelente compañera de clases, de tesis y amiga, por la paciencia necesaria y por motivarme en los momentos de desesperación y sobre todo por hacer de su familia, una familia para mí.

A mis profesores: María E. Lucena y Luis Rojas por la confianza, apoyo, dedicación de tiempo y por compartir conmigo sus conocimientos, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender cosas nuevas.

A mis amigos que forman parte de mi vida: María Rojas, Alexandra, Neil, Yohelis, Reynaldo, Génesis, Edymar, Fairuz, Shadia, Mary Carmen, Fabian, Eleny, Oriany y a todos quienes se me escapan en este momento gracias por ser parte significativa de mi vida y por todas esas vivencias que nunca olvidaré.

A la ilustre Universidad de Los Andes, por ser el alma mater de la Educación Superior y abrir sus puertas para recibir la educación de sus mejores Profesores que hacen vida en ella.

A todos Gracias Totales...!

Se les Quiere Mucho...! *Carmencita...*

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. CAPITULO I. EL PROBLEMA	3
II.1. Planteamiento del Problema.....	3
II.2. Justificación de la Investigación.....	4
II.3. Objetivos de la Investigación.....	5
II.3.1. Objetivo General.....	5
II.3.2. Objetivos Específicos.....	5
II.4. Formulación de la Hipótesis.....	5
III. CAPITULO II. MARCO TEORICO	6
III.1. Trabajos Previos.....	6
III.2. Bases Teóricas.....	13
III.2.1. Familia Lauraceae.....	13
III.2.2. Género <i>Persea</i>	14
III.2.2.1. <i>Persea caerulea</i> (Ruíz & Pav.) Mez.....	15
III.2.3. Aceites Esenciales.....	17
III.2.3.1. Características de los Aceites Esenciales.....	18
III.2.3.2. Distribución de los Aceites Esenciales.....	19
III.2.3.3. Localización de los Aceites Esenciales.....	19
III.2.3.4. Función de los Aceites Esenciales en Vegetales.....	19
III.2.3.5. Clasificación de los Aceites Esenciales.....	19
III.2.3.6. Composición Química de los Aceites Esenciales.....	21
III.2.3.7. Ruta del Acetatos Mevalonato.....	22
III.2.3.7.1. Monoterpenos.....	23

III.2.3.7.2. Sesquiterpenos.....	23
III.2.3.7.3. Diterpenos.....	24
III.2.3.8. Ruta del Ácido Shikímico.....	24
III.2.3.9. Métodos para la Obtención de Aceites Esenciales.....	26
III.2.3.10. Ensayos de Control de Calidad.....	27
III.2.3.11. Análisis de Aceites Esenciales.....	28
III.2.3.11.1. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas...	30
III.2.3.12. Aplicaciones y Usos de los Aceites Esenciales.....	31
III.2.3.13. Toxicidad de los Aceites Esenciales.....	33
III.2.4. Bacterias.....	34
III.2.5. Antibióticos.....	40
III.2.5.1. Espectro de Actividad Antibacteriana.....	42
III.2.5.2. Resistencia a Antimicrobianos Mediada por Microorganismos.....	42
III.2.5.2.1. Resistencia Intrínseca.....	43
III.2.5.2.2. Resistencia Adquirida.....	43
III.2.5.3. Determinación de la Actividad Antibacteriana.....	44
III.2.5.3.1. Prueba de Sensibilidad por Difusión en Agar (Prueba de Kirby-Bauer).....	44
IV. CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO.....	45
IV.1. Recolección y Preparación del Material Vegetal.....	45
IV.2. Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial.....	46
IV.3. Identificación de los Componentes Químicos del Aceite Esencial.....	46
IV.4. Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial.....	47
IV.4.1. Microorganismos Empleados.....	47
IV.4.2. Preparación del Pre-inóculo Bacteriano.....	47
IV.4.3. Preparación de las Placas para el Antibiograma.....	48
IV.4.4. Preparación del Inóculo Bacteriano.....	48
IV.4.5. Ensayo Microbiológico.....	48

IV.4.6. Lectura del Antibiograma.....	49
IV.4.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	49
IV.4.8. Camino Metodológico.....	50
V. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
V.1. Características del Aceite Esencial de <i>Persea caerulea</i>	51
V.2. Composición Química del Aceite Esencial de <i>Persea caerulea</i>	52
V.3. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Persea caerulea</i>	55
VI. CAPITULO V. CONCLUSIONES	61
VI.1. Recomendaciones.....	62
VII. BIBLIOHEMEROGRAFÍA	63

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág
1	Estudios de Actividad Biológica de la Familia Lauraceae por Género desde 1999 hasta 2014.....	7
2	Distribución de la Especie Botánica <i>Persea caerulea</i> en Venezuela.....	9
3	<i>Persea caerulea</i>	16
4	Flor de la Especie Botánica <i>Persea caerulea</i>	17
5	Fruto de la Especie Botánica <i>Persea caerulea</i>	17
6	Monoterpenos Acíclicos y Cíclicos Encontrados en los Aceites Esenciales.....	24
7	Compuestos Procedentes de la Degradación de Ácidos Grasos.....	26
8	Estructura de la Pared Celular de Bacterias Gram positivas	36
9	Estructura de la Pared Celular de Bacterias Gram negativas.....	37
10	Recolección de la Especie Botánica <i>Persea caerulea</i>	45
11	Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial.....	46
12	Preparación de las Placas para el Pre-inoculo Bacteriano.....	47
13	Preparación de Medio de Cultivo Agar Muller-Hinton.....	48
14	Estructura Química del Globulol.....	52
15	Estructura Química del Nerolidol y del β -cariofileno.....	53
16	Compuestos Mayoritarios del Aceite Esencial de <i>Persea Caerulea</i>	54
17	Cromatograma.....	55

18	Halos de Inhibición Bacteriana para <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i>	56
19	Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>S. aureus</i> ...	57

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Pág.
1	Actividad Biológica Registrada en el Estudio de 1999-2014.....	8
2	Propiedades Generales de los Aceites Esenciales.....	19
3	Parámetros a Evaluar para el Control de las Esencias I.....	28
4	Parámetros a Evaluar para el Control de las Esencias II.....	28
5	Diferentes Formas de Uso de los Aceites Esenciales.....	33
6	Diferentes Usos de los Aceites Esenciales.....	33
7	Clasificación de los Antibióticos de Acuerdo a su Composición Química	40
8	Controles Positivos Según Comité Nacional para la Normalización de Laboratorios Clínicos (NCCLS).....	49
9	Compuestos Identificados del Aceite Esencial de <i>P. caerulea</i> por medio de Equipo de CG-EM.....	53
10	Actividad Antibacteriana.....	56
11	Concentración Mínima Inhibitoria.....	57
12	Componentes Químicos de nueve Especies del Género <i>Persea</i>	60



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



LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Estudios de la Actividad Biológica de Plantas

**Estudio del Aceite Esencial y Determinación de la Actividad Antibacteriana
de la Especie Botánica *Persea caerulea* (Ruíz & Pav.) Mez Recolectada en
Mérida-Venezuela.**

Trabajo de Grado

Autores:

Pabón Belén Johana Katherine

Quero López Carmen Julia

Tutor:

Dra. María Lucena De Ustáriz

Cotutor:

Dr. Luis Rojas

RESUMEN

La especie botánica *Persea caerulea* (aguacatillo), es un árbol perteneciente a la familia Lauraceae. En Venezuela se localiza en la cordillera de la costa y la cordillera andina. Este árbol ha sido objeto de estudios etnobotánicos exhibiendo actividad insecticida, acaricida y fungicida. Se registra, que *P. caerulea* contiene sustancias especiales en su aceite esencial que podrían presentar actividad antibacteriana. Objetivo: analizar la actividad antibacteriana y estudiar el aceite esencial obtenido de la especie botánica *P. caerulea* (Ruíz & Pav.) Mez de la familia Lauraceae recolectada en Mérida-Venezuela. Materiales y Métodos: la actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó *in vitro* sobre cinco cepas bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*), empleando la técnica de difusión de disco en agar. El análisis del aceite esencial se realizó por medio de un equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM). Resultados: El aceite esencial mostro ser efectivo para *S. aureus* con un halo de inhibición de 9 mm, siendo su CIM de 0,947 g/mL. Los componentes mayoritarios identificados fueron: globulol con un 21,60 por ciento, nerolidol con 18,99 por ciento y β -cariofileno con 9,59 por ciento.

Palabras claves: *Persea caerulea*, aceite esencial, actividad antimicrobiana, bacterias Gram positivas y Gram negativas.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas desde la antigüedad han tenido gran participación en el descubrimiento de nuevas entidades químicas, las cuales no son utilizadas únicamente en el desarrollo de nuevos fármacos, sino que se amplía su uso a la industria en general y, hoy día, brindan alternativas a los nuevos retos de tecnologías más limpias y amables con el medio ambiente. Históricamente el estudio de productos naturales ha sido una fuente de estructuras químicas únicas siendo éstas, herramientas indispensables para el descubrimiento de nuevos fármacos (Rincón, 2014).

Entre los siglos XVI y XVII se prepararon por primera vez en las farmacias de todo el mundo la mayor parte de los aceites esenciales de los que se dispone en la actualidad. Con la llegada de la medicina moderna, la utilización de vacunas y antibióticos sustituyó a los antiguos remedios basados en aceites esenciales. El fuerte impulso de la química orgánica sintética y el análisis de componentes de algunos aceites esenciales llevó a la producción de aceites aromáticos sintéticos que imitaban a los naturales de «wintergreen», vainilla o almendras amargas (Valarezo, 2008).

La especie botánica *Persea caerulea* (aguacatillo), es un árbol perteneciente a la familia Lauraceae. Su distribución va desde Venezuela hasta Perú. En Venezuela se localiza en la cordillera de la costa y la cordillera andina. Este árbol ha sido objeto de estudios etnobotánicos exhibiendo actividad insecticida, acaricida y fungicida. Además, debido a su rápido crecimiento, contribuye al mantenimiento y protección de nacientes, así como de fuentes de agua. Se registra, que *P. caerulea* contiene compuestos en su aceite esencial que podrían presentar actividad antibacteriana.

Esta información crea interés para el desarrollo del presente proyecto de investigación. Por otra parte, es bien sabido que las bacterias son causa de diversas infecciones, siendo capaces de afectar a cualquier individuo e inducir la

manifestación de cuadros clínicos que podrían ser fatales. Los organismos procariotas en los que se hará énfasis en dicho proyecto serán *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) y *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (Gram negativas).

En atención a lo expuesto, es de importancia entonces, la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas, de allí que se plantea el aislamiento y análisis del aceite esencial de la especie botánica *P. caerulea* para la determinación de su actividad frente a las bacterias mencionadas.

www.bdigital.ula.ve

II. CAPITULO I

EL PROBLEMA

II.1. Planteamiento del Problema

Desde los comienzos de la humanidad, las plantas han ocupado un papel importante, sirviéndole al hombre como: alimento, en la construcción de sus casas, mobiliario, en la fabricación de telas, tintes, aceites, esencias, en instrumentos de caza, de guerra, como forraje, entre otros. Un estudio etnobotánico realizado en el poblado de Huaylingas, tuvo como objeto registrar actividades de subsistencia, técnicas de cultivo, técnicas de conservación, así como investigar sobre el uso tradicional de las plantas. La zona de estudio fue descrita como un tipo de bosque húmedo siempre verde, con plantas como *P. caerulea* “Paltón”, que es empleada como leña y útil en el área de la carpintería (Ceroni, 2002).

Se han descrito múltiples propiedades antimicrobianas y funciones farmacológicas para los principios activos encontrados en los recursos etnobotánicos de la familia Lauraceae, como por ejemplo propiedades antileishmania, cuya información se desprende de la evaluación *in vitro* de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis* (Arévalo y col., 2009).

En referencia a lo anteriormente expuesto y, debido a que no ha sido evaluada la actividad antibacteriana del aceite esencial proveniente de la planta *P. caerulea*, se plantea la siguiente interrogante:

¿El aceite esencial obtenido de la especie botánica *P. caerulea* de la familia Lauraceae, presenta actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas?

II.2. Justificación de la Investigación

El uso de aromas y aceites vegetales data de por lo menos 3500 años a.c y fueron utilizados sobre el cuerpo humano como elementos curativos, cicatrizantes, protectores de malos espíritus, y en los distintos rituales que se llevaban a cabo. Era muy común que antes de una contienda los guerreros limpiaran y protegieran sus cuerpos de pequeños golpes, utilizando ramas de albahaca para alejar los malos espíritus que creían que depositaban sus contrincantes en ellos. Algunos aromas causaban euforia o excitación.

Hoy día, conociendo la clasificación de las plantas y teniendo el hombre la capacidad de identificarlas por sus características, recurre a ellas para mejorar su salud debido a que son: económicas, efectivas, de fácil manejo, de uso popular y fuente histórica de principios activos con actividad biológica. Es por ello que las esencias y aceites esenciales son utilizados en numerosas industrias como lo es en la industria cosmética y farmacéutica, industria alimenticia, industria de productos de limpieza e industria de plaguicidas.

La aplicación de estos aceites aparece como una herramienta útil para el control de plagas, ya que se ha demostrado la actividad repelente de algunas especies botánicas, entre ellas la especie *P. caerulea*. Sin embargo, en la literatura consultada no se han reportado estudios acerca de la actividad antibacteriana que puede llegar a tener esta especie y, debido a que la incidencia de infecciones causadas por bacterias ha aumentado significativamente en los últimos años, se ha llevado al uso indiscriminado de antibióticos provocando que aparezcan nuevas cepas resistentes; es por ello que surge la iniciativa de realizar esta investigación, con el fin de estudiar el potencial antibacteriano del aceite esencial de la planta *P. caerulea* de la familia Lauraceae, para así ampliar el conocimiento y brindar información a la sociedad.

II.3. Objetivos de la Investigación

II.3.1. Objetivo General

Analizar la actividad antibacteriana y estudiar el aceite esencial obtenido de la especie botánica *Persea caerulea* (Ruíz & Pav.) Mez de la familia Lauraceae recolectada en Mérida-Venezuela.

II.3.2. Objetivos Específicos

- Reconocer y recolectar la especie botánica *Persea caerulea* en Mérida-Venezuela.
- Obtener el aceite esencial de la especie en estudio por medio del método de hidrodestilación.
- Analizar el aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).
- Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial frente a bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

II.4. Formulación de la Hipótesis

La búsqueda de nuevos tratamientos para la mejora de diversas afecciones y el restablecimiento de la salud ha sido prioridad para el hombre, siendo las plantas utilizadas como medicina natural para el tratamiento de enfermedades. Entre las plantas que presentan propiedades medicinales se encuentra la especie botánica *P. caerulea* que ha sido objeto de diferentes estudios fitoquímicos exhibiendo actividad insecticida, acaricida y fungicida. Se plantea entonces, la posibilidad de que el aceite esencial de la especie botánica *P. caerulea* presente actividad frente a bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*).

III. CAPITULO II

MARCO TEORICO

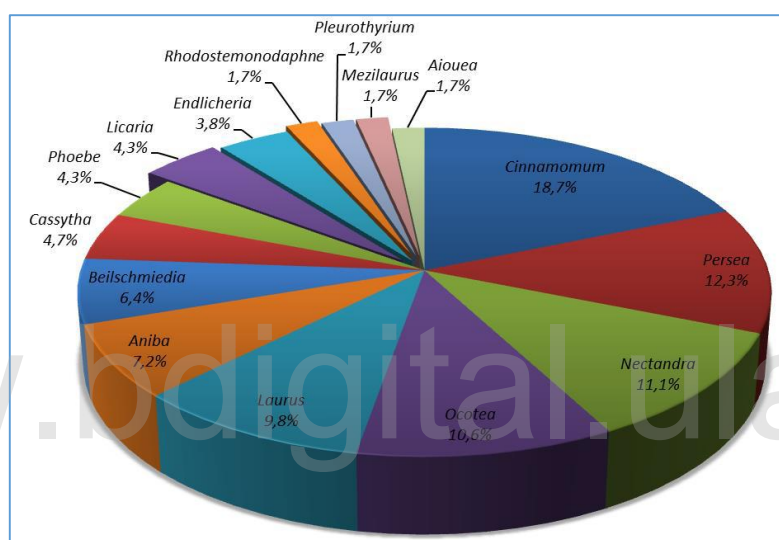
III.1. Trabajos Previos

La familia Lauraceae forma un gran grupo de plantas leñosas, con cerca de 50 géneros y 2500 a 3000 especies distribuidos ampliamente en latitudes tropicales y subtropicales. Las especies de esta familia tienen alta importancia a nivel económico, ya que a ésta pertenecen especies como *Persea americana* (Aguacate), *Laurus nobilis* (Laurel) y *Cinnamomum zeylanicum* (Canela de Ceilán) importantes en la industria alimenticia y así mismo tiene especies como la *Aniba rosaedora* (Palisandro de cayena) utilizada ampliamente en perfumería y en actividades de aromaterapia (Chanderbali, Werff, y Renner, 2001).

Esta familia conforma un grupo importante de plantas que se caracteriza por poseer gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales han sido estudiados por su actividad biológica y diversidad de usos en la medicina tradicional (Cuca y col., 2012). Cabe considerar que la familia Lauraceae está representada por el género *Persea*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en los países tropicales de América y del mundo. Las especies pertenecientes al género *Persea* no tienen registro en cuanto a su diversidad biológica, caracterización quimiotaxonómica y usos potenciales en el campo farmacológico (Cuca y Álvarez, 2011).

Una revisión bibliográfica llevada a cabo en Colombia sobre la actividad biológica de la familia Lauraceae, señala que la especie *Persea americana* Mill es la única en cuanto a importancia comercial se refiere, debido a que su fruto es comestible. La gran mayoría de estudios biológicos han sido realizados sobre esta especie. A continuación, se muestra el porcentaje de estudio de la actividad biológica de los géneros que componen la familia Lauraceae (Figura 1) (Rincón, 2014).

Figura 1: Estudios de Actividad biológica de la Familia Lauraceae por Género desde 1999 hasta 2014



Fuente: Rincón (2014).

Los géneros con el mayor número de registros fueron *Cinnamomum* (18,7%), *Persea* (12,3%) y *Nectandra* (11,1%). Es de importancia resaltar, que los dos primeros géneros se encuentran con mayor distribución a nivel mundial, posiblemente este sea el motivo por el que se encuentra un número superior de reportes para estos dos géneros (Rincón, 2014).

Cabe considerar que el género con mayor estudio sobre la actividad antibacteriana es *Cinnamomum*, pero se hace la sugerencia de realizar estudios de actividad antibacteriana a los aceites esenciales de los géneros *Nectandra*, *Ocotea*, *Persea* y *Aniba*. Además, se encuentran evaluaciones que han demostrado la presencia de compuestos únicos en el aceite esencial de los géneros *Nectandra*, *Ocotea* y *Persea*.

Debe mencionarse que las preparaciones más empleadas para la evaluación de la actividad antibacteriana son el aceite esencial y de preferencia los compuestos aislados a partir de la corteza y de las hojas (Sacchetti, 2006).

La actividad biológica específicamente de la especie botánica *P. caerulea* registrado en esta revisión bibliográfica se muestra en la siguiente tabla:

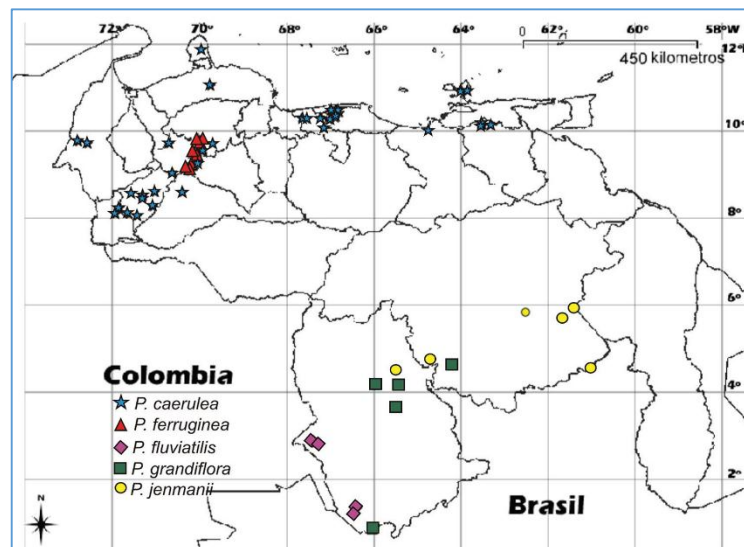
Tabla 1: Actividad Biológica Registrada en el Estudio de 1999-2014

Especie	<i>Persea caerulea</i>
País	Colombia
Actividad Biológica	Citotóxica
Organismo/Ensayo	Líneas tumorales de humano: HT-29, NCI-H727 y NCI-H520
Parte de la planta usada	Corteza y Madera
Preparación/Compuesto	Extracto etanólico

Fuente: Cuca, Aristizabal y Alvarez (2011).

La especie botánica *P. caerulea* ha sido reportada desde Honduras hasta Bolivia, exceptuando Brasil. Es la especie con mayor recolección en Venezuela (Figura 2) y la más común en estado silvestre al norte del Orinoco. Se considera como una especie pionera en los estratos arbóreos de la vegetación secundaria y puede encontrarse dentro de los bosques nublados y a lo largo de áreas intervenidas como carreteras y potreros. Los frutos son comúnmente utilizados en farmacognosia para la extracción de potentes sedantes que pueden ser utilizados como veneno para ratas (Ferrer, 2012).

Figura 2: Distribución de la Especie Botánica *Persea caerulea* en Venezuela



Fuente: Ferrer (2012).

El género *Persea* ha sido objeto de diversos estudios por su gran uso etnobotánico, lo que ha llevado al aislamiento de un amplio rango de compuestos, dentro de los cuales se cuentan: flavonoides, terpenos, lignanos, ácidos absícicos entre otros. Adicional a este grupo, se ha identificado un gran número de metabolitos con mucha relevancia desde el punto de vista biológico, que ha exhibido, entre otras, actividad insecticida. Una investigación tuvo como objetivo determinar la actividad acaricida de los extractos etanólicos de las especies de Lauraceae sobre los ácaros intradomiciliarios *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*, así como caracterizar los extractos obtenidos mediante ensayo fitoquímico preliminar. Como resultado en la prueba de contacto, el extracto de hojas de *P. caerulea* eliminó al 100% el *Dermatophagoides farinae*. Mientras que en la prueba de acción fumigante, dicho extracto eliminó en un 100% el *Dermatophagoides farinae* y 83,4% el *Blomia tropicalis* (después de 120 min de exposición; a 0,1mg/mL) (Cuca y col., 2012).

Dentro de este marco de ideas, ciertos investigadores, llevaron a cabo la recolección de la planta *P. caerulea* en las inmediaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia, cuyo objetivo planteado era la identificación de los componentes

mayoritarios del aceite esencial de las hojas de la especie antes mencionada y determinar su actividad fungicida frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. El proceso de extracción del aceite esencial del espécimen se hizo mediante destilación por arrastre con vapor en un equipo tipo Clevenger. La muestra fue analizada mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos fueron identificados por comparación de los parámetros cromatográficos y los espectros de masas con los datos reportados en la literatura. El análisis químico del aceite esencial permitió determinar un total de 42 compuestos, entre los que se identificaron principalmente sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados y monoterpenos oxigenados. El aceite esencial de la especie en mención exhibió actividad antifúngica significativa contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* mostrando halos de inhibición de 14 x 13 mm (15 µL). El aceite esencial de la especie en estudio puede ser considerado como posible tratamiento agrícola frente a organismos fitopatógenos (Cuca y Álvarez, 2011).

En la medicina tradicional de África, se usa para el tratamiento de convulsiones infantiles y epilepsia varias partes morfológicas de *Persea americana* Mill (aguacate). Un estudio examinó el efecto anticonvulsivante del extracto acuoso de las hojas de esta planta en ratones. Aunque los datos obtenidos en el presente estudio no aportan pruebas concluyentes, parece que el extracto acuoso produce un efecto anticonvulsivante mediante la mejora de la neurotransmisión en el cerebro (Ojewole y Amabeoku, 2006).

Por otra parte, un trabajo realizado en Monteverde Costa Rica ilustra que el *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular responsable de la enfermedad de Chagas, siendo endémico en la mayoría de los países de América, causando una alta morbilidad y mortalidad. Aunque evidencias experimentales y clínicas muestran la importancia de la quimioterapia tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad, el tratamiento de los pacientes se ve limitado por la toxicidad de las drogas disponibles. La enzima cruzaina que es una cisteín proteasa perteneciente al parásito desempeña un papel fundamental en el metabolismo, replicación, supervivencia y patología del mismo. Esta investigación demostró que ciertas

plantas contienen proteasas cisteín inhibitorias que ayudarían a combatir la infección producida por el parásito *T. cruzi*. Entre las plantas estudiadas en el referido trabajo, se encuentra *P. caerulea*, cuyo aceite esencial obtenido de las hojas mostró actividad inhibitoria contra las proteasas del parásito, el cual es rico en sesquiterpenos (Setzer y col., 2007).

Un estudio reveló que el extracto acuoso de las hojas de *P. americana* Mill tiene efectos analgésicos y antiinflamatorios. Esto fue demostrado de forma experimental, al reducir el retorcimiento del ratón inducido por ácido acético y por inhibición dependiente de dosis de edema en la pata del ratón inducida por carragenina (Adeyemi, Okpo y Ogunti, 2002).

Un grupo de investigadores se dio a la tarea de estudiar el liofilizado de almendras de aguacate de la planta *Persea gratissima gaertner*, en el que emplearon un total de 84 ratones, los cuales fueron divididos en tres grupos de 28 cada uno. Contaban con un grupo de referencia negativo, un grupo de referencia positivo y el otro, era el grupo experimental. El grupo de referencia positivo y el de experimentación fueron intoxicados con tetracloruro de carbono. Los ratones experimentales, recibieron además, el liofilizado de almendras de aguacate. Los resultados obtenidos, arrojaron que el mencionado liofilizado presenta actividad anti-ictérica (conjugación y eliminación de bilirrubina) así, como efecto hepatoprotector (normalización de las enzimas aminotransferasas y curación de lesiones hepáticas dentro de los 10 días) (Assane y col., 2001).

Otra investigación aporta, que el aceite esencial de dos clones de *Cinnamomum osmophloeum* (A y B) (Lauraceae) y sus componentes químicos fueron puestos a prueba sobre nueve cepas bacterianas. El aceite esencial B con una concentración mínima inhibitoria de 500 microg/mL, presentó un excelente efecto inhibitor frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp., mientras que el aceite fue efectivo contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, *Vibrio parahemolyticus* con una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 250 microg/mL. Además, el cinamaldehído presentó actividad frente a:

E. coli, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. aureus* resistente a la meticilina, *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp., y *V. parahemolyticus* con una CIM de 500, 1.000, 250, 250, 250, 250, 1000, 500, y 250 microg/mL respectivamente. Los resultados sugieren que el aceite esencial y el cinamaldehído de *C. osmophloeum* son beneficiosos para la salud humana y, podría ser utilizado para fines médicos (Chang y Chang, 2001).

Por otro parte, el efecto antibacteriano del extracto obtenido de tallo y corteza de *Persea cordata* fue estudiado debido a que éste es empleado por la población de Brasil para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se encontró que la fracción de acetato de etilo del extracto hidroalcohólico mostró actividad contra bacterias patógenas que pueden justificar el uso popular de la planta (Schlemper y col., 2001).

El objetivo de un trabajo fue identificar los componentes del aceite esencial del subgénero *Persea*, el cual señala en su parte introductoria que miembros de las familias Annonaceae, Magnoliaceae y Proteaceae han sido empleados en la alimentación, medicina, industria cosmética y como plantas ornamentales. Se distingue el subgénero *Eriodaphne* principalmente en Sudamérica, y el subgénero *Persea* en Meso-América, a la que pertenecen los aguacates comestibles. Este último género es de origen africano, sus especies fueron migrando a Europa, América del Norte y América del Sur. Principalmente en México y Guatemala se formaron y comercializaron los aguacates comestibles. Para este análisis se utilizaron hojas del subgénero *Persea* recolectadas en el Centro de Investigación y Extensión de la Costa del Sur de la Universidad de California. Las hojas fueron sometidas a hidrodestilación en una atmosfera inerte en una unidad tipo Clevenger. Los aceites obtenidos se inyectaron en un cromatógrafo de gases; la columna capilar usada era no polar y, el gas portador, estaba constituido por hidrogeno, helio y aire.

III.2. Bases Teóricas

III.2.1. Familia Lauraceae

La familia Lauraceae es muy popular por el conocido y exquisito fruto del aguacate. Además dentro de la familia se encuentran especies de valores maderables y muy apropiados como árboles ornamentales. Muchas especies producen aceites y esencias de gran importancia económica. Existen varios caracteres propios de la Lauraceae, que permiten distinguirla con facilidad de las demás familias. La caracterización de los géneros, sin embargo, es en muchos casos realmente difícil pues no tienen un criterio uniforme en cuanto a su integración (Aristeguieta, 1973).

En esta familia se incluye alrededor de un millar de especies leñosas propias de los países cálidos, de hojas esparcidas, coriáceas y verdes todo el año. Sus flores, que suelen ser regulares y estar formadas por múltiplos de 3 piezas, pueden tener ambos sexos en cada una o bien haberlas machos y hembras. Las anteras de los estambres se abren mediante ventallitas, y es carácter muy singular. El fruto es carnoso. En la corteza, en las hojas y flores se forma y se acumula esencia; en el fruto y en las semillas, aceite graso. Los glucósidos parecen faltar; pero se conocen algunos alcaloides (Quer, 1962).

Además, esta familia proporciona importantes drogas, tales como la canela de Ceilán (*Cinnamomum ceylanicum*), la canela de China (*Cinnamomum cassia*), el alcanfor (*Cinnamomum camphora*), que vive y se reproduce espontáneamente en las costas de Barcelona, los aromáticos frutos del aguacate (*Persea gratissima*), el sazafrán (*Sassafras officinale*), entre otros. La familia de las Lauraceae reúne una gran variedad de especies, con distribución tropical, representadas por árboles perennes aromáticos; las hojas, enteras y coriáceas son ricas en glándulas con aceites esenciales. Entre la gran variedad de géneros pertenecientes a esta familia se encuentra el género *Persea* (Quer, 1962).

III.2.2. Género *Persea*

En el Neotropico, la familia Lauraceae es un importante grupo vegetal, tanto en el ámbito ecológico como en la economía. Entre las especies con mayor relevancia se cuentan, el aguacate (*Persea americana* Mill.) por sus grandes frutos comestibles, el aguacatillo (*Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez) quien ha sido empleado en la medicina alternativa por sus propiedades sedantes y, por último, el palo de rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), del cual se extraen esencias especiales para ser utilizadas en perfumería (Ferrer, 2012).

El género *Persea* fue descrito por Miller en el año de 1754, y desde entonces se han llevado a cabo numerosas investigaciones, obteniendo como resultado el hallazgo de especies de sumo interés. Este género se encuentra distribuido en el continente americano, desde la Florida hasta Argentina, con aproximadamente 90 especies. Para la Flora de la Guayana Venezolana se han reportado 20 especies y para Venezuela dos variedades de *Persea*. La mayoría de las especies de Lauraceae y del genero *Persea* en Venezuela son árboles o arbustos, los cuales forman parte de bosques pluviales, nublados montanos y andinos, en un rango altitudinal desde 0 hasta 4.000 msnm. El trabajo desarrollado por Ferrer (2012) concluyó que en la región venezolana se encuentran 24 especies *Persea*.

Este género está representado por Arbusto o árboles. Hojas alternas, haz glabro, envés algo piloso. Inflorescencias panículas axilares o subterminales. Flores hermafroditas sin involucro. Perianto de tubo muy corto o nulo; lóbulo 6, desiguales, los externos más que los internos, rara vez subiguales, persistentes. Estambres 9, generalmente todos fértiles, la 4 serie reducida a estaminodios; filamentos más largos que las anteras filiformes pilosos o glabros; glándulas presentes en la 3 serie de estambres, usualmente glándulas grandes, algo estipitadas; anteras con 4 valvas alargado – aoradas, las anteras externas introrsas, las 6 internas extrorsas; estaminoides grandes, sagitados con el ápice glabro, filamento piloso ovario subgloboso, glabro o piloso. Estilo glabro o piloso. Estigma grande, dilatado. Fruto drupáceo, globoso o elipsoideo, perianto no alargado en el fruto (Aristeguieta, 1973).

El género *Persea* ha sido utilizado por muchos años, no solo por su fruto en la alimentación, sino también en la medicina, como leña, árbol de sombra entre otros usos. Las especies del género *Persea* han sido empleadas en la elaboración de té, vino, licor y otros productos en la industria farmacéutica. Dentro de este género se encuentra la especie botánica *P. caerulea*, a la que se le atribuye propiedad acaricida y fungicida.

III.2.2.1. *Persea caerulea* (Ruíz & Pav.) Mez

Sinónimos: *Laurus caerulea* Ruíz et Pavón

Persea laevigata H.B.K.

Persea petiolaris H.B.K.

Persea pyrifolia Nees

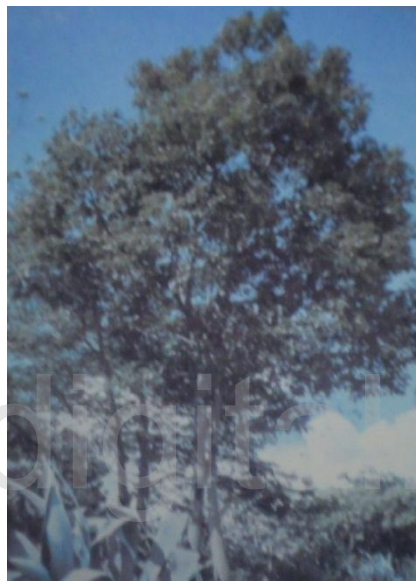
Nombres vulgares: Aguacate: curo, cimarrón.

La planta posee hojas pecioladas con la haz completamente glabra, el envés cuando jóvenes escasamente hirsuto, de forma ampliamente ovada o elíptica, con la base obtusa o redondeada, el ápice algo agudo, pero de forma variable desde obtuso a acuminado. Inflorescencia submultiflora, largamente pedunculada, corimboso-paniculada, tomentulosa, más corta que las hojas, segmentos externos del perianto de 2 a 2 ½ veces más cortos que los internos. Androceo con las tres series fértiles, filamentos lanosos de 3 a 4 veces más largos que las anteras. La tercera serie de los estambres presenta glándulas. Anteras con cuatro ventallas, redondeadas en el ápice. Ovario glaberrimo, con el estilo más largo que la mitad (Bernardi, 1962).

Es una planta leñosa de tamaño variable (Figura 3), desde mero arbusto achaparrado en estaciones desfavorables (lomas quemadas de los Andes venezolanos) hasta árbol de casi 20m de alto. Ramitas algo estrigosas en sus extremidades, glabras y de color pardo o marrón claro, angulosas, con yemas de color ferrugíneo, seríceas; corteza sin sabor. Hojas esparcidas con pecíolos largos hasta 5-6 cm., tenues, canaliculadas, cartáceas o subcoriáceas. La haz glaberrima y nítida, el envés en la

hoja joven blanzuzco y tomentuloso, en la hoja adulta presenta pelos escasos y color verde pálido-glaucó; forma del limbo variable, aovado o elíptico, con la base obtusa o redondeada, con el ápice aguzado y brevemente obtuso-acuminado; largo 15-24 cm., ancho 6-10cm., penninervado. Con los nervios bien evidenciados en ambas caras y brevemente reticulados, los nervios secundarios arrancan en ángulo de 55-60°; bordes aplanados (Bernardi, 1962).

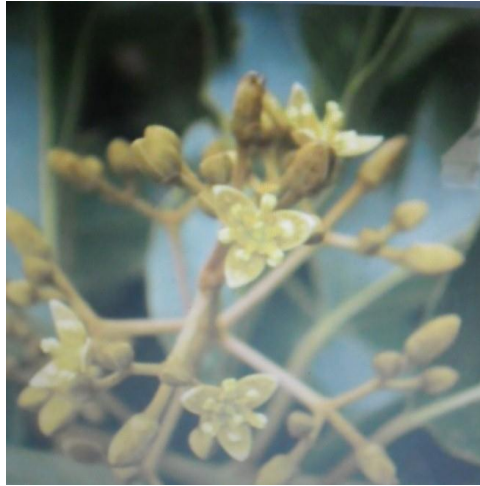
Figura 3: *Persea caerulea*



Fuente: Hoyos (1994).

Presenta inflorescencias submultifloras, largamente pedunculadas, corimbo-panículas ferrugíneo-tomentosas, más cortas que las hojas, con pedicelos de 2-5 mm. Bractéolas caedizas. Tiene flores (Figura 4) amarillentas, ferrugíneo-tomentosas de 4-6mm. De largo. La tercera serie de estambres (la más interna) presenta glándulas y elípticas, las anteras con ventallas sub-extrorsas. Estaminodios sagitados, con el ápice barbado, filamento lanudo. Ovario globoso, glabérrimo, con estilo más largo, encurvado, estigma sub-discoideo. Su fruto es drupáceo-globoso (Figura 5), de 10mm de diámetro, negro, glaucopruinoso, con los lobos periánticos y el pedúnculo aumentado a veces considerablemente (Bernardi, 1962).

Figura 4: Flor de la Especie Botánica *Persea caerulea*



Fuente: Ferrer (2012).

Figura 5: Fruto de la Especie Botánica *Persea caerulea*



Fuente: Ferrer (2012).

III.2.3. Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. En general, son los responsables del olor de las plantas (Arraíza, 2001).

Normalmente los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. Las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales son muy diversas, puesto que el grupo engloba sustancias muy heterogéneas (Domínguez, 1973; Arraíza, 2001).

Cabe considerar que los aceites esenciales son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes (Martínez, 2003).

Muchas drogas con aceites esenciales, no se utilizan únicamente para extraer los principios volátiles que contienen, sino que también se emplean al natural, tanto por sus propiedades medicinales como en alimentación, en este caso son especias o aromas. Una especia es una droga de origen vegetal, aromática o picante, destinada al condimento; un aroma es, de manera más restrictiva, una sustancia de origen natural, que exhala un olor penetrante y agradable; el condimento se define como una sustancia sencilla o compuesta, de marcado sabor, destinada a ser incorporado a los alimentos: su origen no es exclusivamente vegetal (Bruneton, 1991).

III.2.3.1. Características de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales, son generalmente líquidos a temperatura ambiente aunque algunos solidifican a baja temperatura como, por ejemplo, la esencia de anís. La mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos) con excepciones como la esencia de manzanilla, algunos aceites esenciales son inflamables. Generalmente, son menos densos que el agua aunque también hay excepciones como las esencias de clavo y de canela, que son más densas. Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua, son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, entre otros). La solubilidad en alcohol es variable y suelen ser solubles en alcoholes de alta graduación. Poseen índices de refracción elevados y presentan actividad óptica. Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos (Tabla 2) (Kuklinski, 2000).

Tabla 2: Propiedades Generales de los Aceites Esenciales

Líquidos a temperatura ambiente	Solubles en disolventes orgánicos apolares
Volátiles	Solubles en alcoholes de alta graduación
Aromáticos	Índice de refracción elevado
Incoloros o amarillentos	Lipófilos
Menos densos que el agua	Poder rotatorio (quirales)
Insolubles en agua	Extraíbles por arrastre de vapor de agua

Fuente: Kuklinski (2000).

III.2.3.2. Distribución de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se encuentran casi exclusivamente en vegetales superiores, concretamente en ciertas familias de Angiospermas, de las cuales se destacan: Coníferas, Apiáceas, Labiadas, Lauráceas, Asteráceas, Mirtáceas, Rutáceas (Kuklinski, 2000).

III.2.3.3. Localización de los Aceites Esenciales

Se encuentran localizados en diferentes órganos vegetales, como: raíz, fruto, corteza, leño, sumidades floridas, flores, hojas. Además, se acumulan en cavidades secretoras, en células, en pelos secretores, en canales secretores (Kuklinski, 2000).

III.2.3.4. Función de los Aceites Esenciales en Vegetales

Por sus propiedades volátiles y olorosas, intervienen en la polinización, ejerciendo un efecto de atracción sobre ciertos insectos polinizadores y actúan como defensas frente al ataque de parásitos e insectos (Kuklinski, 2000).

III.2.3.5. Clasificación de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Valarezo, 2008).

a) De acuerdo con su consistencia:

Esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas.

1. **Las esencias fluidas** son líquidos volátiles a temperatura ambiente (Rodríguez, Alcaraz y Real, 2012).
2. **Los bálsamos** son extractos naturales obtenidos de un arbusto o un árbol. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes ésteres. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización (Arraíza, 2001).
3. **Las oleorresinas** tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavo, entre otros) (Rodríguez y col., 2012).

b) De acuerdo a su origen:

1. **Los naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos (Arraíza, 2001).
2. **Los artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalol (Valarezo, 2008).
3. **Los sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (Rodríguez y col., 2012).

c) De acuerdo a su naturaleza química:

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%), mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro,

y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente (Arraíza, 2001).

El término quimiotipo alude a la variación en la composición del aceite esencial, incluso dentro de la misma especie. Un quimiotipo es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, entre otras.) que producen poco o ningún efecto a nivel morfológico que sin embargo producen grandes cambios a nivel de fenotipo químico (Arraíza, 2001).

III.2.3.6. Composición Química de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son generalmente mezclas complejas de varias sustancias (más de 200) que a su vez pueden tener estructuras muy diversas. La composición química de los aceites esenciales depende de varios factores como: el origen botánico, el ciclo del vegetal, las condiciones ambientales, las características del cultivo y el procedimiento de obtención, ya que durante el mismo se puede alterar la composición del aceite esencial respecto al vegetal (Kuklinski, 2000).

Generalmente los componentes mayoritarios son hidrocarburos terpénicos (sin aroma o con poco aroma), y los minoritarios son los responsables del aroma característico del aceite esencial y quedan englobados en distintas familias químicas (Ryman, 1995). Estos son:

1. Hidrocarburos terpénicos: terpenos y terpenoides
2. Aldehídos: aldehído benzoico, aldehído cinámico, butanol.
3. Ácidos: acético, palmítico.
4. Alcoholes: linalol, geraniol, mentol.
5. Fenoles: anetol, eugenol.
6. Ésteres: Acetato de linalilo, Acetato de geranilo.
7. Cetonas: Tuyona
8. Otros: Éteres, derivados nitrogenados, sulfuros, tioéteres, tioésteres.

Considerando al aceite esencial como un producto de aroma característico y clasificando su composición sobre la base de esta propiedad, se puede afirmar que un aceite esencial es una mezcla de sustancias constituidas fundamentalmente por una base integrada por hidrocarburos terpénicos (Ryman, 1995).

En menor concentración se encuentra un número no muy alto de sustancias químicas volátiles que son los responsables principales del aroma global del aceite esencial. Por último, se tiene gran cantidad de sustancias a muy baja concentración que presentan la característica de “redondear” el aroma global. Otros componentes del aceite esencial no están relacionados con su aroma (ceras, ácidos, otros.), pero sí pueden tener su importancia para determinadas aplicaciones y pueden actuar como conservantes, antibióticos, o fijadores del aroma en el aceite esencial (Ryman, 1995).

III.2.3.7. Ruta del Acetato Mevalonato

La síntesis específica de cada compuesto suele estar restringida a estados específicos del desarrollo de cada tipo de organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos. Muchos factores afectan la síntesis de los metabolitos secundarios; la concentración de carbono, hidrógeno y azufre, el estado acuífero y la temperatura ambiental son algunos de los más importantes (Lincoln y Zeiger, 2006).

Los terpenos constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios de los vegetales, siendo la mayoría de ellos específicos del reino vegetal, sin embargo, también se pueden encontrar en animales. Los terpenos pueden encontrarse en la fuente vegetal solos o formando glicósidos; su frecuencia y abundancia están ligados a factores genéticos y climáticos (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 1991).

La diversidad de metabolitos terpénicos naturales considera una serie de reacciones y mecanismos que evidencian la existencia de los principales esqueletos para la formación de terpenos (Bruneton, 2001).

El ácido mevalónico es el precursor universal del esqueleto carbonado de los terpenos. La etapa inicial del proceso implica la condensación de los tioéteres del ácido acético: formación del aceto-acetato y condensación de este con una molécula de acetilcoenzima A. la unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono y, se le conoce como isopreno (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 1991).

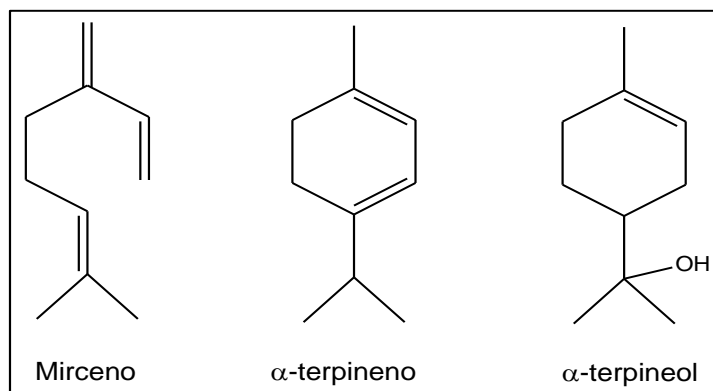
En los aceites esenciales se encuentran únicamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es demasiado elevada: monoterpenos y sesquiterpenos (Bruneton, 2001). Los terpenos se agrupan de acuerdo al número de unidades de isopreno que contienen, entre estos se encuentran:

III.2.3.7.1. Monoterpenos: en su mayoría se encuentran hidrocarburos, que corresponden a los constituyentes más sencillos de la serie de los terpenos. Son el resultado del acoplamiento de dos unidades de isopreno, estos pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos (Figura 6). Están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos, plantas, microorganismos e insectos. A veces constituyen el 90% del aceite esencial (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 1991).

Su precursor es el geranilpirofosfato (GPP). Se encuentran varios tipos estructurales de monoterpenos, los que siguen la regla del isopreno: esqueletos regulares y, en los que no se mantiene la secuencia de dos fragmentos de isopreno unidos “cabeza-cola” llamados esqueletos irregulares. Los monoterpenos regulares son los constituyentes más frecuentes de los aceites esenciales (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 1991).

III.2.3.7.2. Sesquiterpenos: las variaciones estructurales más frecuentes son hidrocarburos, alcoholes y cetonas. Están formados por 15 átomos de carbono; debido a la facilidad que tienen sus estructuras de rearrreglarse, presentan gran diversidad en cuanto a su esqueleto. El precursor de los sesquiterpenos corresponde al farnesilpirofosfato (FPP). Su interés radica en que son componentes habituales de los aceites esenciales de vegetales superiores (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 1991).

Figura 6: Monoterpenos Acíclicos y Cíclicos Encontrados en los Aceites Esenciales



Fuente: Bruneton (2001).

III.2.3.7.3. Diterpenos: formados por 20 átomos de carbono y tienen como precursor al geranilgeranilpirofosfato (GGPP). Principalmente se han aislado de árboles, aunque también se han encontrado en fuentes marinas (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 1991).

III.2.3.8. Ruta del Ácido Shikímico

El elemento estructural que caracteriza a los compuestos fenólicos es la presencia de al menos un núcleo bencénico que contiene un grupo hidroxílico, libre o formando parte de otra función (éter, éster, heterósido). Son derivados no nitrogenados, cuyo ciclo o ciclos aromáticos proceden principalmente del metabolismo del ácido shikímico o de un poliacetato. En la naturaleza, la síntesis de un núcleo aromático es realizada únicamente por vegetales y microorganismos (Bruneton, 2001).

Los compuestos fenólicos de los vegetales proceden de las dos grandes vías de la aromagénesis:

1. *Vía shikimato (ácido shikímico):* la glucosa es el precursor de los fenilpropanoides a través del intermediario clave: el ácido shikímico. La formación del ácido shikímico ocurre a partir de precursores de 3 y 4 átomos

de carbono como son el ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y la eritrosa 4-fosfato (E4P) (Arango, 2010; Marcano y Hasegawa, 1991).

Los aminoácidos fenilalanina y tirosina, se sintetizan por reacciones posteriores del ácido shikímico con PEP, seguida de otras transformaciones. Los ácidos prefénico, fenilpirúvico y el p-hidroxifenilpirúvico son los precursores de estos aminoácidos, que son los constituyentes universales de proteínas y, es punto de partida de la secuencia biosintética que lleva a los ácidos cinámicos (Arango, 2010).

Los ácidos cinámicos son los metabolitos más numerosos del ácido shikímico. Una característica estructural general, en este tipo de sustancias es la presencia frecuente de funciones oxigenadas. Los compuestos fenilpropánicos pueden ciclarse (cumarinas), dimerizarse (lignanos), polimerizarse (ligninas), o bien, prolongar su cadena lateral (estilbenos, flavonoides) (Bruneton, 2001; Arango, 2010).

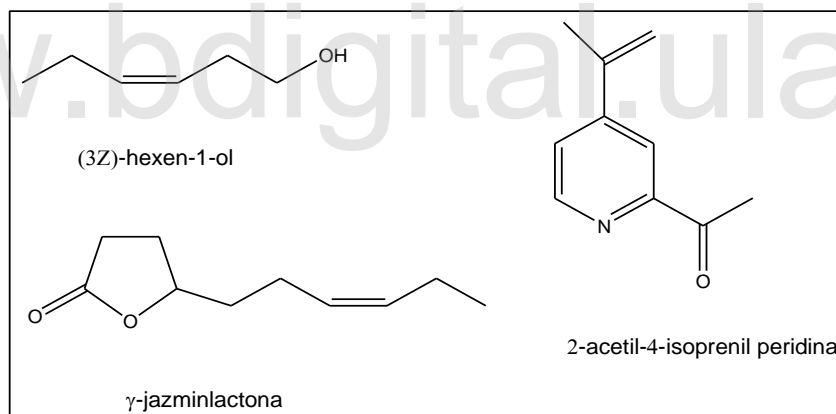
2. *Vía del acetato malonato*: los ácidos grasos son frecuentes en la naturaleza y, constituyen un grupo de sustancias alifáticas diferentes a los terpenoides. Se presentan tanto en animales como en vegetales. Pueden agruparse en ácidos grasos, sus derivados, poliactilenos, prostaglandinas, entre otros. En su mayoría, presentan estructuras acíclicas poco ramificadas, las cuales se forman por condensaciones sucesivas de unidades de acetato-malonato; esta combinación lineal es iniciada por la acetilcoenzima A (Marcano y Hasegawa, 1991).

La grasa natural es una mezcla de ésteres de ácidos grasos y glicerina y, estos se obtienen por hidrólisis alcalina de las grasas. Las grasas sólidas están constituidas principalmente por ácidos grasos saturados, mientras que los aceites están compuestos por ácidos grasos insaturados. La mayoría de los ácidos grasos son monocarboxílicos, de cadena recta con un par de átomos de carbono (usualmente 12, 14, 16 y 18), algunas presentan insaturaciones (Marcano y Hasegawa, 1991).

En la biosíntesis de los ácidos grasos interviene un sistema de dos enzimas: acetil-SCoA y malonil-SCoA. La primera suministra el acetato inicial, el cual es carboxilado a través de la biotina hasta malonato. El malonato que es el elongador de la cadena, transfiere dos carbonos con descarboxilación concurrente, siendo transportado por malonil-SCoA (Marcano y Hasegawa, 1991).

La peroxidación de los ácidos linoleico y α -linolénico induce su ruptura, la formación de ácidos en C9 o C12 y, posteriormente de alcoholes, aldehídos y ésteres de pequeña masa molecular (Figura 7). Estos derivados pueden originarse a través de un mecanismo clásico de β -oxidación. La hidroxilación de la insaturación de un ácido graso es necesaria para justificar la existencia de γ -lactonas y δ -lactonas (Bruneton, 2001).

Figura 7: Compuestos Procedentes de la Degradación de Ácidos Grasos



Fuente: Bruneton (2001).

III.2.3.9. Métodos para la Obtención de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos, por lo que se han clasificado en métodos oficiales y no oficiales (Kuklinski, 2000).

Métodos oficiales: son los contemplados en la farmacopea para obtener los aceites esenciales de uso farmacéutico. Pertenecen a esta categoría:

a. Destilación por arrastre de vapor.

b. Métodos mecánicos (expresión).

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

Métodos no oficinales: se utilizan para la obtención de esencias, principalmente de uso en perfumería o alimentación, aunque también hay esencias que no tienen uso farmacológico pero que se obtienen de forma oficial. Los principales métodos no oficinales son los siguientes: extracción con disolventes orgánicos apolares, extracción con grasas, extracción con gases licuados, extracción por microondas (Albarracín y Gallo, 2003; Martínez, 2001; Kuklinski, 2000).

III.2.3.10. Ensayos de Control de Calidad

Para controlar las esencias deben determinarse diferentes parámetros que se pueden agrupar en: determinaciones físicas, determinaciones químicas, determinaciones espectroscópicas, características organolépticas, determinación del contenido de esencia en la droga y análisis cromatográfico. En los siguientes cuadros (Tabla 3 y 4) se resumen los principales controles para la determinación de los parámetros mencionados (Kuklinski, 2000).

Tabla 3: Parámetros a Evaluar para el Control de las Esencias I

Determinaciones físicas	Determinaciones químicas	Determinaciones organolépticas
Densidad a 20 °C	Índice de acidez	Espectro de UV-visible
Índice de refracción	Índice de ésteres	Espectro de IR
Poder rotatorio	Índice de saponificación	Espectro de RMN
Punto de congelación	Índice de acetilo	
Solubilidad en alcohol de diferente graduación	Índice de fenoles	

Fuente: Kuklinski (2000).

Tabla 4: Parámetros a Evaluar para el Control de las Esencias II

Características organolépticas	Contenido de esencia	Análisis cromatográfico
Color	Por destilación	Cromatografía de capa fina (CCF)
Olor	Por expresión	Cromatografía de gases (CG)
		Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Fuente: Kuklinski (2000).

III.2.3.11. Análisis de Aceites Esenciales

La purificación y aislamiento de los principios activos se puede llevar a cabo por métodos fisicoquímicos no cromatográficos o por métodos cromatográficos (Kuklinski, 2000).

a) métodos fisicoquímicos no cromatográficos: incluyen toda una serie de operaciones como la sedimentación, decantación, centrifugación, filtración, precipitación selectiva, cristalización, partición, entre otros (Kuklinski, 2000).

b) métodos cromatográficos: comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles. La separación de los componentes ocurre debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria (un sólido poroso o un líquido retenido en un soporte sólido) cuando la mezcla es transportada por una fase móvil (eluyente: puede ser líquido o gaseoso). Las técnicas cromatográficas además de ser métodos para purificar y aislar productos, tienen utilidad cualitativa (identificación), porque el tiempo de retención cromatográfico es una característica de cada sustancia, y cuantitativa (determinación), porque es posible recoger las diferentes fracciones de un cromatograma y determinar la cantidad de componente. La diferente velocidad de elución de los componentes se debe a uno de los siguientes fenómenos: adsorción, partición, de intercambio iónico, de exclusión molecular y de afinidad. Las principales técnicas cromatográficas para el análisis de aceites esenciales son (Kuklinski, 2000).

1. Cromatografía de adsorción.
2. Cromatografía de partición.
3. Cromatografía de intercambio iónico.
4. Cromatografía por exclusión de tamaño:
5. Cromatografía de afinidad.
6. Cromatografía de capa fina.
7. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
8. Cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica de separación para resolver numerosos problemas en la industria, medicina, biología y análisis ambiental. Esta técnica es la que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles. Su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos (Valcarcel y Gómez, 1998).

En la CG, un soluto gaseoso (o el vapor de un líquido volátil) es transportado por una fase móvil gaseosa. La fase estacionaria suele ser un líquido no volátil que recubre el interior de la columna o un soporte sólido de grano fino, esta es la forma

más común de cromatografía de reparto gas-líquido. Mientras que la técnica denominada cromatografía de adsorción gas-sólido, se utiliza como fase estacionaria partículas sólidas sobre las que el soluto puede adsorberse (Harris, 1992).

Una muestra de líquido volátil se inyecta a través de un septo de goma (un disco delgado) en un puerto de inyección caliente, recubierto de vidrio o metal, donde se vaporiza la muestra. Las muestras gaseosas pueden inyectarse con una jeringa de cierre hermético o a través de una válvula de muestreo de gas. La muestra es arrastrada hacia la columna por un gas portador inerte (suele ser He, N₂ o H₂), que actúa como fase móvil. Después de pasar por una columna que contiene la fase estacionaria, los solutos separados fluyen por un detector, cuya respuesta se visualiza en un registrador o una computadora (Harris, 1992).

El fundamento del detector, es medir de forma continua una propiedad física o química del gas que circula permanentemente a su través (Valcarcel y Gómez, 1998). El detector se mantiene a mayor temperatura que la columna, de manera que los solutos permanezcan en fase gaseosa. Los solutos que salen del cromatógrafo de gases pueden colectarse para su identificación o enviarse directamente a un espectrómetro de infrarrojo o de masa para el análisis inmediato de cada pico cromatográfico (Harris, 1992).

Los espectrómetros de masa y los espectrofotómetros infrarrojos se utilizan ampliamente en combinación con la CG. Los instrumentos modernos proporcionan el espectro completo para cada componente conforme eluye de la columna, y pueden realizar análisis cualitativo por comparación del resultado con un banco de espectros (Harris, 1992).

III.2.3.11.1 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Se ha convertido en una de las más poderosas herramientas al alcance de los químicos para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas, volátiles y estables a altas temperaturas. El acoplamiento de una columna cromatográfica a

un espectrómetro de masas requiere la utilización de 87 sistemas de entradas especiales. En este caso, se efectúan los espectros de los compuestos que salen de la columna cromatográfica, estos espectros son almacenados en un ordenador para el subsiguiente procesamiento (Allemann, Andres, Borquin y Clerc, 1989; Ramaswami, Briscese, Gargiullo y Von Geldern, 1988). El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Sin embargo, en el caso de columnas rellenas así como en las columnas megacapilares ha de emplearse un separador de chorro, para eliminar la mayor parte del gas portador que acompaña al analito. En este dispositivo, la salida de gases fluye a través de la boquilla de un separador de chorro de vidrio, el cual aumenta el momento lineal de las moléculas más pesadas del analito, de tal forma que el 50% o más de éstas se desplazan aproximadamente en línea recta hacia el conducto colector de salida. Por el contrario, los átomos de helio ligeros se desvían por el vacío y son succionados hacia el exterior. La mayoría de los espectrómetros de masas cuadrupolo y de sector magnético se suministran con los accesorios necesarios para ser acoplados a un equipo de cromatografía de gases (Skoog y col., 2010).

III.2.3.12. Aplicaciones y Usos de los Aceites Esenciales

La aplicación de los aceites esenciales, y de las esencias en general, son múltiples y variadas. Se utilizan tanto por sus propiedades aromáticas, en la industria alimentaria, en perfumería y en la industria de productos de limpieza, como por sus propiedades farmacológicas, en la industria farmacéutica. Las acciones farmacológicas son muy variadas tanto en su utilización por vía tópica (vía externa, sobre la piel) como en su uso por vía interna.

1. *Antisépticos*: frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos incluso frente a hongos productores de micosis y ciertas levaduras (*Candida* sp.). el poder antiséptico es variable según las características estructurales de los componentes del aceite esencial, el cual puede tener:

a. Elevado poder antiséptico: aceites que poseen componentes con un grupo fenol.

- b. Poder antiséptico medio: aceites que poseen componentes con función alcohol.
- c. Bajo poder antiséptico: aceites que poseen componentes con función cetona.

Por su poder antiséptico, los aceites esenciales se utilizan como antisépticos de las vías respiratorias o de las vías urinarias.

2. *Antiespasmódicos*: disminuyen los espasmos gastrointestinales y aumentan las secreciones gástricas, por lo que se usan sobre el aparato digestivo como eupécticos (o carminativos, es decir, facilitan la eliminación de gases), digestivos, estomacales, colagogos (facilitan la salida de bilis de la vesícula biliar al duodeno) y coleréticos (facilitan la secreción de bilis por parte de las células hepáticas). Suelen aumentar las ganas de comer (aperitivos) porque aumentan las secreciones salivares y gástricas.
3. *Sedantes*: algunos componentes de los aceites esenciales tienen acciones sedantes en estados de nerviosismo o ansiedad.
4. *Acción irritante*: algunas esencias aplicadas por vía tópica (sobre la piel) tienen un efecto rubefaciente, es decir, aumentan la circulación capilar y epidérmica y producen un enrojecimiento. Otros aceites son cicatrizantes y vulnerarios (ayudan a sanar heridas y llagas). Aplicados por vía interna actúan sobre el árbol bronquial, fluidificando las secreciones respiratorias y facilitando su eliminación, y son por tanto expectorantes; también pueden actuar sobre el aparato renal ejerciendo una acción diurética que generalmente no suele aprovecharse porque, como efecto indeseable, suelen producir hematuria (emisión de orina con sangre).
5. *Analgésicos*: ciertas esencias aplicadas por vía tópica presentan una acción analgésica frente a dolores musculares, dolores en las articulaciones, entre otros. También surten un efecto antiinflamatorio (Kuklinski, 2000).

Formas de Uso de los Aceites Esenciales (Tabla 5 y 6)

1. En farmacia los aceites esenciales son empleados al natural (infusiones), o en formas de preparaciones galénicas y, muy a menudo, para la obtención de aceites esenciales, muchos de los cuales son oficinales. Algunos de estos

aceites esenciales tienen interés medicamentoso, otros sirven esencialmente para la aromatización de especialidades. Lo mismo ocurre para productos aislados (ejemplo, productos puros aislados de los aceites esenciales) (Bruneton, 1991).

2. En perfumería se emplean aceites esenciales, concretas, resinoides, productos aislados (Bruneton, 1991).
3. En alimentación se usan al natural (especias y aromatizantes), aceites esenciales, concretas, resinoides y también más recientemente, formas hidrosolubilizadas (Bruneton, 1991).
4. En diversas industrias, sobre todo químicas, los productos aislados son materia primas básicas, para la síntesis de principios activos terapéuticos, vitaminas, intermediarios (Bruneton, 1991).

Tabla 5: Diferentes Formas de Uso de los Aceites Esenciales

Droga vegetal: infusión, preparados galénicos
Aceites esenciales: por sus acciones farmacológicas, también como aromatizantes
Productos aislados: por sus acciones farmacológicas, también como aromatizantes

Fuente: Bruneton (1991).

Tabla 6: Diferentes Usos de los Aceites Esenciales

Uso alimentario	Uso en perfumería y cosmética	Otras industrias
Droga vegetal	Aceite esencial	Productos aislados
Aceite esencial	Productos aislados	

Fuente: Bruneton (1991).

III.2.3.13. Toxicidad de los Aceites Esenciales

Este aspecto es de suma importancia, debido al desarrollo de ciertas prácticas como la aromaterapia (definida como el tratamiento de las enfermedades por las esencias

de las plantas). La connotación «producto natural» destinada a las esencias y al hecho de que muchas, son expeditas al público, fuera del sector farmacéutico –por tanto, sin ningún control serio- llevan a una utilización a veces abusiva, a una automedicación peligrosa (Bruneton, 1991).

Los datos de que se dispone sobre la toxicidad crónica des esencias, son muy fragmentarios, no se han estudiado sus posibles efectos secundarios, ni tampoco se ha demostrado la ausencia de efectos cancerígenos o teratógenos. Es evidente que el empleo de estas sustancias, presenta cierto número de riesgos, y que estos medicamentos no disponen de los criterios que cabe esperar de un medicamento moderno (Bruneton, 1991).

En la actualidad, se puede apreciar la tendencia que existe por el consumo de alimentos naturales para tratar diversas enfermedades en el ser humano. Numerosas investigaciones indican el efecto antimicrobiano que tienen los aceites esenciales extraídos de las plantas para sustituir entonces, lo sintético por lo natural, pero ¿Qué son los agentes microbianos?

III.2.4. Bacterias

Los microorganismos, son seres vivos diminutos que individualmente suelen ser demasiado pequeños para ser observados a simple vista. El grupo incluye bacterias, hongos, protozoos y algas microscópicas. También incluyen a los virus, entidades no celulares que a veces se consideran en el límite entre lo vivo y lo inerte. La mayoría de los microorganismos realizan contribuciones fundamentales al bienestar de los habitantes del mundo porque ayudan a mantener el equilibrio de los organismos vivos y las sustancias químicas en el ambiente (Tortora, Funke y Case, 2007).

Cuando se descubrió que las bacterias se teñían con colorantes surgió un criterio de agrupación según su afinidad tintorial. Con la tinción de Gram se formaron dos grandes grupos bacterianos: los Gram positivos, que se tiñen de color violeta y los Gram negativos, que se tiñen de color rojo. También la tinción de Ziehl-Neelsen formó dos grupos. Las bacterias ácido-alcohol resistentes, que se tiñen de color rojo,

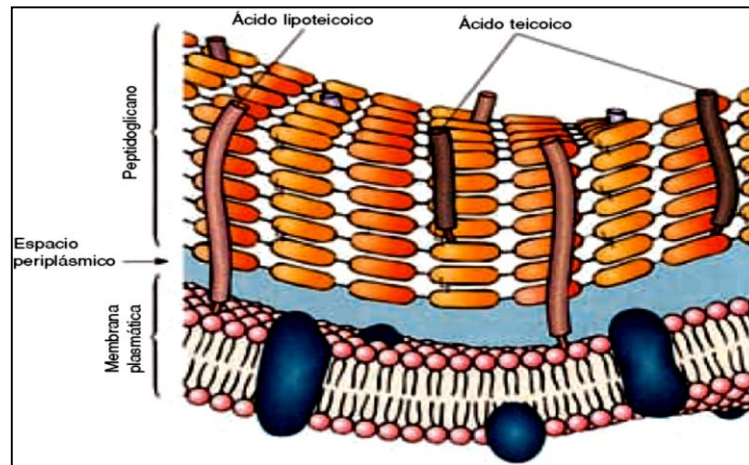
y las no ácido-alcohol resistentes, que se tiñen de color azul con esta técnica (Romero, 2007).

Para este trabajo de investigación es de importancia la coloración de las bacterias según la tinción de Gram, es por ello que a continuación se hará la descripción de la pared celular de las bacterias de acuerdo a la clasificación de Gram.

La pared celular de la mayoría de las bacterias Gram positivas (Figura 8) está compuesta por varias capas de peptidoglucano (también conocida como mureína), que puede ser una estructura solitaria o estar combinada con otras sustancias. El peptidoglucano a su vez está compuesto por un disacárido repetitivo unido por polipéptidos que forma un losange que rodea y protege la totalidad de la célula. El disacárido está formado por monosacáridos denominados N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico y emparentados con la glucosa. El montaje de los diversos componentes del peptidoglucano tiene lugar en la pared celular conformando una estructura gruesa y rígida (Tortora y col., 2007).

Además, la pared celular de las bacterias Gram positivas contiene ácidos teicoicos que están compuestos principalmente por un alcohol (ejemplo, glicerol o ribitol) y fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico, que abarca toda la capa de peptidoglucano y está unido a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, que está unido a la capa de peptidoglucano. La carga negativa de los ácidos teicoicos (generada por los grupos fosfato asociados) determina que estos compuestos se unan a los cationes (iones positivos) y regulan su movimiento hacia el interior y el exterior de las células. Estos ácidos también pueden contribuir al desarrollo celular al prevenir la ruptura de la pared celular y reducir el riesgo de lisis. Por último, los ácidos teicoicos son responsables de una gran parte de la especificidad antigénica de la pared celular y en consecuencia permite la identificación de las bacterias mediante ciertas pruebas del laboratorio (Tortora y col., 2007).

Figura 8: Estructura de la Pared Celular de Bacterias Gram positivas



Fuente: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfologia.pdf

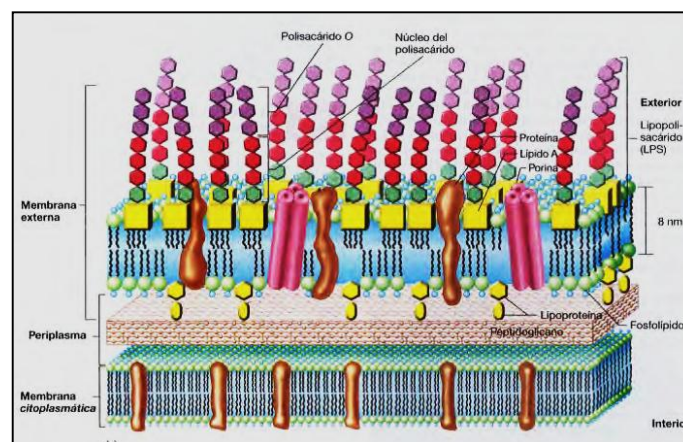
Por otra parte, la pared celular de las bacterias Gram negativas es mucho más compleja que la pared celular de las Gram positivas. La capa delgada de peptidoglucano, próxima a la membrana plasmática, no constituye más del 5 al 10% de todo el peso de la pared. El peptidoglucano puede estar en forma de gel, más que como una capa compacta. La membrana externa está situada por fuera de la capa fina de peptidoglucano. Este compuesto está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y membrana plasmática. El periplasma contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared celular de las bacterias Gram negativas no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica (Prescott y col., 1999; Tortora y col., 2007).

La membrana externa de las bacterias Gram negativas (Figura 9) está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos. Su intensa carga negativa dificulta considerablemente la fagocitosis y la actividad del complemento (lisis de las células e inducción de la fagocitosis), dos componentes de las defensas del huésped. La membrana externa también constituye una barrera que impide el paso

de ciertos antibióticos, enzimas digestivas, detergentes, metales pesados, sales biliares y de ciertos colorantes. La permeabilidad de la membrana externa se debe en parte a la presencia de proteínas llamadas porinas, que forman canales de membrana, permitiendo el paso de diversas moléculas, como nucleótidos, disacáridos, péptidos, aminoácidos, hierro y vitamina B12 (Prescott y col., 1999; Tortora y col., 2007).

El componente LPS de la membrana externa es responsable de características importantes de las bacterias Gram negativas. La fracción polisacárida está compuesta por azúcares llamados polisacáridos O, que es una cadena de polisacáridos que se extiende hacia afuera. Posee varios azúcares peculiares y la composición varía según la cepa bacteriana. Actúan como antígenos, siendo fácilmente reconocibles por los anticuerpos del huésped. El polisacárido central está unido al lípido A. La porción lipídica del lipopolisacárido denominada lípido A, se conoce con el nombre de endotoxina y ejerce un efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o el aparato digestivo del huésped. Contiene dos derivados del azúcar glucosamina, cada uno de ellos está unido a tres ácidos grasos y contiene grupos fosfato o pirofosfato, que se encuentran inmersos en la membrana externa y, el resto de la molécula del LPS sobresale de la superficie (Prescott y col., 1999; Tortora y col., 2007).

Figura 9: Estructura de la Pared Celular de Bacterias Gram negativas



Fuente: <http://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/file/view/243.png/21681643/685x419/243.png>

En el presente proyecto de investigación las bacterias a estudiar serán clasificadas según la coloración de Gram: Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*).

Enterococcus faecalis: los *enterococcus* forman parte de la flora intestinal normal, siendo el *enterococcus faecalis* el más común y causa 85 a 90% de las infecciones enterocócicas. Los *enterococcus* se transmiten de un paciente a otro principalmente por las manos del personal del hospital, algunos de ellos pueden portar el *enterococcus* en el conducto gastrointestinal; en ocasiones se transmite por dispositivos médicos. En los pacientes, los sitios más comunes de infección son el aparato urinario, heridas, conducto biliar y sangre. Pueden causar meningitis y bacteriemia en los neonatos; en los adultos pueden causar endocarditis (Brooks, Carroll, Butel y Morse, 2008).

Staphylococcus aureus: una infección estafilocócica localizada se presenta como un “grano”, infección de un folículo piloso, o absceso. Frecuentemente hay una reacción inflamatoria intensa localizada y dolorosa, que muestra supuración central y cicatriza con rapidez cuando el pus se drena. La infección con el *Staphylococcus aureus* también puede resultar de la contaminación directa de una herida, por ejemplo, infección de las heridas posoperatorias o infección después de traumatismo (meningitis después de fractura del cráneo). Si el *S. aureus* se disemina y sobreviene bacteriemia pueden producirse endocarditis, osteomielitis hematógena aguda, meningitis o infección pulmonar (Brooks y col., 2008).

Pseudomonas aeruginosa: con frecuencia se observa en escaso número en la flora intestinal normal y sobre la piel de los humanos. *P. aeruginosa* se distribuye extensamente en la naturaleza y es común en ambientes húmedos de los hospitales. Puede colonizar a los humanos normales, en quienes es un saprófito. Causa enfermedad en huéspedes humanos con defensas anormales. Produce infección en heridas y quemaduras, formando pus color azul verdoso; cuando se introduce por punción lumbar causa meningitis, e infecciones del aparato urinario cuando la vía de entrada son catéteres, instrumentos o soluciones irritantes. La afección del

aparato respiratorio, en especial por aparatos respiratorios contaminados produce neumonía necrosante. Esta bacteria se observa con frecuencia en la otitis externa, leve de los nadadores. En pacientes diabéticos puede causar otitis externa invasora (maligna). En lactantes o personas debilitadas puede invadir el torrente sanguíneo y causar septicemia mortal. En la mayor parte de las infecciones por *P. aeruginosa* los síntomas y signos son inespecíficos y se relacionan con el órgano afectado (Brooks y col., 2008).

Klebsiella pneumoniae: se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces de casi el 5% de las personas sanas. Produce una pequeña proporción (alrededor de 1%) de las neumonías bacterianas. Pueden causar condensación necrosante hemorrágica extensa del pulmón. En ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacterinemia a partir de las lesiones focales en pacientes debilitados. Puede provocar infecciones nosocomiales (Brooks y col., 2008).

Escherichia coli: es un miembro de la flora intestinal normal. Es la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable de casi el 90% de las infecciones urinarias primarias en mujeres jóvenes los signos y síntomas incluyen poliuria, disuria, hematuria y piuria. Las infecciones de las vías urinarias pueden provocar bacteriemia con signos clínicos de sepsis. Por lo general es nefropatógeno. Es causante común en todo el mundo de diarrea, incluyendo a lactantes. *E. coli* es una de las bacterias principales que causan meningitis en los lactantes (Brooks y col., 2008).

El organismo alberga gran cantidad de bacterias que tienen un papel fundamental en la salud de todo ser humano. Una infección bacteriana es inminente cuando estas bacterias se reproducen sin control e invaden otras partes del cuerpo. Las infecciones bacterianas pueden variar en intensidad y ser solo una molestia hasta una seria amenaza para la vida. Estas infecciones bacterianas son probablemente las más fáciles de tratar, pero también pueden ser perjudiciales si no se tratan rápidamente; una de las maneras de tratar o combatir dichas infecciones es con el uso de antibióticos.

III.2.5. Antibióticos

Son sustancias químicas específicas derivadas o producidas por células vivientes, que incluso en pequeñas concentraciones son capaces de inhibir los procesos vitales de los microorganismos; en la práctica, el término antibiótico se utiliza para designar a todas las drogas sistémicas utilizadas para el tratamiento de infecciones bacterianas. Si bien fueron aislados de tejidos de plantas superiores y animales, este término por lo general se utiliza para designar sustancias inhibitorias de origen microbiano. Los antibióticos pueden ser clasificados por su composición química (Tabla 7) (Korolkovas, 1978; Gennaro, 2003).

Tabla 7: Clasificación de los Antibióticos de Acuerdo a su Composición Química

Grupo: Betalactámicos	
<i>Clase</i>	<i>Descripción</i>
Penicilinas	Es un grupo de más de 50 antibióticos con estructura química relacionada. Todas las penicilinas tienen una estructura central común que contiene un anillo β -lactámico denominado núcleo. Las penicilinas se diferencian por las cadenas laterales unidas a sus núcleos. Inhiben la síntesis de la pared celular y, su espectro de acción es sobre las bacterias Gram positivas
Cefalosporinas	Grupo de antibióticos estrechamente emparentados con las penicilinas. En la actualidad las cefalosporinas se clasifican en cuatro generaciones de acuerdo con el espectro para bacterias Gram negativas y la estabilidad de la droga en presencia de betalactamasa. No obstante, esta clasificación está dejando de ser confiable a medida que la incorporación de nuevos agentes obliga a una mayor cantidad de excepciones y una menor precisión de los criterios para establecer diferencias del espectro antibacteriano
Carbapenemos	Los carbapenémicos inducen betalactamasas, pero también son resistentes a estas enzimas; este fenómeno explica su eficacia contra más del 90% de las especies de bacterias Gram negativas

Continuación: Clasificación de los Antibióticos de Acuerdo a su Composición Química

Monobactámicos	Son análogos naturales o sintéticos de un antibiótico β -lactámico monocíclico aislado de ciertas bacterias del suelo. Los monobactámicos no inducen betalactamasas
Inhibidores de betalactamasas	Las enzimas que abren los anillos β -lactámicos de las penicilinas, las cefalosporinas y los compuestos relacionados con estas clases de drogas, en el nivel de la unión β -lactámica, se conocen con el nombre de betalactamasas. Los inhibidores de las betalactamasas acilan la enzima a través de la formación de una doble ligadura; por lo tanto se disocian muy lentamente
Grupo	Descripción
Glucopéptidos	Inhiben la síntesis de la pared celular. Su espectro de actividad es solo sobre bacterias Gram positivas
Aminoglucósidos	Constituyen un grupo de antibióticos que contienen uno o más aminoazúcares, como glucosamina o neosamina, unidos por enlaces glucosídicos a un anillo básico (amino o guanidino) de seis átomos de carbono. Los aminoglucósidos son bactericidas e inhiben la síntesis de proteínas
Tetraciclinas	Grupo de antibióticos de amplio espectro. Todas las tetraciclinas ejercen efectos adversos similares. Las diferencias entre los distintos miembros de esta clase de antibióticos radican sobre todo en los índices de absorción, la duración de la acción y la posibilidad de administración parenteral. Las tetraciclinas generalmente tienen un efecto bacteriostático
Anfenicoles	El cloranfenicol, es un antibiótico de amplio espectro con graves problemas de toxicidad. Inhibe la síntesis proteica por unión a la subunidad 50S del ribosoma. Su espectro de acción es sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas
Macrólidos	Son lactonas macrocíclicas hidroxiladas que contienen 12 a 20 átomos de carbono en el anillo primario. Inhiben la síntesis proteica por unión a la subunidad 50S del ribosoma. Actúan sobre la mayoría de las bacterias Gram positivas y sobre algunas bacterias Gram negativas
Estreptograminas	Inhiben la síntesis de proteínas por unión a dos sitios separados en la subunidad 50S del ribosoma. Actúan sobre las bacterias Gram positivas
Sulfonamidas	Son antibióticos bacteriostáticos debido a la similitud estructural con el ácido para-aminobenzoico. Interfieren

Continuación: Clasificación de los Antibióticos de Acuerdo a su Composición Química

	con la vía del ácido fólico al unirse a la enzima dihidropteroato sintetasa. Su acción es sobre bacterias Gram positivas y muchas Gram negativas
Polipéptidos	La bacitracina y polimixina B, solo se utilizan de forma tópica debido a su alto grado de toxicidad sistémica. Estos compuestos difieren entre sí por sus mecanismos de acción y espectros antibacterianos. La bacitracina es eficaz contra bacterias Gram negativas e inhibe la síntesis de la pared celular. La polimixina B es activa contra bacterias Gram negativas, a través de la ruptura de la membrana citoplasmática bacteriana
Rifamicinas	El derivado mejor conocido de la familia de las rifamicinas es la rifampicina. Inhiben la síntesis de mRNA

Fuente: Gennaro, (2003); Forbes y Sahm, (2004); Tortora y col., (2007).

III.2.5.1. Espectro de Actividad Antibacteriana

Es comparativamente fácil encontrar o desarrollar fármacos eficaces contra células procariontes y que no afecten las células eucariontes humanas. Por ende, la toxicidad selectiva tiene numerosas dianas. El problema resulta más difícil cuando el patógeno es una célula eucarionte, como un hongo, un protozoo o un helminto. Algunos fármacos tienen un espectro reducido de actividad microbiana o gama de microorganismos diferentes que afectan. Mientras que los antibióticos que actúan sobre una amplia variedad de bacterias se denominan antibióticos de amplio espectro (Tortora y col., 2007).

III.2.5.2. Resistencia a Antimicrobianos Mediada por Microorganismos

Se refiere a la producida por los rasgos codificados genéticamente del microorganismo y es el tipo de resistencia que prueba los métodos de sensibilidad *in vitro*. La resistencia basada en el microorganismo puede dividirse en dos subcategorías: la resistencia intrínseca o inherente y la adquirida (Forbes y Sahm, 2004).

III.2.5.2.1. Resistencia Intrínseca

Esta resistencia es el resultado del estado normal genético, estructural o fisiológico de un microorganismo. Se considera que es una característica natural y heredada en forma invariable, que se asocia con la inmensa mayoría de cepas que constituyen un grupo un género o una especie bacteriana en particular (Forbes y Sahm, 2004).

III.2.5.2.2. Resistencia Adquirida

Es el resultado de la alteración de la fisiología y la estructura celular, causada por cambios en la composición genética habitual de un microorganismo. A diferencia de la resistencia intrínseca la adquirida puede ser un rasgo asociado con solo algunas cepas de un grupo o especie de microorganismo, pero no con otras. Por consiguiente, la presencia de este tipo de resistencia en cualquier aislamiento es imprevisible, y esta falta de predictibilidad es la razón fundamental por la que se necesitan métodos de laboratorio para detectar la resistencia. Debido a que todos los mecanismos de resistencias adquiridos están codificados por vía genética, los métodos de adquisición son básicamente los mismos que permiten el cambio o el intercambio genético. Por tanto, la resistencia puede adquirirse por:

1. Mutaciones genéticas.
2. Adquisición de genes de otros microorganismos por medio de los mecanismos de transferencia genética.
3. Una combinación de episodios de mutación y de transferencia genética (Forbes y Sahm, 2004).

Los antibióticos también son encontrados de manera natural, es decir, aquellos medicamentos procedentes del mundo vegetal, que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos. Son muchas las plantas que poseen un intenso poder antibiótico entre estas se puede hacer mención a la Familia Lauraceae.

III.2.5.3. Determinación de la Actividad Antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales es difícil debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad. Las propiedades específicas de los aceites esenciales tales como: su hidrofobicidad y alta viscosidad pueden reducir la capacidad de dilución o causar una distribución desigual del aceite a través del medio; aun cuando se utilice un apropiado agente solubilizante o dispersante. La susceptibilidad de un microorganismo a un aceite esencial depende principalmente de las propiedades del aceite y de los mismos microorganismos. Se conoce que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los aceites esenciales que las Gram negativas por cuanto unas son más resistentes que las otras (Kalemba y Kunicka, 2003).

III.2.5.3.1. Prueba de Sensibilidad por Difusión en Agar (Prueba de Kirby – Bauer)

Es empleada en patógenos aerobios o facultativos de crecimiento rápido. El principio de esta técnica se basa en colocar un disco de antibiótico sobre la superficie del agar, en el que previamente se ha inoculado la cepa bacteriana de estudio; el disco va a captar humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia fuera a través del agar, produciendo un gradiente de concentración de antibiótico. A medida que aumenta la distancia desde el disco, disminuye la concentración del antibiótico. Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano, en torno al disco se forma un anillo claro. Cuanto más ancha es la zona que rodea al disco más sensible es el patógeno (Prescott, Harley y Klein, 2003).

Actualmente la prueba de difusión en agar más empleada es el método de Kirby – Bauer, que fue desarrollado a principio de la década de 1960 por William Kirby, A. W. Bauer (Ramírez, 2006).

IV. CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

IV.1. Recolección y Preparación del Material Vegetal

La especie botánica *P. caerulea* fue recolectada en las inmediaciones de la biblioteca LABONAC perteneciente a la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Núcleo Mérida de la Universidad de Los Andes, donde se recolectaron aproximadamente tres kilogramos de la misma (Figura 10). La planta fue botánicamente identificada por el Ingeniero Forestal Luis Gámez. La recolección del material para el análisis se realizó el 24 de febrero de 2015.

Figura 10: Recolección de la especie botánica *P. caerulea*



IV.2. Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial

La extracción del aceite esencial se realizó a partir del material fresco, del cual fueron separadas las partes aéreas (hojas) de su tallo para luego ser pesadas y licuadas con una cantidad inespecífica de agua. El material vegetal seleccionado se sometió a un proceso de hidrodestilación; empleando la trampa de Clevenger (Figura 11) obteniéndose aproximadamente 1mL de aceite. El aceite recolectado fue almacenado en refrigeración en un recipiente hermético.

Figura 11: Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial



IV.3. Identificación de los Componentes Químicos del Aceite Esencial

El análisis se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) usando un equipo marca Hewlett Packard 6890 formado por una columna de fenilmetil-polixisilosano de 30m de largo x 0,25 mm (HP-5) y un detector de masas Hewlett Packard MSD 5973. La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición.

IV.4. Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial

IV.4.1. Microorganismos Empleados:

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se seleccionaron 5 especies: 2 cepas de bacterias Gram positivas y 3 cepas de bacterias Gram negativas de referencia internacional.

- Cepas Gram positivas:
 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 2. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Cepas Gram negativas:
 1. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357
 2. *Escherichia coli* ATCC 25922
 3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

IV.4.2. Preparación del Pre-inóculo Bacteriano

Empleando las cepas de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), se realizó un repique bacteriano en medios de cultivos de agar nutritivo, a excepción de *E. faecalis* que por sus condiciones de crecimiento se repico en agar tripticasa soya.

Figura 12: Preparación de las Placas para el Pre-inoculo Bacteriano



IV.4.3. Preparación de las Placas para el Antibiograma

Bajo estrictas condiciones de esterilidad se preparó el medio de cultivo agar Muller-Hinton empleando 7,6 gramos de agar; obteniéndose un total de 150 mililitros; de los cuales se depositaron 15 mililitros en cada placa de Petri (Figura 13). Se dejaron solidificar las placas a temperatura ambiente, para luego ser inoculadas.

Figura 13: Preparación de Medio de Cultivo Agar Muller-Hinton



IV.4.4. Preparación del Inóculo Bacteriano

Aproximadamente 18 horas después de haber preparado los pre-inóculos bacterianos, se procedió a preparar los inóculos tomando una asada de las colonias bacterianas para ser resuspendidas en los tubos de ensayo con solución salina estéril (0,85%), hasta que la turbidez fuese igual a la del patrón de Mac-Farland 0,5 que contiene aproximadamente de 10^6 a 10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro

IV.4.5. Ensayo Microbiológico

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo empleando la técnica de difusión de disco en agar o método de Kirby-Bauer. El inóculo previamente preparado fue tomado con ayuda de un hisopo estéril; evitando los excesos de

humedad rotando el mismo por las paredes del tubo de ensayo. Seguidamente se sembró la muestra en la placa de agar Muller-Hinton. Una vez sembradas todas las placas con los diferentes microorganismos a ensayar, se colocaron los discos de papel filtro impregnados con 10µL del aceite esencial puro de manera equidistante. Para el control de los antibiogramas se emplearon controles positivos y controles negativos; como control positivo (Tabla 8) fueron usados antibióticos según la cepa bacteriana, Eritromicina 15µg (*S. aureus* y *E. faecalis*), Ampicilina 10µg (*E. coli*) y Amikacina 30µg (*K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) y, como control negativo un disco de papel filtro impregnado con DMSO (dimetil sulfóxido). Los antibiogramas se llevaron a refrigeración por 2 horas y luego trasladados a la estufa a 37°C durante 24 horas.

Tabla 8: Controles Positivos Según Comité Nacional para la Normalización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) 2015

Cepa Bacteriana	Antibiótico (µg)	Halo de inhibición (mm)
<i>S. aureus</i>	Eritromicina 15	17
<i>E. faecalis</i>	Eritromicina 15	28
<i>E. coli</i>	Ampicilina 10	32
<i>K. pneumoniae</i>	Amikacina 30	26
<i>P. aeruginosa</i>	Amikacina 30	24

IV.4.6. Lectura del Antibiograma

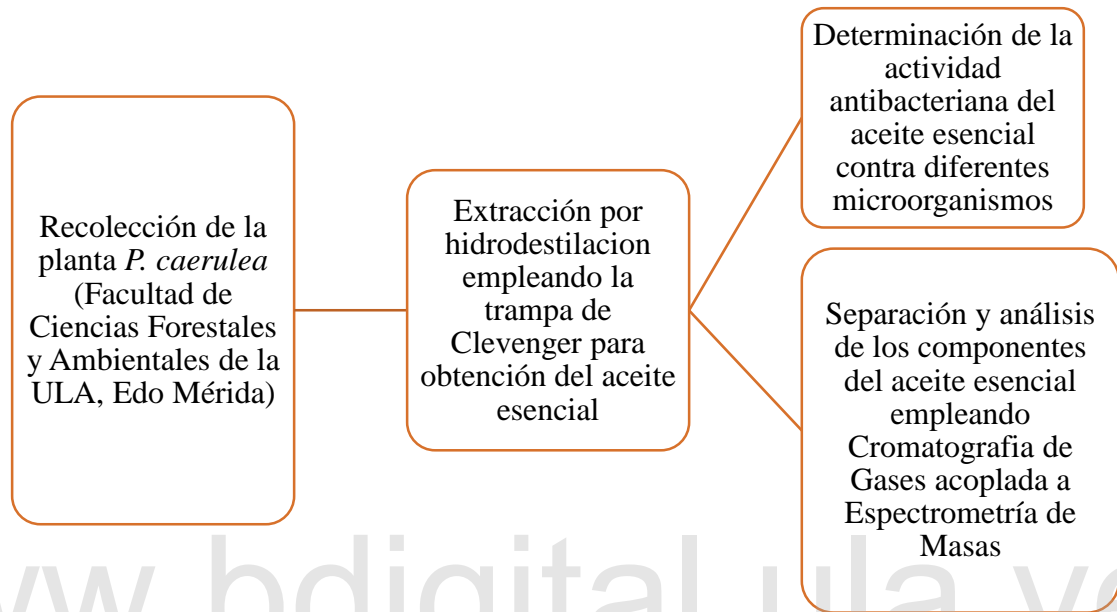
El antibiograma fue evaluado entre las 18 y 24 horas de incubación, encontrándose las bacterias en fase de crecimiento. La lectura se hizo midiendo en milímetros los halos de inhibición presentes en las placas.

IV.4.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizaron diluciones del aceite esencial de *P. caerulea* partiendo de una concentración de 0,947 gr/mL.

IV.4.8. Camino Metodológico

La metodología para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *P. caerulea* se muestra de forma esquemática a continuación:



www.bdigital.ula.ve

V. CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El aceite esencial obtenido de la planta *P. caerulea* colectada en el estado Mérida, se extrajo empleándose la técnica de hidrodestilación. Para el desarrollo de la técnica se hizo necesario contar con un balón de destilación conectado a una manta eléctrica que se encarga de aportar la temperatura para lograr la ebullición, un aparato de destilación y una trampa de Clevenger. Este proceso tuvo un tiempo de duración aproximado de dos horas, en el que se logró obtener una fase acuosa y una fase orgánica (aceite esencia). La temperatura del proceso se inició a los 90 grados centígrados, tomando como precaución el uso de perlas de ebullición para evitar que esta fuese violenta. Una vez iniciada la ebullición, se disminuyó la temperatura a 70 grados centígrados, permitiendo que transcurriera el resto del proceso. Finalmente, se obtuvo el aceite esencial.

V.1. Características del Aceite Esencial de *Persea caerulea*

De la especie botánica *P. caerulea*, se pesó un total de materia vegetal de 2.468Kg (hojas) para el proceso de hidrodestilación, alcanzándose un rendimiento de 0,037 por ciento. El aceite obtenido presentó las siguientes características organolépticas: color amarillo y aroma característico.

V.2. Composición Química del Aceite Esencial de *P. caerulea*

El análisis del aceite esencial de *P. caerulea* se realizó empleando un equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM), de esta manera fue posible conocer la composición química del aceite. Para el análisis se utilizó una solución madre con una concentración de 0,947g/mL. Los resultados de la composición del aceite esencial de *P. caerulea* se presentan en la tabla 9. Como se puede observar se identificaron 21 compuestos, siendo el componente mayoritario el globulol con un 21,60 por ciento (Figura 14) seguido de nerolidol y β -cariofileno (Figura 15) con 18,99 y 9,59 por ciento respectivamente; logrando ser identificados por la base de datos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA.

Figura 14: Estructura Química del Globulol

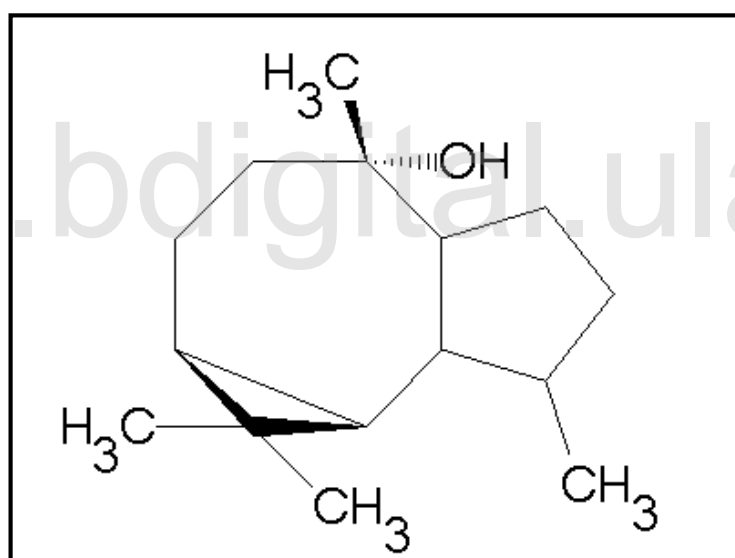


Figura 15: Estructura Química del Nerolidol y del β -cariofileno

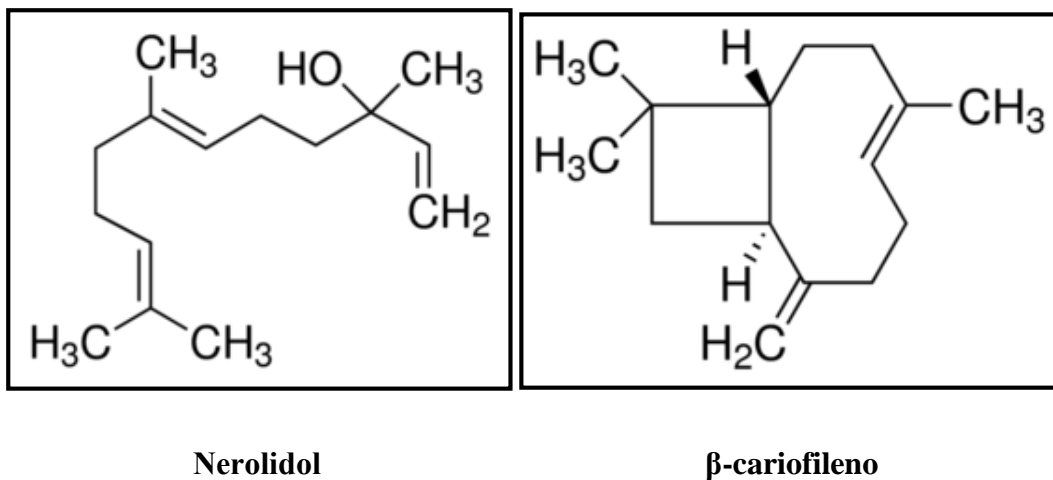


Tabla 9: Compuestos Identificados en el Aceite Esencial de *P. caerulea* por Medio de CG-EM: totalidad de moléculas identificadas y proporción de la composición del aceite esencial de la planta.

#	Compuesto	%	TR	I kcal	I ktab
1	Terpinen-4-ol	3,43	12,70	1184	1174
2	β-cariofileno	9,59	20,18	1442	1419
3	α -humuleno	2,93	21,22	1478	1452
4	Oxido de cariofileno	2,09	24,18	1572	1582
5	Nerolidol	18,99	24,53	1583	1561
6	Cis-3.hexenil benzoato	0,98	24,71	1588	1587
7	Globulol	21,60	25,16	1602	1590
8	Viridiflorol	2,19	25,35	1610	1592
9	Rosifoliol	1,34	25,61	1621	1594
10	Humuleno epóxido II	1,97	25,84	1631	1608
11	Junenol	0,87	26,08	1641	1618
12	β -eudesmol	1,53	26,19	1645	1649
13	α -acorenal	3,95	26,36	1652	1632
14	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5- β -ol	1,92	26,62	1663	1639

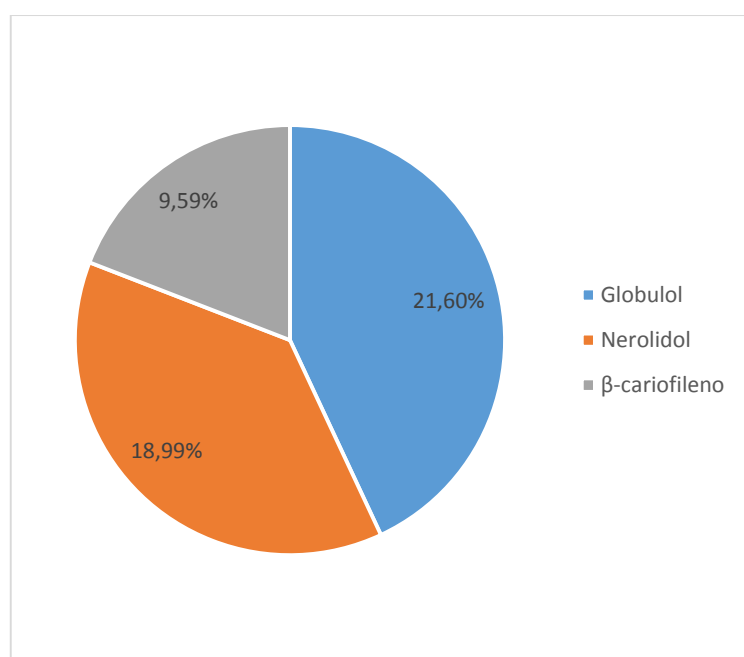
Continuación de Compuestos Identificados en el Aceite Esencial de *P. caerulea* por Medio de CG-EM

15	α -cadinol	1,04	26,83	1672	1649
16	α -cadinol	4,25	27,08	1682	1652
17	Sativene	0,89	28,05	1720	1390
18	Eudesma-3,11-diene	0,90	28,21	1726	1489
19	Ácido E9-tetradecenoico	2,72	29,74	1783	
20	Ent-spathulenol	0,90	30,56	1813	1577
21	Palmitato de metilo	0,76	33,98	1937	

Leyenda: TR: Tiempo de retención, I_{kcal}: Índice de kovats calculado, I_{ktab}: Índice de kovats tabulado.

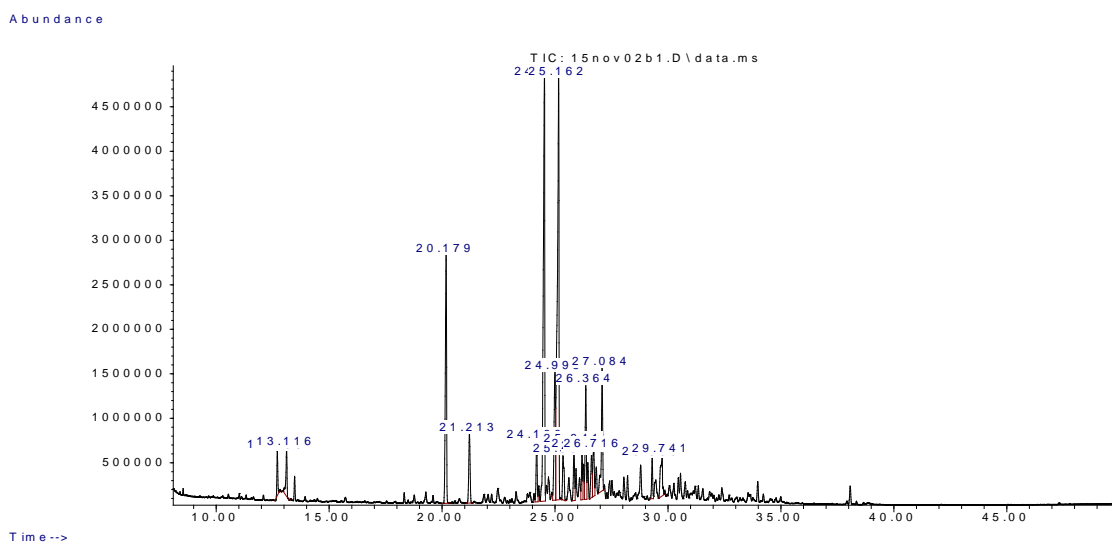
En la figura 16 se aprecia la distribución de los componentes mayoritarios, observándose que en mayor proporción se encuentra el globulol con un 21,60 por ciento, nerolidol con 18,99 por ciento y β -cariofileno con 9,59 por ciento; estos compuestos son sesquiterpenos al igual que otros compuestos encontrados en el aceite como el α -humuleno, oxido de cariofileno, viridiflorol, humuleno epóxido II. También hay presencia de terpenos como el terpinen-4-ol.

Figura 16: Compuestos Mayoritarios del Aceite Esencial de *Persea caerulea*



En el cromatograma (Figura 17) se observan los picos alcanzados por los componentes que componen el aceite esencial.

Figura 17: Cromatograma



V.3. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *P. caerulea*

El aceite esencial de *P. caerulea* fue sometido a un estudio biológico para evaluar la actividad antibacteriana frente a cinco grupos de microorganismos conocidos y frecuentemente causantes de numerosas patologías; el mismo se realizó mediante la técnica de difusión de disco en agar, observándose actividad antimicrobiana con las cepas de *S. aureus* y *E. faecalis*. A las mismas se les evaluó su concentración mínima inhibitoria. Los resultados de dicho estudio biológico se describen con detalle a continuación:

Las especies bacterianas a evaluar fueron *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* todas de la colección americana ATCC; se tomó como referencia para el uso de los controles positivos lo establecido por el Comité Nacional para la Normalización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) 2015, según las cepas bacterianas de ensayo. Al evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial puro, colocado en placas de agar Mueller-Hinton sobre discos de papel filtro por duplicado, se visualizaron los siguientes resultados:

Tabla 10: Actividad Antibacteriana

Cepa Bacteriana	Halos de Inhibición (mm)		
	Aceite concentrado	Control positivo	Control negativo
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19,5	17	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	13	28	0
<i>k. pneumoniae</i> ATCC 23357	0	26	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	24	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	32	0

Leyenda: Control negativo: DMSO; Control positivo: *S. aureus* y *E. faecalis* (eritromicina 15 µg), *k. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (amikacina 30 µg); *E. coli* (ampicilina 10 µg).

Figura 18: Halos de inhibición bacteriana de *S. aureus* y *E. faecalis*

www.bdigital.ula.ve



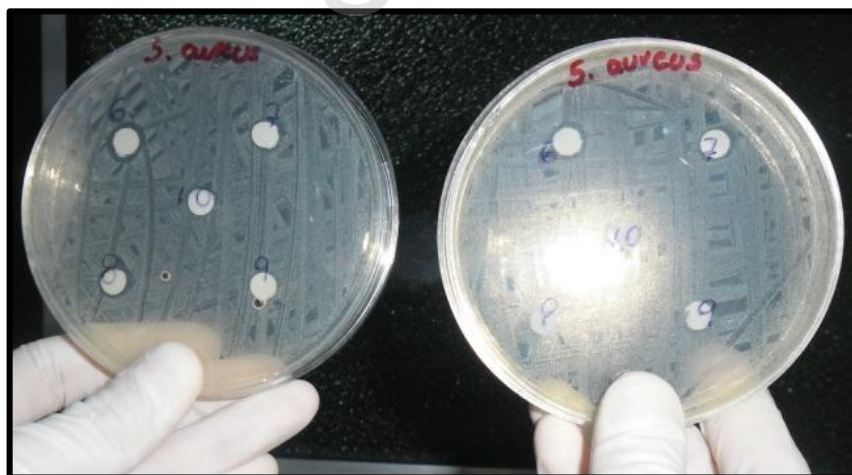
De acuerdo a estos datos, se podría deducir que el aceite esencial de *P. caerulea* es capaz de inhibir en cierto grado el crecimiento bacteriano. El aceite esencial puro fue diluido en DMSO en cuatro fracciones para ser ensayado en aquellas cepas bacterianas que presentaron sensibilidad y así conocer la concentración mínima inhibitoria del aceite, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 11: Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Cepa Bacteriana	Halo de Inhibición (mm)				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0
CIM (gr/mL)	0,947	0,4735	0,2368	0,1184	0,0592

El aceite esencial fue activo frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 9 mm, siendo su CIM de 0,947 gr/mL. En el caso de *E. faecalis*, el aceite no reveló actividad biológica alguna para este ensayo.

Figura 19: Evaluación de la CIM de *S. aureus*



En el año 2006, Roser Vila y Salvador Cañigüeral realizaron el estudio del aceite esencial del árbol *Melaleuca alternifolia* obtenido de las hojas y ramas tiernas; donde el globulol, uno de los compuestos mayoritarios de *P. caerulea*, también se encuentra presente en el aceite esencial de *M. alternifolia*. Dicho aceite mostró tener actividad antibacteriana frente a: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*,

Micrococcus sp. *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y también presentó actividad antifúngica sobre *Candida albicans*.

En Machala-El Oro (Ecuador), fue desarrollado un trabajo que lleva por título: “Elaboración de una crema a partir de un extracto vegetal con acción antimicrobiana de dos plantas medicinales de mayor consumo en la provincia de El Oro 2014”. Una de las plantas utilizadas fue *Eucalyptus globulus* conocido comúnmente como Eucalipto, el contenido del aceite esencial estaba compuesto principalmente por monoterpenos (α y β -pineno, d-limoneno, ρ -cimeno, α -felandreno, canfeno y γ -terpineno), sesquiterpenos (aromadendreno, aloaromadendreno, globulol, epiglobulol, eucaliptona, ledol, macrocarpalos, H, I, J y viridiflorol) y demás compuestos minoritarios (aldehído y cetonas). En los ensayos microbiológicos realizados con la crema ya elaborada, obtuvieron resultados negativos para la presencia de bacterias en el agar (Agar Saboraud) con un periodo de incubación de 24 horas y resultados negativos para la presencia de hongos en el agar con un periodo de incubación de 48 horas (Ajila, 2014).

La fitoquímica y actividad biológica del género *Nectandra*, perteneciente a la familia Lauraceae, fue estudiado en 2015, encontrándose en el aceite una composición química que incluye sesquiterpenos, monoterpenos, y fenilpropanos; mientras que la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial se estudió contra cinco cepas bacterianas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) usando el método de difusión en disco. El aceite esencial para todas las pruebas fue ligeramente eficaz contra la mayor parte de bacterias probadas, a excepción de *B. subtilis* (Macías y col., 2015).

Otro de los compuestos mayoritarios de *P. caerulea* fue Nerolidol; éste compuesto también fue encontrado en el aceite esencial de las hojas de *Melaleuca leucadendron* venezolano en una Investigación de la Universidad Nacional Experimental del Táchira-Venezuela. El aceite esencial de las hojas de *M. leucadendron*, fue extraído por hidrodestilación y analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). Éste aceite resultó biológicamente activo contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Los

principales compuestos presentes en este aceite fueron: 1,8-cineol (38%), nerolidol (29%), alloaromadendreno (14%) y α -terpineol (13%), quienes son materia prima en las industrias farmacéuticas, cosmetológicas y de perfumes (González de Colmenares, 1998).

Por otra parte, el β -cariofileno que se encontró en 9,59% en *P. caerulea*, también ha sido reportado en otros estudios, como el llevado a cabo en el año 2007 donde se determinó que dicho compuesto es encontrado en el aceite esencial de *Origanum majorana* L., conocida popularmente como mejorana, muy utilizada en la gastronomía y medicina natural. En este estudio también se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp.*, utilizando concentraciones del aceite esencial entre 100, 50 y 25% (v/v) en cultivos de bacterias durante 24 horas en agar de soya Triptona (TSA) para todas las pruebas; la actividad del aceite fue moderada con el método de difusión, donde *Escherichia coli* presentó el mayor diámetro de inhibición (23mm), seguido por *Staphylococcus aureus* (16mm) y *Pseudomonas sp.* (14 mm) (Meza y col., 2007).

El β -cariofileno también forma parte de la composición química del aceite esencial del romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Fue evaluada la actividad antibacteriana *in vitro* de cada uno frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella tiphymurium* por el método de difusión en agar. La cepa de *Staphylococcus aureus* resultó ser el microorganismo más sensible (Coy y Acosta, 2013).

El trabajo llevado a cabo por Scora y Scora (2000) evaluó el aceite esencial de nueve especies del género *Persea* fue estudiado empleando CG-EM; los taxones analizados incluyen: *P. schiedeana*, *P. primatogena*, *P. americana* var. *floccosa*, *P. americana* var. *steyermarkii*, *P. americana* var. *nubigena*, *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* var. *guatemalensis*, *P. americana* var. *americana* y el quimiotipo, "aguacate de anís." Como resultado, obtuvieron que el aceite esencial está constituido por más de 90 componentes, de los cuales 76 fueron identificados. En la tabla 12 se aprecia cada especie con los componentes químicos principales.

Tabla 12: Componentes Químicos de nueve especies del género *Persea*

Especie Botánica	Compuestos Principales
<i>P. schiedeana</i>	α -pineno (23,7%), β -pineno (23,2%) y β -cariofileno
<i>P. americana var. floccosa</i>	α -pineno (10,9%), β -pineno (20,6%), α -terpineol (9,6%), β -cariofileno (12,6%), viridiflorene (0,1%) y globulol (0,1%)
<i>P. americana var. steyermarii</i>	α -pineno (7,6%), β -pineno (10,4%), α -terpineol (7,9%), β -cariofileno (8,4%), viridiflorene (10,3%) y globulol (9,2%)
<i>P. americana var. nubigena</i>	α -terpineol (18,4%) y metilchavicol (12,4%)
<i>P. americana var. drymifolia</i>	α -terpineol (39,3%) y metilchavicol (40,2%)
<i>P. americana var. guatemalensis</i>	β -cariofileno (38,3%)
<i>P. americana var. Americana</i>	α -pineno (27,5%), β -pineno (40,9%), α -pineno (24,6%), β -cariofileno (20,7%) y germacene D (10,1%)
<i>P. primatogena</i>	chavicol de metilo (13,9%) y (E) - anetol (67,0%)
Quimiotipo "aguacate de anis"	chavicol de metilo (13,9%) y (E) - anetol (67,0%)

Fuente: Scora y Scora, (2000).

Para el caso de *P. caerulea*, presenta dentro de los compuestos mayoritarios identificados al globulol con 21,60 por ciento y el β -cariofileno con 9,59 por ciento, siendo estos compuestos parte del aceite esencial de las especies del género *Persea* señaladas en la tabla 12.

VI. CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Este proyecto de investigación de la especie *P. caerulea*, es el primero que se ha llevado a cabo en Mérida-Venezuela, al evaluar la actividad antibacteriana de su aceite esencial.
- El aceite esencial de la especie botánica *P. caerulea* obtenido por la técnica de hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger tuvo un rendimiento de 0,037 por ciento.
- Mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, se pudo conocer la composición química del aceite esencial, donde sus compuestos mayoritarios fueron: globulol con 21,60 por ciento seguido de nerolidol y β -cariofileno con 18,99 y 9,59 por ciento respectivamente.
- El aceite esencial de *P. caerulea* mostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* presentando un halo de inhibición de 9 mm y una concentración mínima inhibitoria de 0,947 g/mL.
- Se considera que el aceite esencial de *P. caerulea* posee un pequeño índice de efectividad frente a agentes bacterianos según los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

VI.1. RECOMENDACIONES

- Realizar el proceso de hidrodestilación de forma completa contando con todos los materiales básicos para la misma y, así obtener un mejor rendimiento del aceite esencial de las hojas de la planta *P. caerulea*.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria en la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*, puesto que en el ensayo realizado se presentaron dificultades al contar con un bajo volumen de aceite esencial.

www.bdigital.ula.ve

VII. BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Adeyemi O., Okpo S., y Ogunti, O. (2002). *Analgesic and Anti-inflammatory Effects of the Aqueous Extract of Leaves of Persea americana Mill (Lauraceae)*. *Fitoterapia*, 73 (5), 375-380.
- Ajila, L. (2014). *Elaboración De Una Crema a Partir de un Extracto Vegetal con Acción Antimicrobiana de dos Plantas Medicinales de Mayor Consumo en la Provincia de El Oro 2014*. *Revista de Investigaciones Farmacognósticas Flora Panameña*. 70 (4), 839-883.
- Albarracín, G., y Gallo, S. (2003). *Comparación de dos Métodos de Extracción de Aceite Esencial Utilizando Piper aduncum (cordoncillo) Procedente de la Zona Cafetera. (Línea de Profundización Tecnología en Alimentos)*. Colombia: Universidad Nacional.
- Allemann, D., Andres, R., Borquin, D. y Clerc, J. (1989). *Computer-Aided GC/MS Analysis of Essential Oils in Complex Vegetable Drugs for Quality Control*. *Planta Médica*. 55 (7), 633.
- Arango, G. (2010). *Compuestos Derivados del Ácido Shikimico*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica.
- Arévalo, Y., Robledo, S., Muñoz, D., Granados, D., Cuca, L., y Delgado, G. (2009). *Evaluación in vitro de la Actividad de Aceites Esenciales de Plantas Colombianas sobre Leishmania braziliensis*. *Rev. Colomb. Cienc. Quim farm.* 38 (2), 131-141.
- Aristeguieta, L., (1973). *Familias y Géneros de los Árboles de Venezuela. Facultad de Ciencias-Escuela de Biología*. Universidad Central de Venezuela: Edición especial del Instituto Botánico.
- Arraiza, M. (2001). *Open Course Ware*. Universidad Politécnica de Madrid: Departamento de Ingeniería Forestal.
- Assane, M., Diop, P., Niang, S., Lopez, S., Gueye, P., y Charlevna, A. (2001). *Study of the Anti-icteric and Hepatoprotective Activity of Persea gratissima Gaertner (Lauraceae) Sedes*. *Dakar medical*, 46 (2), 89-93.
- Bernardi, L., (1962). *Lauraceae*. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Forestales, Mérida, Venezuela.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., y Morse, S., (2008). *Microbiología Médica*. México: El Manual Moderno.
- Bruneton, J., (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza, España: Acribia.

- Bruneton, J., (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Zaragoza, España: Editorial Acriba.
- Ceroni, A. (2002). *Datos Etnobotánicas del Poblado de Huaylingas. Cuenca la gallega. Morropon. Piura*. Ecología Aplicada. 1 (001) ,65-70.
- Chanderbali, A., Werff, H. y Renner, S. (2001). *Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes*. Ann. Missouri Bot. Gard, 88, 104-134.
- Chang, S., Chen, P., y Chang, S. (2001). *Antibacterial Activity of Leaf Essential Oils and their Constituents from Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of ethnopharmacology*, 77 (1), 123-127.
- Coy, C. y Acosta, G. (2013). *Actividad Antibacteriana y Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales de Romero (Rosmarinus officinalis), Tomillo (Thymus vulgaris) y Cúrcuma (Curcuma longa) de Colombia*. Revista Cubana de Plantas Medicinales 18 (2), 237-246.
- Cuca, L., Aristizabal, F., y Alvarez, Juan. (2011). *Actividad Citotóxica de Extractos Etanólicos de Especies del Caribe Colombiano*. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 18, 145.
- Cuca, L., Mendoza, D., Álvarez, J., Macías, V. y Coy, E. (2012). *Actividad Acaricida de Extractos de Lauraceae sobre los Ácaros Intradomiciliarios Dermatophagoides farinae y Blomia tropicalis*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 17 (4), 308-319.
- Cuca, L., y Álvarez, J. (2011). *Actividad Antifúngica del Aceite Esencial de Persea caerulea*. Vitae 18 (2), 43.
- Domínguez, X., (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa.
- Ferrer, H. (2012). *Aportes al Conocimiento Taxonómico del Género Persea (Lauraceae) en Venezuela*. 39 (3), 435-478.
- Forbes, B. y Sahm, D., (2004). *Diagnostico Microbiológico*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Gennaro, A., (2003). *Remington Farmacia (Tomo 1)*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- González de Colmenares, Nélica (1998). *Fitoconstituyentes y Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de la Hoja de Melaleuca Leucadendron de Venezuela*. Ciencias, Revista Científica de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, Maracaibo – Venezuela 6 (2), 123 – 128.
- Harris, D. (1992). *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial REVERTÉ. Tercera Edición. Barcelona-España.

- Hoyos, J. (1994). *Frutales en Venezuela*. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas.
- Korolkovas, A., (1978). *Compendio Esencial de Química Farmacéutica*. España: Reverté.
- Kuklinski, C., (2000). *Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural*. Barcelona: Omega.
- Lincoln, T., y Zeiger, E., (2006). *Fisiología Vegetal*. México: Universitat Jaume.
- Macías, V., Cuca, L., y Coy, E. (2015). *Genus Nectandra: "Phytochemistry and Biological Activity"*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 14 (4), 317 – 342.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, A., (2001). *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica.
- Martínez, A., (2003). *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín.
- Meza, M., González, N. y Usubillaga, A. (2007). *Composición del Aceite Esencial de Origanum majorana L. Extraído por Diferentes Técnicas y su Actividad Biológica*. Rev. Fac. Agron. LUZ 24. 725-738.
- Ojewole, J., Amabeoku, G. (2006). *Anticonvulsant Effect of Persea americana Mill (Lauraceae) (Avocado) Leaf Aqueous Extract in Mice*. Phytotherapy research, 20 (8), 696-700.
- Ortuño, M. (2006). *Manual Práctico de Aceites Esenciales Aromas y Perfumes*. (1era edición). 24: copyright Aiyama.
- Prescott, L., Harley, J. Y Klein, D., (1999). *Microbiología*. Madrid: Mc Graw-Hill-Interamericana.
- Quer, F., (1962). *Plantas Medicinales El Dioscórides Renovado*. Barcelona: Labor.
- Ramaswami, S., Briscese, P., Gargiullo, R. y Von Geldern, T. (1988). **Sesquiterpene Hydrocarbons: from Mass Confusion to Orderly Line-Up**. Flavors and Fragrances: A World Perspective. Amsterdam, 951-980.
- Rincón, C., (2014). *Actividad Biológica de la Familia Lauraceae*. (Tesis Magister en Ciencia-Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá, Colombia.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., y Real, S., (2012). *Procedimientos para la Extracción de Aceites Esenciales en Plantas Aromáticas*. Primera edición en español.

- Romero, R., (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. México: Medica Panamericana.
- Ryman, D., (1995). *Aromaterapia: Enciclopedia de las Plantas Aromáticas y de sus Aceites Esenciales*. Barcelona: Kairós.
- Sacchetti, G. (2006). *Essential Oil of Wild Ocotea quixos (lam.) Kosterm. (Lauraceae) Leaves from Amazonian Ecuador*. Flavour and Fragrance Journal, 21, 674-676.
- Schlemper, S., Schlemper, V., da Silva, D., Cordeiro, F., Cruz, A., Oliveira, A., y Cechinel, F. (2001). *Antibacterial Activity of Persea cordata Stem Barks*. Fitoterapia, 72 (1), 73-75.
- Scora, R. y Scora, P. (2000). *Essential Oils of Persea subgenus Persea (Lauraceae)*. Journal of Essential Oil Reserarch 12. 709-713.
- Setzer, W., Stokes, S., Penton, A., Takaku, S., Haber, W., Hansell, E., Caffrey, C., y Mc Kerrow, J. (2007). *Cruzain Inhibitory Activity of Leaf Essential Oils of Neotropical Lauraceae and Essential Oil Components*. Natural product communications. 2 (12), 1203-1210.
- Skoog, D., Holler, F. y Crouch, S., (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. México: Cengage learning.
- Skoog, D., Holler, J. y Nieman, T., (2010). *Principios de Análisis Instrumental*. 5^{ta} edición. Editorial:Mc Graw Hill.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C., (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Valarezo, E., (2008). *Aceites Esenciales: Generalidades, Extracción, Caracterización y Usos*. Coja, Ecuador: Instituto de Química Aplicada Universidad Técnica Particular.
- Valcárcel, M. y Gómez, A. (1998). *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial REVERTÉ. Barcelona- España.
- Vila, R. y Cañigual, S. (2006). *El Aceite Esencial de Malaleuca alternifolia en el Tratamiento de la Vulvovaginitis*. Revista de Fitoterapia 6 (2), 119-128.