



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolas Usubillaga del Hierro”



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE
ANACARDIUM OCCIDENTALE (ANACARDIACEAE) RECOLECTADA EN
EL ESTADO TÁCHIRA**

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

Autor:

Duque Escobar Nahirith Alejandra

Tutor:

Dr. Luis B. Rojas F.

Mérida, Enero de 2020.

DEDICATORIA

A Doña Alejandra, por usted y para usted, abuela mis logros siempre tendrán su huella.

A mis padres, José y Nancy, porque han sido pilares fundamentales, mi motor, y mi fortaleza. Me han dado el amor, apoyo y el mejor ejemplo de vida y de profesionalismo. Por ustedes he llegado a ser quien soy, me siento orgullosa de ustedes, espero devolverles tanta entrega y dedicación con satisfacciones.

Dios me bendijo con ustedes, Javier, José, Karina y Yusmely, mis hermanos, los amo, los admiro y respeto. Porque han estado incondicionalmente para mí, acompañándome y dándome soporte en cada momento.

A mis tres mosqueteros, Carlos Javier, Matías José y Javier Alejandro. Mis sobrinos amados, sepan que esto va también por ustedes, ustedes me dieron la alegría y fortaleza de continuar, me llena de orgullo ser su tía. ¡Los Amo!

A Dionny David, por el amor y la paciencia, por entenderme, apoyarme y por impulsarme a alcanzar mis sueños y ser cada día mejor, vamos por más logros juntos.

A mis amigos, Karla, José Gregorio, Vilnest, Lueidy y Génesis, por acompañarme en esta grandiosa travesía y tenderme la mano en los momentos difíciles, ustedes hicieron más fácil el camino.

A mi familia Duque y Escobar, porque su amor y sus oraciones permitieron que este sueño se consolide, por su acompañamiento en este recorrido, siempre están en mi corazón.

A las familias Valero Criollo, Belandria Arellano, Amaya Pérez y a las “Marías”, gracias a ustedes por siempre brindarme su cariño, sus atenciones y por siempre creer y confiar.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen de la Consolación, por bendecirme, darme salud e iluminarme para alcanzar esta meta tan anhelada.

A la Universidad de Los Andes, mi casa de estudios, y a todos los docentes que me han formado, porque la consolidación de todos los conocimientos adquiridos se evidencia en este trabajo de investigación. Mil veces gracias.

Al Prof. Luis Rojas, mi Tutor, quién hizo posible que esta investigación se llevara a cabo, un profesional grandioso y ejemplar, que además de brindarme su conocimiento me brindó apoyo y orientación durante el proceso investigativo. Eternamente agradecida.

A los profesores Yndra Cordero, Alida Pérez y Diolimar Buitrago, por su dedicación, orientación y aportes a la investigación que permitieron la mejora de la misma.

A la Universidad Nacional Experimental del Táchira y a la Dra. Sulay Zapata por su colaboración y apoyo para la obtención de la muestra vegetal requerida para el desarrollo de esta investigación.

A mi madre, mi mayor ejemplo a seguir, gracias por los consejos y por la orientación, nada hubiese sido igual sin su apoyo.

www.bdigital.ula.ve

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-------------|
| RESUMEN | xii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I. EL PROBLEMA | 3 |
| Planteamiento del problema | 3 |
| Justificación de la investigación | 5 |
| Objetivos de la investigación | 6 |
| <i>Objetivo general</i> | 6 |
| <i>Objetivos específicos</i> | 7 |
| Alcances y limitaciones de la investigación | 7 |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO | 8 |
| Trabajos previos | 8 |
| Antecedentes históricos | 14 |
| Bases teóricas | 15 |
| Familia Anacardiaceae | 15 |
| Características botánicas de la familia Anacardiaceae | 15 |
| Características de la familia Anacardiaceae | 16 |
| Géneros y especies más importantes de la familia Anacardiaceae | 16 |
| Especie <i>Anacardium occidentale</i> | 17 |
| Clasificación taxonómica del <i>Anacardium occidentale</i> | 19 |
| Ficha botánica del <i>Anacardium occidentale</i> | 19 |
| Propiedades biológicas del <i>Anacardium occidentale</i> | 20 |
| Aceites esenciales | 20 |
| Métodos de obtención de aceites esenciales | 21 |
| Hidrodestilación | 22 |
| Método de inyección de vapor de agua | 22 |
| Destilación por arrastre de vapor | 22 |
| Métodos mecánicos (expresión) | 22 |

| | |
|---|----|
| Extracción con disolventes orgánicos apolares | 23 |
| Extracción con grasas | 23 |
| Extracción con gases licuados | 23 |
| Métodos de identificación de los aceites esenciales | 24 |
| Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 24 |
| Índices de retención | 25 |
| Cálculos de los índices de Kovats | 26 |
| Bacterias | 27 |
| Bacterias en estudio | 27 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 28 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 28 |
| <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 30 |
| Antibióticos | 30 |
| Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular | 31 |
| Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas | 31 |
| Antibióticos que inhiben la integridad de la membrana | 31 |
| Resistencia bacteriana | 32 |
| Actividad antibacteriana | 33 |
| Pruebas de susceptibilidad | 33 |
| Concentración mínima inhibitoria | 34 |
| Método de difusión de disco en agar | 34 |
| Método de dilución | 34 |
| Plantas medicinales | 35 |
| Fitoterapia | 35 |
| Productos naturales vegetales | 36 |
| Terpenos | 36 |
| Monoterpenos | 37 |

| | |
|--|----|
| Sesquiterpenos | 37 |
| Fenilpropanos | 38 |
| VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN | 39 |
| Sistema de hipótesis | 40 |
| Hipótesis alternativa | 40 |
| Hipótesis nula | 40 |
| CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO | 41 |
| Tipo de investigación | 41 |
| Diseño de la investigación | 41 |
| Población y muestra | 41 |
| Sistema de variables | 42 |
| Técnicas y procedimientos de la investigación | 42 |
| <i>Recolección de la planta y preparación previa del material vegetal</i> | 42 |
| <i>Obtención del aceite esencial</i> | 43 |
| <i>Análisis de identificación del aceite esencial</i> | 44 |
| <i>Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial</i> | 44 |
| <i>Microorganismos de ensayo</i> | 44 |
| <i>Preparación de inóculos</i> | 45 |
| <i>Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar</i> | 45 |
| <i>Preparación de las placas e inoculación</i> | 46 |
| <i>Colocación de los discos impregnados</i> | 46 |
| <i>Preincubación e incubación</i> | 46 |
| <i>Lectura de las pruebas</i> | 46 |
| <i>Concentración mínima inhibitoria</i> | 47 |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| Resultados | 48 |
| Obtención del aceite esencial | 48 |
| Análisis de identificación del aceite esencial | 48 |

| | |
|---|----|
| Evaluación de la actividad antibacteriana | 51 |
| Discusión | 53 |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 58 |
| Conclusiones | 58 |
| Recomendaciones | 60 |
| REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS | 61 |

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla N° 1. Actividad biológica de algunas especies de la familia Anacardiaceae | 17 |
| Tabla N° 2. Componentes químicos presentes en el <i>Anacardium occidentale</i> | 20 |
| Tabla N° 3. Operacionalización de las variables | 39 |
| Tabla N° 4. Composición química del aceite esencial del <i>Anacardium occidentale</i> | 49 |
| Tabla N° 5. Características organolépticas, físicas y químicas obtenidas del aceite esencial del <i>Anacardium occidentale</i> | 51 |
| Tabla N° 6. Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas | 52 |
| Tabla N° 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial del <i>Anacardium occidentale</i> frente a cepas ATCC | 53 |
| Tabla N° 8. Comparación de resultados de la actividad antibacteriana del <i>Anacardium occidentale</i> | 57 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Gráfico N° 1. Clasificación de los compuestos hallados en el aceite esencial del <i>Anacardium occidentale</i> | 50 |
| Gráfico N° 2. Componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial del <i>Anacardium occidentale</i> | 50 |

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura N° 1. Detalles de la especie <i>Anacardium occidentale</i> | 18 |
| Figura N° 2. Diagrama de la pared bacteriana | 27 |
| Figura N° 3. Mecanismos de acción y de resistencia antibiótica | 31 |
| Figura N° 4. Estructura química del limoneno y bisaboleno | 37 |
| Figura N° 5. Estructura química del ácido caféico | 38 |
| Figura N° 6. Pesaje de las hojas frescas de <i>Anacardium occidentale</i> | 43 |
| Figura N° 7. Licuadora industrial METVISA | 43 |
| Figura N° 8. Hidrodestilación | 43 |
| Figura N° 9. Cromatógrafo de gases, Hewlett-Packard | 44 |
| Figura N° 10. Estructuras químicas componentes del aceite esencial del <i>Anacardium occidentale</i> | 49 |

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CATEDRA COMPONENTE DE LA INVESTIGACION
DR. JOSE RAFAEL LUNA



Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) recolectada en el estado Táchira.

Autora:

Duque Escobar Nahirith Alejandra

Tutor:

Prof. Luis Rojas

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos ha incrementado considerablemente por diversos factores como el consumo inadecuado e irracional de los fármacos, dado a la escasa producción de nuevos agentes antibacterianos se ha desarrollado una amplia investigación en las plantas medicinales, por cuanto representan actualmente una posibilidad de obtener de ella productos con actividad antibacteriana. El objetivo de esta investigación fue confirmar la actividad antibacteriana de aceites de *Anacardium occidentale* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite esencial se obtuvo mediante hidrodestilación y se identificó su composición a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), se identificó el 99 % de los componentes presentes en el aceite esencial, resultado como componentes mayoritarios el δ -3-carene (79,73 %), seguido por el α -terpinoleno (7,87 %). La actividad antibacteriana se evaluó empleando el método de difusión del disco en agar, el estudio reveló que las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 resultaron sensibles a la acción del aceite esencial del *Anacardium occidentale*, mientras que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 presentó resistencia a la acción del aceite esencial ensayado.

Palabras claves: resistencia bacteriana, actividad antibacteriana, *Anacardium occidentale*.

INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento de los antibióticos se ha transformado la historia del tratamiento de las infecciones, posibilitando a través de la terapéutica la erradicación de ciertas patologías. Esto sin duda ha incidido en la mejora de la salud de la población; y al mismo tiempo en el comportamiento de los antibióticos frente a las bacterias (Acuña,2003).

Diversos factores ecológicos, sociales, económicos, culturales, han incidido a favor de que numerosas cepas bacterias presenten resistencia a los antibióticos; entre estos se pueden mencionar: los cambios ecológicos en cuanto al empleo de tierras para la agricultura, desarrollo tecnológico e industrial, el uso inadecuado e irracional de los antibióticos tanto en humanos como en animales, la inexistencia en las farmacias de los antibióticos prescritos, lo que imposibilita que se realice el tratamiento completo y adecuadamente o que se sustituya inoportunamente por otro, el alto costo de los antibióticos que también incide en que no consuma la cantidad prescrita; y aunado a todo eso la gran capacidad que poseen las bacterias y microbios para adaptarse a diferentes ambientes (Becerra, Plascencia, Luévanos, Domínguez y Hernández, 2009).

Es relevante tomar en cuenta que en la actualidad hay una tendencia en la población a confiar sus afecciones primarias de salud en la medicina natural, la cual se basa en el uso de plantas medicinales, que poseen entre sus compuestos principios activos con actividad farmacológica capaz de eliminar o atenuar síntomas de malestar en el organismo, por lo cual se ha incrementado el interés del estudio de estas plantas (Cañigual, Dellacassa y Bandoni, 2003).

Las plantas medicinales entre otras actividades farmacológicas pueden poseer actividad antibacteriana, de esta manera se ha revelado el gran potencial que representan para extraer de ellas agentes anti-infectivos lo cual constituye una

alternativa terapéutica frente a las cepas bacterianas en la actualidad que presentan múltiples resistencias a antibióticos (Cañigual, Dellacassa y Bandoni, 2003).

El presente estudio confirmó la actividad antibacteriana del aceite de *Anacardium occidentale* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Siendo el *Anacardium occidentale* una planta medicinal a la cual se le ha atribuido diferentes propiedades biológicas comprobadas mediante métodos científicos, por lo cual se realizó esta investigación, determinando que entre sus propiedades biológicas se encuentra la actividad antibacteriana.

En este escrito se muestra en el primer capítulo, denominado el problema, contenido de los objetivos de la investigación, la justificación y la delimitación del problema. El segundo capítulo expone algunos antecedentes de la investigación y elementos teóricos. El tercer capítulo recoge los métodos que se utilizarán en la investigación; por otra parte el capítulo cuarto abarca los resultados y discusiones y finalmente el capítulo quinto en el cual se encuentran las conclusiones y recomendaciones obtenidas en la investigación.

CAPITULO I

Planteamiento del Problema

El problema

La actividad antibacteriana está dada por la capacidad que tiene un agente de inhibir o eliminar el crecimiento de un microorganismo, siendo ese agente un fármaco o una droga en específico (antibiótico), el cual puede ser producido de forma natural o sintética (Pedraza y Castellanos, 2009). La era de los antibióticos se inicia con el descubrimiento de la Penicilina, en 1928 cuando Alexander Fleming obtuvo dicho antimicrobiano a partir del moho *Penicillium notatum*, lo cual marca un amplio avance en el campo de la medicina pues permitió la erradicación de enfermedades infecciosas muy graves como la sífilis, la gonorrea y el tétanos.

A pesar de ello, otros microorganismos presentaron resistencia natural a ciertos antibióticos, dado por la variación de la ecología de los microorganismos además de otras causas; dentro de ellos se puede mencionar el caso de *Staphylococcus aureus*, microorganismo que presentó resistencia a la penicilina posterior a la antibióticoterapia con este antibacteriano. Al igual que el *S. aureus* diversas bacterias han presentado resistencia bacteriana a ciertos antibióticos, convirtiéndose en un problema de salud pública reemergente de gran preponderancia, el cual ha ido acrecentándose (Patiño, 2003).

Al respecto, la Organización Mundial de la Salud, (OMS) en el año 2015 aseguró que la resistencia a los antibióticos constituye en la actualidad una de las mayores amenazas a nivel mundial así como también testifica que es cada vez mayor el número de infecciones que se vuelven más difíciles de tratar debido a la ineficacia actual de los antibióticos que se solían utilizar para su tratamiento. Esta organización afirma que la resistencia a los antibióticos es un fenómeno evolutivo natural, aunque el uso indebido de antibióticos lo incrementa.

La resistencia presentada por las bacterias a los antibióticos es un fenómeno mediante el cual un agente bacteriano pierde su efecto frente a las bacterias donde anteriormente ejercía su función (Yaguana, 2015). Concretamente la resistencia bacteriana frente a los antibióticos se considera un problema multicausal y complejo, así lo indican Quizphe y cols. (2014), dado entre otras cosas por la alta prevalencia de enfermedades infecciosas, ausencia de controles de calidad, venta libre de medicamentos en las tiendas y farmacias así como también el uso inadecuado de los antibióticos en el sector agropecuario.

Es importante tomar en cuenta estos factores que ya han sido estudiados por los autores, y además se deben sumar otros, dados por la situación país; como lo es la escases de medicamentos que induce al consumo inadecuado de los mismos, al consumo de dosis incorrectas de antibióticos, entre otros, generando resistencia bacteriana y a su vez dificultando el tratamiento de las patologías pudiendo así propagarse las infecciones y constituyendo un problema de salud pública mayor.(Becerra y cols., 2009).

El hombre en su evolución ha recurrido a las plantas de manera empírica con el fin de obtener alivio a sus enfermedades. Por ello la ciencia reconociendo sus propiedades impulsa serias investigaciones al respecto; sin duda el uso de antibióticos derivados de las plantas, constituye una problemática de interés investigativa desde las diversas áreas de salud (Castañeda y cols., 2008).

Las plantas medicinales han sido utilizadas por diferentes culturas como una alternativa terapéutica, a pesar de ello no todas han sido estudiadas con una base científica. Muchas propiedades terapéuticas o medicinales han sido atribuidas a diferentes plantas empíricamente, las cuales se deben evaluar para ser aceptadas como medicamentos por medio de métodos científicos y así determinar tanto la toxicidad como las propiedades terapéuticas que posean sus principios activos.(Castañeda y cols., 2008).

El uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la medicina tradicional, así lo expone la OMS la cual desempeña un papel importante en la asistencia sanitaria de las atenciones primarias de la salud. Además se describen

aplicaciones en la medicina como fuente de agentes terapéuticos directos, como materia prima para la síntesis de compuestos semisintéticos más complejos. Expone Akerele, (1993), que diversos medicamentos se elaboran a partir de plantas medicinales o de sus principios activos como lo son la morfina (analgésico), reserpina (antihipertensivo), entre otros.

Es por esto que la ciencia se ha interesado en el estudio de las plantas, al observar que gran número de éstas poseen principios activos con actividades farmacológicas las cuales tienen la capacidad de aliviar o atenuar síntomas de malestar en el organismo. En ciertos casos las plantas han presentado actividad antibacteriana y ante la presencia de un gran número de cepas bacterianas antibiótico resistentes actualmente, dichas plantas representan un gran potencial para la obtención de agentes anti infectivos (Akerele, 1993). Este interés lleva a plantear la presente investigación, dirigida al estudio de la actividad antibacteriana del aceite de la planta *Anacardium occidentale* en cepas bacterianas.

Por lo que en esta investigación se formula el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana del aceite de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) frente a cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas?

Justificación de la investigación

Durante el siglo XVIII se creía que todas las infecciones bacterianas eran tratables puesto que existían ya los antimicrobianos creados para ese fin, sin embargo esa idea fue revocada con la aparición de bacterias capaces de resistirse al efecto de los agentes antimicrobianos (Becerra y cols., 2009).

La aparición de dichos microorganismos resistentes y, aunado a ello factores como el alto costo de los antimicrobianos, han incidido en la redirección de la terapéutica de las afecciones de salud hacia la medicina natural, siendo ésta caracterizada por el empleo de recursos netamente naturales como lo son las plantas medicinales (Rojas, Silva, Sansó y Alonso,2013).

Si bien la medicina natural o tradicional tuvo sus inicios ancestralmente, en la actualidad su práctica ha tenido un realce por lo anteriormente señalado, es por ello que amerita ser valorado y estudiado con una base científica que sustente dichos conocimientos, y permita mejorar la eficacia en el tratamiento de las infecciones; considerando que podría constituir un aporte relevante en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Rojas y cols., 2013).

Esta investigación confirmó la actividad antibacteriana presente en el aceite esencial del *Anacardium occidentale*; se justifica en tanto se requiere el estudio sobre la posibilidad de obtención de agentes antimicrobianos a partir de las plantas medicinales en particular del *Anacardium occidentale* con respaldo científico, y de esta manera contribuir con esta necesidad en la población mundial.

Por otra parte, se utilizaron diversos métodos como lo son la obtención del aceite esencial a través del método de hidrodestilación y la identificación y análisis de los componentes del aceite mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite con el uso del método de difusión del disco; métodos que sirven de guía para futuras investigaciones en esta área, y también se llegó a algunas conclusiones sobre el desarrollo del estudio que aportan información importante sobre el *Anacardium occidentale* y su actividad antibacteriana.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Confirmar la actividad antibacteriana del aceite de *Anacardium occidentale* frente a bacterias de referencia internacional como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Objetivos Específicos

- Extraer el aceite esencial del *Anacardium occidentale* mediante hidrodestilación.
- Identificar los componentes del aceite del *Anacardium occidentale* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Comprobar la actividad antibacteriana del aceite obtenido mediante el método difusión del disco en agar.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial.

Alcances y limitaciones de la investigación

Esta investigación se propuso como alcance confirmar la actividad antibacteriana del aceite de *Anacardium occidentale* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se recolectaron hojas de árboles de *Anacardium occidentale* ubicados en el jardín botánico de la UNET, estado Táchira.

Entre las limitaciones de esta investigación se encontró el contexto, puesto que la recolección de las hojas de la planta en estudio fue limitada, siendo tomada una muestra de hojas del árbol de *Anacardium occidentale* ubicado en el municipio San Cristóbal, estado Táchira, Venezuela. Asimismo representó una limitación el costo de los insumos que se requieren para el desarrollo del estudio, de igual manera su disponibilidad en el mercado, lo que imposibilitó a su vez el estudio de los extractos obtenidos de la planta.

CAPITULO II

Marco Teórico

Trabajos previos

El estudio sobre el *Anacardium occidentale* ha permitido precisar de manera científica las diversas propiedades biológicas y medicinales que se han obtenido a partir del mismo. En este capítulo, se muestran diversos estudios realizados a nivel nacional e internacional que hicieron posible la comprensión de las características de composición y bioactividad que presenta el *Anacardium occidentale* en sus extractos y aceite esencial obtenido a partir del pseudofruto, fruto, nuez, corteza, flores y hojas. Posteriormente se presentan algunos antecedentes históricos y bases teóricas que contribuyen en el discernimiento necesario para desarrollar el proceso investigativo.

Pallo (2017) realizó el estudio titulado: Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de la cáscara del Marañón (*Anacardium occidentale*) sobre cepas de *Streptococcus mutans* con la finalidad de comparar el efecto inhibitorio del extracto de la cáscara del marañón sobre cepas de *Streptococcus mutans*. La metodología empleada en dicha investigación fue la obtención del extracto mediante el método hidroalcohólico, empleo de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC, y el efecto inhibitorio se investigó a través del método difusión del disco en agar, agregando a dichos discos las sustancias en estudio (extracto de marañón al 40 y 80 %), también fueron empleados como control positivo el gluconato de clorhexidina al 0,12 % y como control negativo suero fisiológico y se tomaron en cuenta las condiciones óptimas para el microorganismo en estudio (anaerobiosis). Los resultados obtenidos por el autor fueron: En orden decreciente el halo de inhibición de 7,08 mm producido por el gluconato de clorhexidina, seguidamente se encuentra el derivado del extracto de marañón al 80 % con una media de 6,17 mm, y el extracto al 40 % con una media de 4,17 mm. Lo que indica que el extracto del marañón presenta un efecto inhibitorio frente a cepas ATCC de *S. mutans* en sus diferentes concentraciones. El presente

estudio es tomado en consideración en esta investigación por cuanto sirve de sustento para el desarrollo de la misma, aportando información importante sobre la planta en estudio (*Anacardium occidentale*).

Da Silva, Amado, Amaral, Fernandes, Brandao, Monteiro y Meireles (2016): ejecutaron el trabajo de investigación denominado: Actividad antimicrobiana y antioxidante de flores de *Anacardium occidentale* L. comparada con los extractos de la corteza y hojas, cuyo objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos obtenidos de partes aéreas de la planta en comparación con el extracto preparado con las flores. La metodología empleada fue: Obtención por separado de extractos etanólicos de hojas, corteza del tallo y flores, mientras que la actividad antimicrobiana fue evaluada a través de los métodos de difusión en agar y dilución en caldo, además los autores determinaron concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas contra: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella choleraesuis*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. La actividad antioxidante se evaluó a partir de los extractos y en función de la capacidad secuestrante del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, además se emplearon métodos colorimétricos y cromatográficos para la determinación del perfil fitoquímico. Los resultados obtenidos indican que todos los extractos ensayados exhibieron tanto actividad antimicrobiana como actividad antioxidante, siendo el más efectivo el extracto de flores al inhibir el crecimiento de todos los microorganismos probados. Además se identificaron ácidos anacárdicos, gálicos, compuestos fenólicos, triterpenos, flavonas y xantonas en todos los extractos obtenidos. Concluyeron que los extractos de *A. occidentale* son ricos en metabolitos bioactivos con un potente efecto antioxidante y antimicrobiano, sobre todo el extracto de flores, lo que constituye a su vez un potencial biotecnológico de *A. occidentale* como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana de amplio espectro y antioxidante para su uso en la industria de alimentos y cosméticos. El presente trabajo se toma en consideración por aportar información de gran relevancia en cuanto a las

propiedades que posee la planta en estudio, sobre los componentes químicos de la misma y sirve para hacer futuras comparaciones con los resultados de la investigación en curso.

Jesumoronti, Oderilo, Oluwafemi y Olagbadegun (2015) realizaron la investigación Variación en los componentes de aceites esenciales de las hojas de *Anacardium occidentale* que se encuentran en Ondo, en el suroeste de Nigeria. El objetivo de dicho estudio fue la identificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de las variaciones en la composición de las hojas de *A. occidentale* halladas en Ondo. El aceite fue obtenido mediante destilación con trampa de clewenger. El análisis de CG-EM del aceite esencial de las hojas frescas de *Anacardium occidentale* de Nigeria detectó sesenta componentes dentro de éstos los componentes principales fueron β -cariofileno (17.36 %), α -copano (13.50 %), germacreno D. (10.67 %), germacreno B (9.93 %) y gamma-cadineno (8.17 %). Siendo uno de los primeros estudios en reportar la presencia del germacreno en el aceite esencial del *Anacardium occidentale*. Esta investigación es considerada como trabajo previo puesto que constituye uno de los pocos estudios que aporta información sobre la composición del aceite esencial de las hojas de la planta en estudio.

Aguilar, Soto, Saavedra, Hermosilla y Martínez, (2012) realizaron el estudio: Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón) con el objetivo de determinar los metabolitos secundarios y la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. Los métodos utilizados fueron: obtención inicial del extracto fluido y la tintura al 20 % a partir del polvo de las hojas de *Anacardium occidentale* L.. Se realizó tamizaje fitoquímico y pruebas de calidad de las preparaciones farmacéuticas. Se determinó la actividad antibacteriana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella entérica*, *Shigella* sp.) de tres diluciones del extracto seco (50, 100 y 200 mg/mL) de la tintura al 20 % y de los extractos hexánico, clorofórmico y acetato de etilo, con posterior caracterización fitoquímica. Se obtuvo que en el extracto fluido y en la tintura al 20 % se detectaron cumarinas y otros

metabolitos como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos. El índice de refracción, la densidad, el pH y los sólidos totales mostraron resultados similares para el extracto fluido y la tintura al 20 %. Además, para estos indicadores no se encontraron diferencias significativas seis meses después. El extracto seco mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, con los mayores halos de inhibición para la dilución de 200 mg/mL. Asimismo, el extracto de acetato de etilo indicó el menor crecimiento de esta bacteria patógena, según los halos de inhibición. En los extractos, clorofórmico y acetato de etilo, se determinaron cumarinas y azúcares reductores. Concluyendo que en el extracto fluido y la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* se detectaron mayormente cumarinas y su calidad no se afectó durante seis meses. Los extractos hexánico, clorofórmico y acetato de etilo mostraron actividad estafilocócica *in vitro*. Es considerada esta investigación pues aporta información sobre actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos obtenidos de la planta en estudio con dicha propiedad, además de proporcionar otros componentes de interés encontrados en la planta.

Ponce, (2011) realizó el estudio: Actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*. Estudio realizado con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite de la cáscara de la nuez del *A. occidentale* a partir de distintas concentraciones (al 100, 60, 50, 40 y 30 %) sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* (cepas ATCC y cepas aisladas de muestras de pacientes). La siembra, cultivo y recolección del fruto fue llevada a cabo en la ciudad de Iquitos (Loreto- Perú), la extracción del aceite se realizó mediante la técnica sólido-líquido o Soxhlet, el diluyente del aceite fue el Hidróxido de Sodio al 0.1 N, y el control positivo la Clorhexidina al 0,12 %. El aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* en todas las concentraciones utilizadas presentó acción antibacteriana mediante el método de difusión *in vitro*, sobre ambos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* y tuvo mejor actividad antibacteriana que la Clorhexidina al 0,12 % ($p > 0,05$). No se pudo encontrar diferencias significativas en la acción antibacteriana del aceite a las diversas

concentraciones en ambos tipos de cepa, y las cepas de procedencia clínica fueron estadísticamente más sensibles que las cepas ATCC. Esta investigación es considerada puesto que aporta información de gran relevancia en cuanto a la actividad antibacteriana que posee la planta frente al microorganismo *Streptococcus mutans* y las diferentes concentraciones en las que fue empleado, así como también las técnicas empleadas para la extracción de los aceites.

Lafont, Páez, y Portacio, (2011), desarrollaron un estudio titulado: Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (almendra) del marañón (*Anacardium occidentale L.*), con el objeto de evaluar diferentes métodos de extracción de aceite de la semilla del marañón y la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas, la investigación consistió en el empleo de diversos mecanismos para la obtención del aceite con el fin de determinar el mecanismo más eficiente, los mecanismos empleados fueron: proceso de extracción mecánica o prensado, y extracción con solventes en dos modalidades, inmersión e inmersión-percolación. Los investigadores obtuvieron que el mecanismo que mostró más eficiencia fue el inmersión-percolación empleando como solvente el hexano, además observaron que el aceite obtenido por este método posee buenas características organolépticas y propiedades fisicoquímicas de relevancia, dentro de las que se puede mencionar la presencia de ácidos grasos de tipo esteárico, palmítico, linoleico y oleico (omega 9), sugiere la posible utilización del mismo en la industria alimenticia. Este estudio se toma en consideración en la presente investigación por cuanto presta información relevante en cuanto a la composición fisicoquímica del aceite esencial del *Anacardium occidentale*.

Tello, (2011) efectuó el trabajo de investigación: Acción antimicrobiana del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Estudio *in vitro* con el objetivo de establecer la actividad antifúngica del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y la actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* empleando para ellos cepas ATCC y como controles positivos la Nistatina para *C. albicans* y Clorhexidina al 2 % para *S. aureus*. La metodología empleada para la obtención-extracción del aceite fue el

método de presión, y para evaluar la actividad antimicrobiana el método seleccionado fue el método de difusión en disco, realizaron diluciones al 25, 50 y 100 % usando como solvente el Hidróxido de Sodio 0,1 N que a su vez fue utilizado como control negativo. Los resultados de dicha investigación indican la inexistencia de actividad antifúngica del aceite frente a *C. albicans*, pero la presencia de una actividad antibacteriana marcada sobre *S. aureus* tanto en cepas clínicas como en cepas ATCC.

Dzamic, Gbolade, Ristic y Marín (2009) realizaron un estudio denominado: Composición del aceite esencial del *Anacardium occidentale* en Nigeria, siendo su objetivo la identificación de la composición del aceite esencial de las hojas del *A. occidentale*, estudio que relevó los componentes presentes en el aceite esencial, indicando que en su mayoría los componentes corresponden a monoterpenos (62,6%) y sesquiterpenos (31,1 %), además en el estudio identificaron componentes no terpenoides (5,2 %). El componente que predominó en el aceite fue el β -felandreno con un 42,7 %, consecuentemente el β -Cariofileno con un 4,4 %, el α -Pino con un 4,3 % y el Germacren D en un 4,0 %. Los autores lograron la identificación del 98,5 % del total de la muestra y el estudio les permitió observar la diferencia en la composición del aceite esencial obtenido de las hojas en comparación con otros estudios en los cuales se había obtenido el aceite a partir de flores y fruto del *Anacardium occidentale*. Este trabajo es relevante para esta investigación por cuanto servirá para el análisis y comparación de los resultados en relación con la composición del aceite esencial.

Los estudios anteriormente descritos demuestran las diversas propiedades que están presentes en el *Anacardium occidentale*L., lo que favorece el desarrollo de la presente investigación por cuanto permite discernir entre los métodos y técnicas empleados, así como las diferencias en la composición de la planta con el paso del tiempo y con las diferentes condiciones a las que se han realizado los distintos estudios.

ANTECEDENTES HISTORICOS

La investigación sobre la resistencia a los antibióticos tuvo su primicia tiempo después de la invención de la penicilina durante la segunda guerra mundial, ante la aparición de mecanismos de evasión frente a los antibióticos expresados por parte de los microorganismos como mecanismo de supervivencia (Organización Mundial de la Salud, 2001)

La Organización Mundial de la Salud, indica en su tratado “Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos” del año 2001, que la resistencia bacteriana constituye una problemática antigua reconocida en sus inicios como una amenaza a la eficacia del tratamiento y que posteriormente pareció resolverse con la aparición de nuevos antimicrobianos, no obstante en la actualidad las bacterias han desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos y es por ello que constituye actualmente uno de los más alarmantes problemas de salud pública, en cuanto surge la necesidad de incrementar la investigación con la finalidad de combatir las infecciones ocasionadas por microorganismos resistentes a antimicrobianos.

Antes de la creación de los antibióticos, la población atravesó varios cambios en sus creencias en relación al origen de las enfermedades y por consiguiente el remedio para su curación, una de las principales alternativas yacía en emplear plantas a las cuales se le otorgaban efectos medicinales-curativos tal como indica Rojas, y cols., (2013).

Por otra parte, Domínguez, (1973) acota que las plantas tienen un papel de gran importancia para el hombre por su participación e interacción en los ciclos biológicos así como por las propiedades que ofrece, ya sea curación o intoxicación. El presente trabajo de investigación se aboca a determinar una de las muchas propiedades biológicas presentes en las plantas como es la actividad antibacteriana, con la finalidad de hallar una alternativa para tratar las enfermedades infecciosas causadas por bacterias resistentes a antibacterianos.

BASES TEÓRICAS

Familia Anacardiaceae

Es una familia que abarca aproximadamente 600 especies y alrededor de 80 géneros, los cuales se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, frecuentemente en las zonas tropicales, aunque pueden observarse también pero en menor proporción en zonas templadas (Martínez y Ceballos, 2005).

Debido a su amplia distribución a nivel mundial, las plantas pertenecientes a la familia Anacardiaceae representa un importante registro fósil, así como también se reconoce la gran significancia que tiene dicha familia en el ámbito maderero e industrial internacionalmente, conforman árboles de muy buena calidad y resistentes a la pudrición (Pell, 2004).

Características botánicas de la familia Anacardiaceae

La familia Anacardiaceae es reconocida mundialmente puesto que muchos de los géneros y especies que la constituyen brindan además de semillas y frutos comestibles, componentes con propiedades medicinales, cualidad que le aporta mayor relevancia internacionalmente (Pell, 2004).

Las especies pertenecientes a la familia Anacardiaceae se caracterizan por ser mayormente árboles, que en cuanto a sus frutos presentan una amplia diversidad, mientras que una de las características principales de dicha familia es la presencia de canales resiníferos. La mayoría de los géneros presentes en la familia Anacardiaceae producen frutos drupáceos, aunque presentan diversas variaciones propias de su género, así como de los requerimientos geográficos, nutricionales, entre otros (Pell, 2004).

Además presentan hojas que pueden ser simples o compuestas según sea el caso, así como flores perfectas o imperfectas, es relevante destacar que se ha descrito que en las especies pertenecientes a la familia Anacardiaceae se encuentran presentes compuestos como taninos, resinas o látex que son de carácter tóxicos y/o irritantes (Juárez y Novara, 2012).

Características de la familia Anacardiaceae

Es una familia principalmente tropical y subtropical; en América se encuentran 25 de sus géneros y aproximadamente 125 especies, según lo describe (Cabrera, 2005); de árboles, arbustos y raramente lianas, normalmente de hojas alternas y con frecuencia pinnado-compuestas, aunque también se dan las hojas simples. Las flores son regulares y bisexuales, pero en ocasiones son unisexuales, perfectas o imperfectas, actinomorfas, pequeñas; dispuestas en panículas, a menudo muy largas. Estas poseen típicamente 5 sépalos unidos, 5 pétalos libres y de 5 a 10 estambres insertados en un disco carnosos. El fruto es generalmente una drupa, pudiendo ser igualmente una nuez o una sámara (Cabrera, 2005).

Esta familia es conocida por poseer compuestos fenólicos los cuales han sido descritos en irritaciones de la piel, así como también es común encontrar en las plantas pertenecientes a la familia de las Anacardiaceas terpenos, politerpenos y taninos (Tello, 2011). Además las plantas pertenecientes a esta familia, en su mayoría producen resinas que además de ser descritos como causantes de dermatitis son también responsables de conferirle aroma y sabor característico a las partes jóvenes de dichas plantas (Juárez y Novora, 2012).

Diferentes plantas de la familia Anacardiaceae se encuentran distribuidas generosamente por todo el territorio venezolano según estudios realizados por (León, 2003), muchas de ellas incluyendo el género *Anacardium*.

Géneros y especies más importantes de la familia Anacardiaceae

Dentro de los géneros y especies más relevantes de esta familia se pueden mencionar mangos (*Mangifera indica* L. y otras especies), pistachos (*Pistacia vera* L.), anacardos (*Anacardium occidentale* L.) y granos de pimienta rosa (*Schinus terebinthifolia* L.) (Pell, 2004), los cuales son representativos de un gran valor económico debido a que producen frutos comestibles, así mismo otras especies de la familia Anacardiaceae son empleadas de manera ornamental y/o industrial (Juárez y

Novara, 2012). En la tabla N° 1 se describen algunas de las especies pertenecientes a la familia Anacardiaceae y las actividades biológicas que se le atribuyen.

Tabla N° 1. Actividad biológica de algunas especies de la familia Anacardiaceae

| Planta | Actividad Biológica |
|--------------------------------------|---|
| <i>Spondias mombin</i> L. | Actividad antidermatofítica y antimicrobiana |
| <i>Mangifera indica</i> L. | Actividad antiinflamatoria y analgésica, disminución del grado de fenómenos oxidantes |
| <i>Schinus terebithifolius</i> raddi | Actividad antimicrobiana |

Fuente: Elaboración propia a partir de Pell, (2004).

La familia Anacardiaceae abarca dentro de sus géneros al género *Anacardium*, el cual se encuentra constituido por alrededor de 11 especies, donde la especie *Anacardium occidentale* es la mayormente conocida y estudiada, seguida por la especie *Anacardium humile* (conocida popularmente como caju o cajui de campo) y *Anacardium nana* (Cardoso, Ré-Poppi, Coelho, Yasunaka y Schleder, 2010).

Especie Anacardium occidentale

El *Anacardium occidentale* (mercy) es un árbol pequeño que puede alcanzar una altura máxima de 10 metros, no presenta mayores requerimientos en cuanto a la lluvia y presenta sensibilidad a bajas temperaturas por cuanto se considera un árbol tropical (Hoyos, 1994).

Así mismo, describe el autor que el Mercy posee una corteza externa grisácea e interna blancuzca, ramas de color gris claro y una copa de forma irregular y tupida. También describe sus hojas oblongo-obovadas de color verde-amarillento, tienen un tamaño promedio de 12 cm de largo por 5 cm de ancho; mientras que las flores suelen tener un mayor tamaño, son generalmente rosa-amarillento, se disponen en panículas terminales.

El merey posee un fruto que es considerado doble, integrado por una baya falsa originada del pedúnculo de la flor y por la nuez que constituye el fruto verdadero y que procede del gineceo y contiene la única semilla (Roth,1974).

El pseudofruto es drupáceo de 3 cm de diámetro por 3,5 cm de largo, posee forma reniforme y su color puede variar entre el rojo y amarillo dependiendo de si es joven o envejecido (Cabrera, 2005). Éste es comestible, jugoso, de sabor ácido y astringente (Hoyos, 1994).

La nuez o semilla se encuentra sobre un tallo engrosado el cual constituye lo que se conoce como el falso fruto, tiene forma arrañonada mide de 1,5 a 2 cm de ancho por 1,5 a 3 cm de largo, dicha variación depende de la fertilidad de los suelos; La semilla entre otras cosas es rica en aceite y almidones (Cabrera, 2005).

Crece preferiblemente a temperaturas entre 24 y 30°C, en Colombia y Venezuela se encuentra en altitudes entre los 300 a 1000 msnm y se reproduce generalmente por semillas aunque en estado de cultivo se propaga por injerto; existen sembradíos silvestres en el estado Bolívar, Anzoátegui y Monagas donde se utiliza como una industria casera en la producción de turrón, mazapán (Valera, 2012).

Además se ha atribuido a ésta planta diversas propiedades medicinales entre las cuales resaltan el uso del jugo como antidiarreico, el aceite de la semilla para eliminación de verrugas y la decocción de la corteza como antidiabético entre otros (Vit, 2003). En la figura N° 1 se muestran detalles de las características de las hojas, flor, fruto y pseudofruto de la especie *A. occidentale*.



Figura N° 1 Detalles de la especie *Anacardium occidentale*

Clasificación taxonómica del Anacardium occidentale

- Reino: *Plantae*.
- División: Magnoliophyta.
- Clase: Magnoliopsida.
- Orden: Sapindales.
- Familia: Anacardiaceae.
- Género: *Anacardium*.
- Especie: *Anacardium occidentale*.

Ficha botánica de Anacardium occidentale

Según Vit, (2003).

- Especie: *Anacardium occidentale L.*
- Familia: Anacardiaceae.
- Nombres comunes: Cajueiro (Brasil), cashew (USA), marañón (Costa Rica, Ecuador, Perú), merey (Colombia, Venezuela).
- Hábito: Árbol.
- Floración: En los meses de Junio a Julio.

A continuación en la tabla N° 2 se muestra a manera de resumen algunos de los componentes que se han hallado al estudiar diversas partes del *Anacardium occidentale*.

Tabla N° 2. Componentes químicos presentes en el *Anacardium occidentale*.

| Componentes químicos presentes en el <i>Anacardium occidentale</i> | |
|---|---|
| Parte del <i>A. occidentale</i> | Componente observado |
| <i>Hojas</i> | Ácidos fenólicos, gálicos, p-hidroxibenzóico y cinámico |
| | α -pineno |
| | Flavonoides (levoepicatequina) |
| <i>Cáscara del tronco</i> | Taninos, flavonoides |
| <i>Corteza del tronco</i> | Compuestos aromáticos como ácido anacárdico, cardol y anacardol; taninos y polifenoles. |
| <i>Fruto</i> | Ácido anacárdico, cardol, taninos, ácido gálico |
| <i>Semilla</i> | Globulina “Anacardeína” |

Fuente: Elaboración propia a partir de Cabrera, 2005.

Propiedades biológicas presentes en el *Anacardium occidentale*

Diversas propiedades biológicas han sido adjudicadas al Merey como es conocido popularmente el *Anacardium occidentale*, dentro de las más relevantes se pueden mencionar, propiedad antihipertensiva, antiinflamatoria, capacidad de inhibición de la formación de granulomas, propiedad bactericida, antibacteriana, antipirética y propiedad hipoglicemiante (Cabrera, 2005).

Además cabe destacar que otras propiedades biológicas han sido descritas por el empleo empírico de las diferentes plantas en remedios caseros, tales como, jugo del pseudofruto para controlar la tos y aftas, propiedad antidiarreica de la corteza hervida, y uso de su capacidad corrosiva para el tratamiento de verrugas (Cabrera,2005).

Aceites esenciales

Son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica. Se encuentran generalmente formando mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos,

alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 2003).

Dichos componentes se denominan según Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, (2008) como metabolitos secundarios, los cuales a pesar de no ser esenciales para llevar a cabo los procesos fisiológicos del organismo que los sintetiza, son generalmente bioactivos. Con la ayuda de pruebas químicas de caracterización como lo es la fitoquímica se procede a la identificación de los diferentes metabolitos. La presencia de los compuestos en los aceites esenciales obtenidos puede verse modificado por factores como la época de recolección de la planta, el contexto geográfico y modificaciones genéticas, tal como lo exponen (Martínez y cols., 2008).

Existe una clasificación según el origen biosintético de los componentes químicos presentes en los aceites esenciales descrita por los autores Claus y Tyler, (1965) quienes los clasifican como derivados terpénicos que se forman por la ruta del acetato-ácido mevalónico y derivados aromáticos que se forman por la ruta del ácido siquímico-fenilpropanoide.

www.bdigital.ula.ve

Métodos de obtención de aceites esenciales

Diversos métodos de destilación se emplean industrialmente para la obtención de aceites esenciales o volátiles a partir de las plantas, la selección entre los mismos dependerá de las condiciones que posea el material vegetal, Claus y Tyler (1965) describen los siguientes métodos: Destilación con agua, destilación con agua y vapor de agua, destilación directa con vapor de agua, hidrólisis enzimática de los glicósidos, método de la escudilla, método de enfleurage, extracción con disolventes, destilación destructiva.

Otros autores como Kuklinski, (2009) plantean otra clasificación dicotómica en concordancia con lo establecido en la farmacopea, siendo métodos oficiales, los que abarcan la destilación por arrastre de vapor y los métodos mecánicos (expresión) y, métodos no oficiales, que incluyen extracción con disolventes orgánicos, extracción con grasas (enflorado, digestión y método neumático) y extracción con gases licuados.

Hidrodestilación

Técnica que según Kuklinski (2009) es utilizada generalmente en material vegetal que no se ve alterado por la ebullición, en este caso la sustancia en estudio y el agua se ponen en contacto y son llevados a ebullición hasta que el agua convertida en vapor de agua arrastre toda la materia volátil (aceite y agua) consigo hasta que se condensen en la cámara condensadora, posteriormente se recolecta en un recipiente para luego ser separados el agua y el aceite.

Método de inyección de vapor de agua

Empleado principalmente en aquellos casos en que el material vegetal, seco o fresco sufre alteraciones por la ebullición, por ende el vapor de agua se genera en otra parte y llega por una tubería hasta el recipiente que contiene el material vegetal Claus y Tyler, (1965). El material vegetal y el agua no se encuentran en contacto en principio, puesto que la corriente de vapor de agua es la que arrastra los aceites esenciales que posteriormente se condensan junto con el agua y se recolectan, dicha mezcla se puede separar dado que forman dos fases (Kuklinski, 2009).

Destilación por arrastre de vapor

Martínez, (2003) indica que la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se encierra en una cámara inerte y es sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas así como también se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

Métodos mecánicos (expresión)

Claus y Tyler, (1965) indican que es una técnica empleada debido a que ciertos aceites esenciales o volátiles no pueden destilarse sin que se descompongan, aplicada mayormente en frutos, este método consiste en hacer que los aceites esenciales salgan

de las cavidades donde se encuentran mediante la expresión, puede ser también por punción o rallado de la corteza del fruto y la corriente de agua arrastre el zumo del fruto, por decantación se procede a la separación de los aceites esenciales del agua (Kuklinski, 2009).

Extracción con disolventes orgánicos apolares

Método que según Kuklinski, (2009) emplea disolventes orgánicos apolares de bajo punto de ebullición como el diclorometano y el hexano, con la finalidad de obtener aceites esenciales menos volátiles provenientes de material vegetal de peso molecular elevado. Con dicho procedimiento no solo se obtienen aceites esenciales, por lo que es necesario realizar una purificación posterior de los extractos obtenidos.

Extracción con grasas

Ciertos materiales frescos presentan muy bajas cantidades de aceites volátiles por lo que se dificulta su obtención por los métodos convencionales, es por ello que se emplea un procedimiento que Kuklinski (2009) y Claus y Tyler, (1965) describen como la transferencia de los aceites esencial obtenidos del material vegetal a una sustancia grasa, inodora y blanda. Dentro de este principio metodológico se encuentra el enfleurage, la digestión de la droga vegetal en grasa fundida y el método neumático.

Extracción con gases licuados

Método de obtención de aceites esenciales a partir de muestras vegetales que emplea condiciones especiales como elevada presión y baja temperatura así como el uso de gases como el butano, propano y dióxido de carbono. Estas condiciones se emplean para que el gas se mantenga en estado sólido, el presente método es señalado por Kuklinski, (2009) como poco agresivo frente al material vegetal y muy selectivo.

Métodos de identificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden ser identificados a través del uso de diversas metodologías empleadas para ello, dentro de los cuales se pueden destacar, Cromatografía de gases, espectrometría de masas, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cálculo de Índices de Kovats.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Gutiérrez y Droguet, (2002) describen que la cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, da lugar a una técnica que permite la separación e identificación de mezclas complejas. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles (Gutiérrez y Droguet, 2002).

El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía

de gases capilar, que es el caso más habitual. En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Las sustancias idóneas para emplear la Cromatografía de gases-Espectrometría de masas son aquellos que posean inmerso en sí moléculas en concentraciones desde ppb o ppm y que tengan temperatura, peso molecular o polaridad de bajo a mediano (Stashenko y Martínez, 2010).

Índices de Retención

“La retención de los analitos en una columna es función de sus presiones de vapor y de las fuerzas intermoleculares que gobiernan sus relaciones con la fase estacionaria” (Stashenko y Martínez, 2010).

Los índices de retención, son parámetros empleados puesto que permiten la identificación definitiva de los compuestos presentes en una mezcla, está dada por la correlación directa entre los parámetros cromatográficos y los parámetros espectroscópicos tanto de las sustancias problema como de las sustancias patrones (Stashenko y Martínez, 2009).

Cálculo de los índices de Kovats

Se basan en la medición de tiempos de retención relativos con respecto a una serie homóloga de n-parafinas, separadas isotérmicamente y corridas bajo las mismas condiciones experimentales que las de la muestra (Stashenko y Martínez, 2010).

Los KI (índices isotérmicos) se calculan con base en la siguiente fórmula:

$$KI = 100n + 100 \frac{\log t_{Rx} - \log t_{Rn}}{\log t_{RN} - \log t_{Rn}}$$

Siendo **n** el número de átomos de carbono en la n-parafina que eluye antes del compuesto de interés (su tiempo de retención es **tRx**) y **tRn** y **tRN** son tiempos de retención de las n-parafinas con los números de átomos de carbono n y N, respectivamente, que eluyen inmediatamente antes y después del analito de interés (Stashenko y Martínez, 2010).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen mediante fisión binaria, pertenecen al grupo de los procariotas, siendo una de sus características la presencia de ADN dispuesto de manera circular y cerrado, sin membrana nuclear; poseen pared celular la cual está constituida por péptidoglicano y algunas varias según el grupo bacteriano (Pérez y Mota, 2008).

Según su forma pueden clasificarse en tres grupos, cocos, bacilos y espirilos, dicha forma se puede observar microscópicamente (debido a su tamaño que va de 0,5 -3 μm) mediante el uso de tinciones. La tinción o coloración más empleada puesto que permite la diferenciación entre bacterias no solo de acuerdo a su forma sino también según la afinidad con los colorantes empleados, es la tinción Gram; sin embargo existen otras tinciones como lo son Ziehl Neelsen, Azul de metileno, entre otras (Pérez y Mota, 2008).

La tinción de Gram se fundamenta en el empleo de un colorante primario (cristal violeta), un mordiente (lugol), decoloración (alcohol acetona) y un colorante

secundario (safranina), la diferencia en la respuesta de las bacterias a dicha tinciones la existente en la pared celular de las mismas, siendo grampositivas aquellas que se observen color azul violeta y gramnegativas aquellas que se observen color rosado (Pérez y Mota, 2008).

La pared celular de las bacterias grampositivas está constituida por una capa gruesa de péptidoglicano, la cual retiene el colorante cristal violeta; mientras que en las bacterias gramnegativas la pared celular está conformada por membrana celular, espacio periplásmico con una capa fina de péptidoglicano y una membrana externa contentiva de lipopolisacáridos (LPS) constituidos por el lípido A, por el polisacárido central o core y por la cadena lateral O, en este caso al poseer una capa delgada de péptidoglicano no se retiene el colorante primario y con la acción de la decoloración es eliminado, por lo que la estructura bacteriana adquiere la tinción del colorante secundario (Pérez y Mota, 2008).

A continuación en la figura N° 2 se muestra un diagrama que permite identificar las características de mayor relevancia en la pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas.

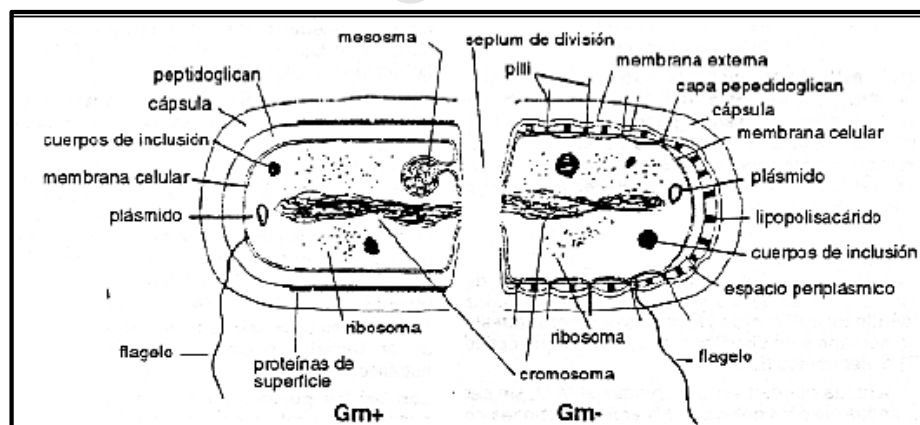


Figura N° 2.Diagrama de la pared bacteriana. Grampositiva a la derecha y gramnegativa a la izquierda (Pérez y Mota, 2008).

Bacterias en estudio

Staphylococcus aureus

Es uno de los microorganismos con mayor importancia dentro del género *Staphylococcus*, se trata de bacterias esféricas grampositivas que suelen disponerse en

forma de racimos; se caracterizan por un crecimiento rápido, producción de hemólisis y parte su patogenicidad se ve relacionada estrechamente a la capacidad de producir toxinas extracelulares (Brooks, Carrol, Butel, Morse y Mietzner, 2011).

Es capaz de producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria (Zaraza, 2012).

Enterococcus faecalis

Existen alrededor de 12 especies constituyentes del género *Enterococcus*, siendo *E. faecalis* y *E. faecium* los patógenos más frecuentes, a pesar de formar parte de la microbiota habitual se ha descrito infecciones por dicho microorganismo, vinculándose a infecciones intrahospitalarias. Cabe destacar que *E. faecalis* posee resistencia intrínseca a la penicilina, aztreonam y cefalosporinas (Brooks y cols., 2011).

Son clasificados como cocos grampositivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos y la mayoría aglutinan con anticuerpos específicos para el grupo D de Lancefield. El reservorio de mayor preponderancia es el hombre en un 80%, se describe que dicha bacteria realiza diseminación de persona a persona. A pesar que forma parte de la microbiota habitual podría llegar a causar patogenicidad dependiendo de varios factores dentro de los que se encuentra presencia de comorbilidad, y someterse a transplantes, entre otros (Ortega, 2010).

Pseudomonas aeruginosa

Bacteria perteneciente al género *Acinetobacter*, con acción patógena invasiva y toxigénica en el ser humano, siendo capaz de afectar a personas con algún compromiso de base o inmunosupresión, siendo común el hallazgo a nivel

intrahospitalario. Se trata de una bacteria anaerobia obligado y que en cuanto a la terapéutica debe ser tratada adecuadamente, puesto que el uso de un solo agente antibacteriano suele resultar ineficaz, fenómeno explicada por la capacidad de ejercer mecanismos de resistencia frente a los antibacterianos. (Brooks y cols., 2011)

Según Zaraza, (2012) esta bacteria pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gramnegativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina; al igual que otras pseudomonas fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono.

Puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis (Zaraza, 2012).

Escherichia coli

Perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, y por ello posee las características principales de este grupo, tales como su forma bacilar, se observa gramnegativo en tinción, se encuentran dentro de la microbiota habitual y en ciertas ocasiones se encuentra actuando como patógeno (Brooks y cols., 2011). La especie *Escherichia coli* constituye una de las especies mayormente aisladas en los laboratorios clínicos, capaz de ocasionar infecciones leves así como septicemias (Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckenberger y Woods, 2008).

Es una de las especies bacterianas más estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Zaraza, 2012).

Klebsiella pneumoniae

Al igual que la especie *Escherichia coli*, forma parte de la familia Enterobacteriaceae, cursa con ciertas características específicas que permiten su identificación a nivel de laboratorio, como lo es crecimiento mucoso, presencia de cápsula de polisacárido de gran tamaño, positividad para la prueba de citrato de Simons y negatividad para la motilidad (Brooks y cols., 2011).

Klebsiella pneumoniae fue descrita por Carl Friedlander como agente causal de neumonías graves, por ello denominado antiguamente como “Bacilo de Friedlander”, con respecto a la distribución de dicha bacteria se documenta que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, así como en el tracto digestivo de animales y humanos (Koneman y cols., 2008)

Esta bacteria gramnegativa asimila y fermenta la lactosa, esto se puede observar en el agar MacConkey donde las colonias son de color rosado y en el medio Kligler fermenta la glucosa y lactosa además de producir gas. Además es un conocido patógeno que afecta primordialmente a individuos inmunosuprimidos y en particular a los recién nacidos hospitalizados en unidades neonatales (Hoyos, Rivera, Hoyos, Mesa y Alfaro, 2007).

Antibióticos

La quimioterapia antimicrobiana tiene sus inicios como ciencia en el siglo XX, y para el año 1950 aproximadamente se centran las investigaciones en aquellas sustancias de origen microbiano llamados antibióticos, siendo una de las características primordiales en éstos la modificación sintética de los fármacos (Brooks y cols., 2011).

Los antibióticos son coadyuvantes del sistema inmune siempre y cuando se usen adecuadamente, de lo contrario el mal uso de los antibióticos propicia un agente causal resistente (Sánchez, 2013)

Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a la tinción gram de las bacterias en antibióticos contra grampositivos y antibióticos contra gramnegativos; se pueden clasificar también según el efecto de su acción en bacteriostáticos y bactericidas;

además son clasificados según su estructura química en antibióticos betalactámicos, cefalosporinas e inhibidores de betalactamasas, y además pueden ser clasificados según su mecanismo de acción (Brugueras y Morejón, 1998). A continuación se presenta la clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Las bacterias, como se mencionó anteriormente poseen una pared celular constituida por péptidoglicano entre otros compuestos, a través de la inhibición de la síntesis de dicha pared celular se logra cumplir un efecto que en la mayoría de los casos es bactericida. Dentro de los antibióticos que emplean éste mecanismo de acción se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, fosfomicina, tercoplanina y bacitracina (Patiño,2003).

Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

Las bacterias sintetizan proteínas mediante los ribosomas, estructuras presentes en las células bacterianas; los antibióticos pertenecientes a esta clasificación actúan inhibiendo dicha síntesis, lo cual resulta en la imposibilidad de supervivencia de los microorganismos (Patiño, 2003). Asimismo es relevante mencionar que es contraproducente la asociación de antibióticos que actúen sobre la inhibición de síntesis de proteínas ya que los mismos actúan por competitividad al sitio de unión (Brugueras y Morejón, 1998).

Antibióticos que inhiben la integridad de la membrana

Antibióticos como las polimixinas, colistinas, nistatina y anfotericina B tienen la capacidad de inducir cambios en la membrana citoplasmática alterando así el medio intracelular bacteriano y ocasionando un efecto antimicrobiano selectivo (Patiño, 2003)

La figura N° 3 permite evidenciar de manera resumida los mecanismos de acción de los antibacterianos y los mecanismos a través de los que las bacterias crean resistencia a dichos agentes antiinfectivos.

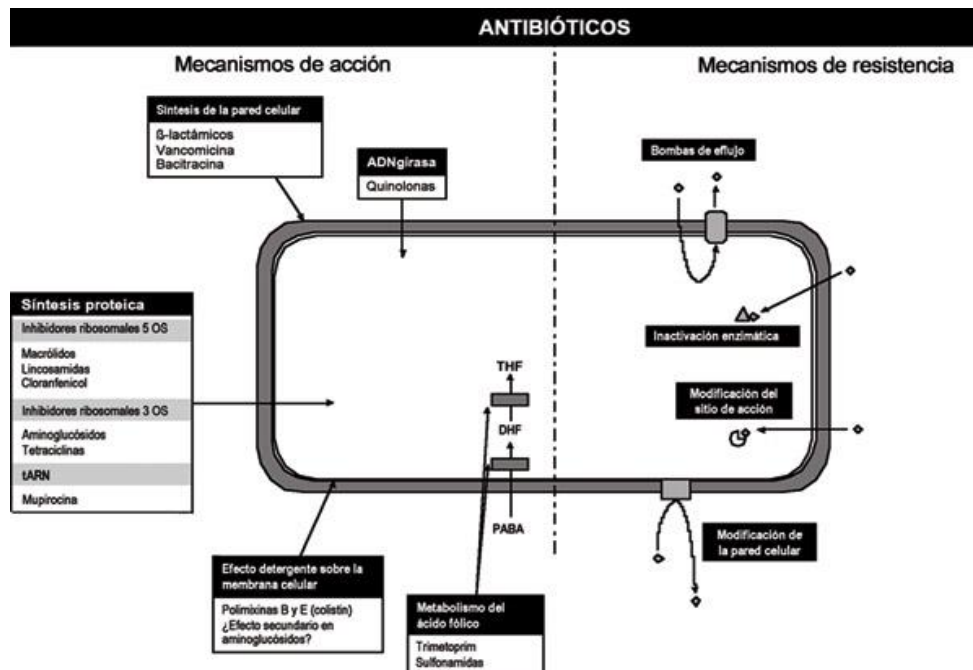


Figura N° 3. Mecanismos de acción y de resistencia antibiótica
Fuente: (Alvo, Téllez, Sedano y Fica, 2016).

www.digital.ula.ve

Resistencia bacteriana

Se denomina resistencia al proceso mediante el cual un microorganismo o bacteria es capaz de disminuir la acción de los agentes antimicrobianos, la misma puede darse por diferentes factores, la resistencia bacteriana constituye un problema clínico (Riverón, López, Ponce y Machado, 2003).

Asimismo, algunos autores afirman que la resistencia bacteriana se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más grandes del mundo por cuanto las enfermedades ocasionadas por cepas resistentes a los antibióticos causan una amplia morbilidad y mortalidad (Quizhpe y cols., 2014). Dentro de los factores relacionados con la resistencia bacteriana se pueden referir los siguientes: uso inadecuado de los antimicrobianos, alto costo de los antibióticos, y globalización y migración (Becerra y cols., 2009).

Las bacterias presentan la capacidad de resistir a los antibióticos por diversos factores, mediante la adquisición de dicha resistencia a través de mutaciones, genes

de resistencia adquiridos de otros microorganismos (conjugación, trasducción, plásmidos) y por adaptaciones metabólicas a los fármacos, denominándose Resistencia intrínseca o natural, o pueden presentar Resistencia Adaptativa a los antibióticos, mecanismo que se da por procesos mayormente fenotípicos dentro de los que se pueden mencionar: indiferencia al fármaco, persistencia o latencia, y biopelículas (Becerra y cols., 2009).

Actividad antibacteriana

Pedraza y Castellanos, (2009) la describen como la capacidad que tiene un agente de inhibir o eliminar el crecimiento de un microorganismo ante un fármaco o una droga en específico (antibiótico), el cual puede ser producido de forma natural o sintética con la finalidad de disminuir el crecimiento de bacterias y/o microorganismos o eliminarlos por completo.

Históricamente se ha conocido el empleo de sustancias naturales para el tratamiento de infecciones, dentro de ellas se encuentran alimentos y plantas con poder antiséptico (Rojas y cols., 2013). Es por esto que se han ido ampliando las investigaciones sobre dichos antimicrobianos naturales empleados tradicionalmente y en mayor proporción en zonas tropicales donde se dan con más facilidad y son usadas para la automedicación (Akerele, 1993).

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Son pruebas *in vitro* que se realizan con la finalidad de determinar una medida de la acción o eficacia de los antibióticos frente a un microorganismo, las empleadas con mayor frecuencias son las pruebas de dilución en medio de cultivo y pruebas de difusión en agar. La prueba de susceptibilidad que se empleó en esta investigación por ser uno de los recomendados por el National Commitee for Clinical Laboratory Standar (NCCLS), es la prueba de difusión de disco en agar o método de Kyrbi-Bauer, es un método cualitativo caracterizado por ser fácilmente estandarizable y se emplea en microorganismos no exigentes de crecimiento rápido (Taroco, Seija y Vignoli, 2008).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Es un método cuantitativo, que permite determinar tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la Concentración mínima bactericida (CMB), dicho método puede emplearse a través de microdiluciones o macrodiluciones en caldo o dilución en agar (Taroco y cols., 2008).

Dicho método es estandarizado por el National Commitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS) así como otros métodos, los cuales tienen en común su capacidad de obtener resultados comparables y reproducibles, así como también el empleo de microorganismos pertenecientes a cepas de control de calidad con resultados conocidos (Taroco y cols., 2008).

Método de difusión de disco en agar

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana que consiste en la difusión de discos impregnados de determinados antibióticos sobre la superficie de un agar en el cual ha sido previamente inoculada una concentración estandarizada del microorganismo en estudio, se procede a incubar por 24 horas para pasado el tiempo realizar la lectura de los resultados a la prueba también denominada antibiograma (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

La lectura se lleva a cabo a través de la medida del halo de inhibición o zona de inhibición de crecimiento del microorganismo, de tal manera que a mayor halo de inhibición mayor será la actividad del antibiótico frente al microorganismo en estudio (Murray y cols., 2009).

Método de dilución

Es un método cuantitativo que emplea cantidades escalonadas de antimicrobiano, generalmente se utilizan diluciones al doble del antibiótico a evaluar, tiene como finalidad determinar la de sustancia antibacteriana necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria inoculada. Este método puede emplearse en agar o en caldo, existiendo en la actualidad una variante realizada en placas de microdilución

que permiten el desarrollo de dicho método con mayor simplicidad (Brooks y cols., 2011).

Plantas medicinales

Son aquellas plantas que tienen la capacidad de elaborar ciertos productos denominados principios activos, dichos compuestos son los que ejercen actividad farmacológica bien sea de manera beneficiosa o perjudicial sobre el organismo por cuanto la utilidad primordial de los principios activos contenidos en las plantas medicinales es el de servir como droga o medicamento para atenuar o disminuir una enfermedad mediante la neutralización del desequilibrio orgánico que representa la enfermedad (Muñoz, 2002).

Diversos medicamentos han sido obtenidos a partir de plantas medicinales dentro de los que se pueden destacar la atropina, codeína y morfina; así como también a partir de las plantas medicinales que se usan como materia prima se pueden adquirir compuestos semisintéticos más complejos. Es por ello que las plantas medicinales son altamente valoradas, sobre todo en países en vías de desarrollo ya que disminuye la dependencia e importación de medicamentos. (Akerele, 1993)

Fitoterapia

Desde tiempos inmemoriales se han usado las plantas con finalidades curativas incluso por un tiempo fueron el único recurso del cual disponían los médicos y de allí nace el interés por profundizar los conocimientos sobre las plantas medicinales y los productos que se obtienen a partir de ellas (Avello y Cisternas, 2010).

En 1980 la fitoterapia se conceptualizaba como una terapia complementaria que utilizaba plantas o partes de ellas donde el empirismo de la medicina tradicional se transforma en fundamento científico (Avello y Cisternas, 2010). Actualmente se define como la ciencia encargada del estudio de la utilización de productos de origen vegetal bajo una finalidad terapéutica, la fitoterapia se basa en el uso de drogas vegetales que no es más que la porción específica de la planta medicinal que se utiliza en la terapéutica (Cañigüeral y Dellacasa, 2003).

Anteriormente la fitoterapia o el uso de drogas vegetales no era tan importante, pero en la actualidad esto ha cambiado, puesto que según estudios estadísticos se logra evidenciar el aumento por parte de la población en el empleo de preparados de la fitoterapia para el tratamiento de afecciones leves, ya que se ha descrito que estos productos no son aptos para para situaciones agudas o de emergencia (Carñigueral y Dellacasa, 2003).

Productos naturales vegetales

Son aquellos producidos de manera dinámica por las plantas, denominados también metabolitos, los cuales se encuentran en equilibrio entre su síntesis y degradación por lo cual se encuentran generalmente constituyendo una concentración constante dentro del sistema vegetal productor. Estos metabolitos o también llamados compuestos químicos celulares pueden ser clasificados en primarios y secundarios; clasificación basada en lo esenciales que son o no para la funcionalidad o vitalidad de la materia viva (Ringuelet y Viña, 2013).

Los metabolitos primarios son aquellos que llevan a cabo las funciones vitales, y dentro de estos se pueden mencionar los glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; por otra parte los metabolitos secundarios son aquellos que ejercen funciones sin fines estrictamente vitales pero que tienen gran importancia ya que han sido investigados históricamente por su utilidad en la empresa farmacéutica puesto que en muchos casos los metabolitos secundarios sirven como materia prima para sintetizar otros componentes de gran utilidad (Ringuelet y Viña, 2013).

Terpenos

Los terpenos de acuerdo con (García y Perez-Urria, 2009) constituyen uno de los grupos más numerosos de metabolitos secundarios, incluye derivados de los esteroides, esteroides, pigmentos carotenoides y hormonas. Los terpenos son especialmente llamativos para fines comerciales por su utilidad para conferir aromas y fragancias a diferentes productos a nivel industrial, así como son de gran interés en el campo de la salud por poseer propiedades biológicas como actividad antimicrobiana, entre otras.

Todo ello debido a su capacidad natural de oxigenación, demostrado por la presencia en estos de alcoholes, fenoles, aldehídos que son los que confieren los olores, sabores y propiedades terapéuticas característicos (Claus y Tyler, 1965).

Son sintetizados por la ruta metabólica del ácido mevalónico y son procedidos de la unión de unidades de isopreno, e indican (García y Perez-Urria, 2009) que pueden ser clasificados de acuerdo a la cantidad de isoprenos que contengan en: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y politerpenos.

Monoterpenos

Los monoterpenos se consideran uno de los principales componentes químicos presentes en los aceites esenciales constituidos por dos unidades de isoprenos, los mismos pueden ser o no oxigenados, siendo generalmente los no oxigenados los que constituyen la mayor proporción de los constituyentes de los aceites esenciales (Claus y Tyler, 1965). Además indican (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003) que representan un potencial en cuanto a su actividad biológica de defensa en aquellas plantas que los producen. Uno de los monoterpenos más conocido es el limoneno que constituye el aceite esencial del limón.

Sesquiterpenos

Son compuestos químicos derivados de la ruta del ácido mevalónico al igual que los monoterpenos, cuya diferencia es que los sesquiterpenos están constituidos por tres unidades de isoprenos. (Beyer y Walter, 1987) indican que pueden encontrarse formando sistemas cíclicos o cadenas hidrocarbonadas alifáticas abiertas, de acuerdo con ellos se clasifican en sesquiterpenos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Un ejemplo de compuesto sesquiterpeno monocíclico es el bisaboleno que se encuentra en la esencia de limones y hojas de pino. A continuación se muestran las estructuras químicas de algunos sesquiterpenos en la figura N°4.

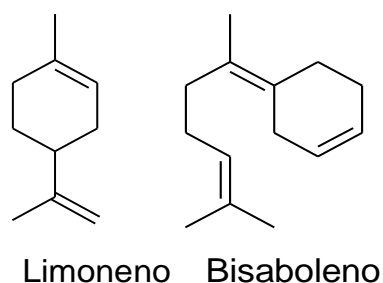


Figura N° 4. Estructura química del limoneno y bisaboleno.

Fenilpropanos

Las plantas sintetizan gran cantidad de componentes presentes en sus aceites esenciales, dentro de estos se encuentran los compuestos fenólicos, también llamados fenilpropanoides o polifenoles, biosintetizados por la ruta del ácido siquímico (García y Pérez-Urria, 2009). Por otra parte es importante resaltar que estos compuestos se caracterizan principalmente por poseer en su estructura un anillo aromático que puede tener uno o más grupos hidroxilos (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

Dentro de este grupo llamado fenilpropanoide se encuentran incluidos gran variedad de compuestos que van desde ácidos fenólicos hasta polímeros más complejos tales como los taninos y la lignina (García y Pérez-Urria, 2009). Uno de los compuestos ejemplares de los fenilpropanoides es el ácido caféico, el cual ha sido estudiado y se ha determinado que posee una importante actividad antioxidante (Sepúlveda y cols., 2003), su estructura se evidencia en la figura N°5.

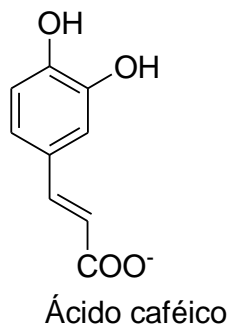


Figura N° 5. Estructura química del ácido caféico.

Variables de la investigación

Tabla N° 3. Operacionalización de las variables.

| Variables | Tipo | Definición conceptual | Definición operacional | Dimensiones | Indicadores |
|--|---------------|--|---|---|---|
| Composición química del Aceite esencial de <i>Anacardium occidentale</i> | Independiente | Fracciones líquidas volátiles, contentivos de sustancias responsables del aroma de las plantas (Martínez, 2003). | -Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. -Índice de Kovats. | -Características organolépticas -Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales tales como: monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. | * Color, olor, sabor y densidad. *Tiempo de retención y abundancia obtenida de los diferentes compuestos presentes en el aceite esencial de la planta <i>Anacardium occidentale</i> *Comparación de los espectros de masas con la base de datos Nist 05, Wiley 6ta edición. |
| Actividad antibacteriana | Dependiente | Capacidad que tiene un agente de inhibir o eliminar el crecimiento de un microorganismo ante un fármaco o una droga en específico (antibiótico), el cual puede ser producido de forma natural o sintética (Pedraza y Castellanos, 2009). | -Método de difusión de Kirby-Bauer en disco o de pozos. | Cepas Grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Cepas Gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 | -Sensible -Resistente |

Fuente: Elaboración propia. (Duque, 2018)

Sistema de hipótesis

Este estudio corresponde con una investigación confirmatoria, en este sentido se propone las posibles respuestas a la pregunta de investigación.

Hipótesis Alternativa (H_A):

Existe una relación causal entre la composición química del aceite de *Anacardium occidentale* y la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Hipótesis Nula (H₀):

No existe una relación causal entre el aceite de *Anacardium occidentale* y la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El proceso investigativo realizado, responde a un estudio confirmatorio; el cual de acuerdo con Hurtado, (2007) “...requiere de una explicación previa o una serie de supuestos o hipótesis. Su objetivo es verificar una o más hipótesis derivadas de una teoría, a partir de la experiencia directa.”.

Diseño de Investigación

Para la presente investigación se asumió el diseño experimental, debido a que se confirmó la actividad antibacteriana del aceite de *Anacardium occidentale* mediante algunos métodos con determinadas condiciones; de tal forma que se pudo observar sus reacciones o efectos frente a las cepas que se estudiaron. En este sentido, fue necesario la manipulación y control de las variables.

El diseño alude a las decisiones que se toman en cuanto al proceso de recolección de datos y de experimentación en el caso de las investigaciones confirmatorias como la que se presenta en este proyecto, que permitan a la investigadora lograr la validez interna de la investigación, es decir, tener un alto grado de confianza de que sus conclusiones no son erradas. (Hurtado, 2007).

Población y Muestra

De acuerdo con Hernández, Fernández, y Baptista, (2003) la unidad de estudio es lo primero que se debe definir, es decir sobre el qué se van a recolectar datos; en este caso fue sobre la planta *Anacardium occidentale* situada en el jardín botánico de la UNET, se dispuso para el análisis el Laboratorio del Instituto de Investigaciones de

la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Laboratorio de Investigaciones de Bioquímica General de la Universidad de Los Andes, desde enero de 2018 hasta mayo 2019.

La muestra en esta investigación corresponde con lo que plantean Hernández y cols., (2003) como muestra no probabilística; estuvo representada por las hojas del *Anacardium occidentale*.

Sistema de Variables

Hernández y cols., (2003) definen las variables como una propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse u observarse.

Entre la diversidad de variables se pueden mencionar; las variables dependientes, la cual de acuerdo con estos autores “no se manipula, sino que se mide para ver el efecto que la manipulación de la variable independiente tiene en ella.” (pág. 190); en esta investigación se representó la variable dependiente por la actividad antibacteriana.

Las variables independientes representan los tratamientos o condiciones que el investigador controla para probar sus efectos sobre algún resultado ésta se manipula durante el curso de la investigación a fin de entender los efectos de tal manipulación sobre la variable dependiente, en esta investigación la variable independiente estuvo representada por la composición química del aceite esencial de *Anacardium occidentale*.

Técnicas y Procedimientos de la investigación

Recolección de la planta y preparación previa del material vegetal

La especie vegetal *Anacardium occidentale* se recolectó en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Experimental del Táchira, Venezuela, fue identificada botánicamente en el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se realizó examen y separación manual de las partes deterioradas. El material vegetal fresco utilizado fue de 1000g.

En la figura N° 6 se puede observar cómo se realizó el pasaje del material vegetal.



Figura 6. Pesaje de las hojas frescas de *Anacardium occidentale*

Obtención del aceite esencial

Una vez recolectada y preparada la planta, se licuó (Figura N° 7) y se sometió a un proceso de hidrodestilación (Figura N° 8) con la intención de obtener el aceite esencial concentrado por arrastre con vapor, en este procedimiento se logró obtener un total de 1,5 mL de aceite esencial concentrado de *Anacardium occidentale*, el cual se almacenó en un frasco bajo condiciones idóneas de temperatura (4-6 °C) para evitar su degradación.



Figura 7. Licuadora industrial METVISA.



Figura 8. Hidrodestilación.

Análisis de identificación del aceite esencial

Para el análisis de identificación se empleó un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5973 serie II, el cual se puede observar en la figura N° 8, equipado con columna capilar HP-5 MS (30 m de longitud, de 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,25 μm). La temperatura del puerto de inyección fue de 230 °C y la del cuadrupolo 150 °C. Se utilizó helio como gas portador, a un flujo de 0,9 mL/min ajustado a una velocidad lineal de 34 m/s. La energía de la fuente de ionización fue de 70 eV con un rango de barrido de 40-500 amu a 3.9 scans/s. Se inyectó 1,0 μl del aceite diluido en éter dietílico con una relación de split de 1:100. Llevando a cabo la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). La identificación de los componentes del aceite se realizó por comparación de sus espectros de masas con los reportados en la base de datos de la librería Wiley 6ta Edición y los índices de Kováts reportados en la literatura.



Figura N° 9. Cromatógrafo de gases, Hewlett-Packard.

Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial

Microorganismos de ensayo

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se seleccionaron 5 especies bacterianas: 2 especies de bacterias grampositivas y 3 especies de bacterias gramnegativas, empleando en todos los casos cepas de referencia internacional

pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) y éstas se obtuvieron del cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis del Estado Mérida, las cuales son:

❖ Cepas Grampositivas:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

❖ Cepas Gramnegativas

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357

Preparación de inóculos

La preparación se realizó a partir de cultivos puros y frescos en un medio de cultivo básico; se procedió a tomar una pequeña cantidad de colonias con un asa en aro para luego ser suspendidas en una solución de Cloruro de sodio (NaCl) al 0,85 % estéril, hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0,5 McFarland (10^{6-8} UFC/mL).

Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar

El inóculo preparado anteriormente se sembró en la superficie del agar con un hisopo estéril. Se colocaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro a los que se les adicionaron 10 μ L del aceite esencial obtenido de *Anacardium occidentale*; con su respectivo control negativo (DMSO: disco con solvente dimetil sulfóxido). El control positivo está representado por discos de antibacterianos comerciales que inhiben el crecimiento de los microorganismos a ensayar:

❖ Discos de antibiótico comercial para las bacterias Grampositivas:

- Para *Staphylococcus aureus*: Eritromicina.
- Para *Enterococcus faecalis*: Ampicilina.

- ❖ Discos de antibiótico comercial para las bacterias Gramnegativas:
- Para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*:
Piperacilina

Preparación de las placas e inoculación

En las placas de Petri se colocaron 20 mL del preparado de agar Müeller Hinton estéril dejándose solidificar a temperatura ambiente. Una vez preparadas las placas se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con los inóculos bacterianos, utilizando para ello un hisopo de algodón estéril. (Velasco y cols., 2007)

Colocación de los discos impregnados

Una vez que las placas fueron debidamente inoculadas, sobre la superficie se colocaron en forma equidistante los discos impregnados con el aceite esencial de *Anacardium occidentale* y los controles negativo y positivo.

Preincubación e incubación

Después de la colocación de los discos en las placas de agar Müeller Hinton, éstas se preincubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas en la estufa. (Rondón y cols., 2006)

Lectura de las pruebas

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a inspeccionar cada una de las placas. Se consideró como resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) cuando un halo de inhibición del crecimiento microbiano se observaba alrededor del disco, dicho halo fue medido y se expresó la magnitud de la medición en milímetros. En el caso contrario, la ausencia del halo de inhibición se interpretó como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana).

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó con aquellos microorganismos que mostraron zonas de inhibición, siguiendo la metodología descrita por Rondón y cols.,(2005).

La CMI se realizó diluyendo el aceite con el solvente dimetil sulfóxido (DMSO) se seleccionó dicho solvente por cuanto no afecta el crecimiento bacteriano; las diluciones preparadas fueron de concentraciones: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, y 5 µg/ml. Posteriormente se impregnaron los discos de papel de filtro con 10µL de cada dilución y consecutivamente se dispusieron de manera equidistante en la superficie del agar, se llevaron a incubación durante 24 h a 37 °C, transcurrido éste tiempo se procedió a observar si había actividad antibacteriana (visible por la aparición de halos de inhibición) y se procedió a medir los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (Rondón y cols., 2005).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Obtención del aceite esencial

Las hojas de *Anacardium occidentale* fueron pesadas (1 Kg) y posteriormente sometidas a un proceso de hidrodestilación por arrastre de vapor empleando para ello un aparato Clevenger, con la finalidad de extraer el aceite esencial. A partir de esta técnica se obtuvo 1,5 mL, lo que corresponde a un rendimiento de 0,15 %. Las características observadas en el aceite fueron: color amarillo claro, aspecto transparente, y olor característico.

Análisis de identificación del aceite esencial

El estudio realizado empleando el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió la identificación de los componentes presentes en el aceite esencial del *Anacardium occidentale*, identificándose exitosamente el 99 % de la muestra. Se hallaron e identificaron los 10 componentes presentes, los cuales se describen en la tabla N° 4, se muestran las estructuras químicas de todos los componentes identificados en la figura N° 10. El componente mayoritario del aceite esencial es el δ -3-careno constituyendo un 79,73 % de la muestra total. Todos los componentes identificados se clasifican como terpenos, específicamente monoterpenos, los cuales fueron reclasificados y se muestran en el gráfico N° 1, siendo Monoterpenos Hidrocarbonados No Oxigenados (5 %) dentro de los que se encuentran el α -pineno, el (Z)- β -ocimeno y el (E)- β -ocimeno; Monoterpenos Monocíclicos (12 %) constituidos por el α -felandreno, el α -terpineno, el limoneno, el γ -terpineno y el α -terpinoleno y Monoterpenos Bicíclicos (83 %) representados por el α -pineno y el δ -3-careno.

Tabla N° 4. Composición química del aceite esencial de *Anacardium occidentale*.

| N° | Componente | TR | % | IKcal | IKtab |
|----|--|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | α -pineno | 5,138 | 2,26 | 939 | 932 |
| 2 | Mirceno | 6,373 | 3,08 | 984 | 988 |
| 3 | α -felandreno | 6,752 | 0,98 | 996 | 1002 |
| 4 | δ-3-careno | 6,959 | 79,73 | 1002 | 1008 |
| 5 | α -terpineno | 7,067 | 1,23 | 1005 | 1014 |
| 6 | (Z)- β -ocimeno | 7,290 | 0,76 | 1012 | 1032 |
| 7 | Limoneno | 7,381 | 1,08 | 1014 | 1024 |
| 8 | (E)- β -ocimeno | 7,878 | 0,78 | 1034 | 1044 |
| 9 | γ -terpineno | 8,209 | 0,74 | 1049 | 1054 |
| 10 | α-terpinoleno | 9,068 | 7,87 | 1085 | 1086 |

Nota. TR: Tiempo de retención; IK: Índice de Kovats.

Fuente: Proceso investigativo.

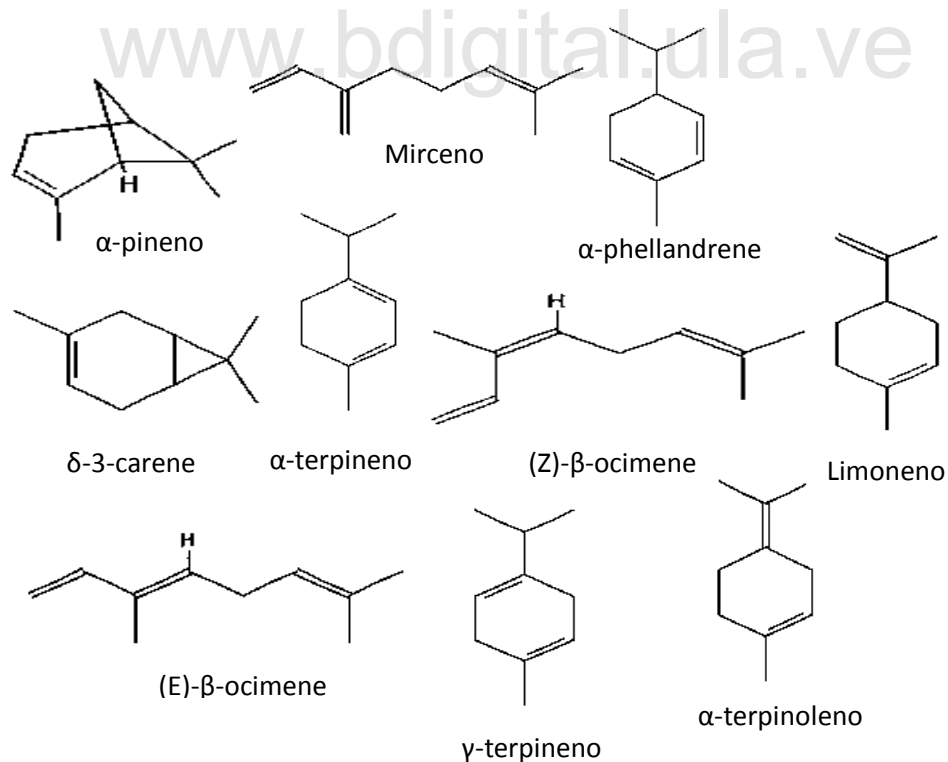


Figura N° 10. Estructuras químicas componentes del aceite esencial *A. occidentale*.

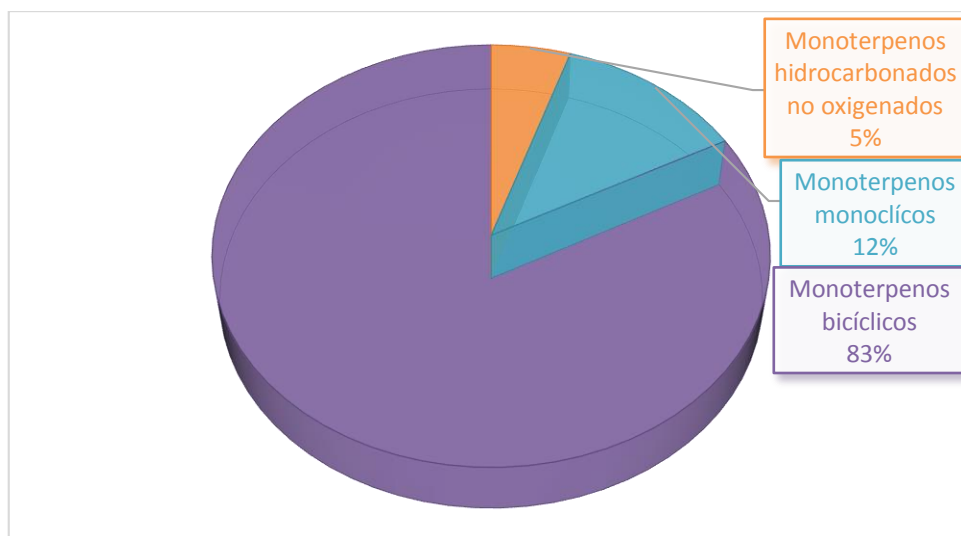


Gráfico N° 1. Clasificación de los compuestos hallados en el aceite esencial del *Anacardium occidentale*.

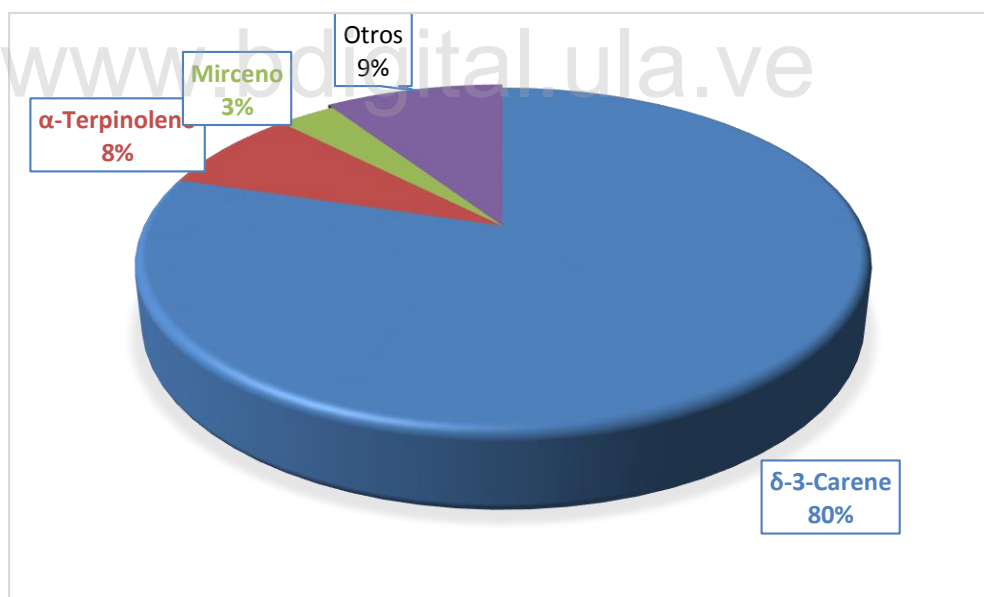


Gráfico N°2. Componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial del *Anacardium occidentale*.

A continuación se indican en la tabla N°6 los ítems que se observaron y se reportaron en cuanto a las características específicas del aceite esencial obtenido de las hojas del *Anacardium occidentale*.

Tabla N° 5. Características organolépticas, físicas y químicas obtenidas del aceite esencial de *Anacardium occidentale*.

| Característica aceite esencial | <i>Anacardium occidentale</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Aspecto | Transparente |
| Color | Amarillo claro |
| Olor | Característico |
| Peso de hojas (g) | 1000,00 |
| Volumen del aceite (mL) | 1,5 |
| Rendimiento % | 0,15 |
| Componente mayoritario | δ -3-careno |

Fuente: Proceso investigativo.

Evaluación de la actividad antibacteriana

El ensayo con el aceite esencial puro de la especie *Anacardium occidentale* mediante el método de difusión del disco en agar, mostró actividad antibacteriana contra cepas ATCC, obteniéndose los siguientes halos de inhibición: en el ensayo con *Escherichia coli* halo de 9 mm, para *Staphylococcus aureus* de 9 mm, *Pseudomonas aeruginosa* de 8mm y en *Enterococcus faecalis* el halo de inhibición obtenido fue de 23 mm. El aceite esencial fue probado también en cepas ATCC de *Klebsiella pneumoniae* sin mostrar actividad antibacteriana.

Los controles positivos para las cepas ensayadas se usaron según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), el cual indica el tipo de antibiótico que debe usarse para cada especie. En la tabla N° 8 se muestran los reportes obtenidos para cada antibiótico ensayado en los microorganismos.

En el presente ensayo, el aceite esencial presentó halos de inhibición un poco mayores al diámetro del disco (6 mm) y menores que los controles positivos que se emplearon.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Anacardium occidentale* se procedió a realizar diluciones de concentraciones 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 y 5 ppm, a partir de las cuales se llevó a cabo el método de difusión del disco en agar, tomando 10 µl de cada dilución para impregnar los diferentes discos empleados en el ensayo.

Este ensayo indicó la concentración mínima inhibitoria para los microorganismos en estudio, los cuales se reflejan en la tabla N° 6.

Tabla N° 6. Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas.

| Microorganismo | Concentración mínima inhibitoria (ppm) |
|-------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 5 |

Fuente: Proceso investigativo.

El ensayo de la actividad antibacteriana y los resultados obtenidos del mismo se reflejan en la tabla N° 7, en la cual se pueden ver los halos de inhibición hallados en cada caso además se muestran los halos de inhibición obtenidos en el caso de los controles positivos.

Tabla N° 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Anacardium occidentale* frente a cepas ATCC.

| Concentración (ppm) | Microorganismos ATCC | | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | Zonas de inhibición (mm) | | | | |
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| 100 | 7 | 7 | 7 | NI | 8 |
| 90 | 7 | 7 | 7 | - | 8 |
| 80 | 7 | 7 | 7 | - | 8 |
| 70 | 7 | 7 | 7 | - | 8 |
| 60 | 7 | 7 | 7 | - | 7 |
| 50 | 7 | 7 | 7 | - | 7 |
| 40 | 7 | 7 | 7 | - | 7 |
| 30 | NI | 7 | 7 | - | 7 |
| 20 | - | 7 | 7 | - | 7 |
| 10 | - | 7 | 7 | - | 7 |
| 5 | - | 7 | 7 | - | 7 |
| AP | 9 | 23 | 9 | - | 8 |
| CP | 32 | 32 | 27 | 27 | 27 |

AP: Aceite puro. **CP:** Control positivo. **NI:** No inhibió.

Fuente: Proceso investigativo.

Discusión

La obtención del aceite esencial de las hojas del *Anacardium occidentale* se llevó a cabo por el método de hidrodestilación, obteniendo un rendimiento de 0,15 %. Con respecto a las características organolépticas obtenidas en el presente estudio no son comparables con los trabajos empleados como sustento en esta investigación puesto a la diferencia en las técnicas empleadas para la obtención del aceite esencial.

Los componentes identificados en la presente investigación del aceite esencial de las hojas del *Anacardium occidentale* coinciden con estudios anteriores a pesar de las diferencias geográficas, en cuanto a que la mayor proporción del aceite esencial está constituida por monoterpenos.

En el presente estudio se obtuvo que el aceite esencial de las hojas de *Anacardium occidentale* está constituido por monoterpenos en su totalidad, mientras que Dzamic y cols., (2009) en su trabajo de investigación hallaron que los monoterpenos constituían un 62,6 % del aceite obtenido, seguido de los sesquiterpenos que conformaron un 31,1 %; por otra parte Montanari y cols., (2012) indican que el aceite esencial hallado en su estudio estaba constituido por 80,7 % por sesquiterpenos hidrocarbonados, 4,7 % por monoterpenos hidrocarbonados, así como los sesquiterpenos oxigenados constituyeron un 3,8 %.

Los estudios que se han realizado sobre la identificación de la composición del aceite esencial de las hojas del *A. occidentale* confluyen en varios de los componentes presentes existiendo diferencias en las proporciones en las cuales se encuentran presentes, hecho que pudiera deberse a las variaciones geoambientales de las localidades de las cuales se obtuvieron las muestras de la especie vegetal en estudio.

Por otra parte, una de las investigaciones que sirven como antecedente al estudio encontró como componente mayoritario el β -felandreno (42,7 %), seguido del β -cariofileno (4,4 %), continúa con el α -pineno (4,3 %) Dzamic y cols., (2009). Mientras que Jesumoronti y cols., (2015) revelan en su investigación como componente mayoritario el β -cariofileno (17.36 %), hallándose luego el α -copano (13.50 %), seguido del germacreno D (10.67 %), el germecreno B (9.93 %) y gamma-cadineno (8,17 %).

Estas investigaciones fueron realizadas en Nigeria, sin embargo la obtención de la muestra vegetal en los dos casos fue de zonas y tiempos diferentes, por cuanto a pesar de hallar similitudes, se logra observar notoriamente diferencias porcentuales en la composición del aceite esencial del *Anacardium occidentale*. Montanari y cols., (2012) realizaron un estudio en Brasil en el cual hallaron como componentes

mayoritarios al (E)-cariofileno (15,42 %), continuado con el germacreno-D (11,50 %) y el α -copaeno (10,30 %).

Al comparar los resultados referidos en dichos estudios con los obtenidos en la presente investigación se puede notar una marcada diferencia en los componentes mayoritarios, los cuales en esta investigación están conformados por el δ -3-carene (79,73 %), seguido por el α -terpinoleno (7,87 %). El componente mayoritario del *A. occidentale* hallado en esta investigación fue determinado también como el componente mayoritario del *Myracrodruon urundeuva*, en el estudio realizado por Montanari y Cols., (2012) con un 78,80 %, cabe destacar que dicha especie es perteneciente a la familia Anacardiaceae.

El componente δ -3-carene no ha sido ampliamente investigado, sin embargo se puede decir que se le atribuye actividad bronco constrictora, capacidad irritante y la actividad con mayor relevancia para este estudio, actividad antibacteriana. Esta actividad antibacteriana se muestra estrechamente relacionada con su naturaleza hidrófoba-lipofílica lo que le permite atravesar con mayor facilidad la membrana bacteriana generando daños a éste nivel que se traducen en una mecanismo de acción antibacteriano (Montanari y Cols., 2012).

Si bien los mecanismos por los cuales los aceites esenciales inducen una actividad antibacteriana no han sido muy bien dilucidados, el estudio realizado por Montanari y Cols., (2012) constituye un precedente relevante el cual dirige la atención hacia el efecto producido por el aceite esencial a nivel de la membrana bacteriana, denominada por los autores como una peroxidación de los lípidos.

Ahora bien, en cuanto a la actividad antibacteriana en el presente estudio se definió como aquella capacidad que poseen algunos agentes de inhibir o eliminar el crecimiento de las bacterias y se evaluó empleando el método de difusión del disco en agar. En este sentido es importante mencionar que diversos autores han realizado estudios en los cuales queda en evidencia la presencia de actividad antibacteriana en extractos y aceites obtenidos de hojas, flores, frutos, nuez y corteza del tronco del

Anacardium occidentale, aunado a ello se ha descrito también actividad antifúngica, capacidades que se adjudican mayormente a la presencia de metabolitos en sus componentes con actividad farmacológica y biológica.

Dentro de los estudios que sirven como soporte a esta investigación, en cuanto a los ensayos de actividad antibacteriana realizados a partir el aceite esencial del *A. occidentale* Ponce, (2011) investigó la actividad antibacteriana presente en el aceite esencial del *A. occidentale* obtenido a partir de la cáscara de la nuez, los resultados obtenidos por el autor destacan una acción antibacteriana marcada frente a *S. mutans*, evidenciada por formar halos de inhibición del crecimiento bacteriano mayores a 21 mm, siendo más activo que el control positivo empleado en dicho estudio (Clorhexidina 0,12 %). Tello, (2011) quien también investigó la capacidad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez, reveló en sus resultados el gran potencial que representa el mismo, puesto que la actividad antibacteriana demostrada por el aceite en estudio fue de halos de inhibición mayores a 13 mm frente a *S. aureus*, coincidiendo con Ponce, (2011) en poseer mayor acción antibacteriana que la Clorhexidina empleada como control positivo en el ensayo.

En esta investigación el aceite esencial obtenido de las hojas del *Anacardium occidentale* se ensayó frente a 5 cepas ATCC, dos de ellas grampositivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y tres cepas gramnegativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*); ensayo en el cual se observó la capacidad presente en el aceite esencial del *A. occidentale* de inhibir el crecimiento bacteriano, lo que demuestra la actividad antibacteriana presente en el mismo. Se realizó el ensayo tanto del aceite puro como de diluciones del aceite esencial con DMSO.

Los resultados obtenidos fueron halos de inhibición para el caso de *S. aureus* de 9 mm en el aceite puro y en las diluciones de 7 mm, en el caso de *E. faecalis* el aceite puro mostró una actividad antibacteriana marcada con un halo de inhibición de 23 mm y en las diluciones un halo de inhibición de 7 mm, para *E. coli* se obtuvo en el aceite puro un halo de inhibición de 9 mm y de las diluciones 7 mm, y finalmente

para *P. aeruginosa* el aceite puro mostró un halo de inhibición de 8 mm y las diluciones halos entre 7-8 mm. En esta investigación se realizó el ensayo del aceite puro obtenido de las hojas del *Anacardium occidentale* frente a cepas de *K. pneumoniae*, sin embargo no se observó inhibición del crecimiento de esta bacteria, lo que indica la resistencia que posee la bacteria frente al aceite esencial ensayado.

En la tabla N° 8 se muestra de manera resumida la comparación de los resultados obtenidos en la presente investigación con respecto a los trabajos que sirvieron como sustento de la misma.

Finalmente es destacable indicar que se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias a las cuales el aceite esencial tuvo la capacidad de inhibir los microorganismos ensayados, siendo estos: para *S. aureus* 40 ppm, *E. faecalis* 5 ppm, *E. coli* 5 ppm y *P. aeruginosa* 5 ppm.

Tabla N° 8. Comparación de resultados de actividad antibacteriana del *A. occidentale*.

| Microorganismos | Duque (2019) | Ponce (2011) | Tello (2011) |
|----------------------|--------------|------------------------|------------------------|
| | AE- Hojas | AE- Cáscara de la nuez | AE- Cáscara de la nuez |
| <i>S. aureus</i> | 9 mm | - | 13 mm |
| <i>E. faecalis</i> | 23 mm | - | - |
| <i>E. coli</i> | 9 mm | - | - |
| <i>K. pneumoniae</i> | NI | - | - |
| <i>P. aeruginosa</i> | 8 mm | - | - |
| <i>S. mutans</i> | - | 21 mm | - |

AE: Aceite esencial. **NI:** No inhibió.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Empleando el método de hidrodestilación por arrastre de vapor se obtuvo el aceite esencial de la muestra vegetal, obteniendo 1,5 ml lo que implica un rendimiento del 0,15 %.
2. Mediante el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se logró analizar el 99 % de la muestra, identificando 10 componentes, siendo los componentes mayoritarios el δ -3-careno con un 79,73 %, el α -terpinoleno con un 7,87% y el Mirceno con 3,08%. Se identificaron 10 componentes presentes en la mezcla, los cuales corresponden en su totalidad a monoterpenos.
3. Se determinó que el aceite esencial presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* con una CMI de 40 ppm, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* con una CMI de 5 ppm.
4. Se determinó que el microorganismo *Klebsiella pneumoniae* presenta resistencia a la acción antibacteriana presente en el aceite esencial del *Anacardium occidentale*.
5. Los resultados obtenidos en cuanto a la identificación del aceite esencial del *Anacardium occidentale* representan un aporte importante, dadas las

variaciones halladas por las diferencias geográficas y ambientales del sitio de recolección de la planta en estudio.

6. La actividad antibacteriana dada por el aceite puro mostró una eficacia ligeramente mayor aunque no muy significativas en el caso de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* que las diferentes diluciones, mientras que en el caso de *E. faecalis* el aceite puro presentó mayor actividad antibacteriana que las diversas diluciones obteniéndose un halo de inhibición de 23mm.
7. La investigación representa un aporte al conocimiento de la actividad antibacteriana presente en el aceite esencial frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y asimismo una alternativa terapéutica de enfermedades causadas por bacterias resistentes a los antibióticos tradicionales.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

1. Ensayar otros métodos de extracción del aceite esencial que exhiban mayor rendimiento de obtención.
2. Ensayar el aceite esencial obtenido de las hojas del *Anacardium occidentale* frente a otras bacterias así como frente a hongos.
3. Investigar la composición y actividad antibacteriana del *Anacardium occidentale* recolectada en otras localidades del país.
4. Ensayar la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en pozo modificada para determinar si algunos compuestos polares del aceite esencial no quedaron retenidos en el papel de filtro.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Acuña, G. (2003) Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Revista Chil Infect, Volumen 20* (1).
- Aguilar, Y., Soto, F., Saavedra, M., Hermosilla, R. y Martínez, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas medicinales, Volumen 17* (4).
- Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud, Volumen 14*. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/47707/WHF_1993_14_4_p390-395_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Alvo, A., Téllez, V., Sedano, C. y Fica, A. (2016) Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista Otorrinolaringología Cir. Cabeza Cuello, Volumen 76* (1).
- Ávalos, A., Pérez, E., (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Revista Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, Volumen 2* (3).
- Avello, M. y Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica Chile, Volumen 138*: 1288-1293
- Balestrini, M. (2006). *Cómo se elabora el proyecto de investigación (1ª ed.)*, Caracas: BL Consultores Asociados servicio editorial.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. (2009) Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades infecciosas y Microbiología, Volumen 29* (2).
- Beyer, H. y Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
- Brooks, G., Carrol, K., Butel, J., Morse, S. y Mietzner, T. (2011) *Jawetz, Meldinick y Adelber-Microbiología Médica (25ª.ed.)*, México: Mc Graw Hill.
- Brugueras, M. y Morejón, M. (1998) Antibióticos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista cubana Med Gen Integr, Volumen 14* (4).
- Cabrera, I. (2005). Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina. Primera Edición. Cali, Colombia. Programa Editorial Universidad del Valle.22-35pag

- Cañigueral, S., Dellacasa E. y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Acta farmacéutica Bonaerense, Volumen 22*(3).
- Cardoso, C., Ré-Poppi, N., Coelho, R., Yasunaka, D. y Sehleder, I. (2010) Identification of the volatile compounds of fruit oil of *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Journal of Essential oil Research, Volumen 22*.
- Castañeda, C., Castro de la Mata, R., Fujita R., Barnett, E., Manrique, R., Ibáñez, L. y Mendoza, E. (2008). Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 plantas con efecto hipoglucemiante. *Revista Horizonte Médico, Volumen 8*(1).
- Claus, E. y Tyler, V. (1965). *Farmacognosia*. Quinta edición. Buenos Aires, Argentina. El ateneo Editorial.164-210pag.
- Da Silva, R., Liberio, S., do Amaral, F., Fernandes, F., Brandao, L., Monteiro, V. y Meireles, R., (2016). Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Anacardium occidentale* L. Flowers in Comparison to Bark and Leaves Extracts. *Journal of Biosciences and Medicines, 4*. Doi:10.4236/jbm.2016.44012
- Domínguez, X. (1973) *Métodos de investigación fitoquímica*. Distrito Federal, México. Limusa.
- Dzamic, A., Gbolade, A., Ristic, M. y Marín, P. (2009) Essential oil composition of *Anacardium occidentale* from Nigeria. *Chemistry of natural compounds, Volumen 45* (3).
- García, A. y Pérez-Urria, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal, Volumen 2* (3).
- Gutiérrez, C. y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (U.P.C)*, N° 122.
- Guerrero, R., Lugo, L., Marín, M., Beltrán, O., León de Pinto, G. y Rincón, F. (2008). Caracterización fisicoquímica del fruto y pseudofruto de *Anacardium occidentale* L. (mery) en condiciones de secado. *Revista de la Facultad de Agronomía. (LUZ)*, Volumen 25:81-94.
- Hernández, R., Fernández, C. Baptista, P. (2003) *Metodología de la Investigación. Tercera Edición*. Chile: Mc Graw Hill.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw.

- Hoyos, A., Rivera, O., Hoyos, C., Mesa, C. y Alfaro, J. (2007). Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *Revista CES Medicina, Volumen 21* (2).
- Hurtado, J. (2007). *El proyecto de Investigación. Quinta edición*. Caracas: Ediciones Quirón-Sypal.
- Jesumoronti, J., Oderinlo, O., Olowafemi, K. y Olagbadegun, J. (2015) Variation in essential oil constituents of the leaf of *Anacardium occidentale* found in Ondo, South Western-Nigeria. *World journal of analytical chemistry, Volumen 3* (1).
- Juárez, F. y Novara, L. (2012) Flora del valle de Lema. *Aportes botánicos de Salta-ser. Flora, Volumen 8* (6).
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Scherenckenberge, P. y Woods, G. (2008) *Diagnostico microbiológico: texto y atlas en color. Sexta edición*. Argentina: Editorial panamericana.
- Kuklinski, C. (2009). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. España: Editorial omega.
- Lafont, J., Páez, M. y Portacio, A. (2011). Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (almendra) del marañón (*Anacardium occidentale* L). *Información tecnológica, Volumen 22*(1), 51-58.
- León, W. (2003) Estudio anatómico del xilema secundario de 17 especies de la familia Anacardiaceae en Venezuela. *Acta botánica Venezuelica, Volumen 26* (1).
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Consejo de desarrollo y humanística.
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Documento en línea. Disponible en: http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_ese ncias2001b.pdf
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., Mesa, M. y Galeano, E. (2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

- Martínez, M. y Cevallos, S. (2005). Arquitectura foliar de Anacardiaceae. *Revista mexicana de biodiversidad*, Volumen 76 (2).
- Montanari, R., Barbosa, L., Demurier, A., Silva, C., Andrade, N., Ismail, F. y Barbosa, M. (2012) Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. *Molecules*, Volumen 17.
- Muñoz, F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Ediciones Mundi-Prensa. Disponible en: https://books.google.co.ve/books?hl=es&lr=lang_es&id=WmX5TibuSrIC&oi=fnd&pg=PA15&dq=plantas+medicinales&ots=-527hYeeE3&sig=beP8D7-xO467186zVvUdSF11WyQ#v=onepage&q=plantas%20medicinales&f=false
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. Sexta edición. España: Elsevier Mosby.
- Ortega, L. (2010). Enterococos: actualización. *Revista habanera de ciencias médicas*, Volumen 9 (4).
- Organización Mundial de la Salud. (2001) Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
- Pallo, J. (2017) Efecto inhibitorio in vitro del extracto de la cáscara del marañón (*Anacardium occidentale*) sobre cepas de *Streptococcus mutans*. (Trabajo de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Patiño, D. (2003) ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico*, (3).
- Pell, S. (2004) Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). (LSU Doctoral Dissertations). Louisiana State University, Louisiana, United States.
- Pedraza, P. y Castellanos, H. (2009). Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte X Cefoperazona- Sulbactam. (Trabajo de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Pérez, M. y Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*. Capítulo 2. 23-41.

- Ponce, C. (2011). Actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*. (Trabajo de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Quizphe, A., Encalada, L., Sacoto, A., Andrade, D., Muñoz, G., Calvo, D., y Lara, M. (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. Disponible en: <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/10/Usa-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>
- Ringuelet, J. y Viña, S. (2013) *Productos naturales vegetales. Primera edición*. La plata: Editorial de la Universidad de la Plata.
- Riverón, F., Lopez, J., Ponce, L. y Machado, C., (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Medica Militar, Volumen 32* (1).
- Rojas, F., Silva, L., Sansó, F. y Alonso, P. (2013) El debate sobre la medicina natural y tradicional y sus implicaciones para la salud pública. *Revista Cubana de Salud Pública, Volumen 39* (1).
- Rondón, M., Velasco, J., Morales, A., Rojas, J., Guatieri, M., Hernández, V. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Salvia Leucantha* Cav. Cultivated in Venezuela Andes. *Revista latinoamericana de Química, Volumen 33*(2).
- Rondón, M., Velasco, J., Hernández, J., Pecheneda, M., Rojas, J., Morales, A., Carmona, J., Díaz, T. (2006). Chemical composition and antibacterial activity of the *Tagetes patula* L (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Revista Latinoamericana de Química, Volumen 34*.
- Roth, I. (1974). *Desarrollo y estructura anatómica del Merey*. Acta Botánica Venezolánica. Caracas, Venezuela. Volumen 9, pp. 197-233.
- Sanchez, J. (2013). Usos clínicos de los macrólidos (Revisión de la literatura). (Trabajo de grado). Universidad autónoma del Estado de México, Toluca, México.
- Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. U. d. República, Temas de Bacteriología y Virología Médica, Oficina del libro FEFMUR, Uruguay, 34, 631-647.
- Sepúlveda, J., Porta, H. y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología, Volumen 21*, (3).

- Stashenko, E. y Martínez, J. (2009) Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica, Volumen 1* (3)
- Stashenko, E. y Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica Volumen .2*, (1).
- Sulbarán, B., Gonzales, B. y Fernández, V. (2013). Caracterización química y actividad antioxidante del pseudofruto de cauñil (*Anacardium occidentale* L.) *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ), Volumen 30*.
- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de Bacteriología y Virología Médica, Oficina del libro FEFMUR, Uruguay, 36(1), 665-668.
- Tello, J. (2011). Acción antimicrobiana del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Estudio in vitro. (Trabajo de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Valera, E. (2012). El Merey nació en Venezuela, Especial para el Universal. Disponible en: <http://www.eluniversal.com/vida/121006/el-merey-nacio-en-venezuela>
- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A. y Rondón, M. (2007). Antibacterial activity of the Essential Oil of *Lippia oreganoides* Against Multiresistant Bacterial Strains of Nosocomial Origin. *Natural Product Communications, volumen 2* (1), 85-88.
- Vit, P. (2003). *Anacardium occidentale* L. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 6 Merey. *Revista de la Facultad de Farmacia, Volumen 45* (1).
- Yaguana, C. (2015). Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y de *Coriandrum sativum* (culantro) mediante el método de sensibilidad por difusión en agar Bauer-Kirby, sobre cepas en comparación con los antibióticos gentamicina y ampicilina. (Trabajo de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Zaraza, M. (2012). Actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Conochea scoparoides* frente a cinco cepas bacterianas de interés clínico en Colombia. (Trabajo de grado). Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.