UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
"Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro"

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

www.bdigital.ula.ve

Trabajo de Grado Presentado como Requisito para Optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

Autor:
Br. Oraides Lisbeth Hernández Ramírez
C.I. V-24.350.266.
Tutora:
Dra. Rosa L. Aparicio Z.

Mérida, Mayo del 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

Todos mis logros y metas van dedicados a Dios, todo poderoso por darme la vida, la salud, y la perseverancia, por bendecirme, escuchar mis oraciones, por enseñarme que lo más importante de cada obstáculo es volverse a levantar y seguir adelante. Por siempre acompañarme, protegerme e iluminar mi camino.

Dedico este logro con mucho orgullo a mis padres: Ora Ydes Ramírez y Eloy Antonio Hernández, gracias por creer en mí, brindarme su amor y apoyo incondicional, por cuidarme y estar siempre pendiente de mí, por llenarme de entusiasmo, ganas de luchar y las mejores energías para continuar, hoy vemos materializado este sueño. Gracias por su confianza y su amor incondicional hacia mí, los amo.

A mí hermano Johan Hernández y Adrianita Rojas, que con mucho cariño estuvieron pendientes de mí, me apoyaron y me dieron palabras de aliento, los quiero mucho.

www.bdigital.ula.ve

A mi ahijada y sobrina consentida Sofía, es mi inspiración para lograr cada una de mis metas y que le sirva de ejemplo que con constancia y dedicación se cumplen los sueños.

A mis amigos y compañeros que estuvieron a lo largo de mi carrera universitaria, en especial aquellos que hicieron este camino más agradable: María Daniela Dávila, Franyelli Paredes, José Torres, Yesnaye Rivas, Eli Morales, Karol Paredes y Ninoska, gracias por todos los momentos que hemos compartido juntos, los quiero mucho.

A todos muchas gracias, Dios los bendiga.

Oraides Lisbeth Hernández Ramírez.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTOS.

A mi Dios: Estoy eternamente agradecida, por escuchar mis oraciones, quien siempre ha estado presente en el camino recorrido guiando mis pasos, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad.

A mi mamá: Ora Ydes Ramírez gracias por tu apoyo, por siempre escucharme, por cuidarme siempre, por decirme las mejores palabras de aliento por compartir conmigo mis alegrías y tristezas, gracias mamá.

A mi papá: Eloy Hernández gracias por ser el pilar para realizar mi carrera Universitaria, por acompañarme a los inicios de este camino, tu confianza y apoyo incondicional, por guiarme en el mejor camino, por siempre cuidarme, gracias papá.

A la ilustre Universidad de Los Andes: por ser mi casa de estudio, por abrirme las puertas, permitirme crecer como persona y formarme como profesional.

A mi tutora: Rosa Aparicio, gracias por sus consejos, correcciones, paciencia, apoyo, tiempo y dedicación brindada. Quien me ha guiado para desarrollar este hermoso tema de investigación. La admiro mucho por su gran ética profesional, eres una persona brillante.

Al Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por haberme permitido realizar esta investigación es sus instalaciones.

A las profesoras: Ysbelia Obregón, Yndra Cordero y a los profesores: †Luis Rojas y Alfredo Usubillaga, gracias por los conocimientos aportados, ayuda y atención en esta investigación.

A la profesora y al Laboratorio de Micología: Profesora Clara Díaz, gracias por los conocimientos aportados en clases, por ser una profesora tan linda y amorosa, que con su gran dedicación para enseñar nos enamoró sobre la micología, gracias por su colaboración y atención para la realización de esta investigación.

A la profesora Saraí de parasitología, por enseñarnos lo valioso que es la carrera, por su dedicación, amabilidad y enseñanza para formarnos como futuros profesionales, gracias por sus buenos consejos.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA……	iii
AGRADECIMIENTOS……..	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO……	v
ÍNDICE DE FIGURAS……...	viii
ÍNDICE DE TABLAS…….	x
RESUMEN…….	xi
INTRODUCCIÓN……..	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA……	4
Planteamiento del Problema……	4
Justificación e Importancia de la Investigación…….	6
Objetivos de la Investigación……	7
Objetivo General……...	7
Objetivos Específicos……...	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación…….	8
Alcances de la Investigación……...	8
Limitaciones de la Investigación……..	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO……..	10
Trabajos Previos……	10
Antecedentes Históricos o Epistemológicos……..	15
Bases Teóricas……..	20
Familia Asteraceae……	20
Género *Ruilopezia*…….	29
Especie *Ruilopezia marcescens*……..	33
Productos Naturales……..	36
Aceites esenciales…….	40

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Pág.
Identificación de los aceites esenciales……..	52
Cromatografía Gaseoso-Líquida con Detector de Ionización de Llama (CG-DIL)……..……....	53
Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa…….....	53
Índices de retención de Kováts……	55
Micología…….	57
Hongos……	57
Definición Operacional de Términos……..	82
Operacionalización de las Variables……..	84
Hipótesis…….	86
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO……..	87
Tipo de Investigación……	87
Diseño de Investigación……...	87
Población y Muestra…….	88
Unidad de Investigación……...	88
Selección del Tamaño de la Muestra……..	88
Sistema de Variables……	88
Instrumentos de recolección de datos……...	89
Procedimiento de la Investigación……..	89
Recolección de la muestra……..	89
Obtención de los aceites esenciales……..	90
Caracterización química del aceite esencial de las hojas de *R. marcescens*……	91
Actividad Antifúngica…….	92
Preparación de las Placas……...	92
Preparación de los Discos……...	92

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Pág.
Preparación de los Inóculos Fúngicos……..	93
Disco control……..	93
Determinación de la actividad antifúngica…….	93
Diseño de Análisis…….	94
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES……..	95
Resultados……..	95
Discusión……	99
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES…….….	104
Conclusiones……..	104
Recomendaciones…….	105
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFIAS…….……..	106

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Características botánicas de la Familia Asteraceae…..	22
Figura 2.	Estructuras de algunos monoterpenos presentes en la familia Asteraceae……..…	25
Figura 3.	Estructuras de algunos sesquiterpenos presentes en la familia Asteraceae……..……	26
Figura 4.	Estructuras químicas de algunos diterpeno……..……..	27
Figura 5.	Morfología general del género *Ruilopezia*……...……..	30
Figura 6.	Algunas estructuras del género *Ruilopezia*…….	32
Figura 7.	Clasificación taxonómica de *Ruilopezia marcescens*...	33
Figura 8.	Algunas estructuras químicas de la especie *Ruilopezia marcescens*……..……...	35
Figura 9.	Estructuras químicas que pertenecen a la clase de compuestos grasos……..……..	37
Figura 10.	Estructura química de algunos terpenos encontrados en la naturaleza……..	42
Figura 11.	Estructura química de algunos compuestos aromáticos…….	43
Figura 12.	Estructura química de algunos compuestos provenientes de la degradación de ácidos grasos……...	43
Figura 13.	Estructura química de los compuestos nitrogenados y azufrados…….	44
Figura 14.	Destilación con agua y vapor de agua……	47
Figura 15.	Hidrodestilación con trampa de Clevenger…….	48
Figura 16.	Extracción con fluidos supercríticos……..……..	50
Figura 17.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas ……..…….	55

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 18. Ecuación matemática del índice de Kováts, para una cromatografía de temperatura programada……..... 56
Figura 19. Morfología del hongo……..…… 58
Figura 20. Transportador MFS, a través de un gradiente electroquímico……. 64
Figura 21. Estructuras químicas de Antifúngicos sintéticos imidazólicos y triazólicos…… 68
Figura 22. Estructura química de Antifúngicos del grupo Alilaminas……. 69
Figura 23. Estructura química de Antifúngicos poliénicos: Anfotericina B…….. 70
Figura 24. Estructura química Antifúngico del núcleo Morfolina…….. 71
Figura 25. Estructura química Antifúngico de grupo pirimidina…….. 72
Figura 26. Estructura química de Antifúngico del grupo Ciclopiroxolamina…… 73
Figura 27. Hidrodestilación empleando la trampa Clevenger……. 91
Figura 28. Aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake)…… 96
Figura 29. Cromatograma general del aceite esencial de las hojas de *R. marcescens* (S.F Blake) Cuatrec……. 99
Figura 30. Actividad antifúngica del Aceite esencial obtenido de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), frente a *Candida albicans* y *Candida krusei*……... 101

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación y Distribución geográfica del género *Ruilopezia* entre Colombia, Ecuador y Venezuela…..….	31
Tabla 2.	Propiedades farmacológicas de los aceites esenciales……	45
Tabla 3.	Clasificación de antimicóticos de acuerdo al tipo de micosis……	73
Tabla 4.	Operacionalización de la variable dependiente actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec……..	84
Tabla 5.	Operacionalización de la variable independiente Caracterización química del aceite esencial de las hojas *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec……	85
Tabla 6.	Características físicas del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec…….	95
Tabla 7.	Composición química del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec…….	97
Tabla 8.	Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec……..	101

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
"Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro"
Trabajo De Grado II.

Autor: Br. Oraides Lisbeth Hernández Ramírez
C.I. V-24.350.266
Tutora: Dra. Rosa L. Aparicio Z.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

RESUMEN

En esta investigación se describe la composición química del aceite esencial y la actividad antifúngica obtenidas de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec. Recolectada en el páramo de El Batallón, en Los Andes Venezolanos. El aceite esencial fue obtenido por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, con un rendimiento de 0,054 % v/p. El análisis de sus componentes volátiles fue realizado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), identificando como compuestos principales el Germacreno D (24,86 %), *α*-pineno (22,38 %), *p*-cimeno (7,35 %) y *α*-felandreno (6,34 %). La actividad antifúngica se evaluó por el método de difusión en discos, frente a levaduras de referencia internacional: *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258). Como resultado de dicha investigación, el aceite esencial no fue activo para *Candida albicans y Candida krusei.* Este es el primer reporte sobre actividad antifúngica de la especie *Ruilopezia marcescens*.

Palabra claves: Asteraceae, Aceite esencial, *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec, *Candida albicans, Candida krusei.*

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

Las plantas son una fuente de diversas moléculas biológicamente activas. Ellas producen numerosos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, aceites esenciales, entre otros (Grayer y Harborne, 1994). Los hongos están bien adaptados para utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, nitrógeno y energía. De allí la dificultad que presenta su control. Estos organismos pueden causar enfermedades muy graves en humanos (Quiroga, Sampietro, y Vattuone, 2001).

El ecosistema del páramo es de las grandes altitudes más diversas y de evolución más rápida del mundo. Hay, más de 144 especies de frailejones dominan el páramo. Éstos han intrigado a los naturalistas, investigadores y botánicos, no solo por su atractiva belleza y su impresionante diversidad morfológica, sino también por sus notables adaptaciones a las condiciones ambientales extremadamente duras del páramo (Díaz, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Los frailejones son muy abundantes en los páramos y bosques alto andinos. En general tienen aspecto de palmas, con una roseta de hojas pubescentes al final, y un tallo cubierto de hojas secas. De cada roseta emergen ramas florales sosteniendo inflorescencias en capítulos, usualmente amarillas. A pesar de que es relativamente fácil reconocer estas plantas su diversidad morfológica es muy notoria, con especies cuyos individuos adultos van desde unos pocos centímetros hasta especies que superan los 15 m de altura (Diazgranados, 2013).

Es importante decir, que algunas plantas de los páramos más abundantes son de la familia Asteraceae, que está caracterizada por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo, la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas (involucro). El nombre

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

“Asteraceae” deriva del género tipo de la familia Aster, término que proviene del griego que significa “estrella” y hace alusión a la forma de la inflorescencia. Por otro lado, el nombre “compuestas”, más antiguo pero válido, hace referencia al tipo particular de inflorescencia compuesta que caracteriza a la familia y que solo se halla en muy pocas familias de Angiospermas. Las Compuestas presentan una considerable importancia ecológica y económica (Stevens, 2012).

Los frailejones forman parte importante de la ecología y biodiversidad de los páramos venezolanos. Generalmente pertenecen a la familia (Asteraceae) de subtribu Espeletiinae, la cual, se encuentra subdividida en ocho (8) géneros (Cuatrecasas, 1976; Badillo, 2001): *Carramboa* Cuatrec (7 especies), *Coespeletia* Cuatrec (8 especies), *Espeletia* Mutis ex H. et B. (19 especies), *Espeletiopsis* Cuatrec (7 especies), *Libanothammus* Ernst (19 especies), *Ruilopezia* Cuatrec. (24 especies), *Tamania* Cuatrec. (1 especie) y *Paramiflos*. El género *Ruilopezia*, llama su atención, ya que, son plantas monocárpicas y con variedad de metabolitos secundarios, la especie *Ruilopezia marcescens* es la especie menos conocida y poco estudiada, pero se encontrada en lo paramos andinos venezolanos (Cuatrecasas, 1987).

www.bdigital.ula.ve

De acuerdo con la tendencia de la población de hacer uso de medicamentos de origen natural, los investigadores utilizaron los productos naturales, el cual, se hizo indispensable la profundización en el conocimiento de las plantas medicinales, analizar su composición química y los factores que puedan hacerla variar, conocer la estructura y las propiedades de los principios activos con miras para poder determinar su posible actividad farmacológica, determinar las indicaciones, contraindicaciones, efectos secundarios entre otros, con el fin de utilizarlas en el tratamiento y prevención de los problemas de salud (Coy, 2014).

Este proyecto de investigación estuvo estructurado por cinco capítulos. El primero titulado El Problema, subtitulado de la siguiente manera:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación y objetivos. El segundo capítulo, titulado Marco Teórico, estará conformado por los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Operacionalización de las Variables y Sistema de Hipótesis. Tercer capítulo, titulado Marco Metodológico, ordenado con los siguientes subtítulos, Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. Cuarto capítulo, comprendido por Resultados y Discusiones. Quinto capítulo Conclusiones y Recomendaciones. Referencias Bibliohemerográficas.

En la presente investigación se caracterizará la composición química y su actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F Blake) Cuatrec de la familia Asteraceae, con el objeto de ofrecer una alternativa mediante el uso de plantas y de sustancias orgánicas. Para nuestro conocimiento, la actividad antifúngica del aceite esencial de *R. marcescens* no ha sido determinada, por lo tanto, este es el primer reporte.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde la antigüedad se conocen que las plantas tienen sustancias que han sido usados como tratamiento para sanar afecciones. A las plantas se les han atribuido diversas propiedades curativas de acuerdo a su forma, color o el hábitat. Estas poseen principios activos que pueden ser sustancias simples tales como alcaloides o mezclas complejas como resinas, aceites esenciales, entre otros. Estos, contienen estructuras y componentes químicos con fines biológicos y farmacológicos (Marcano y Hasegawa, 2002).

www.bdigital.ula.ve

El uso irracional de los antibióticos en la práctica clínica, propició una pronta aparición de mecanismos de resistencia en bacterias y posteriormente en hongos, parásitos y virus. Alexander Fleming, desde que recibió el Premio Nobel de Medicina en el año 1945, advirtió sobre el fenómeno de la resistencia cuando expresó: *"Llegará un momento en que la penicilina podrá ser comprada por cualquiera en los negocios. Existe el peligro de que un hombre por inconsciencia pueda fácilmente aplicarse una dosis insuficiente de algún antimicrobiano y, al exponer a los microbios a una cantidad no letal del medicamento, los haga resistentes"* (Ventola, 2015).

Lamentablemente, el ser humano no concientizó esta alerta y muy pronto aparecieron los primeros aislamientos resistentes como parte de la evolución natural, entre ellos, los hongos en su adaptación al medio ambiente (Ventola, 2015). La resistencia a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo). La resistencia antifúngica

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

continúa creciendo y evolucionando a pesar de la aparición de nuevos fármacos, haciendo más complicado el manejo de los pacientes con infección fúngica invasora (Quiñones, 2017).

Es por ello, que los aceites esenciales podrían ser una alternativa de solución y reemplazos antimicrobianos y/o antifúngicos tóxicos que causan efectos degenerativos en los seres humanos por su alto poder residual prolongado. Parte de los aceites esenciales son una fuente de investigación en el control de microorganismos (Marcano y Hasegawa, 2002).

La resistencia a los antifúngicos hasta hace unos años atrás, tenía menos impacto clínico y epidemiológico que en bacterias. Recientemente, la OPS/OMS emitió una alerta en la región de Latinoamérica relacionada con *Candida auris*, identificado como patógeno humano desde 2009 en Japón y ha sido causa de brotes, afectando a Venezuela y Colombia. Se ha relacionado en pacientes con estancia prolongada en las unidades de cuidados intensivos neonatales y de adultos. Su aislamiento estuvo circunscrito a muestras de sangre, orina y lavado bronqueoalveolar. La resistencia al fluconazol, voriconazol y anfotericina B fue evidente en este patógeno (Quiñones, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Con referencia a lo anterior, dicha investigación se basó en la caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de la especie en estudio, lo que nos genera la siguiente interrogante: ¿Los componentes químicos presentes en el aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec, tendrán el efecto antifúngico eficaz contra las cepas *Candida albicans y Candida krusei?*

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Justificación e Importancia de la Investigación

Por lo general, los aceites esenciales han sido utilizados desde la antigüedad por el hombre con fines medicinales y aunque su uso se perdiera por la aparición de productos químicos estos han vuelto a recobrar importancia, ya que, tienen una ventaja frente a los otros y es que generalmente no tienen efectos adversos sobre la salud del hombre; es por esto por lo que actualmente en muchas partes del mundo investigadores están estudiando las propiedades biológicas de los aceites esenciales y ya se ha descrito que poseen actividad antimicrobiana, antiviral, anticancerígeno, antioxidante, actividades antiinflamatorias y anti protozoarias entre otras (Bakkali, Averbeck, Averbeck y Idaomar, 2008).

Específicamente, en esta revisión se abordará el tema de la utilidad de los aceites esenciales con actividad antifúngica, ya que, son una nueva esperanza para combatir microorganismos que han desarrollado resistencia a los antimicóticos usados comúnmente.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Objetivos de la Investigación.

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química y la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

Objetivos Específicos

- Obtener el aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec., por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger.

www.bdigital.ula.ve

- Identificar los componentes volátiles del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec., mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) y realizar el cálculo de los índices de Kováts de los compuestos identificados.

- Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec., mediante el método de difusión en disco.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, así, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcances exploratorio, descriptivo, correlacional, o explicativo (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

El alcance de esta investigación estará determinado por los aportes que ofrecerá en cuanto a la identificación de los componentes químicos presentes en el aceite esencial y su actividad antifúngica a través de un método de bajo costo y alta eficiencia. Donde se basará en aspectos tales como: Ambientales, siendo un antifúngico elaborado a partir de una especie vegetal, su impacto en el ecosistema no traería consecuencias destructoras, ya que, no es un producto sintético. De salud, siendo un producto de origen orgánico, sin compuestos inestables en el ambiente, su impacto sería positivo en cuanto a la salud del ser humano, ya que los antifúngicos de origen sintético o tóxicos entran en contacto con el hombre y los animales a través de todas las vías de exposición posibles tales como respiratoria, digestiva y dérmica, y estos pueden tener un efecto negativo sobre la salud, cuando el grado de exposición supere los niveles considerados seguros. En lo económico, puesto que las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec., es una especie vegetal reconocida por el potencial de sus hojas, para su uso medicinal de las vías respiratorias y afecciones reumáticas (Aparicio, 2001; Heywood, 1977). En cuanto a su actividad biológica, tiende a pasar desapercibida y esta puede ser aprovechada para la elaboración de un antifúngico, haciendo factibles su oferta y demanda comparados con los antimicóticos de formula sintética. Y en

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

lo social, ya que, mejoraría el bienestar de las personas, en especial las que se encuentras localizadas en zonas húmedas, frías, cálidas y que están expuestas a los factores micóticos.

Limitaciones de la Investigación

Al iniciar cualquier tipo de investigación se presentan algunas limitaciones que obstaculizan el progreso óptimo de la misma, la disponibilidad de trabajos previos, teorías específicas sobre el problema de investigación, recursos económicos, entre otros (Hurtado, 2010). En esta investigación consideramos las siguientes limitaciones: escasa información sobre la actividad antifúngica de la especie vegetal *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., costos elevados de materiales y reactivos para la elaboración de la parte experimental. Así mismo las fallas constantes de la electricidad y del agua en el laboratorio, internet, transporte, así como la dificultad para la recolección del material vegetal. Equipos dañados que limitan para alcanzar el objetivo de esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Fiallos y Moncayo, (2022). Realizaron un trabajo de investigación titulada: Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta *Chuquiragua* (*Chuquiraga jussieu*i J.F. GME). Se enfocaron en la búsqueda de sustancias bioactivas principalmente derivadas de plantas como una alternativa viable en las últimas décadas. Dicha investigación tuvo como objetivo conocer el rendimiento, la composición fitoquimica y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de especie la *Chuquiraga jussieui*. Para este propósito, los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger. Por lo que obtuvieron un rendimiento de 0,0074 % (p/v) se obtuvo de la relación peso del aceite esencial obtenido y peso de la materia prima fresca utilizada.

www.bdigital.ula.ve

Los compuestos fitoquímicos se identificaron por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) encontrándose 73 componentes, los mayoritarios fueron*:* espatulenol (3,8%), *α*-terpineol (3,0%), linalol (2,8%), y óxido de cariofileno (1,7%). La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó adaptando el método de difusión en medio sólido estableciendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Microbiana (CMM). Para ello, utilizaron concentraciones del aceite esencial de 1,0 mg/mL a 24,0 mg/mL, pero el más significativo fue la concentración de 24,0 mg/mL, los cuales arrojó los siguientes resultados, para las cepas de *Escherichia coli, Salmonella entérica*, *Pseudomona aeruginosa* se obtuvieron halos de 27,2 mm siendo el aceite esencial activo frente a estos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

microorganismo y halos de 24,2 mm que demuestra sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus y Candida albicans* (CMI > 30 µL/mL y CMM > 2400).

Cicció y Chaverri, (2022). Realizaron una investigación titulada, Composición química de los aceites esenciales de *Dahlia imperialis* (Asteraceae) de crecimiento silvestre en Costa Rica. El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la composición química de los aceites esenciales de hojuelas e inflorescencias de *D. imperialis* especie silvestre en Costa Rica. La extracción del aceite se efectuó por hidrodestilación con un equipo Clevenger modificado. La Composición Química del aceite se analizó mediante las técnicas de Cromatografía Gaseoso-Líquida con Detector de Ionización de Llama (CG-DIL) y de Cromatografía Gaseoso-Líquida acoplada a un Espectrometría Masas (CG-EM). Se utilizaron índices de retención obtenidos en una columna capilar tipo DB-5 y se compararon con los patrones de fragmentación de masas.

www.bdigital.ula.ve

Sin embargo, se identificaron un total de 131 compuestos, correspondientes a 96,5-99,3 % de los constituyentes totales. Con la realización de este estudio se confirmó que los componentes mayoritarios del aceite de los foliolos fueron *β*-pineno (35,2 %), *α*-felandreno (21,9 %), *α*-pineno (18.0 %), *p*-cimeno (8,3 %), limoneno (4,3 %) y *γ*-muuroleno (3,9 %). Y los componentes mayoritarios del aceite de los capítulos florales fueron *β*-pineno (27,7 %), *α*-felandreno (26,2 %), *α*-pineno (12,4 %), *β*-felandreno (6,6 %), limoneno (5,6 %), *β*-ocimeno (2,9 %) y Germacreno-D (2,2 %). Este es el primer informe acerca de la composición química de aceites esenciales de *D. imperialis.*

Hernández y Moncayo, (2022). Presentaron un trabajo de investigación titulado: “Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de diente de león (*Taraxacum officinale*) frente a microorganismos patógenos”, cuyo objetivo fue determinar la composición química del aceite esencial de las hojas de *Taraxacum officinale* de la familia Asteraceae y su

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

actividad antimicrobiana frente a microorganismos de las especies *Staphylococcus aureus, Eschericia coli y Candida albicans.* Como resultado del proceso de extracción del aceite esencial, se identificaron 17 compuestos, que representaron el 89,97 % de la masa total. El análisis fue realizado por el método de Cromatografía de Gases acoplada a una Espectrometría de Masas (CG/EM), de los cuales, los principales componentes químicos del aceite esencial del diente de león fueron: el germanicol (34,84 %); oleanonato de metilo (16,21 %); Taraxasterol (11,49 %); Genistina (1,51 %); *α*-amirina (1,48 %); Faradiol (1,38 %), entre otros.

Con respecto a la evaluación de la actividad antimicrobiana, utilizaron la concentración en un 100 % del aceite esencial de las hojas de *Taraxacum officinale*, por el método de difusión en medio sólido, por lo tanto, se obtuvo para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 un halo de inhibición de 10 mm, siendo resistente. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un halo de inhibición de 32,00 mm, siendo sensible al aceite esencial de la especie. Y *Cándida albicans* ATCC 90028 presentó un halo de inhibición 18,58 mm teniendo sensibilidad intermedia. Todos los resultados se compararon con datos preparados a partir del patrón de halo de inhibición estándar para *Candida albicans* en el manual de procedimientos antimicrobianos donde especifica que, resistente: < 14 mm; intermedia: 15-18 mm y sensible: > 19 mm y para las bacterias *Staphylococcus aureus y Eschericia coli*: resistente <15 mm, intermedia: 16-20 mm y sensible: > 21 mm.

www.bdigital.ula.ve

Araujo, Vimos, Cruz, Falconí, Rojas y González, (2020). Realizaron una investigación titulada, Componentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) que crece en Ecuador. El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la composición química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* Schltdl. (Asteraceae) colectada en la provincia de Chimborazo, Ecuador. Las hojas de *L. ovatus* fueron sometidas a hidrodestilación para obtener el aceite esencial,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

el cual, fue analizado mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. La actividad fue evaluada frente a cinco bacterias y una levadura usando la técnica de microdilución en caldo en microplacas de 96 pozos. En cuanto a los resultados obtuvieron que el rendimiento del aceite fue de 0,05 % e identificaron 27 compuestos representando 95,45 % de la composición total con un elevado contenido de monoterpenos oxigenados (52,17 %).

Por lo tanto, los compuestos mayoritarios fueron monoterpenos oxigenados representado por el alcanfor (40,48 %) y monoterpenos hidrocarburos tales como el 1,2,5,5-tetrametil-1,3-ciclopentadieno (11,90 %), seguido por *p*-menta-1,5-dien-8-ol (5,23 %) y 1,6-dimetilhepta-1,3,5-trieno (4,69 %). Las bacterias más sensibles a la acción del aceite fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 con concentraciones mínimas inhibitorias de 200-400 µg/mL y bactericidas de 800 µg/mL. La inhibición antimicrobiana frente a las bacterias *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 fue baja, con un rango de concentración mínima inhibitoria de 800 a 6400 µg/ mL. Este reporte representa un primer análisis de la actividad antimicrobiana del aceite de *L. ovatus*, por lo tanto, una contribución importante al estudio del género *Lasiocephalus.*

www.bdigital.ula.ve

En el 2020, Mattos y Collantes realizaron un proyecto de investigación llamado: “Variación estacional de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Ophryosporus peruvianus”,* esta planta pertenece a la familia Asteraceae, el cual, fue obtenido por hidrodestilación y analizado por Cromatografía Gases acoplado a Espectrómetro de Masas. Fueron identificados 89 componentes del aceite esencial entre monoterpenos, sesquiterpénicos, diterpenos, entre otros. De los cuales, los componentes mayoritarios fueron los hidrocarburos *β*-cariofileno (12,45-15,53 %), (Z)-*β*-

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

farneseno (13,61-17,36 %) y *β*-sesquifelandreno (9,73-16,25 %) que estuvieron presentes en todas las muestras de los 5 meses de colecta desde diciembre hasta abril.

En el mes de diciembre fue la primera colecta donde el *β*-sesquifelandreno es el componente mayoritario (16,25 %), el segundo y tercer mes de colecta correspondiente a enero y febrero: se observó (Z)-*β*-farneseno como el mayoritario (17,36 %). Por último, en marzo y abril de colecta fue el *β*-cariofileno (15,53 %) el de mayor porcentaje. El Germacreno D no estuvo presente en el mes de enero, pero en los otros meses si estuvo presente y representó el 4,4 % en menor proporción. El *γ*-curcumeno y *α*-vetivono, están presentes todos los meses de colecta y en menor cantidad (1,49 % y 1,54 %, respectivamente).

Aparicio, †Rojas, Velasco, Usubillaga, Sosa y Rojas. En el 2019, realizaron una investigación titulada: “Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius (*Asteraceae*)*” El aceite esencial de las hojas frescas de *L. neriifolius* (B. ex H) Ernst., fue obtenido por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, obteniendo 1,8 mL (rendimiento 0,87 %). El aceite esencial se caracterizó por el método de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM), identificando como compuestos principales *β*-felandreno (29,04 %), *α*-felandreno (19,86 %), *α*-pineno (13,57 %) y *α*-tujeno (12,35 %). La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con discos, frente a bacterias y levaduras de referencia internacional (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* CDC-B385 y *Candida krusei* ATCC 6258). Como resultado, se obtuvo que el aceite esencial inhibió el desarrollo de *S. aureus* con un halo de inhibición de 10 mm y un valor de CIM de 50 µL/mL; para *Candida albicans* 8 mm y CIM de

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

700 µL/mL y *Candida krusei* obtuvo un halo de inhibición de 10 mm de 500 µL/mL respectivamente. Este es el primer reporte sobre actividad antimicrobiana para *L. neriifolius.*

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

Historia de Productos Naturales

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza, en muchos casos. El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como la astronomía, la química y la medicina. En los últimos años, se ha utilizado los productos naturales, como plantas, insectos, organismos marinos y terrestres, se han identificado una serie de moléculas con actividad contra diferentes géneros y especies de hongos de importancia clínica para los humanos, convirtiéndose en la alternativa para el desarrollo y la formulación de nuevos fármacos antimicóticos con menores efectos secundarios, mayor espectro de acción y menor costo que los disponibles actualmente para el tratamiento de las infecciones por hongos (Cortez, Macedo y Hernández, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Origen de la Medicina Natural

El ser humano desde su origen tuvo que aprender a cazar, vestirse y curarse para buscar la consecución de su bienestar desde una perspectiva “espiritual o científica”. Esta tendencia en el ser humano, está presente en todo momento y donde ha existido alguna sociedad, por primitiva que ésta parezca. Estas sociedades practicaban de manera empírica y a base de prueba y error

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

muchas de las disciplinas científicas actuales. Fueron “arquitectos” al construir chozas, “físicos” al dominar el fuego y “médicos” al curar los diversos males que les aquejaban. Este último aspecto llevó al desarrollo de la medicina actual (Cortez y cols., 2004).

Probablemente, algunos de nuestros antepasados al sentirse enfermo imitaron esa conducta del animal y sanó en el mejor de los casos, por medio del ensayo y error, además de su condición de nómada recolector fue seleccionando vegetales o animales que tenían la propiedad de sanar o mitigar el dolor, pero también de sustancias tóxicas que le podían producir alucinaciones o incluso la muerte. Estas últimas sustancias derivadas de plantas o animales ponzoñosos les fueron sin duda también útiles para la caza de animales o en sus conflictos tribales (Cortez y cols., 2004).

Los ideogramas sumerios, datados aproximadamente 2500 años a.C., mencionan ya varias “medicinas” de origen vegetal. Los formularios terapéuticos mesopotámicos son conocidos en la actualidad gracias a las tablillas en escritura cuneiforme con listas de drogas cuidadosamente redactadas en tiempos de los sumerios. Estos formularios reunían aproximadamente unas 250 plantas, 120 substancias minerales y 180 remedios de origen animal (algunos de ellos todavía sin identificar) que poseían propiedades medicinales. Quizás uno de los primeros documentos detallados es el Códice de Hammurabi, rey de Babilonia (1730 – 1685 a.C.), el cual contiene numerosas referencias sobre el uso de plantas curativas que hasta nuestros días siguen siendo utilizadas (Lezaeta, 2010).

www.bdigital.ula.ve

La medicina babilónica empleaba sustancias principalmente de origen vegetal. Muestra de ello son los jardines construidos en el reinado de Mardukapalidine II (772-710 a.C.), donde se cultivaban alrededor de 64 especies de plantas con propiedades medicinales, entre las que destacan algunas que siguen siendo útiles hasta nuestros días como el beleño, el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

eléboro, la mandrágora, el cáñamo y la adormidera, entre otras (Cortez y cols., 2004).

La cultura china tuvo un gran auge en el estudio de las plantas, animales y minerales con fines terapéuticos. Esos conocimientos fueron plasmados en compendios de los cuales el más importante es el llamado Pen tsao kang mou, escrito en el año 2697 a.C durante el reinado del emperador Shen Nung. En él se describen aproximadamente 8160 formulaciones medicinales, algunas de ellas son estudiadas en nuestros días mientras que otras no pudieron evadir el matiz mágico y carecen de un sustento científico. A pesar de esto, los chinos con su gran capacidad de observación aportaron diversos conocimientos enfocados a curar sus enfermedades. Su medicina tradicional era muy variada, lo que se puede apreciar nuestros días. El uso de las hierbas y del té medicinal chino sigue vigente, así como diversas técnicas curativas como la acupuntura, utilizada como tratamiento para diferentes dolencias, controlar el estrés y la obesidad. También aportaron a la medicina el alcanfor, la efedrina, el ginseng y el látex de opio. Este último se usó como remedio para la disentería y en la medicina moderna se utiliza como calmante, somnífero y analgésico, junto con otros alcaloides como la morfina y la papaverina (Cortez y cols., 2004).

www.bdigital.ula.ve

Por otro lado, la medicina hindú se basó principalmente en el uso de las plantas. Los hindúes tenían un gran progreso en cuanto a cirugía se refiere, por ello muchas de las plantas que utilizaron poseían propiedades anestésicas o narcóticas, como la marihuana (*Cannabis sativa*). Además, desarrollaron antídotos contra la mordedura de serpientes venenosas y fueron de los primeros en utilizar presentaciones farmacéuticas como ungüentos, infusiones, maceraciones y electuarios (medicamentos con la consistencia de la miel). Se sabe que las plantas tropicales son las que poseen una mayor cantidad de principios activos. Una característica importante es que los hindúes manejaban un sistema de recolección que, aunque poseía un carácter mayormente ceremonial también tenía datos que se justifican científicamente;

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

por ejemplo, algunas plantas debían recolectarse frescas por la mañana o por la noche, esto se explica debido a que hay plantas que poseen una mayor concentración de principios activos a determinadas horas del día. Asimismo, las colectas no debían realizarse en lugares cercanos a un cementerio o a aguas contaminadas, debido a que podrían originar otras enfermedades por la proliferación de bacterias u otros microorganismos patógenos que no se eliminaban al ser preparadas (Cortez y cols., 2004).

Los árabes, por su lado, fundaron su propia escuela donde estudiaban botánica y química, surgiendo entonces la alquimia gracias a las técnicas avanzadas de laboratorio que ellos mismos establecieron. Los árabes fueron de los primeros en legislar la profesión farmacéutica, de donde derivaron Farmacognosia: historia y su relación con las ciencias médicas. Sus formulaciones médicas que incluían, entre otras, bebidas fermentadas, jarabes, extractos en alcohol y agua destilada. Lo anterior impulsó, en parte, el desarrollo de la farmacognosia al establecer métodos y técnicas químicas de laboratorio que ayudaron a estudiar las propiedades medicinales de las plantas y animales desde una perspectiva estructurada que posteriormente se convirtió en científica (Cower, y Helfand, 1990; Lezaeta, 2010).

www.bdigital.ula.ve

En cambio, los egipcios fueron de los primeros en dedicarse a estudiar las diversas enfermedades que los aquejaban, por qué sanaban y por qué morían. Los egipcios clasificaron a aquellas plantas y animales que tenían el poder de curar, enfermar o matar. El uso de plantas, tejidos animales y minerales mezclados en cantidades rigurosas y complejas fueron la base de sus farmacopeas; aunque muchas de esas recetas se centraban más en el plano mágico. Parte de esos conocimientos quedaron plasmados en grandes compendios que en la actualidad conocemos como papiros. Estos escritos, en la mayoría de los casos, llevan el nombre de sus descubridores, del lugar de su descubrimiento o de los museos en los que se encuentran depositados. Hoy en día los papiros constituyen uno de los principales legados de los egipcios y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

su interpretación es fuente importante de conocimiento sobre su cultura. Son diez papiros encontrados y descifrados en los que se habla de la elaboración de recetas médicas y fórmulas mágicas, otros se refieren a temas específicos como la obstetricia y la ginecología; en tanto que otros describen los conocimientos angiológicos (Cower, y Helfand, 1990; Lezaeta, 2010).

En América, la herbolaria indígena precolombina jugó un papel importante en el campo de la medicina debido a que el uso de las plantas medicinales y otros productos de origen natural tenía ya una historia de por lo menos 3500 años. Aunque estudios recientes de la paleobotánica han comprobado la existencia de una historia de más de 4000 años de antigüedad detectada en algunos vestigios de tejidos vegetales y polen petrificado encontrados en las excavaciones en zonas arqueológicas de América que sugieren el uso de especies vegetales que aún en la actualidad son perfectamente conocidas y utilizadas en la medicina tradicional (Cortez y cols., 2004).

www.bdigital.ula.ve

Historia del descubrimiento del género *Ruilopezia*

En la actualidad se están descubriendo nuevas especies y la clasificación de algunos géneros aún no es concluyente. El Dr. José Cuatrecasas (1903-1996), destacado botánico español, dedicó casi 60 años al estudio de este grupo y publicó siete géneros en 1976: *Carramboa* Cuatrec., *Coespeletia* Cuatrec., *Espeletia* Mutis ex Humb. & Bonpl., *Espeletiopsis* Cuatrec., *Libanothamnus* Ernst, *Ruilopezia* Cuatrec. Y *Tamania* Cuatrec. (Cuatrecasas 1976). El octavo género, *Paramiflos* Cuatrec., se añadió casi 20 años después (Cuatrecasas 1995).

Para el género *Ruilopezia*, su nombre proviene de la colaboración del dúo Ruiz Terán y López Figueiras, compañeros de investigación del Dr. José Cuatrecasas. Ese género posee varias especies en las que destacan, la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ruilopezia atropurpurea (A.C.Sm.) Cuatrec. (anteriormente *Espeletia atropurpurea*) y la *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec el cual, es el objeto de estudio en esta investigación. La abreviatura «S.F. Blake» se emplea para indicar a Sidney Fay Blake como autoridad en la descripción y clasificación científica de las plantas.

Bases Teóricas

Familia Asteraceas

La familia Asteraceae (Compositae), se encuentra dentro del orden Asterales, es un grupo cosmopolita, del que se reportan 1314-1500 géneros y 20000-23000 especies. Las especies presentan adaptaciones a diversos ambientes, incluyendo los páramos. En Venezuela, Asteraceae es la tercera familia de Angiospermas más diversa, después de Orchidaceae y Fabaceae. (Badillo, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Adicionalmente se ha introducido 30 especies más, por lo cual, la mayoría de las especies se concentran en los páramos y subpáramos, donde no sólo son abundantes, sino que presentan un alto endemismo tanto a nivel de géneros como de especies. Son en su mayoría hierbas anuales o vivaces, aunque también podemos encontrar arbustos y árboles. Por su estructura florar y por su composición química, se considera la familia más evolucionada de todas las dicotiledóneas (Aristeguieta, 1964).

Distribución y características de la Familia Asteraceae

De todas las especies angiospermas (plantas con flores), la familia de las Asteraceae (anteriormente llamadas Compositae) es la más grande, son plantas vascuales y ha sido objeto de numerosos estudios. Esta familia está

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

repartida por toda la tierra desde las regiones polares hasta los trópicos, su distribución es cosmopolita excepto en la región Antártica. En Venezuela se conocen cerca de 760 géneros y 210 especies (Badillo, 1997).

Las características botánicas de esta familia son las siguientes: Las hojas son simples o compuestas y se disponen en el tallo de forma generalmente alterna o en roseta, aunque hay representantes con las hojas opuestas. Como mecanismo de defensa a los herbívoros, algunas especies desarrollan espinas en el tallo, hojas o brácteas del involucro plantas herbáceas anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles. Se caracterizan por presentar las flores agrupadas en capítulos, inflorescencia que funcionalmente se comporta como una flor. Hojas sin estípulas, generalmente alternas, en ocasiones en roseta basal; pueden presentar espinas, ver figura 1 (Badillo, 1997).

www.bdigital.ula.ve

- Las especies son generalmente plantas herbáceas, arbustos o menos frecuentemente árboles.
- Las inflorescencias son en capítulos que consiste en una estructura ensanchada (receptáculo) donde se sitúan desde una a cientos de flores, rodeada por las brácteas del involucro. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores. Es la característica principal de estas plantas.
- Las flores son pentámeras. La fórmula floral es 5-5-5-2, lo que quiere decir 5 sépalos que forman el cáliz, 5 pétalos que forman la corola, 5 estambres y 2 carpelos. Pueden ser hermafroditas (tanto flores tubulosas como liguladas), unisexuales (algunas flores liguladas son femeninas y otras tubulosas son funcionalmente masculinas), o incluso estériles (flores tubulosas como flores liguladas), coexistiendo con flores fértiles.
- Los estambres aparecen en número cinco, con filamentos generalmente libres y anteras alargadas y soldadas formando un tubo.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- La corola esta soldada, sea en forma de tubo (flores tubuladas) o en forma de lengüeta dirigidas al exterior (flores linguales). La corola se compone de 5 pétalos soldados y puede ser de dos tipos: tubulosa con cinco lóbulos (actinomorfa) o ligulada, formando una única estructura aplanada y alargada con tres o cinco lóbulos (cigomorfa).
- Cáliz ausente o transformado en un vilano de pelos, setas, escamas o corona.
- Las anteras están soldadas y forman un tubo alrededor del estilo.
- El pistilo comprende un estilo terminal con dos estigmas y un ovario ínfero onilocular y oniovulado.
- El fruto se denomina aquenio es un fruto seco, acompañado del vilano que son pelos vilano permite la dispersión del aquenio, bien a través de las corrientes de aire, bien porque se engancha en el pelaje o superficie de los animales. Ciertas especies poseen canales y pelos secretores, otras especies tienen canales lactíferos (Badillo, 1997)

www.bdigital.ula.ve

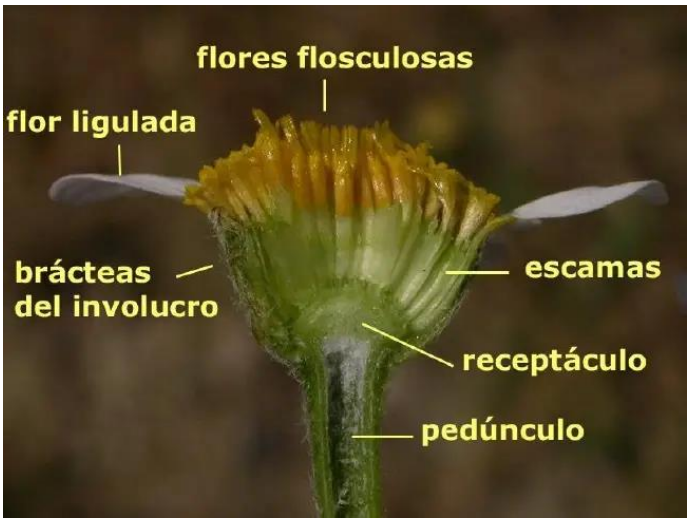


Figura 1: Características botánicas de la Familia Asteraceas (Izco, 2004).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Clasificación taxonómica de la Familia Asteraceae

Fue a principios del siglo XIX cuando la familia Asteraceae se clasificó botánicamente por primera vez por Henri Cassini, un botánico francés, describió la mayoría de las tribus reconocidas, así como numerosos géneros. El primer ensayo sobre Asteraceae fue escrito por Lessing y publicado en 1832. Más tarde, un botánico diferente llamado Candolle creó su propia clasificación en 1836. Luego, en 1873, Bentham desarrolló una clasificación que era muy similar a la de Cassini, que Hoffman adoptó en 1890 luego de hacer algunos cambios. Durante los siguientes 100 años la clasificación de Hoffman de las Asteraceae se consideró correcta y dividió a la familia en trece tribus y dos subfamilias: Tubuliflorae y Linguliflorae (Heywood, 1977).

La clasificación ha sufrido otro cambio en los últimos 20 años, luego de una extensa investigación realizada por Cronquist (1955) y Jeffrey (1978) la descripción actual es la siguiente, pertenece al Reino: Plantae; Subreino: Tracheophyta; División: Angiospermae; Clase: Eudicotyledoneae; Orden: Asterales; incluyen tres subfamilias, Asterideae, Cichorioideae y Barnadesioideae, y 17 tribus (Panero y Funk, 2002).

www.bdigital.ula.ve

De los cuales, solo trece tribus han sido reconocidas en Venezuela (Badillo, 2001). La familia Asteraceae comprende la tribu Heliantheae, es la tribu más primitiva y diversificada. Dentro de ellas, se subclasifican por el número de subtribus. En Venezuela la subtribu Espeletiinae es la más representativa de la flora de los páramos andinos. Dichas especies poseen respuestas a cambios ambientales, algunas modificaciones morfológicas pueden explicarse por mutación, aislamiento y adaptación ecológica, así como a las variaciones del hábitat (Panero y Funk, 2002).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Importancia de la familia Asteraceae

Esta familia es notable en la agricultura (para el consumo humano y animal, como malezas, por sus propiedades tóxicas e insecticida), en jardinería (uso ornamental), en apicultura (donadoras de néctar y polen), en la industria alimentaria (aceites comestibles, especias), en la industria farmacéutica y cosmética (metabolitos secundarios con actividad biológica y aceites esenciales) y en la industria de madera para su recolección en leña y celulosa (Del Vitto y Petenatti, 2009).

La familia contiene un número importante de plantas de gran importancia a nivel económico estas plantas sirven de reserva de alimentos, como medicamento o materia prima para usos diversos (Heywood, 1977). Las Asteraceae están bien representadas en el mundo de las plantas medicinales (Farmacopea Herbolaría de los Estados Unidos Mexicano, 2021).

www.bdigital.ula.ve

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados en la familia Asteraceae

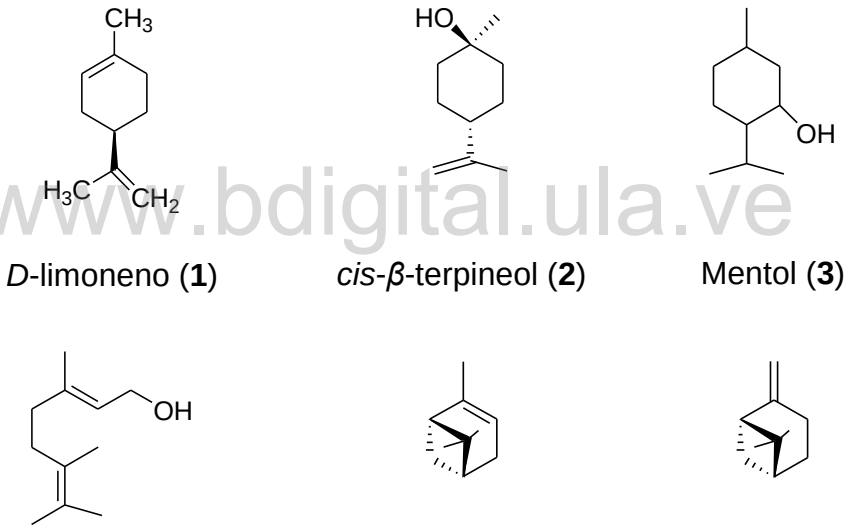
Las Asteraceas contienen algunos compuestos simples en los aceites esenciales, tales como, compuestos aromáticos terpenoides, monoterpenos sesquiterpenos y diterpenos. Sin embargo, en la familia Asteraceae no está presente iridoides (Heywood, 1977; Bruneton, 2011).

Terpenos: representan los metabolitos secundarios de las plantas, responsables del olor del vegetal. Son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. La diversidad de los metabolitos terpénicos naturales son las siguientes: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos; triterpenos presentes en aceites esenciales. Las sustancias

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, cetonas, ésteres, etc (Bruneton, 2011).

- Los monoterpenos: son compuestos pequeños y muy volátiles, están biosintetizados por la unión de dos moléculas de isopreno, unidas en estructuras de 10 carbonos. Se encuentran en los aceites esenciales de una gran variedad de plantas, a las que dan su olor y sabor característicos: *D*-limoneno (**1**), cis-*β*-terpineol (**2**), mentol (**3**), geraniol (**4**), *α* -pineno (**5**), *β*-pineno (**6**), entre otros. Ver figura 2 (Evans, 1991; Bruneton, 2011).



D-limoneno (**1**) *cis*-*β*-terpineol (**2**) Mentol (**3**)

Geraniol (**4**) *α*-pineno (**5**) *β*-pineno (**6**)

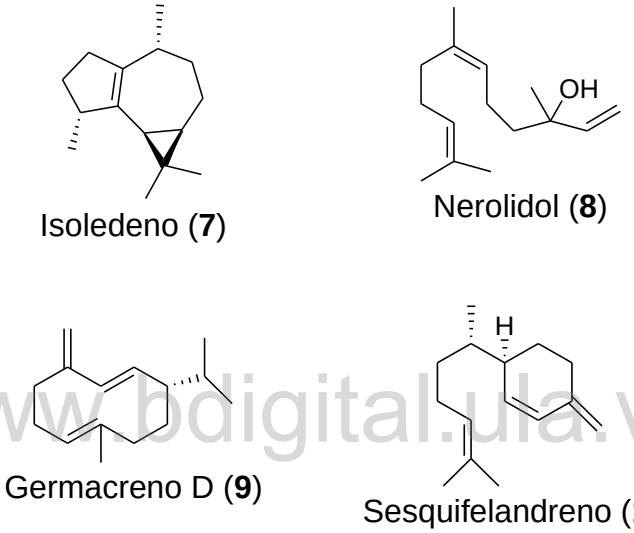
www.bdigital.ula.ve

Figura 2. Estructuras de algunos monoterpenos presentes en la familia Asteraceae. Tomado y modificado (Bruneton, 2011).

- Los sesquiterpenos: son los siguientes en orden creciente y están formados por la unión de tres moléculas de isopreno unidas en estructuras de 15 carbonos. Se distribuye mayormente en plantas superiores,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

mayormente en la familia Asteraceae. Hongos (Basidiomycetes), algas y organismos marinos. Gran número son constituyentes habituales de los aceites esenciales de vegetales superiores. Está representado por: Isoledeno (**7**), nerolidol (**8**), Germacreno D (**9**), *β*-sesquifelandreno (**10**), entre otros. Ver figura 3 (Evans, 1991; Bruneton, 2011).



Isoledeno (**7**) Nerolidol (**8**)

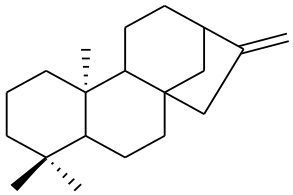
Germacreno D (**9**) Sesquifelandreno (**10**)

www.bdigital.ula.ve

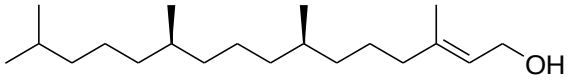
Figura 3. Estructuras de algunos sesquiterpenos presentes en la familia Asteraceae. Tomado y modificado de (Bruneton, 2011).

- Diterpenos: son característico por tener en su estructura cuatro isoprenos, constituidos por 20 carbonos. Dentro de este grupo de compuesto se encuentra el kaureno (**11**) y fitol (**12**) Ver figura 4, este último es un alcohol diterpénico acíclico que forma parte de la clorofila y es precursor de la vitamina A. Las vitaminas A, E y K también son diterpenos (Evans, 1991).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Kaureno (**11**)



Fitol (**12**)

Figura 4. Estructuras químicas de algunos diterpeno. Tomado y modificado de (Bruneton, 2011).

Usos etnobotánicos de la familia Asteraceae

Los usos etnobotánicos son todas aquellas aplicaciones que los seres humanos le brindan a las plantas para satisfacer sus necesidades. Las plantas de la familia Asterácea son usadas como fuente de alimento, medicina, colorante, ornamento, forraje, en control biológico, como fuente de caucho, madera y leña. Especialmente, utilizadas en el área alimenticia como la lechuga, alcachofa y el cardo. En aceites comestibles como el girasol. En la parte ornamental se utilizan las margaritas, dalia, caléndula y crisantemo. Algunas plantas de la familia Asteraceae son arvenses, como la *Conyza sonchus y Caléndula arvensis* (Funk, Sussana, Stuess y Bayer, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Actividades farmacológicas y/o biológicas de la familia Asteraceae

Usos medicinales: Estudios han mostrado el valioso uso terapéutico de muchas asteráceas. Algunas originan medicamentos industriales como la equinácea y la manzanilla. La Caléndula posee cerca de 97 aplicaciones medicinales; para el acné, contusiones, dermatosis, eccemas, dismenorrea, escaldaduras y otras. Por otro lado, la manzanilla tiene alrededor de 88

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aplicaciones medicinales; para las afecciones digestivas, alergias, asma, catarro, cistitis, dermatosis y náuseas (Stevens, 2012).

Cosmética: los aceites esenciales se aplican en la cosmética y algunas de las plantas de la familia asteráceas son materia prima para su elaboración, por ejemplo, la caléndula, el diente de león, la manzanilla (Evans, 1991).

Antioxidantes: debido a que muchas plantas de la familia Asteraceae contiene flavonoides. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres (Evans, 1991).

Edulcorantes: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) es una planta originaria de Paraguay y actualmente cultivada en cierta escala para la obtención de un glicósido diterpénico, el esteviósido, una sustancia 300 veces más dulce que la sacarosa y sólo 20 % menos dulce que la sacarina (Wagner, 1977) y su empleo se ha ido incrementando, sobre todo por la toxicidad de algunos edulcorantes artificiales, integrándoselo a alimentos funcionales (Madrigal y Sangronis, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Hortalizas: La especie más consumida es la lechuga, aunque otras de poco consumo son la escarola, la endivia y la achicoria. Otras especies tienen potencial como hortaliza de hoja, pero, por sus principios amargos, inducen a una baja palatabilidad; por ejemplo, el diente de león, la lechuguilla, la lechuga de cabro y la *Pacourina edulis* (Stevens, 2012).

Con Principios Amargos: Las sustancias amargas en Asteraceae se han utilizado como estimulantes del apetito y como digestivos. Se han empleado la gavilana, *Artemisia absinthium* L. (ajenjo) y *Centaurea benedicta* L., han alcanzado importancia por este motivo en farmacia e industria alimentaria. El ajenjo, debe su sabor a lactonas sesquiterpénicas, por lo cual es empleado para elaborar bases de licores aperitivos como “vermouth”; en cuanto a *Centaurea benedicta* anteriormente denominada *Cnicus benedictus*, contiene una lactona sesquiterpénica de tipo Germacreno esterificada llamada

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

cnicina, ésta le confiere un sabor amargo menos intenso; ambas especies son usadas en la industria farmacéutica como estimulantes del apetito (aperitivos) y digestivos (Wagner, 1977).

Género *Ruilopezia*

Aspectos botánicos y distribución geográfica del Género *Ruilopezia*

Este género posee las siguientes características que las distinguen de los demás géneros, tales como: Disposición foliar espiralaza, aquenios obpiramidales o prismáticos (trígono o tetrágono), lisos (no estriados), con subepidermis carbonosa, glabros y sin vilano (calvos), excepto en un caso, formado por tres escamas. Número cromosómico básico n = 19, flores marginales del capítulo femeninas, fértiles y flores del disco seudohermafrodita, funcionalmente masculinas, plantas básicamente leñosas, vegetativamente monopodiales, conductos resiníferos generalizados excepto en el leño, especialmente ricos en compuestos diterpenoides tetracíclicos de estructura molecular kauranoide (Cuatrecasas, 1976).

www.bdigital.ula.ve

Este género es quizá el menos conocido taxonómicamente, ya que tiene numerosas especies recientemente descubiertas y las antiguas fueron solo parcialmente descritas. Del género *Ruilopezia* se reconocen en el presente 24 especies distribuidas en los Andes de Venezuela desde el extremo suroeste, en la vertiente oriental del páramo Tama (Cuenca del Oirá), hasta el extremo oriental de la cordillera en las sierras de Barbacoa y Nepes (Trujillo–Lara). De las 24 especies de *Ruilopezia* (ver tabla 1), once ya fueron nominalmente conocidas y publicadas anteriormente como Espeletia. Es importante decir, que el género *Ruilopezia*, tiene un corto período de floración y algunas dejan de florecer durante años, algunas de ellas producen inflorescencias (Cuatrecasas, 1976).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El género *Ruilopezia* tiene las siguientes características: caulirosula monocárpica simple o ligera. Posee un biotipo de caulirrósula semélpara y se llaman también “frailejones” que es un rosetón generalmente grande de hojas gruesas cubiertas por espeso indumento blanco; el rosetón está sostenido por un largo tronco, a modo de una palmita; algunas veces el tronco es corto y el rosetón sésil o subsésil. Los tallos están densamente cubiertos de hojas marchitas, ver figura 5. Hojas coriáceas, flexibles o rígidas, densamente humedecidas. En todo caso, los frailejones constituyen un elemento fisionómico típico del paisaje de las regiones que habitan, que son los páramos, las partes más altas y despejadas de Los Andes septentrionales, zona en que dan lugar a extensas formaciones gregarias llamadas frailejones (Cuatrecasas, 1996).

www.bdigital.ula.ve

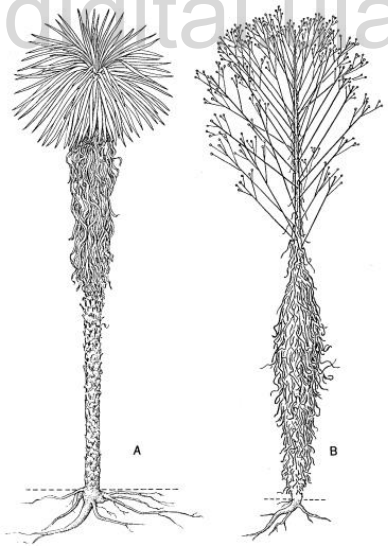


Figura 5. Morfología general del género *Ruilopezia***.** A) Caulirrósulas monocárpica de *Ruilopezia figueirasii* en estado vegetativo 2 metros de alto. B) misma especie en estado frutífero, ejemplar de 3 metros de altura. Tomado y modificado de (Cuatrecasas, 1987).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 1. Clasificación y Distribución geográfica del género *Ruilopezia* entre Colombia, Ecuador y Venezuela.

Especies	Colombia	Ecuador	Venezuela
Ruilopezia atropurpurea			X
Ruilopezia bracteosa			X
Ruilopezia bromelioides			X
Ruilopezia cardonae	X		X
Ruilopezia coloradarum			X
Ruilopezia cuatrecasasii			X
Ruilopezia emmanuelis			X
Ruilopezia figueirasii			X
Ruilopezia floccosa			X
Ruilopezia grisea			X
Ruilopezia hanburyana			X
Ruilopezia jabonensis			X
Ruilopezia jahnii			X
Ruilopezia josephensis			X
Ruilopezia leucactina			X
Ruilopezia lindenii			X
Ruilopezia lopez-palacii			X
Ruilopezia marcescens			X
Ruilopezia margarita			X
Ruilopezia paltonioides			X
Ruilopezia ruizii			X
Ruilopezia usubillagae			X
Ruilopezia vergarae			X
Ruilopezia viridis			X
Total de especies:			24

Tomado y modificado de (Diazgranados, 2013).

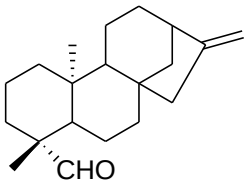
www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados del género *Ruilopezia*

El género *Ruilopezia* Cuatrec., posee en sus conductos resiníferos (canales esquizógenos y células) generalizados excepto en el leño, especialmente ricos en compuestos diterpenoides tetracíclicos de estructura molecular kauranoide. Cuatrecasas (1987). Los diterpenos son terpenos de 20 carbonos. Se encuentran en las plantas superiores, hongos, insectos y seres marinos, algunos tienen como estructuras base el kaurenal (**13**) (posee un grupo carbonilo) Ver figura 6. Los diterpenos de dicha base, poseen propiedades farmacológicas y biológicas (Aparicio, Romero, Rojas, Khouri y Usubillaga, 2001). También se encuentran monoterpenos tales como Sabinene, β–Ocimene, mirtenol y 1,8-cineol. Además, de sesquiterpenos 7-epi-α-Selinene, Germacrene-B, silfiperfol-6-eno, silfiperfol-6-en-5-ona, α-Amorfeno (Alarcón, Peña, Velasco, Baptista, Rojas, Aparicio y Usubillaga, 2015; Pérez, Rojas y Aparicio, 2017; Aparicio y cols., 2001).

www.bdigital.ula.ve



Kaurenal (**13**)

Figura 6. Algunas estructuras del género *Ruilopezia*
Tomado y modificado de (Gonzaga, Costa y Geraldo, 2005).

Usos etnobotánicos y farmacológicos del Género *Ruilopezia*

Dicho género es utilizado para estudios de investigación, forman parte del ecosistema del páramo. Son plantas pertenecientes a los frailejones pueden ser aprovechados para usos medicinales, aceites esenciales, en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

infusiones, jarabes para aliviar la tos, enfermedades pulmonares, combatir el asma, entre otros. La resina de estas plantas se utiliza para encuadernar y también en construcciones (Naranjo, 2010).

Especie *Ruilopezia marcescens*

Será objeto de estudio en esta investigación, es una de las 24 especies del género *Ruilopezia,* esta es la menos conocida taxonómicamente, se ubica en zonas frías y de gran altitud, en Venezuela se encuentra entre los estados Táchira y Mérida, ver figura 7 (Cuatrecasas, 1987).

Clasificación taxonómica de *Ruilopezia marcescens*

www.bdigital.ula.ve

- **Reino**: Plantae
- **División**: Magnoliophyta
- **Clase**: Magnoliopsida
- **Orden**: Asterales
- **Familia**: Asteraceae.
- **Subfamilia**: Asteroideae
- **Tribu**: Heliantheae.
- **Subtribu**: Espeletiinae.
- **Género**: *Ruilopezia*
- **Especie**: *marcescens*

Tomado y modificado de (Gonzaga, Costa y Geraldo, 2005).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 7. Clasificación taxonómica de *Ruilopezia marcescens.* Tomado y modificado de (Cuatrecasas, 1987).

La especie de estudio *Ruilopezia marcescens* tiene las siguientes características macroscópicas:

www.bdigital.ula.ve

• La vaina abaxial de las hojas está cubierta de pelos planos o subplanos (1-2 mm), sobre las abundantes nervaduras, llanuras verdes lisas, dispersas o densas; nervios secundarios en ángulos de 70-85°. Los ejes y ramas de la inflorescencia son de color verde velloso. Pedicelos peludos y escasamente glandulares, placas ovadas subyacentes u hojas ovadas y acuminadas.

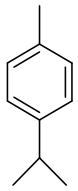
• Vaina de las hojas sin florescencia corta. Capítulos de 14 a 20 mm de diámetro, círculo de lígulas de 30 a 45 mm, disco de 14 a 20 mm diámetros., filarios externos 30-15 x 16-7 mm anchamente ovados reticulados-venosos.

• Corola radios blanco 12-17 mm, tubo de 1,5-2,5 mm grueso y cónico subagudo. Corolas del disco ante pálido de 6-8 mm de largo, lóbulos escasamente peludos en el ápice (Cuatrecasas, 1987).

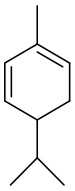
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Metabolitos secundarios aislados de *Ruilopezia marcescens*

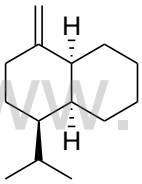
La especie *Ruilopezia marcescens,* posee monoterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos hidrocarbonados y diterpenos, en las cuales está presente, el Germacreno D (**9**), el *α*-pineno (**5**), *p*-cimeno (**14**), *α*-felandreno (**15**), *δ*-amorfeno (**16**), *Trans*-*α*-bergamoteno (**17**) y el Kaurenal (**4**) Ver figuras 9 (Aparicio y cols., 2001).



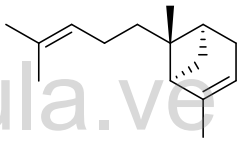
p-cimeno (**14**)



α-felandreno (**15**)



γ-Amorfeno (**16**)



Trans-*α*-bergamoteno (**17**)

www.bdigital.ula.ve

Figura 8. Algunas estructuras químicas de la especie *Ruilopezia marcescens*. Tomado y modificado (Aparicio y cols., 2018).

Actividades farmacológicas y/o biológicas de *Ruilopezia marcescens*

Las hojas de la planta *Ruilopezia marcescens* se utilizan como emplasto para tratar el reumatismo, inflamaciones, así como en infusiones para bronquitis y como sudoríficos (Aparicio y cols., 2001). También posee una importante función, como efecto repulsivo contra herbívoros, además de ejercer actividad insecticida contra mosquitos, así como efecto repelente

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

contra garrapatas, atribuido al metabolito secundario Germacreno D (Kiran y Devi, 2007; Bruce y cols., 2005; Birkett y cols., 2008; Bruzual y cols., 2015).

Productos Naturales

Definición de los Productos Naturales

Los productos naturales son compuestos orgánicos, sustancias derivadas del metabolismo secundario de los organismos vivos, las cuales generalmente participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia. De ahí que también se les denomine “metabolitos secundarios”. Estas sustancias no están involucradas en el metabolismo “basal” o primario, en el cual se involucran azúcares, lípidos, proteínas y glicéridos, entre otras sustancias (Pietra, 2002).

www.bdigital.ula.ve

En otras palabras, es un compuesto químico producido por un organismo vivo en la naturaleza, puede ser un compuesto orgánico, aislado por la mano del hombre, que es originado por un proceso metabólico primario o secundario. Se estima que varios cientos de miles de productos naturales y biomoléculas han sido aislados y caracterizados a partir de plantas, hongos, organismos marinos y líquenes, entre otros. Sólo a partir de plantas se han aislado y caracterizado más de 110 mil metabolitos secundarios, y se estima que quedan varios millones de sustancias por descubrir, ya que sólo se ha analizado una ínfima parte de las fuentes naturales disponibles (Pietra, 2002).

Clasificación de los Productos Naturales

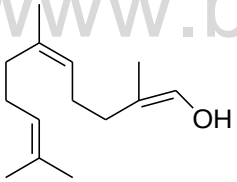
Los productos naturales se clasifican desacuerdo al tipo de estructura química. Así tendremos diferentes clases:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

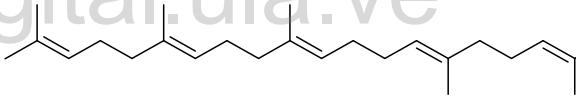
- Clase 1: Compuestos grasos o alifáticos de cadena abierta como: ácidos grasos, azúcares y gran cantidad de aminoácidos.
- Clase 2: Compuestos alicíclicos o ciclo alifáticos como: terpenoides, esteroides y algunos alcaloides.
- Clase 3: Compuestos aromáticos o benzoicos como: fenoles, quinonas, etc.
- Clase 4: Compuestos heterocíclicos como: alcaloides, flavonoides, bases de ácidos nucleicos.

Por ejemplo, el geraniol (**4**), el farnesol (**18**) y el escaleno (**19**) pertenecen a la clase de compuestos grasos o alifáticos de cadena abierta es decir clase 1 y el timol (**20**) a la clase 3, pero debido a las consideraciones biogenéticas o de biosíntesis, son usualmente tratados con otros terpenoides bajo la clase 2, ver figura 9 (Pietra, 2002).

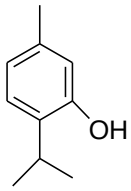
www.bdigital.ula.ve



Farnesol (**18**)



Escualeno (**19**)



Timol (**20**)

Figura 9: Estructuras quimicas que pertenecen a la clase de compuestos grasos. Tomado y modificado de (Bruzual, 2015).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Rutas biosintéticas

Son un conjunto de reacciones de naturaleza enzimática, que contiene un sistema enzimático, la cual, una molécula que se transforma es reconocida por aquél como un todo. La especificad de las reacciones enzimáticas ocurre a niveles no sólo de centros quirales sino también de proquirales (Marcano y Hasegawa, 2002). Se conocen en la actualidad tres grandes vías o rutas fundamentales que permiten la biosíntesis de la gran mayoría de los diferentes tipos de productos naturales conocidos:

a.- **Ruta del ácido melavónico:** A partir de él se forman unidades de prenilo que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, esteroides, carotenoides), se lleva a cabo en el citosol. El ácido mevalónico se forma a partir de dos moléculas de acetil coenzima A, dicho acido posee en su estructura seis carbonos, procede de tres moléculas de ácido acético, es el precursor de la unidad de isopreno (cinco carbonos) que se origina por su deshidratación y descarboxilación simultánea (Marcano y Hasegawa, 2002).

www.bdigital.ula.ve

A continuación se nombra los precursores de los principales tipos de terpenos, formados mediante reacciones catalizadas por enzimas: geranilpirofosfato (GPP), precursor de los monoterpenos en C 10; farnesilpirofosfato (FPP), precursor de los sesquiterpenos en C 15; geranilgeranilpirofosfato (GGPP), precursor de los diterpenos en C20; el Geranilfarnesilpirofosfato (GFPP), precursor de los sesterterpenos en C25; La formación de triterpenos en C30 (e indirectamente de los esteroides) y de los carotenos en C40 no escapa totalmente a la regla: provienen del escualeno y del fitoeno, dos hidrocarburos resultantes del acoplamiento reductor de dos unidades de FPP (2 X C,5= C30) y de dos unidades de GGPP (2 x C 20= C40) (Bruneton, 1991).

b.- **Ruta del ácido shikímico:** A partir de él se forman los aminoácidos como L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano, a partir de estos se sintetizan

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

otros compuestos más complejos (fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides). Es empleada por microorganismos y plantas, pero no por los animales, y ésta es la razón por la que a la fenilalanina y triptofano se les clasifica como esenciales para los humanos porque solamente se pueden obtener a partir de la alimentación. En cambio, la tirosina sí es sintetizada por el organismo, pero a partir de la fenilalanina ya ingerida (Bruneton, 1991).

En síntesis, el ácido shikímico ocurre en los plastos de las plantas verdes, por condensación de eritrosa 4-fosfato y fosfoenolpiruvato. El resultado de la condensación es el 3-deshidroquinolato. Es decir, el fosfoenolpiruvato es el sustrato para la producción de los compuestos fenólicos, como la tirosina, la fenilalanina o las auxinas. Ocurre el segundo paso: La producción de fenilalanina se produce también en las algas por la incorporación de otra molécula de fosfoenolpiruvato en 3-deshidroxiquinolato (Hopkins, 1999). El tercer paso, es la producción de ácido cinámico seguida de la producción de cumaril-S CoA. Y finalmente sucede el cuarto paso, ya que debido a la formación del cumaril-S CoA este compuesto es el precursor de la mayoría de fenoles en los vegetales naturales (Hopkins, 1999).

www.bdigital.ula.ve

c.- **Ruta del acetato-malonato (ruta policétida):** A partir de malonato y acetato se forman los policétidos (acetogeninas) y ácidos grasos. También producen la conjunción del acetil CoA por la vía acetato para dar Fenólicos. Estos compuestos se clasifican atendiendo a diferentes criterios, cumplen funciones muy diversas en los seres vivos y tienen diferentes capacidades como materiales de partida (precursores) para los metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios no son esenciales para la vida, pero contribuyen definitivamente a la adaptación de las especies y su supervivencia. Son más característicos para un grupo biológico particular, tal como una familia o un género, y aparentemente, la maquinaria sintética puesta en juego aquí está relacionada con la evolución de las especies (Bruneton, 1991).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Los policétidos se sintetizan mediante complejos multienzimáticos, agrupaciones de proteínas con distintos centros catalíticos. Estos complejos son muy importantes ya que los policétidos y los intermediarios de su síntesis son muy reactivos e impiden que interaccionen con otros compuestos. El cebador es la molécula de arranque, suele ser acetilCoA en la mayoría de los casos. El cebador llega al complejo multienzimático y sobre él se van uniendo moléculas de malonilCoA (3C), pero sólo se fijan 2C por cada molécula de malonil, el tercer C se libera en forma de CO_2. Las moléculas del tipo: [CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO]n son muy reactivas. Cuando hay 6C se ciclan para dar lugar a compuestos fenólicos (Hopkins, 1999).

Aceites esenciales

www.bdigital.ula.ve

Definición

Los aceites esenciales son sustancias de olor característico, obtenido a partir de materias primas frescas de origen vegetal, por extracción con un disolvente no acuoso, seguida de eliminación de dicho disolvente por un procedimiento físico. También se define como productos químicos que forman las esencias aromáticas de un gran número de vegetales. El termino aceite esencial se aplica para designar sustancias volátiles obtenidas por extracción, a base de vapor de las plantas, o por otros métodos. Las propiedades que caracterizan a estos aceites son la volatilidad y origen vegetal. El termino más actual con el que se conoce esta sustancia es el de esencias (Bruneton, 1991).

Estos aceites se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes partes de las plantas: en las hojas, raíces, en el pericarpio del fruto, en las semillas, en el tallo, en las flores, en los frutos, madera y resina que exuda todo el árbol, formándose en las partes verdes con clorofila del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

flor. Se clasifican con base en diferentes criterios: como consistencia y origen (Marcano y Hasegawa, 2002).

Las plantas producen los aceites con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización Los aceites esenciales se pueden encontrar en algunas familias tales como: Asteraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Apiales, Lamiaceae y Verbenaceae (Bruneton, 2011).

Propiedades físicas de los Aceites esenciales

Se presenta en estado líquido cuando están a temperatura ambiente escasamente tienen color y su densidad es inferior a la del agua con excepción de la esencia de sasafrás. Poseen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, son liposolubles y muy poco soluble en agua, pero arrastrable por el vapor de agua. Son intensamente aromáticos, no grasos por lo que no se enrancian, el cual, es una verdadera ventaja, también son volátiles y livianos es decir poco densos. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire (Bruneton, 2011).

www.bdigital.ula.ve

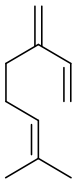
Composición química de los Aceites esenciales

Los aceites esenciales están constituidos por compuestos de bajos pesos moleculares y volátiles, tenemos a los hidrocarburos de mayor importancia son los terpenos tales como: monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. También se pueden encontrar fenilpropano, compuestos aromáticos, compuestos procedentes de la degradación de ácidos grasos, nitrogenados o azufrados (Tyler, 1988). La gran variedad de compuestos que

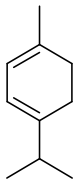
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

se encuentran contenidos en los aceites esenciales se puede clasificar de la siguiente manera:

- **Terpenos**: En los aceites esenciales se localizarán los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es demasiado elevada: monoterpenos encontramos los mirceno (**21**), *α*-terpineno (**22**), *p*-cimeno (**14**), entre otros, ver figura 10 (Marcano y Hasegawa, 2002).



Mirceno (**21**)

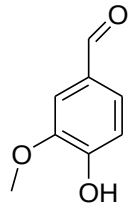


α-terpineno (**22**)

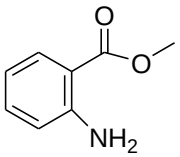
Figura 10: Estructura química de algunos terpenos encontrados en la naturaleza. Tomado y modificado de (Sowndhararajan y Kim, 2016).

www.bdigital.ula.ve

- **Compuestos aromáticos:** se pueden encontrar en los aceites esenciales compuestos en C_6-C_1 como la vainillina (**23**) (bastante frecuente) o como el antranilato de metilo (**24**), ver figura 11. También se encuentran los derivados del fenilpropano (C_6-C_3) en menor proporción (Marcano y Hasegawa, 2002).



Vainillina (**23**)



Antranilato de metilo (**24**)

Figura 11: Estructura química de algunos compuestos aromáticos. Tomado y modificado de (Sowndhararajan y Kim, 2016).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Compuestos provenientes de la degradación de ácidos grasos**: son compuestos químicos producto de la transformación de moléculas no volátiles, ya que, son el resultado de un proceso llamado peroxidación, que sufren los alcoholes, aldehídos y ésteres de pequeña masa molecular, dando origen a estructuras de 9 carbonos o de 12 carbonos, presentes en los aceites esenciales. Los componentes que sufren esta peroxidación son: octanal (**25**) y decanal (**26**) son aldehídos componentes importantes en los cítricos; el *cis*-3-Hexen-1-ol (**27**), es responsables del olor intenso a hierba muy importante ya que se utiliza en sabores de frutas, verduras y en perfumes, ver figura 12. Como producto de la peroxidación del octanal se obtiene el ácido octanoico, éste es un ácido graso que se deriva del aldehído octanal (Marcano y Hasegawa, 2002).

www.bdigital.ula.ve

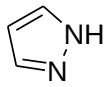
Octanal (**25**) Decanal (**26**) *cis*-3-Hexen-1-ol (**27**)

Figura 12: Estructura química de algunos compuestos provenientes de la degradación de ácidos grasos. Tomado y modificado de (González, 2004).

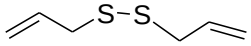
- **Los compuestos nitrogenados o azufrados:** están presentes en los aceites esenciales en poca proporción a veces están ausentes, tales como: pirazinas y butenetioatos, 2-acetil-4-isopropenilpiridina. Los compuestos nitrogenados pueden agruparse como aminas, amidas, nitrocompuestos, nitrilos, oximas, ésteres y compuestos cíclicos (indol, imidazol, pirazina, pirazol (**28**), piridina y triazina). Los compuestos azufrados presentes en aceites esenciales pueden agruparse como acíclicos (sulfóxidos, sulfuros, tioles y tioésteres) y cíclicos (tiofuranos y tiazoles). Específicamente,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

las especies del género *Allium* se caracterizan por la presencia de numerosos sulfuros y tiofenos, por ejemplo, el sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo (**29**), trisulfuro de dimetilo y disulfuro de alilo, se encuentran en los aceites esenciales de cebolla (*Allium cepa*) y del ajo (*Allium sativum*), ver figura 13 (Bruneton, 1991).



Pirazol (**28**)



Disulfuro de dimetilo (**29**)

Figura 13: Estructura química de los compuestos nitrogenados y azufrados. Tomado y modificado (González, 2004).

Usos farmacológicos y biológicos de los aceites esenciales

www.bdigital.ula.ve

Algunas de las aplicaciones son para hacer más agradable, atractivo o un producto y algunos se utilizan en preparados farmacéuticos con propiedades biológicas, tales como: insecticidas, fungicidas, antinflamatorios y en los preparados especiales (González, 2004). Algunas propiedades fundamentales de los aceites esenciales destacan en la tabla 2.

Tabla 2: Propiedades farmacológicas de los aceites esenciales

PROPIEDADES	UBICACIÓN Y UTILIDAD
Antiséptico	Presentes en tomillo, clavo, mentas, salvia, orégano, y pino. El poder antiséptico frente a diversas bacterias patógenas y hongos responsables de micosis y sobre levaduras (*Candida*).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 2: Propiedades farmacológicas de los aceites esenciales (Continuación)

PROPIEDADES	UBICACIÓN Y UTILIDAD
Antihelmíntica o antiparasitaria	Se les atribuye al paico, boldo, ajenjo, eucalipto, clavo y sasafrás.
Efecto sobre el Sistema Nerviosos Central.	Nerolí y lavanda (sedantes), limón (euforizante), valeriana, lúpulo y melisa (tranquilizantes).
Rubefacientes	Encontrados en el romero, trementina, wintergreen y el alcanfor.
Descongestionante	Pino, trementina, tomillo y eucalipto.
Digestivo	Se utiliza aceite esencial de la menta, manzanilla, menta, piperina, hinojo, anís, coriandro y romero con propiedades espasmolíticos.

www.bdigital.ula.ve

Tomado y modificado de (Bruneton, 1991; Raut y Karuppayil, 2014).

Toxicidad de los aceites esenciales

Es importante mencionar sobre la toxicidad crónica de los aceites esenciales no se dispone de datos. Tampoco se ha demostrado los efectos secundarios, ni tampoco la ausencia de efectos cancerígenos o teratógenos. Con respecto a la toxicidad agudo se conoce mejor, ejemplo de ello tenemos que dos gramos de mentol en un adulto pueden ser mortales, en un niño las gotas nasales de mentol pueden inducir espasmos de la glotis conduciendo a una asfixia refleja (Evans, 1991).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Métodos de obtención de los aceites esenciales

Los aceites se obtienen generalmente de plantas por diferentes métodos, presentados a continuación:

Arrastre de vapor de agua: es el más utilizado para extraer aceites esenciales de materias primas naturales como flores, frutas y resinas. Es el proceso más apropiado para la elaboración de perfumes, la muestra vegetal debe estar fresca y cortada en trozos pequeños, para ser encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Por lo tanto, se insufla vapor para que este transporte y separe los aceites fragantes. Por su estado gaseoso, el vapor se mezcla con las sustancias insolubles en agua, las que separa y arrastra al recipiente colector de la destilación, el cual al final del proceso se llena principalmente agua destilada y una pequeña parte de aceite esencial, este último puede recolectarse fácilmente por decantación, ya que, forma una fase separada del agua (Bruneton, 1991).

www.bdigital.ula.ve

El resultado es un aceite esencial 100% puro que conserva la complejidad del olor original y es mucho más intenso que el aroma de la propia materia prima. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Posee alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada, ver figura 14 (Bruneton, 1991).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 14: Destilación por arrastre de vapor. Tomado y modificado de (Rodríguez, Alcaraz y Real, 2012).

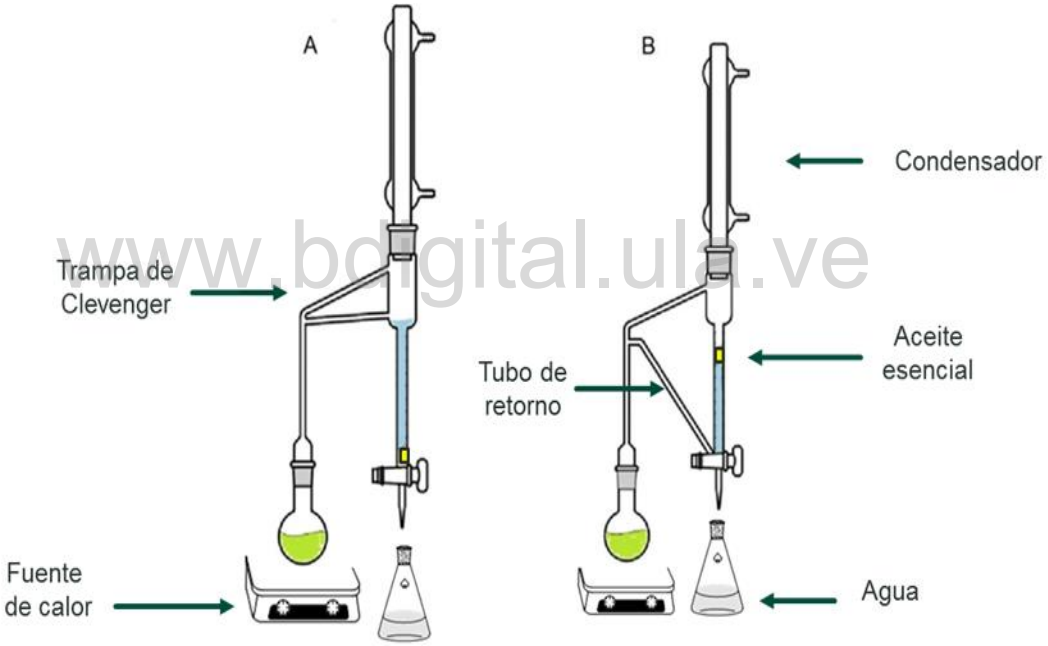
La hidrodestilación con trampa de Clevenger: para empezar la hidrodestilación es un método de extracción de aceites esenciales en el cual el material está sumergido en agua a ebullición, la característica principal de este proceso es el contacto directo del agua y el material del cual se extraerá el aceite esencial. La corriente de vapor saturado, que se genera hace que el aceite esencial de las flores, frutos, hojas, tallos y demás partes del vegetal se vaporiza hacia la superficie del extractor donde se ubica el condensador, donde el aceite condensado es recuperado en un recipiente. En 1928 Joseph Franklin Clevenger propuso un novedoso aparato de vidrio consistente en un adaptador de vidrio que conduce el vapor de manera diagonal al condensador. Cuando el líquido retorna al sistema es dirigido a una sección graduada donde se almacena, permite realizar extracciones más largas pues el líquido se recircula al sistema, evitando agregar más solvente al sistema con los inconvenientes que eso acarrea, además, es posible realizar un seguimiento a la extracción para saber en qué momento se logró extraer la máxima cantidad de aceite esencial de la muestra (Ortuño, 2006).

www.bdigital.ula.ve

La trampa de Clevenger es un instrumento que está compuesto de un balón, donde se deposita la materia prima previamente licuada y una cantidad determinada de agua pura. El balón es calentado constantemente y el aceite

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

esencial con el agua presente se evapora continuamente. El condensador va acoplado al balón a través de una conexión en forma de D que permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua condensada regresa al balón por rebose de la conexión. Es importante resaltar que se observará una sección graduada el líquido y el aceite esencial, esto se separan por decantación. Si el aceite esencial es menos denso que el agua se formará una capa en la parte superior de la sección, y si es más denso se ubicara en la parte inferior del agua, ver figura 15 (Ortuño, 2006).



www.bdigital.ula.ve

Figura 15: Hidrodestilación con trampa de Clevenger. En la imagen A para aceites más densos que el agua. En la imagen B para aceites menos densos que el agua. Tomado y modificado de (Rodríguez y cols., 2012).

La destilación por inyección de vapor de agua: es también conocida como destilación por arrastre con vapor seco, es un proceso mediante el cual se realiza la extracción de aceite esencial de la especie vegetal con vapor de agua producido fuera del destilador en un generador llamado caldera. En este

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tipo de destilación se puede controlar la cantidad de vapor y la especie vegetal no es calentado por encima de 100°C y debido a esto, el aceite esencial no experimenta degradación termina y así se protege a los componentes termolábiles (Rodríguez y cols., 2012).

Extracción con disolventes: se fundamenta en la solubilización de los aceites esenciales en un disolvente, su elección depende de parámetros técnicos y económicos; selectividad, poder disolvente respecto a sus constituyentes; estabilidad, inercia química; temperatura de ebullición no muy alta pero que permita su eliminación total y evitar pérdidas; seguridad en su manipulación (Domínguez, 1979). Los disolventes más utilizados son: éter de petróleo, éter etílico, hexano, pentano, diclorometano y etanol. Del extracto el disolvente se separa por destilación y el disolvente que embebe la masa vegetal se recupera por inyección de vapor de agua, generalmente este proceso es a temperatura baja, para cuidarse de la degradación inducida por le presencia de agua y el pH ácidos y debido a su poca selectividad extraen a otros componentes como triglicéridos, carotenoides, ceras, entre otros. Posterior a esto, necesita un proceso de purificación (Rodríguez y cols., 2012).

www.bdigital.ula.ve

Extracción con grasas: El método aprovecha la liposolubilidad de los aceites esenciales en materias grasas, se aplica sobre todo para extracción de aceites esenciales de pétalos de flores. Presenta dos variantes: El enflorado: se realiza la extracción por difusión en frio hacia la materia grasa, consiste en colocar los pétalos entre dos placas de vidrio con películas de grasa en su superficie, con la misma grasa se hacen varias extracciones renovando los pétalos (Rodríguez y cols., 2012). Y por digestión: para la extracción los pétalos se ponen en contacto con grasa fundida, el proceso se realiza a una temperatura caliente. Los aceites esenciales disueltos en grasa pueden ser extraídos con alcohol y así obtener soluciones alcohólicas de aceite esencial (Rodríguez y cols., 2012).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Extracción con fluidos supercríticos: al someter un fluido a altas presiones y muy bajas temperaturas se obtiene un estado diferente conocido como el supercrítico**,** el cual, posee propiedades intermedias entre líquido y gases. El CO_2 al ser sometido a estas condiciones, tiene la buena capacidad de difusión en los sólidos y ser un buen disolvente, ya que, tiene la densidad similar de los líquidos y la viscosidad de los gases que favorece al penetrar en los poros de la muestra. Por lo tanto, extraer en estas condiciones a los aceites esenciales es muy selectiva y no agresiva. Generalmente el gas que se usa es el CO_2, el cual, es fácil de eliminar y se puede recuperar. Este método presenta inconvenientes por el costo y la complejidad del equipoutilizado, pero las ventajas superan su elevado costo, ya que permite, producir productos fidedignos y próximos al del producto natural, ver figura 16 (Bruneton, 1991; Domínguez, Parzanese, 2013).

www.bdigital.ula.ve

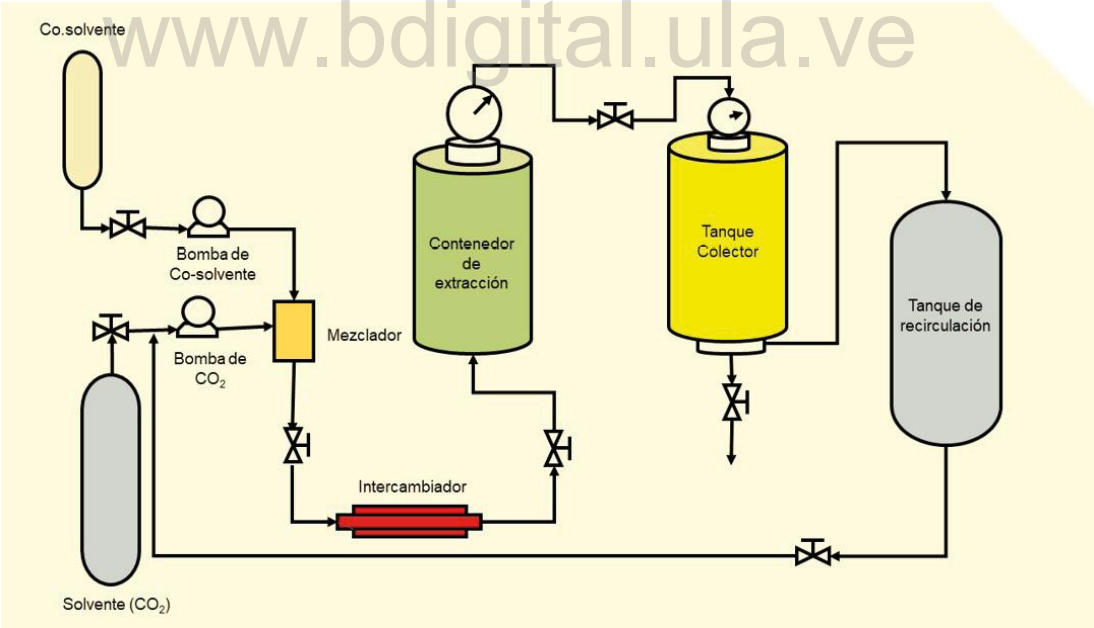


Figura 16: Extracción con fluidos supercríticos. Tomado y modificado de (Rodríguez y cols., 2012).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Extracción por microondas: Esta técnica puede utilizarse asistiendo un método convencional como la hidrodestilación o adaptando un equipo para establecer como método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente. Utiliza recipientes cerrados para calentar el disolvente de extracción sobre el punto de ebullición atmosférico. La elevada temperatura aumenta la solubilidad de los analitos de interés y baja la viscosidad del disolvente, facilitando la penetración en la matriz. La extracción por microondas ofrece beneficios como una reducción considerable del tiempo y del consumo de energía, puede realizarse a gran escala con reactores de microondas (Rodríguez y cols., 2012).

Análisis de los aceites esenciales

www.bdigital.ula.ve

Se realiza el análisis de los aceites volátiles para descubrir cualquier adulteración y verificar la calidad de un aceite no adulterado. Se hace un examen preliminar y organoléptico, en el cual, se coloca una muestra del aceite en un frasco o probeta graduada. Se observa el color, la claridad, la viscosidad, la presencia o ausencia de sedimentos, las ceras separadas y el agua. Posteriormente se caracteriza la muestra por medio de Cromatografía Gaseosa, para identificar los principales componentes y cuantificarlos. Finalmente se evalúan sus propiedades fisicoquímicas como densidad, solubilidad e índice de refracción. También se ejecutan pruebas especiales según el aceite con que se ensaya para determinar el contenido de ésteres, total de alcoholes, punto de congelación, residuo de evaporación, porcentaje de aldehídos, entre otros (Medinilla, 1996).

Para efectuar el análisis de los componentes de los aceites esenciales se debe realizar a través de diferentes técnicas, si se desea determinar la cantidad de sus constituyentes volátiles se necesita de la Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama (CG-DIL), mientras que si se

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

requiere de la identificación de los compuestos entonces se necesita la Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM). A pesar de que otras técnicas instrumentales pueden ser también empleadas, como la resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja (IR), entre otras, la mayoría de las investigaciones se realizan con las dos primeras. Pero cuando se requiere de un control de calidad deberán incluirse las determinaciones de una serie de métodos físicos y químicos tradicionalmente usados, junto con la evaluación sensorial (Medinilla, 1996).

Identificación de los aceites esenciales

La separación e identificación de todos los grupos químicos mencionados anteriormente presentes en los aceites esenciales de las plantas y fuentes naturales depende en gran medida de la cromatografía de gases. En algunos casos, la cromatografía de gases puede ser el único medio de identificación, a veces se requieren al menos dos columnas de polaridad sustancialmente diferente para tener confianza en las asignaciones basadas en la comparación directa de los tiempos de retención con los patrones o el conocimiento preciso de los índices de retención de Kováts. Esto también aplica cuando se utiliza cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas para el análisis de sus constituyentes (Davies, 1990).

www.bdigital.ula.ve

Es importante conocer el fundamento de la cromatografía de gases para conocer la utilidad de los detectores. Por lo tanto, es una técnica analítica que permite separar mezclas de compuestos fácilmente volatilizables y térmicamente estables en sus componentes individuales. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, a través de una fase estacionaria con la que es inmiscible fijada a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre ambas. Aquellos componentes fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden identificarse cualitativa y/o determinarse cuantitativamente. La clasificación más frecuente en cromatografía, la marca el tipo de fase móvil, en este sentido la cromatografía de gases emplea como fase móvil un gas (Davies, 1990).

- **Cromatografía Gaseoso-Líquida con Detector de Ionización de Llama (CG-DIL):** el gas procedente de la columna se mezcla con hidrógeno y esta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire. Por encima de la llama, se dispone un colector cilíndrico polarizado con el fin de recoger los iones generados; sobre este dispositivo, se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador y el electrodo colector. El DIL o detector de ionización de llama utiliza una llama de hidrógeno y aire a la que se transfiere la muestra para oxidar moléculas orgánicas y producir partículas cargadas eléctricamente (iones). Los iones se recogen y producen una señal eléctrica que luego se mide. Es técnica que se utiliza para analizar compuestos orgánicos con base de carbono (Davies, 1990).

www.bdigital.ula.ve

- **Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa:** es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. En la cromatografía de gases una vez separados, detectados y cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de los componentes, es el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca. En el caso, de la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por trasposición de los espectros particulares de cada componente (Sandra y Bichi, 1987).

Es por ello, que se creó una técnica combinada en CG-EM (Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa) que permite la separación e identificación de mezclas complejas. Dicha técnica se trabaja en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para sus análisis, por lo que ambas técnicas son compatibles, ver figura 17 (Davies, 1990; Sandra y Bichi, 1987).

www.bdigital.ula.ve

La técnica comienza con el cromatógrafo de gases, donde la muestra se volatiliza. Esto vaporiza efectivamente la muestra a fase gaseosa y separa sus diversos componentes utilizando una columna capilar llena con una fase estacionaria (sólida) y un gas portador inerte como argón, helio o nitrógeno. A medida que los componentes se separan, se eluyen de la columna en diferentes momentos, lo que se conoce como sus tiempos de retención. Los componentes salen de la columna de cromatografía de gases y se ionizan por el espectrómetro de masas que utiliza fuentes de ionización química o electrónica. Las moléculas ionizadas se aceleran a través del analizador de masas del instrumento, que es una trampa de iones. Aquí los iones se separan en función de sus diferentes relaciones masa/carga. Al final de este proceso se realiza la detección y el análisis de iones, con picos compuestos que aparecen en función de sus relaciones masa/carga. Las alturas de los picos, son proporcionales a la cantidad del compuesto correspondiente. Una muestra compleja producirá varios picos diferentes, generando el espectro de masas (Sandra y Bichi, 1987).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rápidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR siglas en ingles que significa selected ion recording. En esta modalidad se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de utilizar el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias. Gran parte de la información relevante se ocupa de los datos de retención en los diferentes tipos de fase estacionaria que se han utilizado para las separaciones de los compuestos químicos de interés. Sin embargo, la mayoría de este procedimiento se lleva a cabo en columnas capilares con fases polares de dimetilpolisiloxano (metilsilicona) “estándar” y Carbowax 20M (Jennings y Shibamoto, 1980).

www.bdigital.ve

Figura 17. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa.

Índices de retención de Kováts

Estos índices se sustentan en una comparación entre la posición del pico de un analito en el cromatograma y los picos correspondientes a hidrocarburos lineales, uno de los cuales eluye antes del componente de interés y el otro después, utilizando la siguiente relación matemática para

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

calcularlos, en el caso de que sea una corrida cromatográfica con programación de temperatura (Davies, 1990). Para proporcionar un medio fácil de identificar un compuesto desconocido, Kováts propuso un sistema de índices basado en los *n*-alcanos como sustancias de referencia, puesto que estos compuestos son químicamente inertes, solubles en las fases estacionarias comunes y no polares (Jennings y Shibamoto, 1980). El índice de Kováts, se calcula mediante una ecuación matemática, ver figura18.

$$I = \left[\frac{t_{r(desconocido)} - t_{r(n)})}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

Figura 18. Ecuación matemática del índice de Kováts a temperatura programada. Tomado y modificado de (Kováts 1958; Davies, 1990).

www.bdigital.ula.ve

Donde: $\boldsymbol{I}$ = índice de retención de Kováts; n= número de átomos de carbono en el alcano más pequeño; N=número de átomos de carbono en el alcano más grande. $t'_r =$ tiempo de retención ajustado; Z= diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más pequeño y el más grande. En el caso de cromatografía de gas con temperatura programada se puede calcular un valor utilizando números directos en lugar de su logaritmo (Davies, 1990).

De esta forma se obtiene, una relación lineal cuando se grafica el logaritmo de los tiempos de retención vs los índices de Kováts. Dicho esto, los Índices de retención de Kováts se calculan a partir de los cromatogramas de gases por interpolación logarítmica entre n-alcanos. El cromatograma obtenido aporta la información sobre los porcentajes relativos de cada uno de los componentes en la mezcla, al mismo tiempo que la información espectral de cada pico permite identificar a las diversas sustancias que la forman. Los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

componentes obtenidos se comparan con los patrones auténticos y con los datos de la literatura (Kováts, 1958; Jennings y Shibamoto, 1980; Adams, 2007).

Micología

Es la rama de la microbiología que se encarga del estudio de los hongos, su nombre proviene de las palabras griegas: mykes: hongo, logos: estudio, originalmente, es el estudio de las setas, las cuales se encuentran entre los hongos más grandes, lo que atrajo la atención de los naturalistas antes de que se crearan los microscopios. Con la invención del microscopio por Antonie van Leeuwenhoek, en el siglo XVII, comenzó el estudio sistemático de los hongos. Pero el fundador de la micología es Pier Antonio Micheli (italiano), quien en 1729 publicó Nova Plantarum, donde incluyó sus investigaciones sobre los hongos (Casas, 1994).

www.bdigital.ula.ve

Hongos

Son también desinados con el termino fungí, pertenecen a organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares, entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y los organismos productores de setas. Poseen un núcleo y una membrana nuclear, un retículo endoplásmico, mitocondrias y un aparato secretor. Muchos son aerobios obligados o facultativos. Tienen paredes rígidas (por la presencia de quitina), son heterótrofos (no poseen clorofila), se reproducen sexual y asexualmente, o solo asexualmente. Son quimiótrofos secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles que luego son absorbidos pasivamente o integrados a la célula por transporte activo. Posee el talo o

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

cuerpo vegetativo, puede ser unicelular o típicamente filamentoso (Casas, 1994; Arenas, 2008).

Están clasificados en un reino distinto al de las plantas, animales, protozoos y cromistas. Se distinguen de las plantas en que son heterótrofos y posee pared celular compuesta por quitina, en cambio las plantas de celulosa. También se distingue de los animales porque estos últimos no poseen pared celular. Es el reino de la naturaleza más cercano filogenéticamente a los animales, ver figura 19 (Casas, 1994; Arenas, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Figura 19: Morfología del hongo. Tomado y modificado de (Cannon, Lamping y Holmes 2009).

Clasificación de los hongos

Los criterios según los cuales se clasifican los hongos están todavía sujetos a discusión, por lo que no existe una clasificación definitiva y aceptada por todos. El cual se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Tipo de vida:** los hongos pueden ser saprofitos, parásitos y simbiontes. Los hongos saprofitos estos se alimentan de sustancias en descomposición, como el champiñón (*Agaricus)*, hongos de fruta y de la madera. Los hongos parásitos se alimentan de los líquidos internos de otros seres vivos o viven a expensas de otros organismos vivos como el hombre, platas, animales insectos inclusive otros hongos que pueden ser perjudiciales ocasionando infecciones, por ejemplo, el *Trichophyton rubrum.* Los hongos simbiontes se asocian con otros organismos y se benefician mutuamente, es decir, hongo recibe el alimento que necesita y a cambio ayuda al otro organismo a sobrevivir, es la forma más común de los hongos superiores Ejemplo: *Lactarius deliciosus y* líquenes son el conjunto de un alga y el hongo (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2006; Bonifaz, 2012).

- **Forma:** pueden ser levaduras, moho, levaduriformes y dismórficos. Las levaduras son unicelulares, microscópicas, ovales o redondas, también llamadas blastoconidias. Los mohos, son de cuerpo en forma de hilos o filamentos en forma de tubo, que se conoce como micelio. Se reproducen a través de esporas, que se esparcen fácilmente por el aire. Los hongos levaduriformes son aquellos que presentan diversas morfologías blastoconidias, hifas o pseudohifas, adoptan formas ovales y alargadas constituyendo un pseudomicelio. Y por último los hongos dismórficos, son aquellos que dependiendo de la temperatura y los nutrientes donde se desarrollen, adoptan un solo tipo de morfología (Jawetz y cols., 2006).

www.bdigital.ula.ve

- **Imperfecto**: Corresponde a fase asexual de un hongo que recibe el nombre de anamorfo.

- **Verdaderos o Perfectos**: Corresponde a fase sexual de un hongo que recibe el nombre de teleomorfo.

- **Reproducción**: todos los hongos se reproducen mediante esporas. Estas pueden originarse mediante procesos sexuales o asexuales,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

se dispersan gracias a la incidencia del viento, el agua, los animales, entre otros. Forman hifas y luego desarrollan micelios. La reproducción sexual de los hongos ocurre cuando se unen dos hifas haploides, formando una espora diploide de tipo zigospora, basidiospora o de ascospora. En cambio, la reproducción asexual sucede cuando una espora fúngica haploide es producida por mitosis a partir de una célula progenitora haploide. Es genéticamente idéntica a la célula parental. Las esporas de hongos pueden convertirse en nuevos individuos haploides sin ser fertilizadas. En resumen, los hongos pueden reproducirse asexualmente de tipo esporas, brotación o fragmentación y de manera sexual para dar origen a una espora (Jawetz y cols., 2006; Arenas, 2008).

- **División**: se puede clasificar de acuerdo a su división en las cuales existe Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota y Hongos anamorfos (Deuteromycota) (Whittaker, 1969; Casas, 1994). Actualmente, las técnicas de biología molecular han permitido el establecimiento de una taxonomía basada en secuencias de ADN, por tal razón, en el año 2015 fueron nuevamente clasificados en cinco filos: Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Ruggiero, Gordon, Orrell, Bailly y Bourgoin, 2015). A continuación, se describirá cada una de ellas:

www.bdigital.ula.ve

Ascomycota: estos hongos contienen ascosporas dentro de las estructuras reproductoras denominadas ascas. Hongos de reproducción sexual con micelio tabicado. Dentro de esta división se pueden encontrar varios géneros tales como: *Saccharomycetes* usadas en la fermentación de la cerveza y la *Candida* sp es un patógeno oportunista, dismórfico, se reproduce de forma asexual por gemación (Whittaker, 1969; Casas, 1994; Romero, 2007).

Zygomycota: es el grupo de los comúnmente conocidos como mohos, posee esporas sexuales que reciben el nombre de zigosporas. En esta división

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

se encuentra *Mucor* sp*, Rhizopus* sp*, syncephallastrum* sp*,* entre otros (Whittaker, 1969; Romero, 2007).

Basidiomycota: son hongos superiores capaces de desarrollar estructuras reproductivas macroscópicas llamadas basidiocarpos o setas como por ejemplo el níscalo y el champiñón, su unidad de reproducción son las basidiosporas y poseen cuerpo fructífero en forma de seta. Hongos de tipo reproducción sexual, por ejemplo: *Rhodotorula sp* y el *Agaricus* brunnescens es el tipo de hongo comestible más comercializado como champiñones (Romero, 2007; Whittaker, 1969).

Deuteromycota ahora llamados Hongos anamorfos: son hongos de reproducción asexual, generalmente se realiza por medio de esporas asexuales llamadas conidios, incluye levaduras, que son unicelulares, hifas y pseudohifas multinucleadas. Son responsables de muchas infecciones micoticas, la quitina y glucano: son los componentes principales de la pared celular de los deuteromicetos. Algunos producen micotoxinas, la sustancia cancerígena como de origen natural. Dentro de esta división se conocen especies: *Penicillium griseofulvum* contiene el componente principal antifúngico griseofulvina; *Penicillium notatum* a partir de ella se creó la penicilina; *Phoma* sp, *Aspergillus flavus* causante de diversas micosis en humanos, entre otras (Whittaker, 1969; Romero, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Chytridiomycota: incluye a todos aquellos hongos microscópicos con zoosporas o gametos flagelados como células reproductoras. Son generalmente acuáticos y saprofitos, La reproducción es mayormente asexual también presenta una fase sexual. Dentro de esta división se encuentra *Nowakowskiella sp* (Jawetz y cols., 2006; Ruggiero y cols., 2015).

Glomeromycota: ocurre formación de micorrizas, estructuras que establecen una relación simbiótica entre plantas, su unidad de reproducción son las glomerosporas. No pueden sobrevivir sin la presencia de raíces de las plantas. Tienen hifas cenocíticas y se reproducen asexualmente, produciendo

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

glomerosporas Destacan géneros de micorrizas como *Acaulospora, Entrophospora, Gigaspora y Scutellospora* (Jawetz y cols., 2006; Ruggiero y cols., 2015).

Mecanismos de resistencia de los hongos

Los mecanismos de resistencia de los hongos dependen de varios factores de virulencia y de otros factores explicados a continuación:

- **Capacidad de adhesión:** Esta capacidad es importante para la patogenicidad porque promueve la formación de un complejo llamado biopelícula que le permite adherirse, favoreciendo la invasión y propagación de la infección, actuando como un importante mecanismo de resistencia (Delgado, Prieto, Amich y Salve, 1994).

www.bdigital.ula.ve

- **Mutaciones en los genes:** que codifican para la síntesis de ergosterol de la membrana plasmática, es decir, se debe a mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico, como la alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol (Delgado y cols., 1994).

- Mutación en el gen ERG11: codifica la diana principal de los antifúngicos azólicos, la enzima lanosterol-14-*α*-desmetilasa, es responsable del principal paso en la ruta biosintética del ergosterol debido a la eliminación oxidativa del grupo 14-*α*-metilo del lanosterol y conversión en ergosterol, componente esencial de la membrana celular de los hongos. Por lo tanto, las mutaciones en el gen ERG11 originan modificaciones en la secuencia de aminoácidos y, en consecuencia, cambios en la estructura de la enzima diana lanosterol 14-*α*-desmetilasa, produciendo una alteración en el sitio de unión a los azoles. Produciendo una mutación puntual del gen ERG11, presentándose una sustitución de arginina por lisina en el aminoácido 467 del gen ERG11, que

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

contribuye a la resistencia a los azoles, se presenta en aislamientos clínicos resistentes (Delgado y cols., 1994).

- Mutación en el gen FKS1: este codifica la enzima *β*-(1,3)-glucanosintasa principales enzimas involucradas en la síntesis *β*-(1,3) (1,6)-D-glucano es un compuesto de la pared celular de los hongos. Las cuales, las alteraciones en este gen se asociarían a una resistencia a equinocandinas (Jawetz y cols., 2006).

- Mutación en el gen cyp51: codifica para 14-*α*-demethylase, este gen es responsable de la resistencia a azoles en hongos filamentosos como aspergillus, debido a la sustitución de los aminoácidos en dicho gen, que puede generar resistencia evitando el acceso del azol al sitio activo o generando rearreglos estructurales en la cavidad de unión que afecten la afinidad entre el azol. Todas estas mutaciones conocidas tienden a surgir como consecuencia de la exposición a terapias de azoles a largo plazo (Jawetz y cols., 2006).

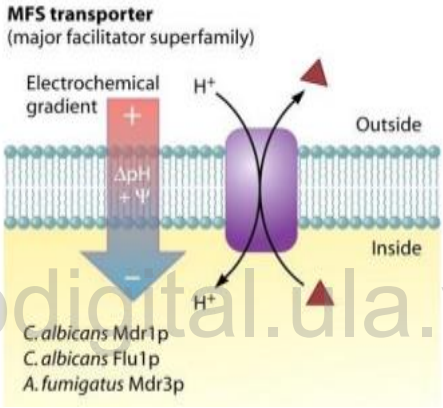
www.bdigital.ula.ve

- **Sobreexpresión del gen ERG11:** da como resultado concentraciones aumentadas de lanosterol 14-*α*-desmetilasa y en consecuencia se requieren cantidades mayores del antifúngico para inhibir la enzima (Delgado y cols., 1994).

- **Sobreexpresión de genes que codifican para bombas de expulsión de fármacos fuera del microorganismo:** se forma barreras de permeabilidad o un sistema de bombeo del antifúngico conformado por transportadores ATP-binding cassette (ABC) y Facilitadores mayores (MF) son un sistema de bombeo activo mediado por ATP, se localizan en la membrana citoplasmática y contribuye a la resistencia de casi todos los azoles, expulsando el fármaco hacia el exterior de la célula. Los transportadores ABC son codificados por los genes CDR (Candida Drug Resistance) y los transportadores MF son codificados por los genes MDR (Multidrug Resistance). La sobreexpresión de los transportadores es la causa más frecuente de resistencia

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

a los antifúngicos (todos los azoles), mientras que la sobreexpresión por los genes MDR sólo confiere resistencia al fluconazol. En una célula susceptible, los antifúngico azólicos entran por difusión pasiva actuando sobre la enzima lanosterol desmetilasa, que es producto del gen ERG11, inhibiendo la síntesis del ergosterol. Estas células sensibles presentan expresión de niveles bajos de los genes CDR y el gen MDR. Pero en una célula resistente, los azoles son menos efectivos contra el lanosterol 14-alfa-desmetilasa por la sobreexpresión de los genes CDR y MDR, ver figura 20 (Jawetz y cols., 2006).



www.bdigital.ula.ve

Figura 20: Transportador MFS, a través de un gradiente electroquímico. Tomado y modificado de (Cannon y cols., 2009).

La resistencia ante los tratamientos antimicóticos no es el único motivo de preocupación, también la toxicidad y las interacciones medicamentosas clínicamente importantes sobre las enzimas humanas del citocromo p450, motivan a la realización de estudios farmacocinéticos profundos de estos compuestos, teniendo en cuenta las características clínicas y genéticas de cada individuo (Delgado y cols., 1994).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antimicóticos

También son llamados Antifúngicos o agentes fungicidas capaces de eliminar o detener su crecimiento, compuestos utilizados en el tratamiento de las infecciones causadas por hongos. En comparación con los fármacos antibacterianos se cuenta con pocos antifúngicos para el tratamiento de las infecciones micóticas. Muchas sustancias con actividad antimicótica han demostrado ser inestables o tóxicas para los seres humanos, o bien, tienen características farmacológicas indeseables como mala difusión a los tejidos (Ryan y Ray, 2017).

Clasificación y mecanismo de acción de los antimicóticos

www.bdigital.ula.ve

Los criterios de clasificación del compuesto antifúngico dependerán del tipo de micosis presentada a continuación: Las micosis superficiales son las infecciones de las mucosas, piel y anexos cutáneos pelo y uñas producen un proceso infeccioso que no va más allá del epitelio o la capa más externa de la piel o mucosa. En segundo lugar, micosis subcutáneas son infecciones de la epidermis, dermis y otros órganos cercanos, causadas por la inoculación traumática de hongos saprofitos con capacidad de convertirse en parásitos, originan complicaciones graves que son muy molestas, pero rara vez mortales. En tercer lugar, se encuentra las micosis sistémicas o profundas, que son las que afectan a órganos profundos, su vía de entrada, en general, es la inhalatoria y suelen ser muy graves y mortales. Sus agentes etiológicos son los hongos patógenos primarios. Y, por último, las micosis oportunistas, que afectan a hospedadores inmunosuprimidos, ver tabla 3 (Bennett, 1996).

En un enfoque clínico, se ha clasificado a las micosis en locales y sistémicas y por ende la categorización de los antimicóticos (ver tabla 3), debido a que el tratamiento de las micosis son más complicadas que el de las

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

infecciones bacterianas, ya que, las micosis superficiales se encuentran en piel y faneras con escasa o nula vascularización y las micosis profundas producen respuestas granulomatosas que impiden una buena penetración o absorción del fármaco porque son particularmente poco solubles y los hongos son células de crecimiento lento, con pared celular con quitina, glucano, poliósidos, fosfolípidos y esteroles, ausentes generalmente en las bacterias. Es importante mencionar que existen algunas excepciones de acuerdo a su uso debido a que algunas micosis superficiales pueden tratarse por vía sistémica tales como: griseofulvina o el ketoconazol, donde sus componentes se concentran en capa córnea o en los lípidos cutáneos (Bennett, 1996).

Los antifúngicos pueden ejercer su acción en diferentes niveles sobre la célula fúngica: el primer nivel, ejercen su acción en la pared celular, impidiendo su síntesis por ejemplo las equinocandinas que inhiben la β-1,3-glucano sintasa, situada en la membrana plasmática. El segundo nivel es actuando sobre la membrana, alterando su permeabilidad o impidiendo su síntesis, o la de componentes esenciales como el ergosterol, tales como los compuestos azólicos, los polienos, las alilaminas y las morfolinas (Balkis, Leidich, Mukherjee, y Ghannoum, 2002).

www.bdigital.ula.ve

Y, por último, actúan sobre los mecanismos implicados en la división celular, por ejemplo, la griseofulvina que afectan al ARN (5-fluorocitosina) o los que interactúan con los microtúbulos e impiden la división celular y el ciclopirox, que da lugar a una depleción de electrolitos celulares que conduce a una reducción de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Balkis y cols., 2002).

- **Antifúngicos azólicos:** Se dividen en dos grupos, imidazólicos y triazólicos, ambos se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que contiene 2 (imidazolicos) o 3 nitrógenos (triazolicos). Los derivados imidazólicos conocidos como, clotrimazol (**30**), miconazol (**31**), ketoconazol se

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

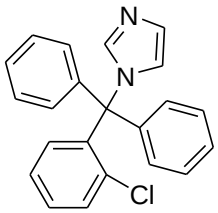
emplean de forma tópica en dermatomicosis y/o candidiasis vulvovaginal. Están indicados en casos de tinea corporis, tinea pedis, tinea cruris y otras dermatofitosis. Cuando la infección afecta al pelo suele ser necesario recurrir al tratamiento sistémico. También están indicados en candidiasis cutáneas y mucosas excepto en pacientes inmunodeprimidos; pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica. La mayoría son también activos frente a Trichomonas. Los derivados triazólicos se emplean en el tratamiento de micosis sistémicas poseen un espectro antifúngico superior y menos efectos secundarios, los triazoles utilizados son fluconazol (**32**), voriconazol (**33**), itraconazol, posaconazol, isavuconazol y ravuconazol, ver figura 21 (Nocua, Uribe, Cortes, 2020).

El mecanismo de acción de los derivados azólicos: consiste en la inhibición de la síntesis de ergosterol por bloqueo de la enzima lanosterol desmetilasa mediante la unión del fármaco con el grupo hemo del citocromo P450. La formación de un complejo entre el derivado azólico y el citocromo, impide el proceso oxidativo inicial del lanosterol. Con ello se inhibe la síntesis del ergosterol y se acumula lanosterol, que facilita la construcción defectuosa de la membrana fúngica (Nocua y cols., 2020).

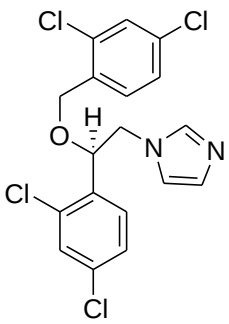
Algunos derivados azólicos parece que son capaces de bloquear a otras enzimas de la cadena biosintética del ergosterol, provocando la acumulación de metabolitos intermediarios que pueden colaborar en la desestabilización de la membrana citoplasmática (Nocua y cols., 2020).

www.bdigital.ula.ve

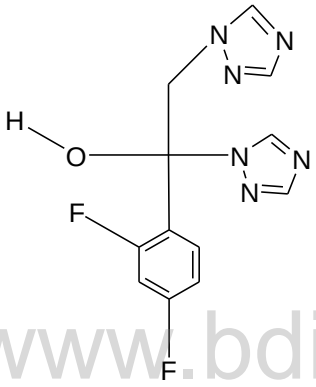
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



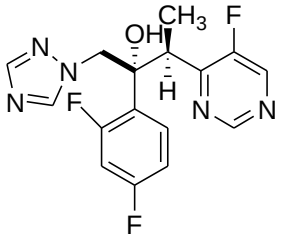
Clotrimazol (**30**)



Miconazol (**31**)



Fluconazol (**32**)



Voriconazol (**33**)

www.bdigital.ula.ve

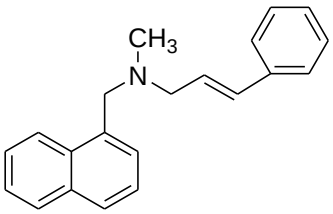
Figura 21: Estructuras químicas de Antifúngicos sintéticos imidazólicos y triazólicos. Tomado y modificado de (Valdés, 2005; Nocua y cols., 2020).

Alilaminas: son compuestos de carácter básico que resultan de la sustitución parcial o total del hidrógeno en el tipo de amoniaco por una o varias moléculas de alilo, se encuentra en las esencias de ajo y de mostaza. Este grupo antimicótico inhiben la síntesis del ergosterol, dentro de este grupo se encuentra Naftifina (**34**) y la terbinafina (**35**) es el único compuesto de este grupo comercializado estando disponible tanto para uso tópico como sistémico, ver figura 22 (Schildknecht, 1972; Terrell y Hughes, 1992).

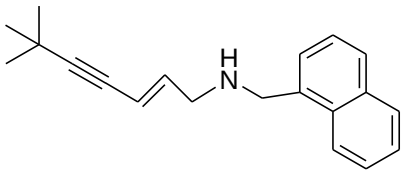
Mecanismo de acción: en actúan directamente en la enzima escualeno-peroxidasa y no sobre la C-14-alfa-demetilasa (azoles), inhiben a la enzima escualeno peroxidasa y de esta forma disminuye la concentración de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Van den Bossche, Marichal, Gorrens y Coene, 1991).



Naftifina (**34**)



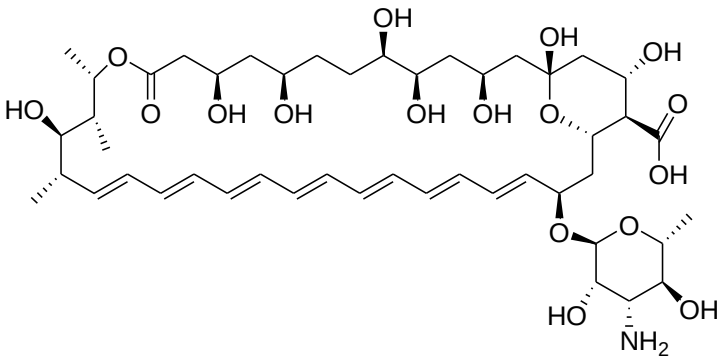
Terbinafina (**35**)

Figura 22. Estructura química de Antifúngicos del grupo Alilaminas. Tomado y modificado de (Nocua y cols., 2020; Valdés, 2005).

www.bdigital.ula.ve

Antifúngicos poliénicos: son estructuras que tienen dobles enlaces carbono-carbono, un anillo de lactona y múltiples grupos hidroxilo en un lado del anillo. Representados por la natamicina, nistatina y la anfotericina B. La anfotericina B (**36**) se utiliza por vía sistémica intravenosa, mientras que la nistatina sólo se emplea en formulaciones tópicas y está cayendo en desuso clínico, ver figura 23. En el caso de la nistatina es demasiado tóxica para administrarla por vía intravenosa; por lo tanto, solo se emplea para tratar infecciones fúngicas de la piel, las membranas mucosas y la luz gastrointestinal (Denyer, Hodges, Gorman y Gilmore, 2011).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Anfotericina B (**36**)

Figura 23: Estructura química de Antifúngicos poliénicos: Anfotericina B. Tomado y modificado de (Denyer y cols., 2011).

El mecanismo de acción de los polienicos, es en la unión del fármaco al ergosterol de membrana por endocitosis, unión de vacuolas y estabilización proteínas. Ocasionando poros y alteración de la permeabilidad de la membrana, ocurre la salida de iones, estrés oxidativo y finalmente la muerte celular. Es útil en infecciones por *Candida spp., Cryptococcus spp., Aspergillus spp., Fusarium spp. Meningitis criptococócica* (Denyer y cols., 2011).

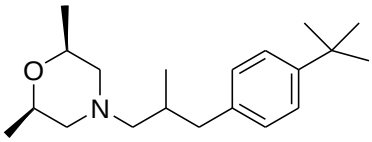
www.bdigital.ula.ve

Morfolinas: contiene un el grupo funcional amino como el éter, debido a la posesión del grupo amina, la morfolina es una base. Es un antifúngico tópico, el más representativo es el Amorolfina (**37**) ver figura 24. Se emplea en crema o barniz de uñas para tratar la onicomicosis, tales como, dermatofitos y cándida. Se aplica directo sobre las uñas y la piel infectada, por lo que no se absorbe. No se administra por vía sistémica (Denyer y cols., 2011).

El mecanismo de acción de las morfolinas, es inhibir la acción de las enzimas delta-14-reductasa y delta-7,8-isomerasa, las cuales son necesarias para la síntesis del ergosterol, principal componente funcional y estructural de la membrana de los hongos y levaduras. La inhibición de la síntesis del ergosterol induce alteraciones en la permeabilidad membranal y pérdida de los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

elementos intracelulares esenciales, inhibiendo el crecimiento del hongo e induciendo su muerte (Denyer y cols., 2011).



Amorolfina (**37**)

Figura 24: Estructura química Antifúngico del núcleo Morfolina. Tomado y modificado de (Denyer y cols., 2011; Valdés, 2005).

Equinocandinas: Son un grupo de lipopéptidos semisintéticos, productos de la fermentación de varios hongos*: Coleophoma empedri*, *Aspergillus nidulans* y *Glarea lozoyensis*, representados por caspofungina, anidulafungina, rezafungina y micafungina. Es el fármaco de elección en la candidiasis invasora en el paciente crítico. El uso de anidulafungina está autorizado únicamente en adultos, mientras que caspofungina y micafungina están autorizadas también para uso pediátrico (Cortés, Russi y Jully, 2011).

www.bdigital.ula.ve

El mecanismo de acción de Equinocandinas: actúan en la pared celular, inhibiendo de forma no competitiva la síntesis de D-glucano, lo que produce la lisis celular por edema de la célula y de la membrana. Siendo un tratamiento de elección en la candidiasis, también utilizado frente a *Aspergillus* spp (Cortés y cols., 2011).

Pirimidinas: representada por flucitosina (**38**), es un antifúngico activo únicamente frente a levaduras, tales como *Candida* spp*.* Y *Cryptococcus* spp*.* No debe utilizarse en monoterapia por inducir resistencias con facilidad debido a su espectro de acción es limitado, ver figura 25 (Romero, 2007; Cortes y cols., 2011; Denyer y cols., 2011).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El mecanismo de acción de las Pirimidinas es actuar como antimetabolito impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos ADN, ARN y proteínas. Ingresa a célula del hongo a través de una permeasa, una proteína de la membrana de hongos, es específica para citosina. En este punto se convierte en 5-FU (5-fluorouracilo) por una desaminasa la flucitosina es una antimetabolito de pirimidina, este se incorpora en el ADN fúngico e impide la síntesis durante el proceso de replicación celular, porque no posee el terminal 3 ‘, no pueden agregarse otros nucleósidos, y la síntesis de ácidos nucleicos queda bloqueada 25 (Romero, 2007; Cortes y cols., 2011; Denyer y cols., 2011).

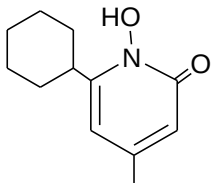
Flucitosina (**38**)

www.bdigital.ula.ve

Figura 25: Estructura química Antifúngico de grupo pirimidina. Tomado y modificado de (Denyer y cols., 2011).

Ciclopiroxolamina: representado por el ciclopirox, es un N -óxido derivado de 2-hidroxipiridina y puede denominarse agente antifúngico de hidroxipiridina. El ciclopirox (**39**) es un antifúngico de uso tópico y de acción fungistática ver figura 26. El mecanismo de acción de Ciclopirox actúa provocando una depleción de electrolitos celulares fúngicos, que conduce a la reducción de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas 25 (Romero, 2007; Cortes y cols., 2011; Denyer y cols., 2011).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Ciclopirox (**39**)

Figura 26: Estructura química de Antifúngico del grupo Ciclopiroxolamina. Tomado y modificado de (Valdés, 2005; Denyer y cols., 2011; Nocua y cols., 2020).

Tabla 3. Clasificación de antimicóticos de acuerdo al tipo de micosis.

Grupo Farmacológico	**Sistémico**	**Locales**
Azoles	Fluconazol, Itraconazol (Oral/intravenoso), Voriconazol, Posaconazol, Isavuconazol y Ravuconazol.	Ketoconazol, Clotrimazol y Miconazol.
Alilaminas	Terbinafina	Terbinafina y Naftifina
Poliénicos	Anfotericina B	Natamicina y Nistatina
Morfolinas	-	Amorolfina
Equinocandinas	Caspofungina, Anidulafungina, Rezafungina y Micafungina	-
Pirimidinas	5-Fluorocitosina	-
Ciclopiroxolamina	-	Ciclopirox

Fuente: Hernández y Aparicio (2023).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Actividad antifúngica

Es el proceso mediante el cual ciertas sustancias demuestran la capacidad de eliminar, inhibir, reducir la presencia y el crecimiento de los hongos. Para ello, se debe aplicar diversos ensayos para determinar la actividad antifúngica. Existen métodos estandarizadas conocidas como pruebas de susceptibilidad, las cuales son técnicas esenciales en la búsqueda de actividades biológicas de nuevos compuestos naturales (Romero, 2007).

Métodos para determinar la actividad antifúngica

Los métodos para evaluar la actividad de aceites esenciales sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Cowan, 1999). Es por ello, que para los hongos los medios de aislamientos son los siguiente: Agar Sabouraud, agar saboraud dextrosa, agar saboraud dextrosa más cicloheximida, agar lactrimel, infusión cerebro corazón, entre otros. En cuanto, al tiempo de incubación es distinto, dependiendo del tipo de hongo aproximadamente 7-15 días, ya que, los hongos tardan en crecer (Whittaker, 1969; Casas, 1994).

www.bdigital.ula.ve

Los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana se encuentran los métodos cualitativos y métodos cuantitativos. La primera, incluye difusión en disco y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina en forma cualitativa el efecto antimicrobiano de las sustancias obtenidas de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producido por la sustancia antimicrobiana (Burgess, Jordan, Bregu, Mearns y Boyd,1999).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La segunda, participan los métodos de dilución que son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana. Otra técnica muy utilizada es la denominada concentración mínima inhibitoria (CMI), se define como la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Esta técnica puede ser mejorada con la ayuda de indicadores redox, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana (Burgess y cols., 1999).

Método cualitativo

Método de difusión: es un método que se desarrolla de acuerdo a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa de microorganismos y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar. Esta técnica se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS (Burgess y cols., 1999).

www.bdigital.ula.ve

Método de difusión de disco en agar Kirby-Bauer: Se realiza la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares, Saboreaud-Dextrosa (levadura), se prepara un inoculo del microorganismo a evaluar para esto se toma una azada de un cultivo puro de dicho microorganismo y se suspende en solución salina fisiológica estéril, luego se comparar por turbidez con el patrón de Mc Farland, posteriormente el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar se coloca un papel filtro de 6 mm de diámetro sobre la placa impregnado de la sustancia a probar, posteriormente se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos. Una desventaja que se presenta cuando la sustancia a probar es una sustancia natural es el papel filtro Whatman debido a que contiene celulosa y esta posee grupos hidroxilos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

libres presentes en cada glucosa haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica actuando directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco impidiendo la difusión de estos en el agar (Bauer, Kirby, Sherris y Turck, 1966).

El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por el CLSI.

- Sensible (S): Si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente (R): La probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- Sensibilidad Intermedia (SI): Cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones, es decir, se necesita fuertes concentraciones locales o aumento de la posología. (Bauer y cols., 1966).

www.bdigital.ula.ve

Método de difusión de disco en pozos: Se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25 µL de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la caja invertida a 35±2 °C por 24 h para bacterias y a 29±2°C por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (Burgess y cols., 1999).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Método cuantitativo

Método de dilución: una cantidad de extracto de planta o compuesto activo, es mezclado con una cantidad de medio de cultivo. Puede ser llevado a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido. La concentración final deseada debe ser considerada m/v o v/v con respecto al medio de cultivo (Hassan, Rahman, Deeba, y Mahmud, 2009).

Dilución en agar: en esta técnica el agar es mezclado con una cantidad de extracto de planta o compuesto activo para obtener una concentración final con el medio. En el caso de no conocer su concentración, podría agregarse una alícuota en peso (mg, µg) aforando a un volumen final, es decir, si tuviésemos una alícuota de 100 µg y completáramos el volumen con el medio de cultivo a 1 mL tendríamos una concentración de 100 µg/mL. Para este método, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible (Hassan y cols., 2009).

www.bdigital.ula.ve

Dilución en medio líquido: también llamado dilución en caldo, se procede de la misma forma descrita en el párrafo anterior para obtener una concentración final del extracto en el medio. La diferencia radica en la interpretación de los resultados se realiza de manera diferente, por turbidimetría e indicadores redox, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana. Para este tipo de técnicas se requiere un espectrofotómetro, en el cual, se realizan lecturas a una densidad óptica (DO) de 600 nm para la determinación de crecimiento microbiano y de 540-570 nm cuando se utiliza redox. La CMI se considera aquella concentración en la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio. Las desventajas de la turbidimetría se presentan en aquellos compuestos no solubles que pudieran interferir con la lectura, es por ello que se debe aplicar un blanco que contenga medio de cultivo y el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

compuesto en cuestión sin adición del microorganismo como control de crecimiento (Hassan y cols., 2009).

En los indicadores redox, los más utilizados son el bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y resazurina. En la técnica de difeniltetrazolio consiste en la conversión del MTT a formazán esto es mediado por las células metabólicamente activas, produciendo un color púrpura directamente proporcional a la viabilidad celular. Una vez obtenido el formazán los cultivos deben ser centrifugados para recuperar el mismo formazan, al cual se le adiciona dimetil sulfóxido (DMSO) para disolverlo, finalmente se lee a una en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 540-570 nm. En la técnica redox por la técnica de resazurina, esta se fundamenta en la reducción de resazurina a resofurina, por las células metabólicamente activas, produciendo un color rosa directamente proporcional a las células viables, se incuba, se observa el cambio de color y se lee en el espectro. La CMI para estas técnicas se considera aquella concentración en la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio de color (Hassan, y cols., 2009).

www.bdigital.ula.ve

Macrodilución: se prepara una serie de tubos de caldo de cultivo o agar con concentraciones de la sustancia antimicrobiana de mayor a menor, posteriormente se inoculará la cepa o microorganismo de referencia y el resultado se comprobará por la ausencia de turbidez del medio. Todos los tubos de la macrodilución se incuban a 35°C y se observa cada día la presencia de crecimiento comparando con el tubo control (Murray, Baron y Pfaller, 2003).

Microdilución: se denomina así porque involucra pequeños volúmenes de caldo, se procesa en un medio líquido, pero en placas de poliestireno con 96 micropozos en lugar de tubos, utilizando concentraciones conocidas de la sustancia antimicrobiana. Las placas para microdilución se incuban a 35°C y se observan por la presencia de crecimiento visible. Los pozos para microdilución se observan con la ayuda de un espejo lector y el crecimiento de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

cada pozo es comparado con el crecimiento del pozo control negativo (Murray y cols., 2003).

Método de E-Test: es un método cuantitativo de difusión en agar, consiste en aplicar sobre un medio de cultivo, donde se encuentra ya el microorganismo de referencia sembrado o inoculado, unas tiras plásticas que llevan incluidas un gradiente de concentración de un determinado antibiótico determinando en el mismo estudio la concentración mínima inhibitoria (CIM), luego se incuba por 24 horas a temperatura de 37 °C, donde se evidenciara el halo de inhibición en forma de elipse llegando hasta el marcador de la concentración del antibiótico (Martín, Pemán y Rubio, 2001).

Pruebas de susceptibilidad Antifungigrama

www.bdigital.ula.ve

El CLSI (Committee for Clinical and Laboratory Standards) y el EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) han desarrollado métodos de referencia reproducibles, aunque laboriosos, para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de levaduras y hongos filamentosos. Para la interpretación de estos métodos se han definido una serie de conceptos: *concentración mínima inhibitoria* (CMI), que es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento del microorganismo y el otro método es *concentración mínima efectiva* (CME), que es la concentración más baja de *candida* que produce un cambio morfológico (colonias pequeñas, redondeadas y compactas, en lugar de hifas) y se utiliza para definir la actividad de las *cándidas* sobre hongos filamentosos a través de puntos cortes (Quindes, Salesa, Carrillo,1994).

Método para dermatofitos: se realiza un estudio in vitro el cual debe tener en cuenta que estos microorganismos tienen un lento crecimiento y los métodos de propagación para los hongos filamentosos se deben de modificar según cada microorganismo; el Instituto de Estándares Clínicos y de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Laboratorio (CLSI), recomienda utilizar medio de cultivo sólido (CLSI, 2020; NCCLS, 2020).

Para ello, se prepara el inoculo de la cepa a evaluar por picadura en medio Lactrimel, se incuba por 7-15 días a 25 °C para la formación de micro y macroconidias. Se cosechan las conidias en tubo cónico estéril con agua destilada estéril; se cuentan las conidias en un hematocitómetro y se ajusta la densidad a $1x10^6$ conidias/mL. Luego se inoculan placas de medio sólido Müeller-Hinton con ayuda de un hisopo, se espera a que se seque la superficie del medio, se adicionan 10 µL del agente a evaluar sobre un disco de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro; una vez seco el disco, con ayuda de pinzas se coloca sobre la superficie del agar, se incuba bajo las condiciones antes mencionadas. Al concluir el período de incubación se observa la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco y se mide su diámetro (CLSI, 2020; NCCLS, 2020).

www.bdigital.ula.ve

Método para levaduras: Para la preparación del inóculo se realiza un subcultivo en agar dextrosa Sabouraud o agar papa dextrosa, se incuba a una temperatura 35 °C, por un período de tiempo dependiendo del microorganismo a prueba. Posteriormente se prepara una suspensión en solución salina 0,85 % o agua estéril con 0,5-2,5 × 10^{6-8} UFC/mL. Se preparan placas con medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico (MOPS) 0,165 M a pH 7,0 ± 0,1. Los agentes antimicrobianos a evaluar se preparan a diferentes concentraciones y se agregan 0,1 mL de estas soluciones en medio a tubos de ensayo estériles; después se agregan 0,9 mL de la solución de dilución, se incuba bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Para la interpretación de los resultados se observa la turbidez de los tubos contrastándolos con los controles (CLSI, 2020).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) para dermatofitos: Para la determinación de la CMI se sigue el método de microdilución establecido por la LCSI M38-A para hongos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

filamentosos. Se prepara un inóculo de conidias a una densidad óptica de 0,08-0,1 UA, se realiza la lectura en un espectrofotómetro a 625 nm, de esta solución se toma una alícuota y se hace una dilución 1:50 en medio RPMI-1640, por otra parte, se preparan una serie de diluciones de fármaco a evaluar. En una placa de 96 pocillos se colocan 100 µL de la solución diluida de conidias más 100 µL de la dilución de los fármacos y controles. Posteriormente, se incuban a las mismas condiciones antes mencionadas por 7 días. Al término de estos días, se observan los pocillos para verificar el crecimiento de los microorganismos. La CMI es la última concentración donde hay inhibición del crecimiento; de estos pocillos se toma una asada y se inocula en medio sólido Müeller-Hinton y se incuba bajo las mismas condiciones por 7 días, la CMF corresponde a la concentración donde no hay crecimiento (CLSI, 2020; NCCLS, 2020).

Las galerías biomérieux SA son otro método para levaduras y determinar la sensibilidad de las levaduras hacia los antifúngicos, en medio semi sólido, incluyen 16 pares de cúpulas. Cuatro pares de cúpulas no tienen antifúngico y sirven de testigo de cultivo. Los otros pares contienen antifúngico en dos concentraciones (c y C) para categorizar las cepas. Dos antifúngicos se encuentran presentes en varias concentraciones, lo que permite completar la respuesta mediante una CMI (Quindes, Salesa, y Carrillo, 1994).

La levadura a analizar es colocada en suspensión, luego transferida al medio de cultivo e inoculada en la galería. Tras 24-48 horas de incubación, la lectura del crecimiento se hace en forma visual o con el sistema de API. El resultado obtenido permite clasificar la cepa como sensible, intermedia o resistente, o suministrar una CMI utilizando 5-Fluorcitocina y Anfotericina B (Quindes, Salesa y Carrillo, 1994).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Definición Operacional de Términos

- **Aquenios**: es un tipo de fruto seco producido por numerosas especies de plantas de flor (Invernón y González, 2012).
- **Arvenses**: son todas aquellas especies vegetales que crecen de forma silvestre en un ecosistema agrícola y que compiten por agua y nutrientes con las plantas del cultivo. Su nombre común es maleza o mala hierba y por lo general cuentan con gran facilidad para extenderse, esto se debe a que en la mayoría de las ocasiones son especies endémicas muy adaptadas al medio ambiente (Invernón y González, 2012).
- **Emplasto o cataplasma:** es una pasta de uso tópico que se obtiene a partir de plantas y otras sustancias con propiedades medicinales. El preparado suele tener una textura blanda, cálida y húmeda, la cual se aplica en la zona de dolor para disminuir la inflamación (Sánchez, 2006).
- **Esporas**: Las esporas son formadas por los hongos y liberadas para crear nuevos hongos. Las esporas son células reproductivas haploides que se encuentran en algunas bacterias, plantas, algas, hongos y protozoos (Casas, 1994).
- **Fungistática**: es el nombre que reciben los agentes capaces de suspender el crecimiento y el desarrollo de los hongos, o la germinación de sus esporas. A diferencia de los fungicidas, los fungistáticos no matan necesariamente a los hongos, pero sí los paralizan y los detienen (Casas, 1994).
- **Gemación**: El hongo desarrolla una nueva parte de su cuerpo, la cual eventualmente se rompe. Esta parte luego se convierte en un “nuevo” organismo (Casas, 1994).
- **Monocárpica**: plantas que florecen solo una vez y después mueren (Invernón y González, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Palatabilidad**: se emplea para aludir a la cualidad de un alimento que resulta agradable al paladar (Sánchez, 2006).
- **Plantas no vasculares:** absorben el agua directamente de la atmósfera y carecen de tejidos conductores y estructurales complejos para favorecer el crecimiento, de ahí su tamaño reducido (Invernón y González, 2012).
- **Plantas vasculares:** son las llamadas plantas superiores o cormófitas que forman parte de la flora. Su principal característica es que presentan una diferenciación real de tejidos en raíz, tallo, hojas, flores. Las plantas vasculares cuentan con tejidos conductores y estructurales complejos que otorgan a la planta una base con la que crecer de forma más óptima (Invernón y González, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Operacionalización de las Variables

Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

1. Variable	**2. Tipo de variable**	**3. Definición conceptual**
Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.	Dependiente Discreta	Capacidad de inhibir, estabilizar y eliminar el crecimiento de Hongos (Casas, 1994).
4. Definición operacional	**5. Dimensiones**	**6. Indicador**
El método de difusión en agar (método de Kirby Bauer)	Sensible Intermedia Resistente	Tamaño del halo de inhibición del crecimiento fúngico en milímetros.

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Hernández y Aparicio, 2023.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 5. Operacionalización de la variable independiente Caracterización química del aceite esencial de las hojas *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

1. Variable	**2. Tipo de variable**	**3. Definición conceptual**
Caracterización química del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec	Independiente	Comprende una mezcla varios compuestos químicos, a partir de una fuente natural en proporciones considerables para ser tomados en cuenta, como componentes importantes del aceite esencial (Bruneton, 2011).
4. Definición operacional	**5. Dimensiones**	**6. Indicador**
Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM).	Moléculas activas: Monoterpenos, Sesquiterpenos y Diterpenos.	Comparación del índice de Kováts con las diferentes bases de datos para lograr la identificación de los compuestos.

Fuente: Hernández y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis

En vista de que existen estudios realizados con anterioridad, donde se demuestran que los aceites esenciales pertenecientes a la familia Asteraceae y la sub-tribu Espeletiinae han reportado actividad antifúngica, es de esperarse que el aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, presente actividad antifúngica frente a microorganismos de referencia internacional *Candida albicans y Candida krusei.*

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

En el 2010 Hurtado, señala que el tipo de investigación alude al grado de profundidad y clase de resultado a lograr en la investigación. En tal sentido, esta investigación es de tipo confirmatoria, ya que se fundamentó en una serie de mediciones y cálculos que se realizaron con la finalidad de comprobar la actividad antifúngica que posee el aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, frente a una cepa de referencia de internacional *Candida albicans* y *Candida krusei.*

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la Investigación

Hurtado (2010) refirió que el diseño tiene relación con el dónde y el cuándo se recopila la información necesaria y la amplitud de la misma, con el fin de responder la interrogante planteada. De acuerdo a lo citado anteriormente, el diseño de esta investigación es experimental, debido a que el investigador interviene sobre la variable independiente para analizar sus posibles resultados; por lo tanto, se estudia la caracterización química de las hojas *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec , donde se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial obtenidos en la especie y de campo ya que la muestra se recolectó en el área de desarrollo en la carretera vía páramo Recolección en el Páramo de El Batallón a 4,5 Km del cruce entre la vía Pregonero y la Grita estado Táchira.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Se entiende por la población el conjunto finito o infinito de elementos con características comunes, para los cuales serán extensivos las conclusiones de la investigación (Arias, 2006). La unidad de investigación de este estudio está representada por la especie *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

Selección del Tamaño de la Muestra

Se entiende por muestra al subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible (Arias, 2006). Para esta investigación la muestra está representada por las hojas frescas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

www.bdigital.ula.ve

Sistema de Variables

Variable independiente

Las variables independientes son las causas que agregan y explican los cambios en la variable dependiente (Arias, 2006). En este caso la variable independiente es la caracterización química del aceite esencial de las hojas *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, ya que, dependiendo de las concentraciones de dichos componentes puede variar la susceptibilidad antifúngica.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Variable dependiente.

Las variables dependientes son aquellas que se modifican por accidente de la variable independiente, constituyen los efectos o consecuencias que se miden (Arias, 2006). Para esta investigación la actividad antifúngica es una variable dependiente debido a que esta puede aumentar o disminuir de acuerdo con las proporciones de los compuestos del aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake).

Instrumentos de recolección de datos

El instrumento se define como una ayuda o una serie de elementos que el investigador construye con la finalidad de obtener información, facilitando así la medición de los mismos (Tamayo, 2007). Para la recolección de los datos en este estudio, se emplearon tablas elaboradas, en las cuales se consignaron las características físicas, cromatograma, composición química del aceite esencial, actividad antifúngica del aceite esencial en estudio como resultados al trabajo de la investigación.

www.bdigital.ula.ve

Procedimiento de la Investigación

Recolección de la muestra

La recolección de las hojas frescas de *Ruilopezia marcescens* S.F. Blake), Cuatrec, se realizó en el estado Mérida lugar recolección en el Páramo de El Batallón a 4,5 Km del cruce entre la vía Pregonero y la Grita estado Táchira. Un voucher correspondiente (RA06) fue depositado en el MERF Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Obtención de los aceites esenciales

Se utilizaron 6,980 gramos de las hojas frescas de la especie en estudio, las cuales fueron lavadas, licuadas y colocadas en el equipo de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger con 5 L de agua. Al llegar a su punto de ebullición (80 °C), el material vegetal inicio el proceso de extracción y arrastre los componentes volátiles que forman parte del aceite esencial de la planta.

El vapor formado pasó por un condensador, luego la mezcla de aceite y agua fue recolectada en la trampa de Clevenger, donde se separaron por diferencia de densidades, de esta manera se obtuvo el aceite esencial, el procedimiento fue realizado durante 4 horas. Una vez hecha la destilación se procedió a recoger el aceite, se tomó de la trampa con una pipeta Pasteur y se colocó sobre sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 para eliminar la humedad.

www.bdigital.ula.ve

El aceite libre de humedad, se almacenó en la nevera bajo atmosfera de nitrógeno para su posterior análisis, ver figura 27. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio “A” de Síntesis del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes bajo la asesoría por el Prof. Alfredo Usubillaga, el Prof. Luis Rojas y la Dra. Rosa Aparicio.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 27: Hidrodestilación empleando la trampa Clevenger.

www.bdigital.ula.ve

Caracterización química del aceite esencial de las hojas de R. *marcescens*

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, se realizó mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), bajo la asesoría del Prof. Alfredo Usubillaga y el Prof. †Luis B. Rojas.

El aceite obtenido se analizó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlet Packard modelo 6890 con columna capilar HP-5 de 30 metros de largo y equipado con un detector de masa marca Hewlett Packard modelo 5973. Los espectros de masas que se obtuvieron mostraron información sobre el patrón de fragmentación del compuesto, su masa molecular y porcentaje de similitud con los compuestos contenidos en la sexta edición de la base de datos Wiley

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ms. Para el análisis se preparó una solución de 20 µL de aceite en 1 mL de éter dietílico.

De la muestra se inyectó 1,0 µL. El programa de temperatura que se utilizó es el siguiente: iniciándose en 60 ºC durante cero minutos, luego se incrementó la temperatura a razón de 4 ºC/min hasta 260 ºC. El inyector se mantiene a 200 ºC y el detector a 280 ºC. La relación de reparto fue de 1:100. La identificación de los componentes se realizó por medio de la base de datos computarizada Wiley MS Data, Sexta Ed (Adams, 2007). Para el cálculo del índice de Kováts, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, modelo Autosystem y se usó patrones de una serie de *n*-parafinas de C_7 a C_{22} (Kováts, 1958).

Actividad Antifúngica

www.bdigital.ula.ve

La actividad antifúngica se realizó en el Laboratorio de Micología, bajo la asesoría de la Prof. Clara Díaz y el Prof. Alexander Moreno de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Se utilizó para la evaluación de la actividad antifúngica, el método de difusión en agar con discos descrita por (Martin, Pérman y Rubio, 2001), frente a levaduras de referencia internacional: *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

Preparación de las Placas

Preparación de los Discos

Se utilizaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro estériles, posteriormente se impregnaron con 10 µL del aceite esencial de las hojas

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ruilopezia marcescens (S.F. Blake), Cuatrec en una concentración del 100 % (Martin, Pérman y Rubio, 2001).

Preparación de los Inóculos Fúngicos

El inóculo de cada cepa se preparó a partir de un cultivo puro y fresco de 24 horas, provenientes de un medio de cultivo básico Agar Sabouraud glucosa al 2 % (ASD), y se suspendió en 1 mL de solución salina fisiológica (SSF) estéril, se ajustó visualmente hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón de 0,5 McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) descritas por (Velasco, Rojas, Salazar, Rodríguez, Díaz, Morales y Rondón, (2007); Martín y cols., 2001).

Disco control

www.bdigital.ula.ve

Para esta investigación se utilizó de Fluconazol 25 µg para *Candida albicans* y Voriconazol 25 µg para *Candida krusei* como discos de controles positivos y a su vez el disco de dimetilsulfóxido (DMSO) que se utilizó como control negativo (Martín y cols., 2001).

Determinación de la actividad antifúngica

Una vez ajustado la turbidez al patrón 0,5 McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) se siembra en el Agar de Müeller Hinton modificado, posteriormente se colocó con ayuda de una pinza estéril, los discos de papel filtro de 6 mm impregnados con el aceite puro extraído de la planta en estudio, también se habilitó el disco de control positivo y disco control negativo, se dejó a temperatura ambiente por 30 min y posteriormente se llevó a incubar a 37 ºC por 24 a 48 horas. Finalmente, se realizó la lectura de los resultados si hubo o no actividad

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

antifúngica, la cual se evidencia con la formación de un halo de inhibición alrededor del disco y se reporta si inhibe o no inhibe.

Diseño de Análisis

(Hernández, Fernández, y Baptista, 2006) refirieron que existen dos tipos de enfoques de Investigación: cualitativo y cuantitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático mientras que la metodología cualitativa se basa en los principios teóricos desarrollados en la investigación.

Podemos decir, que esta investigación tuvo un enfoque cuantitativo, fundamentado en una revisión bibliográfica de la especie de la planta a desarrollar, donde se observó si tiene actividad antifúngica, en consecuencia, se analizó los resultados obtenidos en función de la técnica *in vitro* utilizado, frente a las cepas *Candida albicans y Candida krusei.*

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

De los 6,980 g hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, se obtuvo 3,8 mL del aceite esencial, por el método de hidrodestilación con la trampa de Clevenger. Con respecto a las propiedades físicas, el aceite esencial presentó un color ligeramente amarillo, una densidad de 0,835 g/mL, el rendimiento 0,054 % y un índice de refracción de 1,4953, ver tabla 6 y figura 28.

Tabla 6. Características físicas del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec.

www.bdigital.ula.ve

Características del aceite esencial	***Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec**
Parte usada	Hojas frescas
Cantidad (g)	6,980 g
Cantidad	3,8 mL
Aspecto	Transparente
Color	Ligeramente amarillo
Olor	Característico
Rendimiento	0,054 %
Índice de refracción	1,4953
Índice de rotación	-21,242
Densidad	0,835 g/mL

Fuente: Hernández, Aparicio y †Rojas (2023).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 28: Aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake).

www.bdigital.ula.ve

El análisis mediante la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, reflejó la presencia de 49 compuestos químicos, es por ello, que los componentes mayoritarios fueron: el Germacreno D (24,86 %); el α-pineno (22,38 %); *p*-cimeno (7,35 %), α-felandreno (6,34 %), δ-amorfeno (3,88 %), α-terpineol (1,50 %) y Kaurenal (0,41 %). Estas estructuras químicas están relacionadas con la actividad biológica presentes en el aceite esencial. Por lo tanto, los compuestos volátiles identificados fueron representado por: Hidrocarburos Alifáticos Insaturados 1,13 %, Hidrocarburos Monoterpénicos 41,46 %, Monoterpenos oxigenados 6,79 %, Hidrocarburos Sesquiterpénicos 42,40 %, Sesquiterpenos oxigenados 4,50 %, Diterpenos 0,41% e Hidrocarburos aromático oxigenado 0,75 %. Estos compuestos químicos representan el 97,04 % del total del aceite, los datos se pueden apreciar en la tabla 7 y en la figura 29, del cromatograma de CG-EM.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 7. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec

N° Pico	T.R (Min)	Área (%)	Sustancia	I.K$_{ref}$	I.K$_{calc}$
1	3,79	0,73	2-Hexen-1-ol	797	869
2	**5,08**	**22,38**	**α–pineno**	**939**	**937**
3	5,16	0,15	Cafeno	954	940
4	5,93	0,84	Sabineno	975	969
5	6,02	1,85	β-pineno	979	972
6	6,30	0,28	Mirceno	990	982
7	**6,68**	**6,34**	**α-felandreno**	**1002**	**994**
8	6,99	0,26	α-terpineno	1017	1003
9	**7,20**	**7,35**	***p*-cimeno**	**1024**	**1009**
10	7,31	1,22	D-limoneno	1029	1012
11	7,39	0,76	1,8-cineol	1031	1015
12	8,14	0,49	γ terpineno	1059	1046
13	8,39	0,72	*Cis*-sabineno hidrato	1070	1056
14	9,01	0,30	α-terpinoleno	1088	1082
15	9,32	0,33	Trans-sabineno hidrato	1098	1095
16	9,45	0,17	Nonanal	1100	1099
17	9,82	0,23	4,8-dimetil-1,3,7 nonatrieno	-	1113
18	10,01	0,33	Cis p-2-menteno-1-ol	1121	1121
19	10,57	0,22	Trans-p-2-menteno-1-ol	1140	1140
20	10,75	0,21	Trans-verbenol	1141	1146
21	11,76	1,83	Terpineno-4-ol	1177	1179
22	12,19	1,50	α-terpineol	1188	1192
23	12,38	0,49	Mirtenol	1195	1197
24	14,21	0,40	Geraniol	1252	1256
25	18,62	0,42	β–elemeno	1390	1395
26	19,33	0,88	*Cis* α-bergamoteno	1412	1415
27	19,48	1,77	Trans-cariofileno	1419	1419
28	19,96	2,38	*Trans* α-bergamoteno	1434	1437
29	20,18	2,15	*Z*-β-farneseno	1442	1445
30	20,52	0,60	α-humuleno	1454	1457
31	20,59	1,01	*E*-β-farneseno	1456	1459
32	20,77	0,75	Ageratocromeno 6-demetoxi	1463	1466
33	**21,41**	**24,86**	**Germacreno D**	**1485**	**1488**
34	21,53	0,25	β-selineno	1490	1492
35	21,66	0,25	δ-selineno	1492	1496

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 7. Composición química del aceite esencial de las hojas de Ruilopezia marcescens (S. F. Blake) Cuatrec. (Continuación.)

N° Pico	T.R (Min)	Área (%)	Sustancia	I.K$_{ref}$	I.K$_{calc}$
36	21,73	0,54	Valenceno	1496	1498
37	21,83	1,46	Biciclogremacreno	1500	1502
38	22,15	3,88	δ–amorfeno	1512	1512
39	22,61	0,59	δ-cadineno	1523	1527
40	22,85	1,11	*Trans*-γ-bisaboleno	1531	1535
41	23,61	0,25	Germacreno B	1561	1558
42	23,75	0,83	*E*-nerolidol	1563	1563
43	24,14	0,60	Germacreno D-4-ol	1575	1574
44	24,20	0,95	Espatulenol	1578	1576
45	24,36	0,30	Óxido cariofileno	1583	1581
46	26,36	0,65	τ-muurolol	1642	1647
47	27,15	0,57	α-bisabolol	1685	1679
48	27,80	0,20	Noolkatol	1715	1705
49	40,99	0,41	Kaurenal*	-	2233
Hidrocarburos Alifáticos Insaturados (%)			1,13		
Hidrocarburos Monoterpénicos (%)			41,46		
Monoterpenos oxigenados (%)			6,79		
Hidrocarburos Sesquiterpénicos (%)			42,40		
Sesquiterpenos oxigenados (%)			4,50		
Diterpenos (%)			0,41		
Hidrocarburos aromático oxigenado (%)			0,75		
Total identificado			**97,04**		

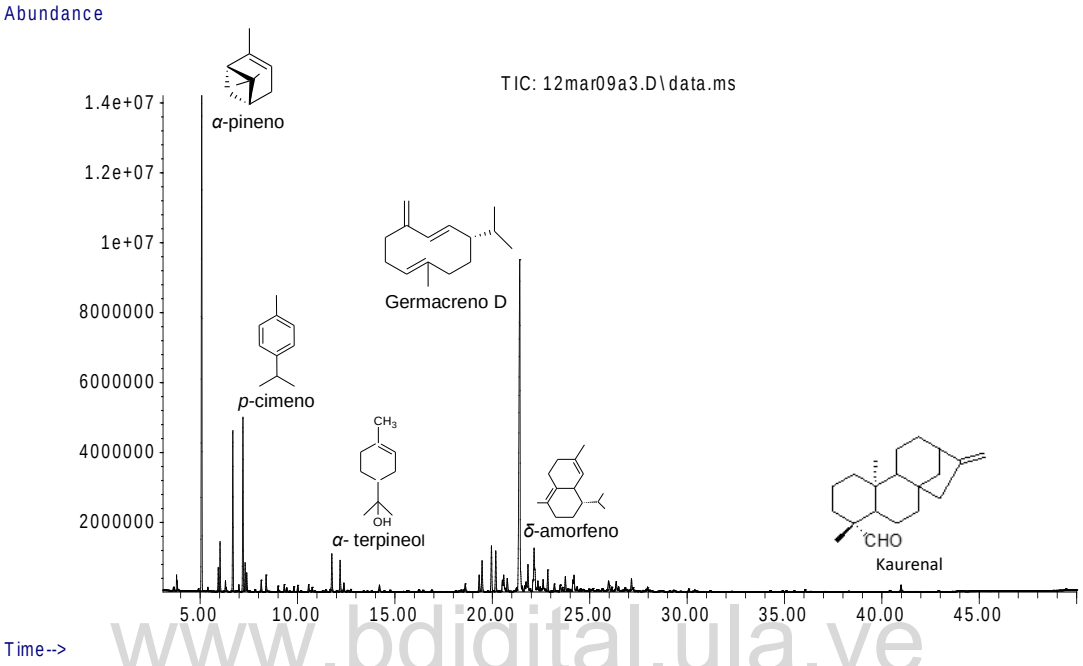
www.bdigital.ula.ve

T. R: Tiempo de retención de los componentes. % Área: área relativa. IK$_{ref}$. Índice de Kováts tomado de la bibliografía (Adams, 2007). IK$_{calc}$. Índice de Kováts calculado con la temperatura programada en la columna HP-5 MS. *Identificado por comparación directa con una muestra autentica.

Fuente: Hernández, Aparicio y †Rojas (2023).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 29: Cromatograma general del aceite esencial de las hojas de *R. marcescens* (S.F Blake) Cuatrec.



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Hernández, Aparicio y †Rojas (2023).

La composición química del aceite esencial de las hojas de *R. marcescens* (S.F Blake) Cuatrec, se encontró el componente con mayor proporción fue el Germacreno D, el cual, juega un papel importante como precursor de muchos otros sesquiterpenos, puede tener efecto repulsivo contra herbívoros (Bruneton, 2011), de ejercer con actividad insecticida contra mosquitos (Kiran y Devi, 2007). También, el Germacreno D posee actividad antibacteriana (Aparicio, 2018). Así como efecto repelente contra áfidos (Bruce, 2005) y garrapatas (Birkett y cols., 2008; Bruzual y cols., 2015).

Otras investigaciones proporcionadas por Aparicio y cols., 2001 logran estudiar el aceite esencial de las hojas de varias especies de *Ruilopezia* tales como *R. atropurpurea* reporta el Germacreno D (0,7 %) y limoneno (40,0–48,8%); en *R. floccosa* el *α*-pineno (28,2%) y Germareno D no estuvo

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

presente; para *R. lindenii* el Germacreno D (11,4 %) y en *R. marcences* el Germacreno D (33,5%) al inicio de la época de floración y al final de la misma (24,9 %) correspondiente al mes de enero. Además, Alarcón, Peña, Velasco, Baptista, Rojas, Aparicio y Usubillaga, 2015 reportan que el aceite esencial de *R. bracteosa* (Standl.) Cuatrec. Presenta *β*-mirceno (34,2 %), *α*-pineno (24,3%), 7-*epi*-*α*-selineno (9,1%), *β*-pineno (8,5%) y Germacreno B (0,9 %) como componentes mayoritarios. Conjuntamente, Pérez, Rojas y Aparicio, 2017 estudiaron la composición del aceite esencial de *R. lindenii* (Sch.Bip. ex Wedd.) Cuatrec., recolectada en dos altitudes del sector de San José, vía Mucutuy, en el Estado Mérida (Venezuela) y encontraron que los componentes mayoritarios en una altura de 2870 metros fueron: trans-cariofileno (30,9 %), óxido de cariofileno (12,3 %), espatulenol (11,7 %) *α*-pineno (5,0 %) y AR-curcumeno (4,3 %) y a otra altura de 3048 metros: trans-cariofileno (18,7 %), oxido de cariofileno (8,9 %), espatulenol (13,5 %), silfiperfol-6-eno (11,2 %), *α*-pineno (4,5 %), kaurenal 2,94 %, AR-Curcumeno (6,4 %) y no hubo presencia de Germacreno.

www.bdigital.ula.ve

Por lo tanto, los aceites esenciales de las especies del género *Ruilopezia* anteriormente mencionadas, muestran un alto contenido de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, los resultados obtenidos en esta investigación son coherentes con los análisis anteriores realizados, pero se diferencia de las demás especies, en el contenido de Germacreno-D, ya que, en otras especies del género *Ruilopezia*, este compuesto está presente en menor proporción. En cambio, para *Ruilopezia marcescens* representa el (24,86 %), como componente mayoritario siendo así su principal característica diferenciable.

En cuanto a la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, no mostró actividad inhibitoria, ver tabla 8 y figura 30 (RM 01).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 8. Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S. F. Blake) Cuatrec.

Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)*		
	Control Positivo		
	AE	FLU	VOR
***Candida albicans* ATCC 14053**	NA	50*	-
***Candida krusei* ATCC 6258**	NA	-	20*

AE: aceite esencial, FLU: Fluconazol (25 µg); VOR: Voriconazol (25 µg); NA: no activo; *Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm, media tomada de dos ensayos consecutivos.

Fuente: Hernández, Aparicio y Diaz (2023).

www.bdigital.ula.ve

Figura 30. Actividad antifúngica del Aceite esencial obtenido de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), frente a *Candida albicans y Candida krusei*

Candida albicans *Candida krusei*

Fuente: Hernández, Aparicio y Diaz (2023).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec, de la familia Asteraceae en dicha investigación no mostró actividad que inhiba el desarrollo de los hongos *Candida albicans y Candida krusei* respectivamente. Este es el primer reporte sobre la actividad antifúngica del aceite esencial de *R. marcescens.* Sin embargo, Cordero, Díaz, Rojas, Aparicio, Velasco, Usubillaga y Colmenares, 2017 realizaron una investigación sobre los aceites esenciales de las partes aéreas de *Coespeletia moritziana*, *Espeletia schultzii* y *Coespeletia timotensis*, fueron obtenidos por hidrodestilación y analizados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Los rendimientos fueron de 0,8 mL, 1 mL y 0,5 mL respectivamente. Los componentes mayoritarios encontrados para *Coespeletia moritziana* fueron: *β*-felandreno (28,42 %), *α*-pineno (25,16 %), *β*-pineno (10,05 %) y kaurenal (4,63 %); para la especie *Espeletia schultzii:* α-felandreno (15,34 %), limoneno (14,52 %), mirceno (12,1 %) y *α*-pineno (7,74 %); y por último, en *Coespeletia timotensis fueron*: *β*-felandreno (48,08 %), *α*-pineno (21,68 %), *β*-pineno (8,68 %) y por ultimo *γ*-cadineno (3,98 %). La actividad antifúngica la evaluaron por el método de difusión en agar con discos modificado contra *Candida albicans* CDC B-385 y *Candida krusei* ATCC 625.

www.bdigital.ula.ve

Los aceites esenciales de las especies de *Coespeletia* inhibieron el desarrollo de *Candida albicans* y *Candida krusei* con halos de inhibición que oscilaron entre 7 y 10 mm de diámetro y valores de CMI entre 110 y 510 µg/mL. El aceite esencial de *Espeletia schultzii* fue activo solo contra *Candida albicans* con halos de inhibición que oscilaron entre 7 mm de diámetro y valores de CMI 210 µg/mL. Por lo tanto, el aceite esencial de las especies de *Coespeletia* tienen actividad contra *Candida albicans* y *Candida krusei*, es importante mencionar que *Coespeletia moritziana* mostró mejor actividad contra las cepas de *Candida krusei* con un halo de inhibición de 110 µg/mL. En cambio, la especie *Espeletia schultzii* solo mostro actividad contra *Candida albicans.*

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Esto quizás se deba al *α*-pineno y *β*-felandreno, componentes mayoritarios en las especies de *Coespeletia* perteneciente a la Asteraceae, por lo general estos compuestos se encuentran dentro de esta familia, a las cuales, se les ha atribuido actividad antifúngica (Naranjo, 2010; Quiroga, Sampietro y Vattuone, 2001). En referencia al estudio anterior, se correlaciona con esta investigación, ya que, el aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec, posee una concentración de α–pineno (22,38 %) y α–felandreno (6,34 %), este último, está en menor proporción en comparación al estudio anterior, lo cual, le puede atribuir a la poca potencia antifúngica.

Además, Bruzual, Guzmán, Crescente y Lanza, 2015 realizaron una investigación sobre el aceite esencial de *Wedelia calycina* (Asteraceae), fue analizado por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) su componente más significativo relacionado a actividad biológica fue el Germacreno D (8,83%), también presenta otros compuestos tales como *β*-sesquifelandreno (7,87%) y óxido de cariofileno (5,10%). La actividad se valoró utilizando el método de difusión en agar, dicho aceite esencial si tuvo actividad antibacteriana pero no obtuvo actividad antifúngica para las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Penicillum hirsutum* y *P. expansus* y *Candida albicans*.

www.bdigital.ula.ve

El estudio anterior, se relaciona con esta investigación, ya que, el aceite esencial de las hojas *Ruilopezia marcescens* de la familia Asteraceae, su componente mayoritario también es el Germacreno-D (24,86 %), el cual, no fue activo contra *Candida albicans y Candida krusei,* esto posiblemente se deba a que los hongos poseen una pared celular rígida, constituida por quitina y glucano, además de membrana celular de ergosterol. Al contario de las bacterias que no lo poseen y solo tienen pared celular constituida principalmente de peptidoglucano.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De las hojas frescas de la especie *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec se obtuvo 3,8 mL del aceite esencial con un rendimiento de 0,054 %.

El análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG/EM), mostró la presencia de 49 compuestos químicos que constituyen el 97,04 % de las sustancias presentes en las hojas de *Ruilopezia marcescens*. Los principales componentes químicos del aceite esencial resultaron ser: Germacreno D (24,86 %), α-pineno (22,38 %), *p*-cimeno (7,35 %) y el α-felandreno (6,34 %), δ-amorfeno (3,88 %), α-terpineol (1,50 %) y un diterpeno como el Kaurenal (0,41 %) que es un compuesto que está presente en algunas especies del frailejón, lo cual, son un conjunto de estructura con propiedades fitoquímicas y biológicas.

www.bdigital.ula.ve

La apreciación de la actividad Antifúngica fue desarrollada por el método de difusión en agar con discos, frente a cepas fúngicas de *Candida albicans y Candida krusei*, demostrando la resistencia al aceite esencial de la especie *Ruilopezia marcescens,* por lo tanto, no hubo actividad.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Recomendaciones

Dar continuidad a la investigación del género *Ruilopezia* propias de los páramos andinos del estado Mérida Venezuela, de las cuales casi no existe información bibliográfica y con ello, tener un conocimiento en el descubrimiento de nuevas especies vegetales con actividad terapéutica.

Continuar la investigación relacionada con actividad citotóxica, antioxidante, antiinflamatoria y antiparasitaria del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec.

Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas la especie *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake), Cuatrec. contra otras especies productoras de micosis que son perjudiciales para la salud.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

REFERENCIA BIBLIOHEMEROGRÁFIAS

Abuhammour, W., Eyassu, H., y Gaber, E. (2004). Newer Antifungal Agents. *Indian Journal of Pediatrics*, 7 (4): 253 - 259.

Adams, R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 5 th edition. Illinois (USA).

Alarcón, L., Peña, A., Velasco, J., Baptista, J., †Rojas, L., Aparicio, R., y Usubillaga, A. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruilopezia bracteosa*. *Natural Product Communications.* 10 (4): 655–656.

Aparicio, R., Romero, M., †Rojas, L., Khouri, N., Usubillaga, A., (2001). Composition of the essential oil of four species of *Ruilopezia* from the Venezuela Andes. *Flavour and Fragrance Journal*. 16 (3): 172-174.

Aparicio, R., †Rojas, L., Velasco, J., Rojas, J., Sosa, M., y Usubillaga, A. (2019). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). *Revista Peruana de Biología* 26 (1): 095 -100.

Aparicio, R., †Rojas, L., Usubillaga, A., y Lucena, M. (2018). Caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec, *Revista de la Facultad de Farmacia*. 81(1-2): 6–12.

Araujo, L., Vimos, K., Cruz, R., Falconí, F., †Rojas, L., y González, A. (2020). Componentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) que crece en Ecuador. *Acta Biológica Colombiana.* 25(1): 22-28.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Arenas, R. (2008). Micología médica ilustrada. 3era edición. Editorial McGraw-Hill. México.

Arias, F. (2006). *El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica*. 1ra edición. Editorial Episteme. Venezuela.

Aristeguieta, L. (1964). Compositae. *Flora de Venezuela*. 10 (1): 43–61.

Badillo, V. (2001). Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. *Ernestia*. 11 (3): 147-199.

Badillo, V. (1997). Los géneros de las Compositae (Asteraceae) de Venezuela. Clave artificial para su identificación. Ernestia 6 (3): 51-168.

Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. A Review. Food And Chemical Toxicology. 46 (2):446–475.

www.bdigital.ula.ve

Balkis, M., Leidich, S., Mukherjee, P., y Ghannoum, M. (2002). Mechanisms of fungal resistance: an overview. *Drugs.* 62 (7) :1025 - 1040.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology.* 45 (4): 493-496.

Bennett, J. (1996). Fármacos antimicrobianos: fármacos antimicóticos. En: Goodman LS, Gilman A (editores). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México.

Birkett, M., Al Abassi, S., Krober, T., Chamberlain, K., Hooper, A., Guerin, P., Pettersson, J., Picket, J., Slade, R., y Wadhams, L. (2008). Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggar, from the East Africa plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemical* 69 (8): 1710–1715.

Bonifaz, A. (2012). Micología Médica Básica (4.a ed.). México: McGraw Hill.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Bruce, T., Birkett, M., Blande, J., Hooper, A., Martin, J., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L., y Wadhams, L. (2005). Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Management Science*. 61(11): 1115–1121

Bruneton, J. (2011) Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales. 2da Edición. Zaragoza: Acribia.

Bruneton, J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 2da Edición. Editorial Acribia. España.

Bruzual, V., Guzmán, W., Crescente, O., y Lanza, J. (2015). Aceite esencial de *Wedelia calycina* (Asteraceae): Composición química, actividad antibacteriana y antifúngica. Saber (Revista multidisciplinaria del Consejo de Investigaciones de la Universidad de Oriente), Venezuela, 27(1): 87–93

Burgess, J., Jordan, E., Bregu, M., Mearns, A., y Boyd, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology.* 70 (1): 27-32.

Cannon, R., Lamping, E., y Holmes, A. (2009). Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. Clinical Microbiology Reviews. 22 (2):291-321.

Casas, G. (1994). Micología general. Universidad central de Venezuela. Ediciones de la biblioteca, Caracas.

Cicció, J., y Chaverri, C. (2022). Composición Química de los aceites esenciales de *Dahlia imperialis* (Asteraceae) de Crecimiento Silvestre en Costa Rica. *Revista Sociedad Química de México*. 66 (4): 468-479.

CLSI. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement. M27-A2, M38-A y M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cortés, L., Russi, N., y July, A. (2011). Equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*. 28 (6): 529-536.

Cortez, V., Macedo, J., y Hernández, M. (2004). Farmacognosia: Breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica.* 15(2):123-136.

Cower, D., y Helfand, W. (1990). Historia de la Farmacia. 2da Edición. Editorial Doyma. España: Madrid.

Cowan, M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-582

Coy, C. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). (Tesis de Pregrado). Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Departamento de Química. Bogotá, Colombia.

www.bdigital.ula.ve

Cuatrecasas, J. (1976). Una Nueva Subtribu en las Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. Phytologia. 35 (1): 43-61.

Cuatrecasas, J. (1987). Clave diagnóstica de las especies de *Ruilopezia* (Espeletiinae, Heliantheae, Compositae) *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 44 (2): 401-419.

Cuatrecasas, J. (1995). Un nuevo género de Compositae: Paramiflos (Espeletiinae) de Colombia. *Actas de la Sociedad Biológica de Washington.* 108(4): 748-750

Cuatrecasas, J. (1996). Clave provisional de las especies del género *Espeletiopsis* Cuatrec. (Espeletinae, Compositae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 54(4): 370-377.

Davicino, R., Mattar, M., Casali, Y., Correa, S., Pettenati, E y Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología*. 14 (2): 247 - 251.

Davies, N. (1990). Gas Chromatography Retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on metilsilicona and carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*. 503 (1):1-24.

Del Vitto, L., y Petenatti, E. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*. 18(2): 87–115.

Delgado, A., Prieto, S., Amich, S., y Salve, M. (1994). Laboratorio de microbiología. 1ª. Edición. McGraw-Hill Interamericana. España.

Denyer, S., Hodges, N., Gorman, S., y Gilmore, B. (2011). Microbiología farmacéutica de Hugo y Russell. 8va edición. Wiley-Blackwell. EEUU.

www.bdigital.ula.ve

Diazgranados, M. (2013). Aportes a la delimitación de los páramos desde el estudio de los frailejones. 1era Edición. Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Colombia.

Diaz, M. (2017). La geografía da forma a la filogenia de los frailejones (Espeletiinae Cuatrec., Asteraceae): un ejemplo notable de radiación rápida reciente en islas del cielo. (Tesis de Doctoral) Universidad de Saint Louis, Saint Louis, Departamento de Biología, Estados Unidos.

Domínguez, X. (1979). Métodos de investigación fitoquímica. 1era edición. Limusa, Mexico.

Domínguez, L., y Parzanese, M. (2013). Tecnologías para la industria alimentaria fluidos supercríticos. Alimentos Argentinos Natural Product Reports 19(4): 181-192.

Evans, W. (1991). Trease and Evans Pharmacognosy. 13° edition. McGraw Hill Interamericana. México.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2021). 3 era edición. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). México.

Fiallos, M., y Moncayo, L. (2022). Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* J.F. GME). Tesis de maestría en química aplicada. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado Universidad Estatal de Milagro. Ecuador.

Fischer, N. (1990). Sesquiterpene lactones: Biogenesis and Biomimetic Transformations. Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids. 1° Edition. Towers & H. A. Stafford (Eds.), EEUU.

Funk, V., Sussana, A., Stuess, T., y Bayer, R. (2009). Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Viena: International Association for Plant Taxonomy.

www.bdigital.ula.ve

Gonzaga, L., Costa, I., Geraldo, M. (2005). Genero *Bacharis* (Asteraceae): aspectos químicos, económicos y biológicos. *Revista Química Nova.* 28 (1): 85-94.

González, Á. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas (Trabajo de Grado). Sede manizales Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia.

Grayer, R., y Harborne, J. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, *Phytochemistry Reviews*. 37 (1):19-42.

Gupte, M., Kulkarni, P., y Ganguli, B. (2002). Antifungal antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58 (1): 46-57.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hassan, A., Rahman, S., Deeba, F., y Mahmud, S. (2009). Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. *Journal of Medicinal Plants Research.* 3 (1): 20-23.

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2006). Metodología de la Investigación. (5ª ed.). McGrawHill. México.

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. (5ª ed.). Mc Graw Hill. México.

Hernández, C., y Moncayo, L. (2022). Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de diente de león (*Taraxacum Officinale*) frente a microorganismos patógenos. (Tesis de Maestría en Química Aplicada). Universidad estatal de Milagro de Ecuador.

Heywood, V. (1977) Biología y Química de las Compositae. Londres, Nueva York., Academic Press. 29-693.

www.bdigital.ula.ve

Hopkins, W. (1999) Capítulo 14. Moléculas y Metabolismo en Introducción to Plant Physiology. 2nd edition. Editorial J. Wiley. EEUU.

Hurtado, J. (2010). El Proyecto de Investigación. Comprensión Holística de la Metodología y la Investigación. 1era edición. Editorial Quirón-Sypal. Venezuela.

Invernón, V., y González, M. (2012). Manual de laboratorio de Botánica. *Reduca* (Biología). Serie Botánica. 5 (2): 1-14.

Izco, J. (2004). Botánica. 2ª edición. Editorial Mc Graw Hill. España.

Jawetz, E., Melnick, J., y Adelberg E. (2006). Manual de Microbiología Médica. 18a edición. Editorial Mc Graw Hill. México.

Jennings, W., y Shibamoto, T. (1980). Qualitative analysis of flavor and fragrance volatis by glass capillary gas chromatography. 1st Edition. Academia Press, EEUU.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Kiran, S., y Devi, P. (2007). Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylons wietenia* DC. *International Journal for Parasitology*. 01(2): 413–418.

Kováts, E. (1958). Characterization of organic compounds by gas chromatography. Part 1. Retention indices of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Elsevier Ltd Review.* 41 (2):951–958

Lezaeta, M. (2010). Medicina natural al alcance de todos. 1 era edición. Editorial: Hojas de Luz. España.

Madrigal, l., y Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57 (4): 387-396

Magdalena, V. (2019). Propiedades antimicrobianas, antioxidantes e inmunomoduladoras de los aceites esenciales: una revisión sistemática. Revista Nutrientes 11 (11): 27-86.

www.bdigital.ula.ve

Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. 2ª Edición. Editorial Torino, Venezuela.

Martín, E., Pemán, J., y Rubio, M. (2001). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 1 era edición. *Revista Iberoamericana de Micología* - Asociación española de micología. España.

Mattos, E., y Collantes, L. (2020). Variación estacional de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Ophryosporus peruvianus*. *Revista Sociedad Química de Perú*. 86(3): 329-335

Medinilla, B. (1996). Manual de Laboratorio de Farmacognosia, Universidad de San Carlos de Guatemala, *Revista Biomédica*. 15 (2): 270-274.

Murray, P., Baron, E., y Pfaller, M. (2003). Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. ASM Press. EEUU.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Naranjo, P. (2010). Etnomedicina y etnobotánica avances en la investigación. Universidad Andina Simón Bolívar. 1era edición. Editorial Abya yala. Ecuador.

NCCLS. (2020). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition Serving the World's Medical Science Community Through Voluntary Consensus 22(15):3.

Nocua, L., Uribe, P., y Cortes, J. (2020). Azoles of then and now. Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología 31 (5): 219-230.

Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. 1 era edición. Editorial Aiyana. España.

Palá, J. (2002). Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "Eryngium" l, en la península Ibérica. (Tesis de Grado), Universidad Complutense de Madrid España.

www.bdigital.ula.ve

Palella, S., y Martins, F. (2010). Metodología de la Investigación Cuantitativa. 2da edición. Fedupel. Venezuela.

Panero, J., y Funk, V. (2002). Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington.* 115 (4): 909-922.

Pérez, A., Rojas, L., y Aparicio, R. (2017). Análisis comparativo de los componentes volátiles de *Ruilopezia lindenii* (Schultz-Bip.ex Wedd.) Cuatrec., recolectada a diferentes altitudes en Mérida-Venezuela. *Revista multidisciplinaria semestral Academia*. 16 (18): 39-44.

Pietra, F. (2002). Biodiversity and Diversity of Natural Products, 1st edition of the Pérgamo editorial, EEUU.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Quindes, G., Salesa, R., y Carrillo, A. (1994). Multicenter Evaluation of ATB Fungus: A Standardized Micromethod for Yeast Susceptibility Testing. Chemotherapy. 40 (4): 245-251.

Quiñones, D. (2017) Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud" *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 69(3):17-25.

Quiroga, E., Sampietro, T., y Vattuone, M. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Ethnopharmacol Review*. 74(4):89-96.

Raut, J., y Karuppayil, A. (2014). Status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products Review*. 62(4): 250-264.

Rodriguez, M., Alcaraz, L., y Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. 1era edición. Editorial CIB. México.

Romero, B. (2007). Avances en la taxonomía y sistemática de los hongos: una revisión general. En La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. *Revista de Divulgación de la Ciencia*. 5(2):10-27.

Ruggiero, M., Gordon, D., Orrell, T., Bailly, N., y Bourgoin, T. (2015). A Higher-level classification of all living organisms. Plos One Review. 10(4):9-14.

Ryan, K., y Ray, C. (2017). Sherris Microbiología médica. 6ta edición. McGraw Hill. México.

Sánchez, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. 1 era edición. Editorial Aiyana. España.

Sandra, P., y Bichi, C. (1987). Capillary gas chromatography in essential oils analysis. 1st edition. Taylor & Francis Group. EEUU.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Schildknecht, C. (1972) Allyl compounds and their polymers (including polyolefins). 1st edition. Wiley-Interscience. EEUU.

Sowndhararajan, K., y Kim, S., (2016) Influencia de las fragancias en la actividad psicofisiológica humana: con especial referencia a la respuesta electroencefalográfica humana. *Revista Ciencia farmacéutica.* 29 (4): 724-751.

Stevens, P. (2012). «Asteraceae». Angiosperm Phylogeny Website, versión 13.

Tamayo, M. (2007). El proceso de la investigación científica; incluye glosario y manual de evaluación de proyectos 4ta edición. Editorial Limusa. México.

Terrell, C., y Hughes, C. (1992). Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. *Mayo Clinic Proceedings*. 67(2): 69-91.

www.bdigital.ula.ve

Tyler, V., Brady, L., y Robbers, J. (1988). Pharmacognosy. Philadelphia, 9th Edition. Publisher: Lea & Febiger, USA.

Valdés, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*. 39(2):1-5.

Van den Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., y Coene, M. (1991). Biochemical basis for the activity and selectivity of oral antifungal drugs. British *Journal Of Clinical Practice*. 44 (2): 41-46.

Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A., Rondón, M. (2007). Antibacterial activity of the essential oil of Lippia oreganoides against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Products Communication*. 2: 85-88.

Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 40 (4): 277-83.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Wagner, H. (1977). Pharmaceutical and economic uses of the compositae. En: heywood, harborne & turner (eds.), the biology and chemistry of the compositae. *Academic press*. 1 (2): 411-33.

Whittaker, R. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science Review* 163 (2): 150-194.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)