



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



**Actividad biológica y composición química del aceite  
esencial de las hojas de *Espeletopsis pannosa* (Standl.)  
Cuatrec.**

**Autor(a):** Br. Lacruz B. Génesis D.

**Tutor(a):** Dra. Aparicio Rosa L.

**Mérida, junio 2023**



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



**Actividad biológica y composición química del aceite  
esencial de las hojas de *Espeletopsis pannosa* (Standl.)  
Cuatrec.**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Licenciada en Bioanálisis**

**Autor(a):** Br. Lacruz B. Génesis D.

**Tutor(a):** Dra. Aparicio Rosa L.

**Mérida, junio 2023**

## AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios, por guiarme y acompañarme a lo largo de mi carrera universitaria, por darme salud y sabiduría.

A mis padres, por contar con su apoyo en todo momento y quienes han creído en mí siempre.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, en especial la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por permitirme formarme académicamente, por ser mi segunda casa, donde conocí excelentes profesores y compañeros.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por haberme permitido realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones y culminar mi parte experimental.

A mi Tutora Dra. Rosa Aparicio, le agradezco por aceptarme ser su tesista, por su paciencia, dedicación, compromiso, por sus conocimientos, enseñanzas y orientación durante todo el desarrollo de este trabajo de investigación.

## **DEDICATORIA**

Primeramente, a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida. Gracias a él que me regala entendimiento y fortaleza, para seguir con mis metas.

A mi madre Eledy Bermúdez, por todo el esfuerzo, dedicación, sacrificio, el apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, confianza en cada momento de mi vida y en mis estudios, y sobre todo amor.

A mi padre Daniel Lacruz, por su apoyo incondicional, sacrificio por buscar siempre la manera para ayudarme económicamente en todo este proceso, y por siempre estar a mi lado dándolo todo.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	ix
<b>RESUMEN.....</b>	xi
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	1
<b>CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....</b>	4
Planteamiento del problema.....	4
Justificación e importancia de la investigación.....	6
Objetivos de la investigación.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
Alcances y limitaciones de la investigación.....	9
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....</b>	11
Trabajos previos.....	11
Antecedentes históricos.....	14
Bases teóricas.....	16
Familia Asteraceae.....	16
Género <i>Espeletiopsis</i> .....	20
Especie <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.....	25
Productos naturales.....	28
Aceites esenciales.....	33
Hongos.....	43
Definición operacional de términos.....	54
Operacionalización de las variables.....	54
Hipótesis.....	56

## ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

<b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>57</b>
Tipo de investigación.....	57
Diseño de investigación.....	57
Población y muestra.....	58
Unidad de la investigación.....	58
Selección del tamaño de la muestra.....	58
Sistema de variables.....	58
Técnica e instrumentos de recolección de datos.....	59
Procedimiento de la investigación.....	59
Diseño de análisis.....	65
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructuras químicas de algunos componentes de la Familia Asteraceae.....	19
<b>Figura 2.</b> Estructuras químicas de algunos componentes del género <i>Espeletiopsis</i> .....	23
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas de algunos componentes de otras especies de frailejones.....	25
<b>Figura 4.</b> Especie <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.....	26
<b>Figura 5.</b> Flores de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.....	26
<b>Figura 6.</b> Estructuras químicas de la especie <i>Espeletiopsis pannosa</i> .....	28
<b>Figura 7.</b> Ruta metabólica de los terpenos a partir del ácido mevalónico.	30
<b>Figura 8.</b> Ruta metabólica del ácido shiquímico.....	32
<b>Figura 9.</b> Estructuras químicas de los aceites esenciales.....	35
<b>Figura 10.</b> Estructuras químicas de algunos componentes del tipo diterpenos (kaureno).....	36
<b>Figura 11.</b> Estructuras químicas de algunos componentes derivados del fenilpropano.....	37
<b>Figura 12.</b> Esquema de destilación por arrastre con vapor.....	38
<b>Figura 13.</b> Esquema de la hidrodestilación con trampa de Clevenger.....	39
<b>Figura 14.</b> Mecanismos de acción de las diferentes familias de antifúngicos en uso clínico.....	49
<b>Figura 15.</b> Voucher depositado en el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec.....	60
<b>Figura 16.</b> Trampa de Clevenger usada para la hidrodestilación.....	61
<b>Figura 17.</b> Equipo de cromatografía de gases usado.....	62
<b>Figura 18.</b> Cepas usadas en el ensayo de referencia internacional.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

(Continuación)

<b>Figura 19.</b> Halo de inhibición de los discos con aceite esencial de <i>Espeletiopsis pannosa</i> .....	69
--	----

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la familia Asteraceae.....	17
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Espeletiopsis</i> .....	21
<b>Tabla 3.</b> Especies del género <i>Espeletiopsis</i> en Venezuela.....	22
<b>Tabla 4.</b> Clasificación taxonómica de la especie <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.....	27
<b>Tabla 5.</b> Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de <i>E. pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.....	55
<b>Tabla 6.</b> Operacionalización de la variable independiente: Composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.....	56
<b>Tabla 7.</b> Características del aceite esencial de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec.....	66
<b>Tabla 8.</b> Composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec.....	67
<b>Tabla 9.</b> Tipo de compuestos identificados en las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

(Continuación)

<b>Tabla 10.</b> Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec.....	69
<b>Tabla 11.</b> Compuestos mayoritarios en algunas especies de <i>Espeletiopsis</i> .....	71
<b>Tabla 12:</b> Compuestos mayoritarios en algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae.....	72
<b>Tabla 13.</b> Compuestos mayoritarios en algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae.....	72
<b>Tabla 14.</b> Compuestos mayoritarios en algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae.....	73
<b>Tablas 15.</b> Actividad antifúngica de algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae.....	74



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”  
Trabajo de Grado II



**Actividad biológica y composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.**

**Autor(a):** Lacruz B. Génesis D.

**Tutor(a):** Dra. Aparicio Rosa L.

**Resumen**

*Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., conocida como frailejón plateado, perteneciente a la familia Asteraceae, se caracteriza por poseer aceites esenciales con metabolitos de tipo monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, los cuales han demostrado tener actividad antimicrobiana. El presente trabajo buscó determinar la actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de las hojas de *E. pannosa*. El aceite esencial de las hojas frescas fue obtenido por la técnica de hidrodestilación con la trampa de Clevenger, obteniendo 2,4 mL (rendimiento de 0,088 %), se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Logrando identificar el 97,06 %. Entre los grupos de compuestos volátiles identificados predominaron los hidrocarburos monoterpénicos (63,0 %) e hidrocarburos sesquiterpénicos (27,69 %). Los compuestos mayoritarios fueron  $\alpha$ -tujeno (13,26 %),  $\alpha$ -pineno (26,89 %),  $\beta$ -pineno (11,01 %) y aristoleno (10,07 %). También se evidenció la presencia de compuestos pertenecientes al grupo de los silfiperfol. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar con discos frente a candidas de referencia internacional. El aceite esencial de las hojas de *E. pannosa* presentó actividad antifúngica, inhibiendo a *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258) con un halo de inhibición de 10 mm para ambas. Este es el primer estudio de la actividad antifúngica del aceite esencial de *E. pannosa* y del género *Espeletiopsis*.

**Palabras clave:** Aceite esencial, *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec, actividad antifúngica.

## INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han constituido y siguen constituyendo la materia prima fundamental para la obtención de medicamentos. Estos son compuestos químicos sintetizados por las plantas, que ejercen mecanismos de defensa importantes contra agentes patógenos que las atacan, tales como microorganismos bacterianos, fúngicos e insectos. No obstante, muchas investigaciones han sido dirigidas a la obtención de estas sustancias para su aislamiento y posterior estudio de la actividad antimicrobiana que ejercen sobre diferentes especies de bacterias y hongos patógenos para el ser humano. Si bien es cierto, los microorganismos han desarrollado resistencia a gran cantidad de las drogas disponibles; esto ha representado una alarma a nivel mundial (Cañigual, Dellacassa y Bandoni, 2003).

Recientemente se ha generado un interés por estudiar los beneficios obtenidos de las sustancias de origen vegetal, favoreciendo la producción y estudio de extractos vegetales que contribuyan a combatir las infecciones ocasionadas por estos microorganismos resistentes. Uno de los productos aprovechables de las plantas son los denominados aceites esenciales, es debido a su amplia gama de usos terapéuticos registrados. De hecho, un aceite esencial es el producto de una mezcla de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas que poseen ciertas características, entre las que destaca su potencial bioactividad (Bruneton, 2001).

A nivel mundial se han realizado diferentes estudios con los aceites esenciales, obtenidos de varias plantas clasificadas como medicinales, cuyo objetivo principal ha sido buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus o parásitos. Una motivación específica, es la búsqueda de sustancias fungistáticas y fungicidas con escasa o nula toxicidad, para el desarrollo de nuevos antifúngicos de uso seguro (Rosilla, 2012).

La familia Asteraceae, muestra un gran potencial como fármaco usado en la medicina natural, principalmente en el mercado de sus productos naturales. Estudios realizados han demostrado que los aceites esenciales de esta familia de plantas poseen un alto contenido en hidrocarburos sesquiterpénicos. La presencia de estos metabolitos en Asteraceae, se ha asociado con las propiedades curativas debido a actividades farmacológicas específicas (Clavin, Gorzalczany, Macho, Muñoz, Ferraro, Acevedo y Martino, 2007).

*Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., conocida como frailejón plateado, perteneciente a la familia Asteraceae, es una planta arrosetada, con hojas lineales, se encuentra a 3.500 m.s.n.m, en suelos que contienen abundante agua (Hidalgo, Ricardi, Gaviria y Estrada, 1999). Está distribuida en los páramos andinos de Venezuela, en los estados Mérida, Táchira y Trujillo. Sus hojas y partes aéreas han sido usadas por la población para tratar enfermedades respiratorias (asma, gripe, expectorante y antitusivo), enfermedades de la piel, reumatismo y problemas digestivos, resultando de gran importancia en la fitoterapia tradicional local. Esta especie, se caracteriza por poseer aceites esenciales con monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (Hidalgo y cols., 1999; Usubillaga, Romero y Aparicio, 2003) los cuales han demostrado tener actividad antibacteriana (Meccia, Rojas, Velasco, Díaz y Usubillaga, 2007).

Así pues, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

Esta investigación se desarrolló siguiendo las Normas APA, la cual esta segmentada en cinco capítulos. En el Capítulo I, se expone el problema, en donde se desarrollaron puntos como: planteamiento del problema, justificación de la investigación, objetivos de la investigación y alcances y limitaciones de la investigación. Por otra parte, en el Capítulo II, se presentó el contenido del marco teórico compuesto por: trabajos previos, antecedentes históricos, bases teóricas, operacionalización de variables, sistema de hipótesis y definición de términos.

Asimismo, el Capítulo III, denominado marco metodológico, fue estructurado de la siguiente manera: tipo de investigación, diseño de investigación, población y muestra, sistema de variables, procedimiento o metodología de la investigación y diseño de análisis. Continuamente se desarrolló el capítulo IV, donde se expusieron los resultados de la investigación y se discutieron los mismos. También se anexó un capítulo independiente para las conclusiones y recomendaciones, siendo este el capítulo V. Además del apartado de Referencias bibliohemerográficas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del problema**

La actividad biológica de las plantas ha sido objeto de estudio desde tiempos remotos hasta el día de hoy. Dicha actividad se ha evaluado a partir de extractos de diferentes disolventes, así como en aceites esenciales. Actualmente, los componentes químicos de las diferentes partes vegetales se aíslan con el fin de estudiar dicha actividad. Específicamente, la comunidad científica ha puesto un enfoque especial sobre la actividad antimicrobiana, debido al acelerado aumento de la resistencia de los agentes infecciosos frente a los fármacos antimicrobianos. Cabe resaltar, que la actividad antimicrobiana es conocida como la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población microbiana o para eliminarla (Fica, 2005).

Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) promueve la búsqueda constante de nuevos antibióticos que contrarresten la resistencia de los microorganismos ya existentes y los reemergentes, por lo que se ha incrementado el interés de las plantas medicinales debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que pueden ser útiles en el desarrollo de antibióticos.

A diferencia de los antibacterianos, se cuenta con pocos antifúngicos para el tratamiento de las infecciones micóticas, algunas sustancias con esta actividad pueden ser inestables o tóxicas para los seres humanos. Por otra parte, los hongos son organismos que se caracterizan por presentar una gran plasticidad ante los cambios ambientales, al igual que las bacterias también han desarrollado mecanismos de resistencia a los principales grupos antifúngicos. Este fenómeno ocurre a causa de la presión selectiva que ejercen los antifúngicos, la cual facilita

la selección de cepas que desarrollan diferentes mecanismos de resistencia para sobrevivir y reproducirse en su presencia. Además, el tratamiento de las infecciones micóticas es limitado tanto por la toxicidad de anfotericina B, la resistencia de algunas especies de *Candida* y a antimicóticos como itraconazol, fluconazol y voriconazol, así como por el alto costo de los tratamientos. Como consecuencia, la incidencia de las infecciones fúngicas va en ascenso, lo que incrementa el riesgo para la salud humana que suponen las infecciones que provocan, particularmente entre individuos inmunocomprometidos (Rivero, 2019; Cordero y cols., 2017).

Por lo tanto, el conocimiento de la resistencia a los antifúngicos es esencial para el desarrollo de estrategias profilácticas y terapéuticas eficaces que eviten los problemas que están apareciendo en la actualidad con las micosis por hongos resistentes. Si bien, el desarrollo de compuestos con actividad antifúngica se ha producido mucho más lentamente que el de antibacterianos, y aunque el número de antifúngicos ha ido aumentando en las últimas décadas, la mayoría pertenece a un grupo limitado de familias que comparten mecanismos de acción y por tanto, de resistencia (Pontón y Quindós, 2006).

Lo anterior ha estimulado la búsqueda de nuevas moléculas con potencial antifúngico en productos obtenidos de diferentes plantas. Algunos estudios han revelado que los aceites esenciales de las partes aéreas de varias especies de la subtribu Espeletiinae de los páramos venezolanos han mostrado actividad antifúngica frente a varias especies de *Candida*, dependiente de la variación en la composición de los mismos de acuerdo con los géneros y especies de cada planta. Lo cual incrementa la posibilidad de utilizar dichos aceites esenciales como alternativa en los tratamientos de infecciones micóticas como candidiasis. Ya que *Candida albicans* continúa siendo la especie comúnmente más implicada en la forma invasiva y no invasiva de Candidiasis (Cordero y cols., 2017).

No obstante, son escasos los estudios realizados sobre la bioactividad de la especie *Espeletopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. Por lo tanto, con la finalidad de

contribuir con el estudio del género *Espeletiopsis*, en el presente estudio se pretendió caracterizar el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y se evaluó la actividad antifúngica por el método de difusión en agar con discos frente a cepas de *Candida* de referencia internacional.

Por consiguiente, una vez planteada la situación actual del problema, las autoras de esta investigación se formuló el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antifúngica y la composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.?

### **Justificación e importancia de la investigación**

En la presente investigación se consideraron varias razones para realizarla. En primer lugar, las hojas del género *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., representan una alternativa como antifúngico, ya que algunos componentes de varias especies pertenecientes al género *Espeletiopsis* tienen potencialidad antimicrobiana (Aparicio, Rojas, Velasco, Vega y Usubillaga, 2021; Cordero y col., 2017). En segundo lugar, en la realidad se muestra al género *Espeletiopsis* como un contribuyente para el tratamiento de diversas afecciones en la población andina, debido a la biodisponibilidad y la actividad biológica de la misma (Vit, Meléndez y Schwartzberg, 2003). En tercer lugar, se reconoció la necesidad de analizar los compuestos orgánicos del aceite esencial de las hojas de esta planta, ya que de ellos depende el potencial bioactivo de la misma (Cordero y cols., 2017 y Vit y cols., 2003).

Aunque los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático, no todas las plantas contienen estas sustancias y las que presentan, poseen una concentración tan baja que hace imposible su obtención práctica (Ortuño, 2006). Además, los estudios fitoquímicos realizados a

diferentes especies muestran un gran potencial de los aceites esenciales, debido a que en el análisis de estos aceites los componentes mayoritarios son monoterpenos hidrocarburos de la serie mentano y pinano (Cordero y cols., 2017), cuyos metabolitos están fuertemente relacionados con actividad antimicrobiana.

Por consiguiente, la investigadora focalizó su evento de estudio en la actividad antifúngica de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. y la composición química del aceite esencial de las hojas desde el punto de vista confirmatorio por diversas razones. Primeramente, la poca información divulgada sobre la actividad antifúngica de esta planta recabó sobre el interés de la presente investigación. Además, la presencia de aceites esenciales en *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., impulsó a conocer el rendimiento de la obtención del mismo. De igual forma, conocer las diferentes especies fúngicas que presentaron sensibilidad o resistencia frente al aceite esencial evaluado. Y finalmente, la potencialidad de aportar información para próximas investigaciones sobre dicha planta.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo general***

Determinar la actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

### ***Objetivos específicos***

- Obtener el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger.
- Identificar los componentes del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. por la técnica de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).
- Calcular de los índices de Kováts de los compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.
- Determinar actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. por el método de difusión en agar con discos contra especies de *Candida* de referencia internacional.

## **Alcances y Limitaciones de la investigación**

### ***Alcances de la investigación***

El alcance de una investigación está relacionado con la profundidad en cuanto al conocimiento que se desea adquirir sobre la problemática de estudio durante el proceso de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). En correlación a esta afirmación, el desarrollo de la presente investigación permitió obtener aceite esencial de las hojas de *Espeletopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., a partir de muestras de las mismas, recolectadas en la Laguna de Mucubají, Páramo Sierra Nevada, en la ciudad de Mérida.

A partir del aceite esencial, se identificaron los componentes químicos presentes en el aceite esencial mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM). Además, se pudo comprobar la actividad antifúngica frente a cepas de *Candida* de referencia internacional. Finalmente, se espera reportar y presentar los resultados en un congreso o jornada nacional científica. Asimismo, divulgar los hallazgos encontrados, mediante la publicación en una revista científica nacional o internacional.

### ***Limitaciones de la investigación***

Las limitaciones son obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador (Arias, 2006). Están relacionadas con los recursos teóricos, técnicos y de presupuesto económico durante el desarrollo de la investigación (Hernández y cols., 2010). En tal sentido, durante esta investigación existieron limitaciones teóricas debido a los escasos trabajos previos y el poco acceso a la información de interés. Además, se presentaron limitaciones técnicas a la hora de recolectar el material vegetal, así como para ejecutar la parte experimental por razones de costos económicos de

transporte, materiales y reactivos para los ensayos pertinentes. Cabe señalar que las fallas de los servicios públicos como eléctricos, luz, agua, internet en la zona, fueron obstáculos a los que la investigadora se enfrentó al momento de la ejecución de la investigación.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Aparicio, Rojas, Velasco, Vega y Usubillaga (2021), estudiaron la caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pozoensis* Cuatrec. (Cuatrec). Para dicho estudio se recolectaron hojas frescas de *E. pozoensis* cerca de Laguna de los Puentes situada en el páramo de La Culata, Estado Mérida, Venezuela. El aceite esencial se obtuvo mediante hidrodestilación usando una trampa de Clevenger, obteniéndose 2,5 mL de aceite (rendimiento 0,84 %). El análisis de gases/masas se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), el cual permitió identificar el 96,46 % de su composición. Los componentes mayoritarios identificados del aceite esencial de la *E. pozoensis* fueron  $\alpha$ -pineno (24,17 %),  $\alpha$ -tujeno (11,43 %), *E*-cariofileno (11,39 %) y  $\beta$ -pineno (9,98 %). Además, se encontraron como componentes minoritarios los siguientes derivados del silfiperfol: silfiperfol-4,7 (14)dieno (3,66 %), presilfiperfol-7-eno (1,00 %), silfiperfol-5-eno (0,73 %) y silfiperfol-6-eno (0,41 %). Se evaluó la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con disco ante organismos de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357), *Escherichia coli* ATCC (25952) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853). Los investigadores hallaron que el aceite esencial solamente pudo inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* a una concentración inhibitoria mínima de 80  $\mu$ L/mL, mostrando un halo de inhibición de 10 mm. Este trabajo se relaciona con la presente investigación ya que la planta *Espeletiopsis pozoensis* pertenece al mismo género de la especie de interés, como

es *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. También, se ejecutará el mismo protocolo de obtención del aceite esencial y análisis de la composición química.

Araujo, Vimos, Cruz, Falconí, Rojas y González (2020), estudiaron los componentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) que crece en Ecuador. En esta investigación, se obtuvo el aceite esencial de las partes aéreas de *L. ovatus* por hidrodestilación y analizado mediante CG-EM. La actividad fue evaluada frente a cinco bacterias y una levadura usando la técnica de microdilución en caldo en microplacas de 96 pozos. El rendimiento del aceite fue de 0,05 % y 27 compuestos fueron identificados, representando 95,45 % de la composición total con un elevado contenido de monoterpenos oxigenados (52,17 %). Los compuestos mayoritarios fueron alcanfor (40,48 %) y 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*.

Aparicio, Rojas, Velasco, Usubillaga, Sosa, y Rojas (2019), trabajaron en la caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). El cual obtuvieron por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, recuperando 1,8 mL (rendimiento 0,087 %). El aceite esencial se analizó por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), identificando como compuestos principales  $\alpha$ -pineno (19,86 %),  $\alpha$ -tujeno (12,35

%),  $\beta$ -felandreno (29,04 %) y  $\alpha$ -felandreno (13,7 %). 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* ATCC23357, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* CDC-B385 y *Candida krusei* ATCC 6258). El aceite esencial inhibió el desarrollo de *S. aureus*, *C. albicans* y *C. krusei*, con un valor de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 50  $\mu$ L/mL, 700  $\mu$ L/mL y 500  $\mu$ L/mL, respectivamente. Esta investigación se relaciona con el presente trabajo, debido a que se estudia un género de la subtribu Espeletiinae, de interés común. Además, se correlaciona con el tipo de actividad biológica que se pretende analizar.

Aparicio, Rojas, Usubillaga y Lucena (2018), estudiaron la caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec. Las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., fueron recolectadas 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  $\alpha$ -pineno (22,38 %),  $\alpha$ -felandreno (6,34 %), germacreno D (24,86 %) y *p*-cimeno (7,35 %). La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar con discos, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853). Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) fueron de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL y 1,0 mg/mL para *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Igualmente, el aceite no fue activo frente a *E. faecalis*. Esta investigación se correlaciona con el presente estudio por la caracterización de una especie perteneciente a la subtribu

Espeletiinae de la familia Asteraceae a la cual pertenece *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

### **Antecedentes Históricos o Epistemológicos**

De todas las especies de Angiospermas (plantas con flores), la familia de las Asteraceae (Compositae) es la más grande y ha sido objeto de numerosos estudios. Esta fue reconocida por Teofrasto hace unos 300 años a.C. En 1752 fue establecida con el nombre de Compositae por Giseke. Durante el periodo 1812-1831 se realizaron las más importantes aportaciones de dicha familia por el francés Henri Cassini, en cuanto a la descripción detallada de la morfología de Asteraceas, agrupándola en 19 tribus. Posteriormente, se realizaron algunas modificaciones por parte de Lessing (1832), Candolle (1838) y Bentham (1873), quienes reagruparon a Astereaceae en ocho (8), tres (3) y trece (13) tribus, respectivamente. Esta última clasificación es la que se conoce hasta hoy, incluida en la obra *Genera Plantarum* (1862-1883) de George Bentham junto a Joseph Dalton Hooker (Funk, Susanna, Stuessy y Bayer, 2009).

Los frailejones, pertenecientes a la subtribu Espeletiinae, son representantes característicos de los páramos venezolanos, estos se agruparon inicialmente en el género *Espeletia*. Este nombre fue creado por José Celestino Mutis en honor al Virrey del Nuevo Reino de Granada José Ezpeleta y fue publicado oficialmente por Humboldt y Bonpland en *Plantae Aequinoctiales* 1808. Weddell (1856) dividió el género *Espeletia* en dos grupos, árboles (con dos especies) y hierbas (con nueve). Standley (1915), describió 17 especies, siendo el primero en mencionar el característico crecimiento en forma de roseta de muchas especies de frailejón. Un estudio completo del género fue realizado por Smith y Koch (1935) quienes describieron la morfología, anatomía floral y palinología (Cuatrecasas, 1976).

La subtribu Espeletiinae (Astereaceae) fue creada en 1976 por Cuatrecasas, con aproximadamente ciento ochenta especies que ocupan a nivel altitudinal desde los

2000 ms.n.m en adelante, incluyendo el bosque alto-andino, el subpáramo y páramo (Díazgranados, 2012). La cual la subdividió en ocho (8) géneros *Carramboa*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Libanothamus*, *Ruilopezia*, *Tamania* y *Paramiflos* (Cuatrecasas, 1976). Posteriormente, muchos botánicos en todo el mundo realizaron importantes aportes al conocimiento de las Astereaceae. Sin embargo, uno de los aportes más significativos a la clasificación y filogenia de las Asteráceas llegó con los estudios moleculares de ADN de Jansen y Palmer en 1987 (Katinas, Gutiérrez, Grossi y Crisci, 2007).

Los primeros estudios acerca de la composición química de los frailejones realizados en el estado Mérida, fueron reportados por el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a principios de los años 1970 (Romero, 2000). En los últimos años se han analizado los aceites esenciales de varias especies de la subtribu Espeletiinae de los páramos venezolanos. Como ejemplo tenemos el estudio de los componentes volátiles de las especies: *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. (Usubillaga y Capra, 1988), *Espeletia weddellii* Sch. (Khoury, Usubillaga, Rojas y Galarraga, 2000), *Espeletia batata* Cuatrec. (Usubillaga, Khouri, Rojas y Morillo, 2001), *Libanothamnus* (Usubillaga, Aparicio, Romero, Rojas y Khouri, 2001), *Coespeletia* (Aparicio, Romero, Khouri, Rojas y Usubillaga, 2002), *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. (Meccia y cols., 2007), *Espeletia nana* Cuatrec. (Peña, Rojas, Aparicio, Alarcón, Baptista y cols., 2012), *Carramboa tachirensis* (Obregón, Rojas, Usubillaga, Pouységu y Quideau, 2015), *Coespeletia timotensis*, *Coespeletia moritziana* y *Espeletia schultzii* (Rojas, Usubillaga y Galarraga, 1999; Alarcón y cols., 2016; Cordero y cols. 2017), *Espeletiopsis pozoensis* (Cuatrec) Cuatrec (Aparicio y cols., 2021).

Actualmente, no existen divulgaciones referentes al estudio de la actividad biológica, específicamente antifúngica, y composición química del aceite esencial de la especie *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

## **Bases Teóricas**

### ***Características de la familia Asteraceae***

De todas las especies de Angiospermas (plantas con flores), la familia Asteraceae es la más grande y ha sido objeto de numerosos estudios. Esta familia está dividida en más de 1500 géneros y posee más de 25000 especies reconocidas, que están repartidas por toda la tierra de las regiones polares hasta los trópicos. En Venezuela se conocen cerca de 760 géneros y 210 especie, de los cuales 12 géneros, 189 especies, 2 subespecies y 5 variedades son endémicos (Badillo, 1997).

Presentan características botánicas muy variadas. Las especies son plantas de tipo herbáceas, arbustos o menos frecuentes árboles. Las hojas sin espículas, generalmente alternas, en ocasiones en roseta basal, además pueden presentar espinas. Las inflorescencias son en capítulos con brácteas estériles formando el involucre y de brácteas fértiles sobre las cuales se encuentran las flores arregladas en espiral. La fórmula floral es 5-5-5-2, lo que significa 5 sépalos que forman cáliz, 5 pétalos que forman la corola, 5 estambres y 2 carpelos. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores. Además, las flores pueden ser hermafroditas, unisexuales o estériles. La corola está soldada, sea en forma de tubo (flores tubuladas) o en forma de lengüeta dirigida al exterior (flores linguales). Las antenas están soldadas y forman un tubo alrededor del estilo. El pistilo comprende un estilo terminal con dos estigmas y un ovario ínfero unilocular y uniovulado. El fruto se denomina aquenio: es un fruto seco, raras veces carnoso por la naturaleza de epicarpio. Ciertas especies poseen canales y pelos secretores, otras especies tienen canales laticíferos (Peralta y Royuela, 2018; Tapia, 2010; Funk y cols., 2009 y Badillo, 1997).

Con respecto a la distribución geográfica, las Asteraceae son una familia cosmopolita, que se distribuye en casi todas las latitudes, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta las zonas alpinas, por lo tanto, es posible encontrar sus

representantes en casi todos los tipos de vegetación y climas (Tapia, 2010). En Venezuela se encuentran desde el nivel del mar como la cordillera de la costa, donde crece la *Espeletia neriifolia*, hasta los sitios más elevados de los páramos andinos. En la zona andina y alto Guayana existe una elevada concentración de especies de las Asteraceae (Aristeguieta, 1964).

La clasificación taxonómica de la familia Asteraceae según cita Carlquist (1976) (Tabla 1), se subdivide en tres subfamilias como lo son Barnadesionedeae, Cichorioideae; además de Asteroideae y se compone además por trece tribus.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la familia Asteraceae

Categoría	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
	Barnadesionedeae
Subfamilias	Cichorioideae
	Asteroideae

Tomado y modificado de Tapia, 2010.

Algunos de los compuestos químicos secundarios presentes en la familia Asteraceae son: sesquiterpenos, flavonoides, monoterpenos, diterpenos, triterpenos, cumarinas y alcaloides (Funk y cols., 2009). Se han identificado, a partir de los aceites esenciales de las partes aéreas *Helianthus annuus* y *H. strumosus* monoterpeno hidrocarburos, en particular  $\alpha$ -pineno (**1**) (50,65 %) sabineno (**2**) (6,81 %),  $\beta$ -pineno (**3**) (5,79 %) y limoneno (**4**) (7,2 %) (Lawson, Sharp, Powers, McFeeters y Satyal, 2019).

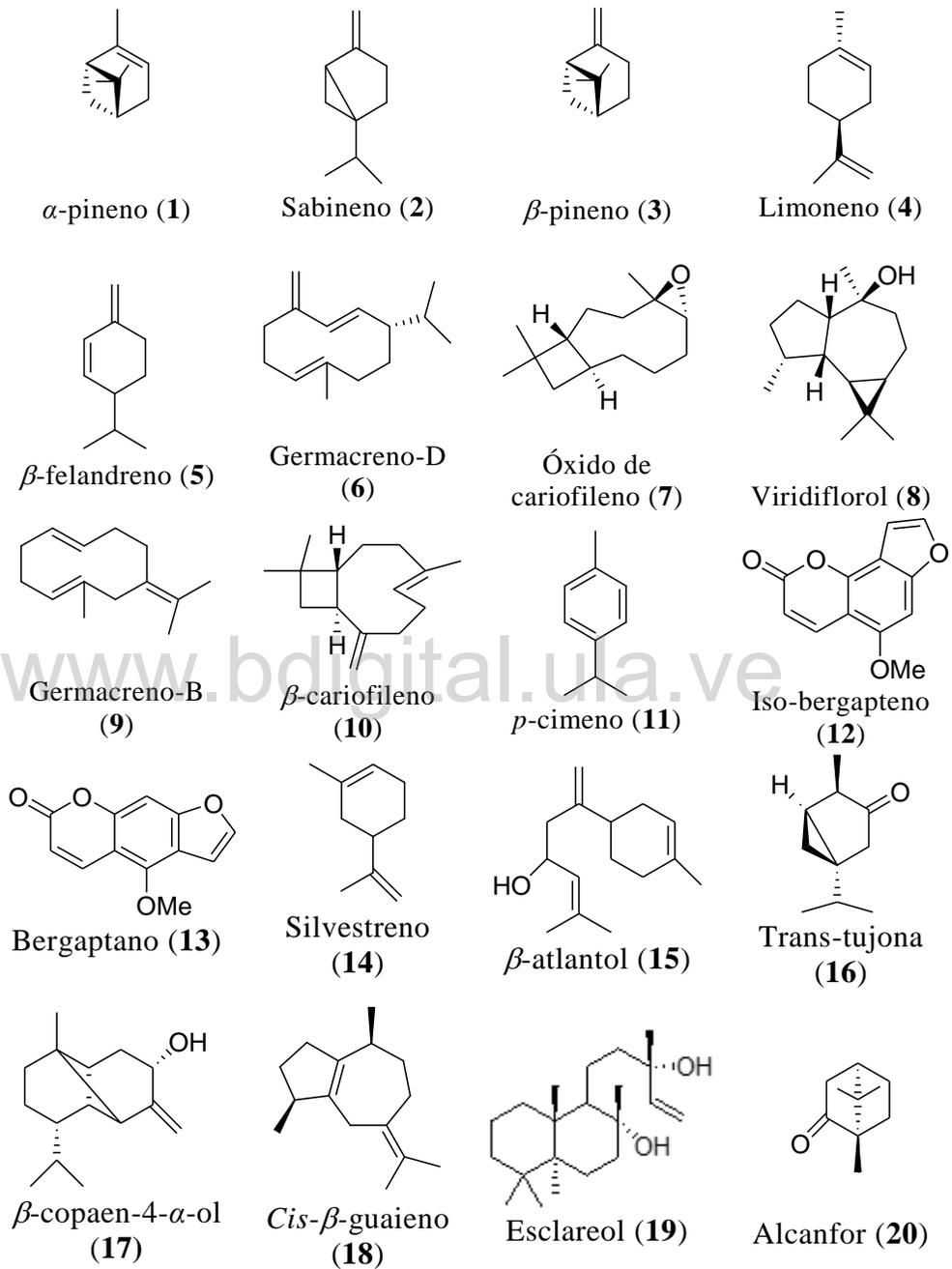
También, *Baccharis* es un género Asteraceae de plantas con flores, con 268 compuestos químicos identificados en los aceites esenciales de hojas, flores y ramas. Los cuales están constituidos principalmente por terpenoides como  $\alpha$ -pineno (**1**),  $\beta$ -felandreno (**5**), germacreno D (**6**), óxido de cariofileno (**7**), viridiflorol (**8**), germacreno B (**9**),  $\beta$ -cariofileno (**10**) (Chaverri y Cicció, 2017).

Por otra parte, 60 nuevos compuestos han sido aislado de *Tagetes erecta* (Asteraceae) como *p*-cimeno (**11**), *iso*-bergapteno (**12**), bergapteno (**13**), silvestreno (**14**) y  $\beta$ -atlantol (**15**) (Abdulwahab, Othman y Dastan, 2020). En el aceite esencial de hojas de *Artemisia vulgaris* L. se identificaron como componentes mayoritarios  $\beta$ -cariofileno (**10**), germacreno D (**6**) y *trans*-tujona (**16**). En el aceite esencial de hojas de *Bidens pilosa* L. se identificaron mayormente  $\beta$ -cariofileno (**10**), germacreno D (**6**) y  $\beta$ -copaeno-4- $\alpha$ -ol (**17**). En el análisis de los aceites volátiles de hojas de *Sphagneticola trilobata* L. se encontraron componentes  $\alpha$ -pineno (**1**), derivados del *cis*- $\beta$ -guaieno (**18**) y esclareol (**19**) (Linhares, Da Silva, de Oliveira, Costa, Conceição y de Oliveira, 2018).

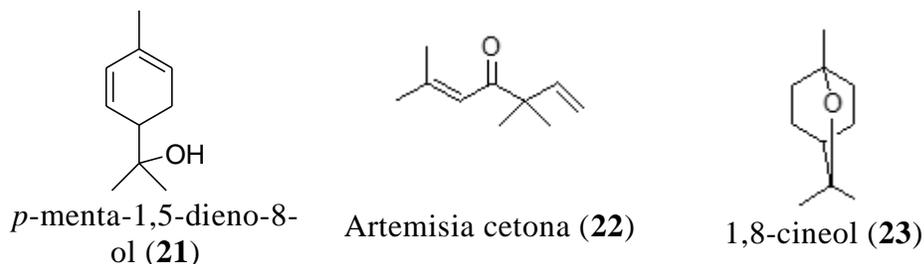
Asimismo, del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* Schltdl. (Asteraceae), se ha aislado alcanfor (**20**) y *p*-menta-1,5-dieno-8-ol (**21**) (Araujo, Vimos, Cruz, Falconí, Rojas y González, 2020). Además, el aceite esencial obtenido a través de las regiones aéreas de *Artemisia parviflora* Pauri Garhwal (Uttarakhand, India) contiene germacreno D (**6**) (14,7 %),  $\beta$ -cariofileno (**10**) (15,3 %), alcanfor (**20**) (11,4 %), artemisia cetona (**22**), (7,8 %) y 1,8-cineol (**23**) (5,8 %) (Figura 1) (Bisht, Kumar, Kumar, Dua y Kumar, 2021).

La presencia de éstos metabolitos, se ha asociado con propiedades curativas debido a actividades farmacológicas específicas tales como: anti-inflamatoria, anticancerígena, antioxidante, antiespasmódica, antireumática y antiulcerogénica (Clavin y cols., 2007; Schütz, Carle y Schieber, 2006), analgésica, cicatrizante (Purizaca y Condori, 2018) y antimicrobiana (Aparicio y cols., 2021; Cortez, 2021; Huerfano, 2018; Cordero y cols., 2017; Alarcón y cols., 2016; Pinto y Toro, 2013).

**Figura 1.** Estructuras químicas de algunos componentes de la familia Asteraceae.



**Figura 1.** Estructuras químicas de algunos componentes de la familia Asteraceae.  
(Continuación).



Tomado y modificado de Adams, 2007.

Muchas de las plantas pertenecientes a la familia Asteraceae han presentado buena actividad contra diversas afecciones de salud, por tal motivo, son usadas para el tratamiento como diurético, depurativo, adelgazante, antidiabético, antibiótico, regulador hormonal y de grasas, problemas hepáticos y alérgicos. También se usa para tratar enfermedades como pulmonía, pleuresía, estimulante, digestiones difíciles, dolor estomacal, estimulante del apetito y de la función biliar, fatiga, falta de ánimo y para la caída de cabello o calvicie prematura. Incluyendo, su empleo para tratar afecciones de la piel como el acné, dermatitis, infecciones urinarias, antimalárico y antioxidante (Purizaca y Condori, 2018).

### *Características del Género Espeletiopsis*

*Espeletiopsis*, es uno de los géneros de la subtribu Espeletiinae, de los ocho clasificados y descritos por Cuatrecasas en 1976 y 1996 (Tabla 2). Esta planta herbácea presenta hojas en rosetas grandes, en el extremo del tronco. Pudiéndose observar de dos formas: con tronco corto y roseta a ras del suelo, o tronco largo que pueden alcanzar varios metros de biotipo caulirósula. La florescencia axilar de las hojas de la roseta es escasa, de tipo corimbo, con terminación en flor o en capitulo, con hojas, ramas, pedúnculos y brácteas alternas. Aunque en algunos

casos desarrolla pedúnculos floríferos inferiores adicionales, los cuales deforman la sinflorescencia por alargamiento proximal (Cuatrecasas, 1996).

**Tabla 2.** Clasificación Taxonómica del  
Género *Espeletiopsis*

Categoría	Nombre
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Heliantheae*
Subtribu	Espeletiinae
	<i>Carramboia,</i>
	<i>Coespeletia, Espeletia,</i>
	<i>Espeletiopsis</i>
Género	<i>Libanothamnus,</i>
	<i>Ruilopezia, Tamania y</i>
	<i>Paramiflos</i>

**Nota:** \* La subtribu se ha circunscrito recientemente dentro de la tribu Millerieae Lindl, como parte de la Alianza Heliantheae. Tomado y modificado de Diazgranados, 2012.

De acuerdo a su distribución, este género se encuentra mayormente en Colombia y en Venezuela en los páramos de los estados Táchira, Mérida y Trujillo, Cuatrecasas (1996), describe veinte especies del género *Espeletiopsis*. No obstante, se consideran que solo 6 especies son endémicas de Venezuela (*E. angustifolia*, *E. cristalinensis*, *E. meridensis*, *E. pannosa*, *E. pozoensis* y *E. purpurancens*) (Tabla 3) (Aparicio y cols., 2021; Diazgranados, 2012 y Cuatrecasas, 1996).

**Tabla 3.** Especies del Género *Espeletiopsis* en Venezuela

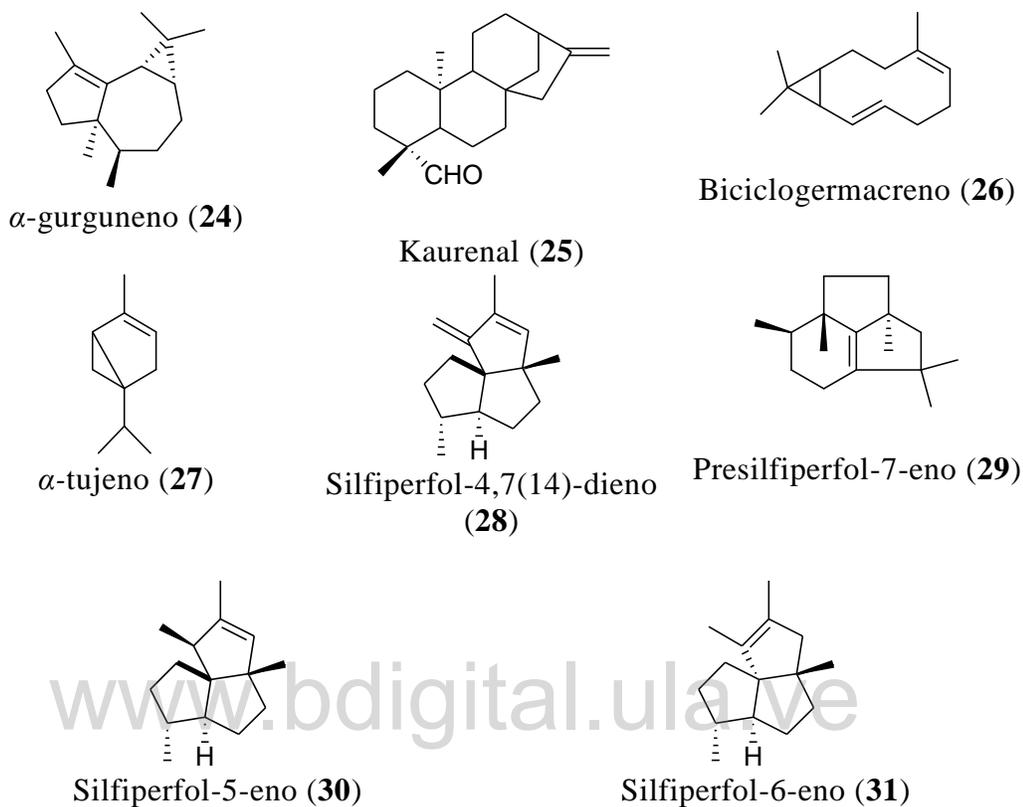
<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Distribución Geográfica</b>
<i>E. angustifolia</i>	Frailejón blanco	Mérida: Páramo de Mijará, San José y Beguilla.
<i>E. meridensis</i>	Frailejón de Mérida	Mérida: (carretera andina) Páramo de la negra
<i>E. pannosa</i>	Frailejón plateado	Trujillo: (Páramo del Jabón) Paramo de Mérida. Mucuruba
<i>E. pozoensis</i>	Frailejón chirique	Mérida: Páramo de pozo negro
<i>E. cristalinensis</i> *	Incienso cenizo de la Cristalina	Trujillo: Páramo de la Cristalina

Nota: \*Híbrida. Tomado y modificado de Cuatrecasas, 1996 y Diazgranados, 2012.

En la subtribu Espeletiinae, la química es similar en todos los géneros, ya que se caracterizan por la aparición de grandes cantidades de derivados kaurenos, sólo se diferencian que las concentraciones son diferentes (Bolhmann, Suding, Cuatrecasas, Robinsón y King, 1980). Por su parte, Meccia y cols. (2007), identificaron del aceite esencial de hojas y raíces de *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. (Asteraceae) 24 componentes, que constituían el 92,9 % del aceite total de las hojas, mientras que en las raíces solo identificaron 16 compuestos. Los compuestos más abundantes en las hojas fueron  $\alpha$ -pineno (**1**) (29,9 %),  $\beta$ -pineno (**3**) (9,6 %),  $\beta$ -cariofileno (**10**) (14,1 %),  $\alpha$ -gurjuneno (**24**) (9,9 %) y Kaurenal (**25**) (5,3 %). En las raíces, los principales fueron  $\alpha$ -pineno (**1**) (27,9 %),  $\beta$ -pineno (**3**) (10,9 %),  $\beta$ -cariofileno (**10**) (10,2 %) y biciclogermacreno (**26**) (8,6 %).

Vega en el 2018, a partir del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pozoensis*, identificó cómo compuestos mayoritarios,  $\alpha$ -pineno (**1**) (24,2 %),  $\alpha$ -tujeno (**27**) (11,4 %),  $\beta$ -cariofileno (**10**) (11,4 %),  $\beta$ -pineno (**3**) (9,9 %), asimismo se identificaron nuevos componentes en esta especie como son: Silfiperfol-4,7(14)-dieno (**28**) (3,66 %), presilfiperfol-7-eno (**29**) (1,00 %), Silfiperfol-5-eno (**30**) (0,73 %) y Silfiferbol-6-eno (**31**) (0,41 %) (Figura 2).

**Figura 2.** Estructuras químicas de algunos componentes del género *Espeletiopsis*.



Tomado y modificado de Adams, 2007.

De la subtribu Espeletiinae, donde pertenecen los frailejones se han estudiado otras especies en las que se mencionan: en el aceite esencial de diferentes especies del género *Libanothamnus* ubicados en Los Andes Venezolanos se han aislado  $\alpha$ -tujeno (27) (18,1 %), limoneno (4) (19,4 %), mirceno (32) (17,1 %), sabineno (2) (25,6 %) (Usubillaga y cols., 2001). Del aceite esencial de las hojas de *Espeletia nana* Cuatrec., constituían  $\alpha$ -pineno (1) (38,1%),  $\beta$ -pineno (3) (17,2%), mirceno (32) (15,0%), espatulenol (33) (4,2 %), biciclogermacreno (26) (4,0 %),  $\alpha$ -zingibereno (34) (4,0 %) y  $\gamma$ -himachaleno (35) (3,7 %) (Peña y cols., 2012).

Además, el aceite esencial de las hojas de *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec, posee como componentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno (1) (2,3 %), germacreno-

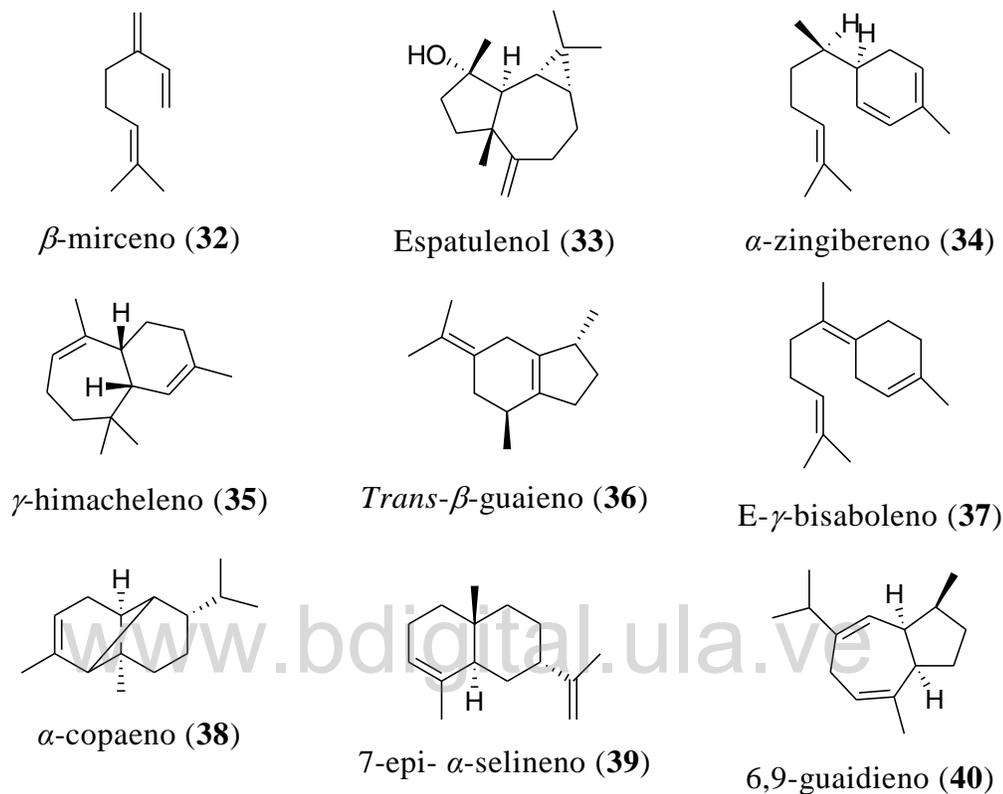
D (**6**) (44,4 %),  $\beta$ -cariofileno (**10**) (3,0 %), *trans*- $\beta$ -guaiano (**36**) (8,0 %), *E*- $\gamma$ -bisaboleno (**37**) (3,2 %),  $\alpha$ -copaeno (**38**) (2,2 %) y Kaurenal (**25**) (6,6 %) (Obregón y cols., 2015). Del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia bracteosa* se identificó  $\alpha$ -pineno (**1**) (24,3%),  $\beta$ -pineno (**3**) (8,5%),  $\beta$ -mirceno (**32**) (34,2%), 7-*epi*- $\alpha$ -selineno (**39**) (9,1%) y 6,9-guaiadieno (**40**) (4,4%) (Figura 3) (Alarcón, Peña, Velasco, Baptista, Rojas y cols., 2015). Del aceite esencial de *Espeletia schultzei* Wedd se ha aislado  $\alpha$ -pineno (**1**) (50,11 %),  $\beta$ -pineno (**3**) (16,28 %) y  $\beta$ -mirceno (**32**) (14,71 %) (Figura 3) (Alarcón y cols., 2016).

Todos ellos han sido reportados en varias especies de los géneros *Espeletia*, *Coespeletia*, *Libanothamus* y *Ruilopezia* de la subtribu Espeletiinae, lo que indica la estrecha relación existente entre los diferentes tipos de frailejones (Meccia y cols., 2007).

En efecto, este género con alto contenido de derivados del kaureno, actualmente son plantas de gran interés para los científicos de diferentes partes del mundo, debido a las numerosas actividades biológicas que se les han reportado últimamente, algunas propiedades que se le han atribuido son: actividad antibacteriana (Aparicio y cols., 2021, Aparicio y cols., 2018), antimicótica (Aparicio y cols., 2019, Cordero y cols., 2017, Alarcón y cols., 2016).

Igualmente, las hojas y partes aéreas han sido empleadas para enfermedades respiratorias (asma, gripe, expectorante y antitusivo), enfermedades de la piel, reumatismo y problemas digestivos, resultando de gran importancia en la fitoterapia tradicional local (Hidalgo y cols., 1999).

**Figura 3.** Estructuras químicas de algunos componentes de otras especies de frailejones.



Tomado y modificado de Adams, 2007

***Generalidades de la especie Espeletiopsis pannosa (Standl.) Cuatrec.***

La especie *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. también conocida como frailejón plateado, es una planta arrosetada, con hojas lineales poco angostadas hacia la base, con superficie axial e indumento aplicado y argentado-seríceo, aproximadamente entre 25-45 cm de largo y 4-10 mm de ancho, densamente lanuginosas por ambas caras, blanquecino-plateado por el haz (Figura 4) (Cuatrecasas, 1996).

**Figura 4.** Especie *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.



Tomado y modificado de Station Alpine Joseph Fourier, (SAJF) 2013.

Las inflorescencias son de tipo corimbo ramificado, ramas alternas, subtendidas por pequeñas brácteas. Caulirrósula, 0,5-1,2 m. Ejes de las capitulescencias erectos con ramificación alterna, densamente lanuginosos con hojas caulinares y ramificación alterna. Involucro multiseriado. Capítulos heterógamos. Las flores radio femenino, corolas liguladas, densamente pilosas, flores del disco masculinas, corolas tubulares, pilosas en los lóbulos. Papus ausente (Figura 5). Encontrándose a 3.500 m sobre suelos con buen contenido de aguas (Vivas y Ubiergo, 2010; Hidalgo y cols., 1999 y Cuatrecasas, 1996).

**Figura 5.** Flores de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.



Tomado y modificado de SAJF, 2013.

La especie *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. se encuentra distribuida en los páramos de Venezuela, en el Estado Trujillo en el páramo de El Jabón, en el

Estado Mérida en el páramo de Sierra Nevada de Mérida, páramo de Los Conejos, Mucurubá, La Culata, faldas superiores del pico El Toro y páramo de Timótes (Aristeguieta, 1964). Esta especie de frailejón tanto las hojas y partes aéreas han sido usadas en comunidades para tratar diversas enfermedades respiratorias como el asma, además empleado como expectorante y antitúxico. Incluyendo enfermedades de la piel (Hidalgo y cols., 1999).

La taxonomía de la subtribu fue cuidadosamente examinada. En 1996 Cuatrecasas publicó la clave para 20 especies de *Espeletiopsis*, en la cual se describe la especie *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. Su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica de la especie

*Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

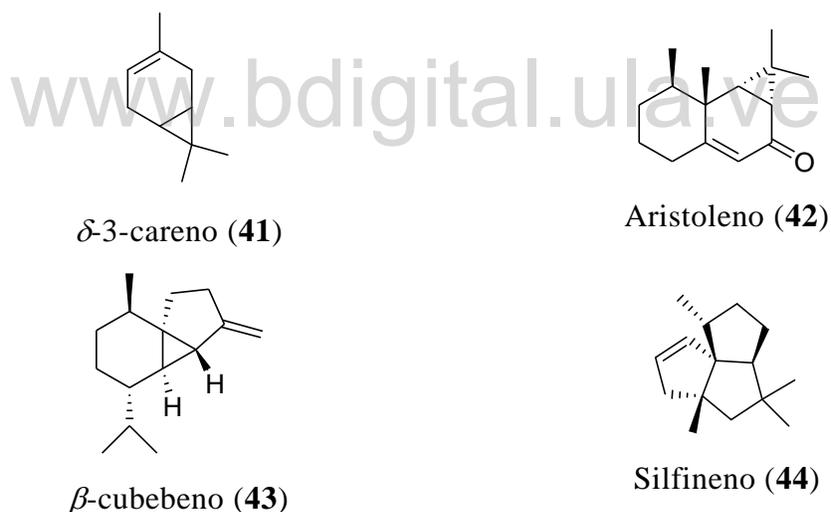
Categoría	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoleophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Heliantheae
Subtribu	Espeletiinae
Genero	<i>Espeletiopsis</i>
Especie	<i>E. pannosa</i>

Tomado y modificado de Cuatrecasas, 1996.

### **Composición química del género *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.**

Saavedra (2012), determinó la composición química del aceite esencial de *E. pannosa* (Standl.) Cuatrec., en la cual identificó como componentes mayoritarios al  $\alpha$ -pineno (**1**) (26,89 %),  $\alpha$ -tujeno (**27**) (13,26 %),  $\beta$ -pineno (**3**) (11,01 %), mirceno (**32**) (3,67 %),  $\delta$ -3-careno (**41**) (3,86 %) aristoleno (**42**) (10,07 %) y  $\beta$ -cubebeno (**43**) (3,83 %), e igualmente identificó una serie de compuestos derivados del núcleo silfiperfol como: Silfiperfol-5-eno (0,54 %) (**30**), silfineno (**44**) (0,75 %), Silfiperfol-6-eno (**31**) (2,96 %), Silfiperfol-4,7(14)-dieno (**28**) (0,29 %) (Figura 6).

**Figura 6.** Estructuras químicas de la especie *Espeletiopsis pannosa*



Tomado y modificado de Adams, 2007.

### **Productos Naturales**

En un sentido amplio, un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza. Específicamente, las plantas producen muchas

sustancias, producto de su metabolismo (fotosíntesis) crean su propio alimento y como producto brindan compuestos de diversa naturaleza, estos compuestos se denominan metabolitos. Se clasifican en dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios (Goda, 2022).

En un sentido más restrictivo, un producto natural comprende solo los metabolitos secundarios. Dichos productos deben diferenciarse de los metabolitos primarios que son productos químicos necesarios para la vida, resultantes del metabolismo vital de todo ser vivo; son carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleídos (Gutiérrez y Esteves, 2009).

En contraste a los metabolitos primarios, los productos naturales o metabolitos secundarios son subproductos de rutas metabólicas normales que ocurren en ciertas especies, siendo particulares dentro de un grupo taxonómico, estado de vida o tejido presentando una distribución restringida dentro del reino vegetal dando origen a la quimiotaxonomía (Cseke y cols., 2006).

Los metabolitos secundarios, también conocidos como fitoquímicos, son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales, que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal. Dichas funciones se encargan del mecanismo de defensa, agentes polinizadores, sustancias de reserva y cicatrizantes para sus propias heridas (Domínguez, 1973).

### ***Clasificación de los metabolitos secundarios***

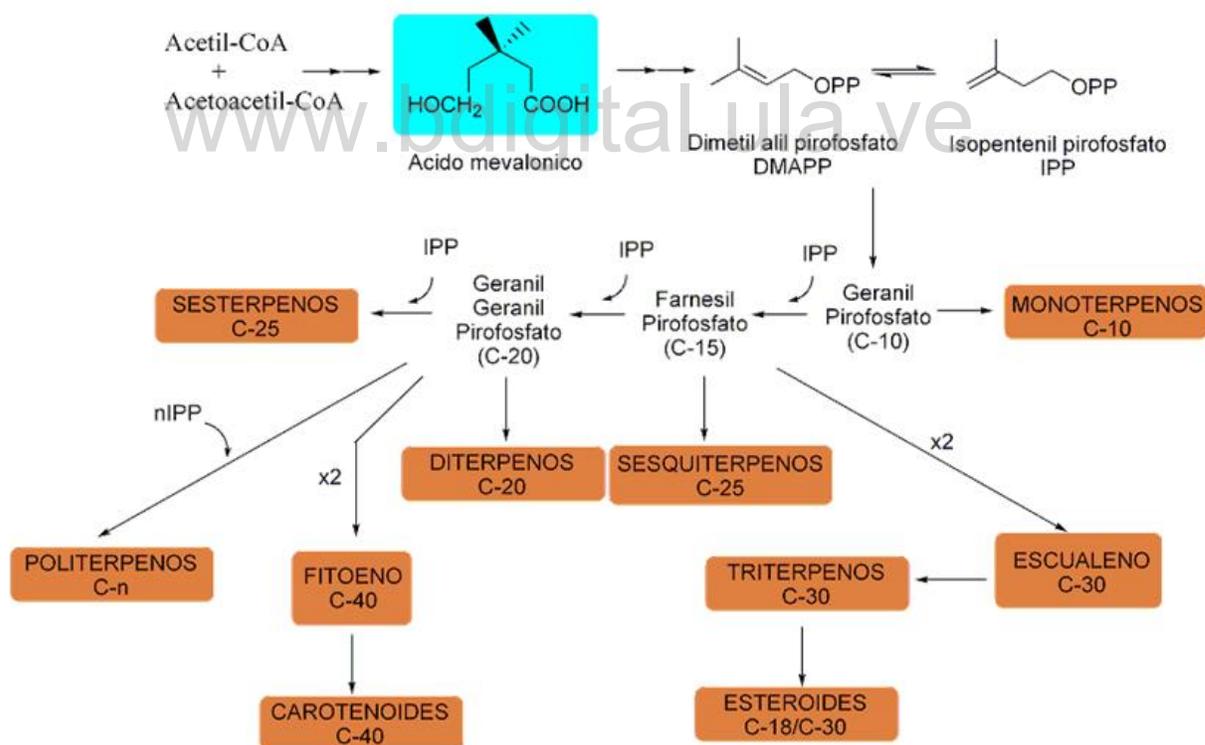
La clasificación de los fitoquímicos se realiza basándose en su estructura química, bioformación, fuente de producción, así como en la actividad biológica que presenta. Según Cseke y cols., (2006), dentro de los principales compuestos considerados hasta hoy como fitoquímicos se encuentran los terpenos (carotenoides y saponinas), polifenoles (flavonoides), los fitoestrógenos

(isoflavonas y lignanos), los compuestos azufrados (glucosinolatos), polisacáridos (glucanos) y los fitoesteros. Algunos de ellos se describen a continuación:

### Terpenos

Con el nombre de terpenos se conoce un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos más difundidos. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y aunque poseen estructuras químicas distintas, proceden de la ruta metabólica del ácido mevalónico por su deshidratación y descarboxilación simultánea (Figura 7) (Rajput y cols., 2018).

**Figura 7.** Ruta metabólica de los terpenos a partir del ácido mevalónico



Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

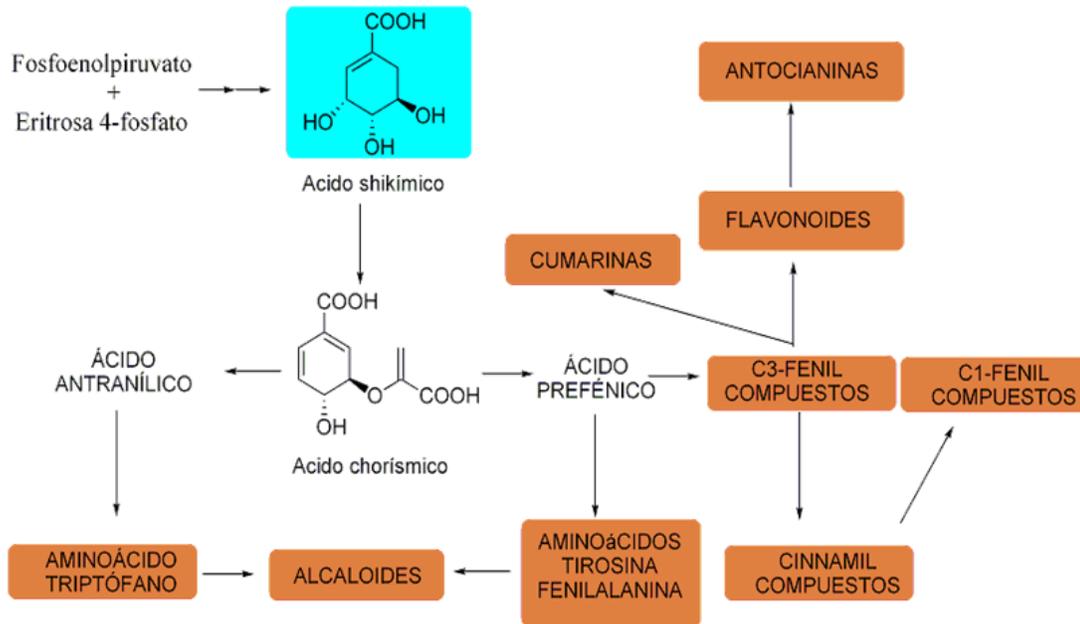
Así mismo, dan lugar a la condensación de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. La condensación, mediante unión “cabeza-cola” de los dos últimos precursores de terpenos, origina el geranil-pirofosfato (GPP), que es precursor de un gran número de principios activos vegetales (monoterpenos  $C_{10}H_{20}$ , iridoides, algunos alcaloides etc.), y al farnesil-pirofosfato (FPF) por condensación cabeza-cola con otra unidad de isopreno. Así se forman los sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpenos ( $C_{30}H_{34}$ ) (Marcano y Hasegawa, 2002 y Bruneton, 1991). Entre ellos agrupamos a: Iridoides, lactonas sesquiterpénicas y saponinas (Ekiert, y Szopa, 2020).

### *Polifenoles*

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos, pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas (Cseke y cols., 2006).

Los fenilpropanoides son responsables de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shiquímico (Figura 8) y derivados de éste, aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptófano y tirosina. La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Rajput y cols., 2018).

**Figura 8.** Ruta metabólica del ácido shiquímico



Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

### Glucósidos

Se los puede definir como productos de condensación de azúcares, la porción no azucarada se denomina aglicona o genina. Desde el punto de vista estructural los glucósidos se pueden considerar como acetales internos. La unión entre el aglicón y el azúcar se realiza entre el grupo funcional OH del azúcar y el grupo funcional OH y/o fenólico del aglicón (enlace glicosídico), se forma por la deshidratación del azúcar y de la aglicona. Un grupo hidroxilo de la aglicona se condensa con el hidroxilo del hemiacetal del azúcar, formándose así un acetal interno. Ellos son considerados por su papel importante en la defensa de la planta, pero las investigaciones recientes demuestran roles adicionales como compuestos de almacenamiento de nitrógeno reducido y el azúcar, que pueden ser movilizados cuando son exigidos para su uso en metabolismo primario (Silverio, 2016).

### *Generalidades de los aceites esenciales*

Los aceites esenciales son productos del metabolismo secundario de las plantas, forman parte del arsenal de la defensa contra sus depredadores, enfermedades y plagas. Presentan como característica principal su compleja composición química y su carácter fuertemente aromáticas. Son líquidos volátiles, inestables, frágiles, y alterables con la luz, muy raramente coloreados; en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter, aceites vegetales y minerales. Su densidad es inferior a la del agua excepto en algunos casos. Poseen índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada (Ortuño, 2006 y Bruneton, 2001). Estos son característicos de los magnoliales, los laurales y los piperales, también de algunas familias no emparentadas, como: Myrtaceae, Rutaceae, las familias de Apiales, Lamiaceae, Verbenaceae y Asteraceae (Bruneton, 2001).

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 flor. Se clasifican con base en diferentes criterios: como consistencia y origen. El aceite esencial dentro de la planta se encuentra confinado en un tejido al cual se le denomina micela. La cual favorece la transpiración de la planta, ayudando así a la formación de clorofila (Bruneton, 1991).

Sin embargo, algunos autores afirman que la esencia de las plantas no interviene en el metabolismo vegetal, aunque otros suponen que las esencias únicamente poseen actividad hormonal para favorecer la polinización. En cambio, Tyndall supone que intervienen en la transpiración y regulan la conductividad calorífica del agua y la presión osmótica (García, 1953).

Ahora bien, farmacológicamente cada aceite esencial contiene las propiedades específicas de la planta de la que se obtiene, cuyos componentes químicos servirán para distintas finalidades. Pero en líneas generales, y gracias a su compleja composición molecular, todos los aceites esenciales son, en mayor o menor grado: analgésicos, antibióticos, antimicóticas, regeneradores celulares, sedantes, antisépticos, inmunoestimuladores, antivíricos, antiinflamatorios, mejoran la circulación sanguínea y linfática, equilibran las emociones (Albornoz, 1980).

Además, los aceites esenciales se utilizan en la industria farmacéutica para la obtención de diversos principios activos como anetol, eugenol o también excipientes y aromatizantes en la preparación de jarabes, suspensiones, elixires y otras formas farmacéuticas. Así mismo, en la industria de la alimentación, licorería y confitería se suelen utilizar como aromatizantes (Rosilla, 2012).

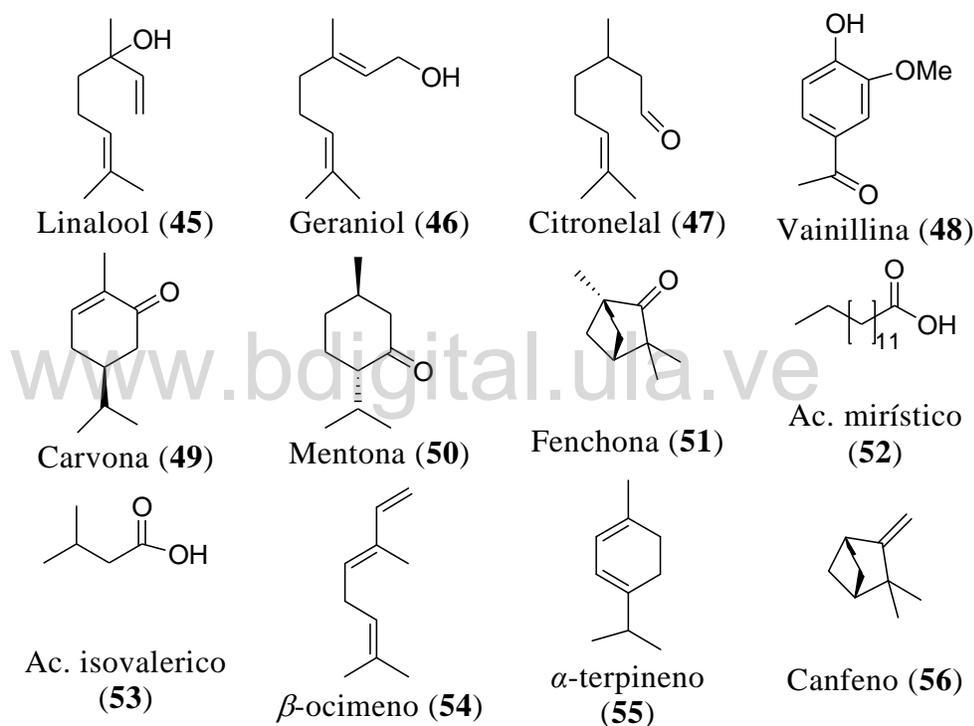
### *Composición química de los aceites esenciales*

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de más de 100 compuestos orgánicos entre los que se encuentran: compuestos alifáticos de bajo peso molecular como: alcoholes: linalol (45), geraniol (46), aldehídos: (citronela (47), vainilla (48); cetonas tales como carvona (49), mentona (50), fenchona (51), ácidos mirístico (52), ácido isovalérico (53), todos en estado libre; alcanos, compuestos sulfurados y nitrogenados. La mayoría de estos están constituidos principalmente por terpenos (derivados del acetato mevalonato). Los hidrocarburos de mayor importancia son los terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides. Debido a que estos compuestos oxigenados son los responsables de los olores, sabores y propiedades terapéuticas que caracteriza a los aceites esenciales (Bruneton, 1991).

Entre los terpenoides, los compuestos más volátiles, mono- y sesquiterpenos, son los únicos que se encuentran en el aceite esencial de las plantas, ya que su masa molecular no es demasiado elevada. Específicamente, los monoterpenos son los

constituyentes más sencillos de esta serie, los cuales resultan del acoplamiento de dos unidades isoprenicas, casi siempre se encuentran hidrocarburos. Estos pueden ser acíclicos como el mirceno (**32**), ocimeno (**54**), monocíclicos  $\alpha$ -terpineno (**55**), *p*-cimeno (**11**) o bicíclicos  $\alpha$ -pineno (**1**), canfeno (**56**), sabineno (**2**) (Figura 9). A veces constituyen más del 90 % del aceite esencial (Bandoni, 2000).

**Figura 9.** Estructuras químicas de algunos componentes de los aceites esenciales



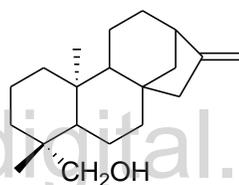
Tomado y modificado de Adams, 2007.

A su vez, los sesquiterpenos contienen 15 átomos de carbono y presentan una gran diversidad al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones. Constituyen el grupo principal de isoprenoides de los productos naturales (Figura 9) (Bruneton, 1991, 2001). No obstante, los frailejones producen principalmente aceites esenciales ricos en diterpenos del tipo kaureno (Usubillaga y cols., 2003).

Si bien, los diterpenos constituyen un amplio conjunto de compuestos que contienen 20 carbonos procedentes del metabolismo de 2E, 6E, 10E-Geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Estos se encuentran abundantemente en las Asteraceae.

Los kaurenos son diterpenos cristalino tetracíclicos, de fórmula  $C_{20}H_{32}$ , cuyo nombre proviene del popular “*kauri*” (Bruneton, 2001). El cual es uno de los grupos más importantes de la serie de diterpenos tetracíclicos, Kaurenal (**25**) y Kaurenol (**57**) (Figura 10).

**Figura 10.** Estructuras químicas de algunos componentes del tipo diterpenos (kaureno).

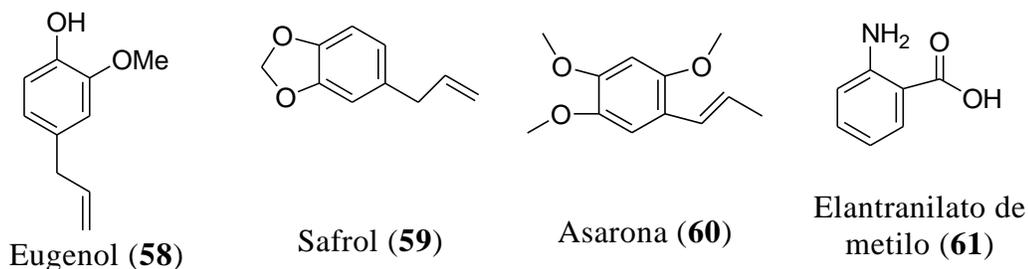


Kaurenol (**57**)

Tomado y modificado de Usubillaga y cols., 2003.

Por otra parte, los aceites esenciales contienen compuestos aromáticos, formados por la vía del ácido shiquímico-fenilpropanoide. Los derivados del fenilpropano (C-C) son muchos menos frecuentes que los terpenoides. Se trata generalmente de alil y propenilfenoles, a veces de aldehídos, característicos de determinados aceites esenciales de Apiceae (anís, hinojo, perejil, entre otros), pero también de los de clavos, nuez moscada, estragón, albahaca, acoro (cálamo aromático), canela como el eugenol (**58**), safrol (**59**), asaronas (**60**). Igualmente pueden encontrarse en los aceites esenciales compuestos en C-C como la vainilla (bastante frecuente) o como el antranilato de metilo (**61**) (Figura 11) (Bruneton, 1991).

**Figura 11.** Estructuras Químicas de Algunos Componentes derivados del fenilpropano



Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002.

### ***Métodos de obtención de los aceites esenciales***

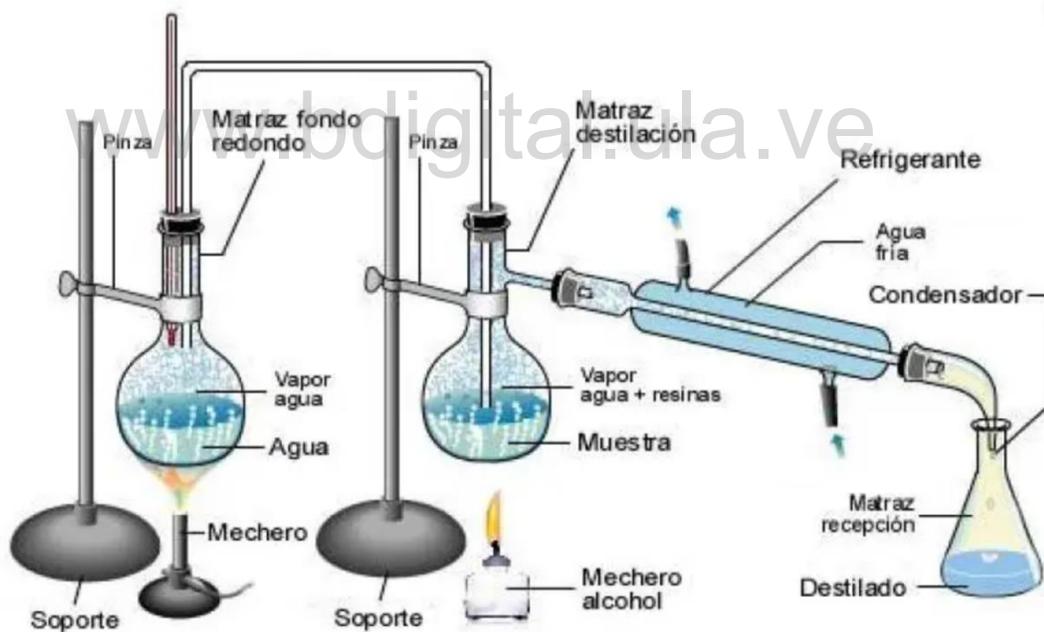
Los aceites se obtienen generalmente de plantas por diferentes métodos, adaptados a la naturaleza y propiedades de los aceites esenciales o de los cuerpos aromáticos de donde proceden (Gennaro, 1998). Los métodos comúnmente usados para obtener los aceites esenciales son: destilación (con agua, con agua y vapor de agua y directa con vapor de agua o por arrastre de vapor, al vacío), lixiviación, enfloración, maceración y expresión, además de la hidrodestilación (Ortuño, 2006).

El proceso de la destilación, es uno de los métodos de extracción más utilizados. El cual consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasen a fase vapor y, posteriormente, enfriar el vapor hasta recuperar estos componentes en forma líquida mediante un proceso de condensación. El vapor que se desprende no tiene la composición del líquido original, sino que es más rico en el volátil (Susial, 2011).

Al extraer los aceites esenciales mediante vapor de agua, el material de la planta, conocido como carga, se coloca en un destilador, el cual está conectado a una cámara de agua que se calienta hasta ebullición. El vapor de agua desprendido se pasa a través del material vegetal. El calor rompe la cámara de almacenamiento del

aceite esencial con la carga y libera el aceite hacia el vapor, arrastrando las partículas de aceite esencial hacia la cámara condensadora, que es simplemente un tubo en espiral sumergido en agua fría, que condensa el vapor en agua. Al final de la condensación, el agua y los aceites esenciales se recogen en un recipiente conocido como “balón de destilación”. Considerando que el agua y el aceite no se mezclan, la solución se separará en aceite esencial e hidrolato. Los aceites esenciales son en general menos densos que el agua y flotarán sobre la misma, lo cual permite drenar el hidrolato y recuperar el aceite esencial (Figura 12) (Ortuño, 2006 y IQR, 2020).

**Figura 12.** Esquema de destilación por arrastre con vapor



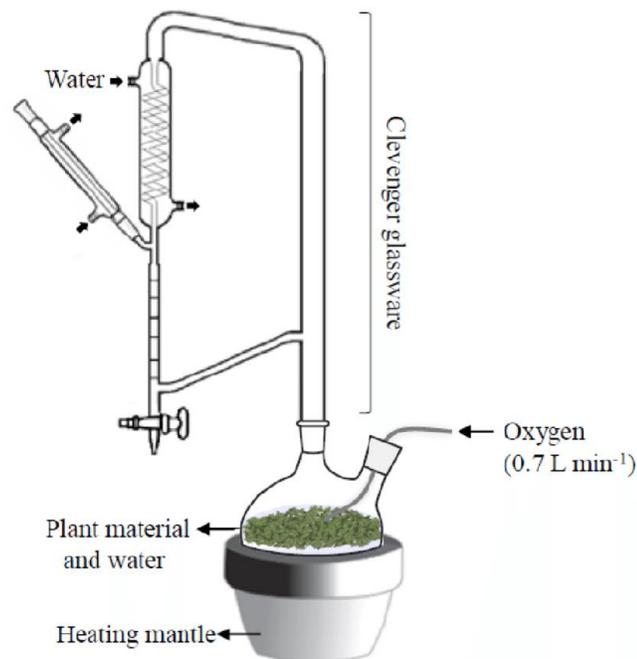
Tomado y modificado de Martínez, 2003.

A diferencia de esta técnica, existen métodos donde el aceite esencial se obtiene mediante el uso de un solvente, produciendo así la difusión del aceite hacia el

solvente. La esencia es solubilizada en el aceite que actúa como vehículo extractor, que luego se separará mediante destilación al vacío. Esta técnica es conocida como lixiviación. La cual se puede combinar con un proceso previo de maceración, en cuya técnica el material permanece varios días sumergido en disolventes como aceite, grasa fundida, y etanol. La adaptación del método para extracción de aceites esenciales florales se denomina enfloración (Ortuño, 2006).

Específicamente, la hidrodestilación es un método de extracción de aceite esencial, el cual consiste en poner en contacto directo el material vegetal con agua hirviendo, y por medio del vapor se arrastra el aceite a un condensador, para así obtener dicho producto. Para esta técnica se usa la trampa de Clevenger, la cual es un aparato compuesto por un balón, donde se deposita la materia prima previamente licuada y una cantidad determinada de agua pura (Figura 13) (Bruneton, 1991).

**Figura 13.** Esquema de la hidrodestilación con trampa de Clevenger



Tomado y modificado de Cerpa, 2007.

El balón es calentado constantemente y el aceite esencial con el agua presente se evapora continuamente. El condensador va acoplado al balón a través de una conexión en forma de D que permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua condensada regresa al balón por rebose de la conexión (Bruneton, 1991).

Actualmente se han desarrollado técnicas de extracción de aceites esenciales con fluidos supercríticos. La materia prima se corta en trozos pequeños o es molida, y luego de preparar la carga, ésta se empaca en una cámara de acero inoxidable donde se hace circular un líquido en estado supercrítico (por ejemplo, CO<sub>2</sub>). Las esencias son solubilizadas y arrastradas por el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor, eliminándolo luego de la cámara mediante descompresiones sucesivas hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. El CO<sub>2</sub> cambia a fase gaseosa y se extrae del recipiente quedando sólo el aceite esencial (IQR, 2020).

Finalmente, se obtiene una esencia bastante pura, el rendimiento es alto y es ecológicamente compatible. El solvente se recupera rápidamente e incluso se puede reciclar. Además, las bajas temperaturas que se utilizan en el proceso no cambian químicamente los componentes de la esencia. Sin embargo, los equipos para realizar este método son costosos ya que requieren bombas para generar altas presiones, así como equipos resistentes a dichas presiones (IQR, 2020 y Bruneton, 1991).

### ***Técnicas y análisis de identificación de los aceites esenciales***

La identificación de los aceites esenciales de las diferentes partes de las plantas supone un nivel de complejidad considerable, debido al alto número de compuestos presentes en ellos. El aislamiento y purificación de cada componente se puede realizar con técnicas cromatográficas en capa fina, en columna o por destilación fraccionada y posterior reacción de coloración, pruebas de grupos funcionales, obtención de derivados y determinación estructural por métodos tradicionales. En

la actualidad se desarrollan técnicas cromatográficas de alta resolución, principalmente la cromatografía de gases con columnas capilares. Así como técnicas espectroscópicas, particularmente la espectrometría de masas (EM), la espectroscopia infrarroja (IR) y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Además, con el avance de la tecnología se han implementado sistemas cromatográficos acoplados a técnicas espectroscópicas, especialmente la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) y la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia infrarroja (CG-FID) (Bandoni, 2000)

En efecto, el fundamento de la cromatografía se basa en la separación de sustancias que se encuentran presente en una mezcla compleja, entre dos fases inmiscibles, una móvil y otra estacionaria. Los componentes de la mezcla serán separados según la afinidad que presenten a cada fase, es decir, las moléculas de la mezcla que presenten afinidad por la fase estacionaria serán retenidas y las demás serán arrastradas por la fase móvil, de modo que, según la afinidad de los solutos a las fases, las velocidades medias de avance a lo largo del sistema serán diferentes. Esto debido a las interacciones entre los solutos y las fases mediadas por fuerza de tipo Van der Waals, puentes de hidrógenos o transferencia de cargas. Dicha unión determina la velocidad del desplazamiento del soluto a lo largo de la fase. Por lo tanto, se logra la separación entre componentes fuerte y débilmente retenidos en las fases, lográndose identificar en bandas fijadas a lo largo de la corrida. Estas últimas se pueden analizar cualitativa o cuantitativamente con diferentes métodos fisicoquímicos (Skoog, 2008):

En contraste, cuando la fase móvil es gaseosa, por ejemplo: helio, argón, hidrógeno, nitrógeno y la fase estacionaria está constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica, la técnica se denomina cromatografía de gases (CG). En la cual la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se produce por el flujo del gas inerte, que no interacciona con las moléculas del analito. El sistema de inyección

está acoplado a un cromatógrafo que permite detectar las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas (Bandoni, 2000).

Para la identificación de los componentes del aceite esencial mediante CG se ha utilizado frecuentemente la comparación de sus tiempos de retención que consiste en el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico, con los de los patrones. Sin embargo, los tiempos de retención están fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, es diseño de equipo. Por este motivo ha sido necesaria la introducción de parámetros relativos como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención (Bandoni, 2000).

La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial, mediante el cálculo del índice de retención de Kováts. Este se determina analizando conjuntamente la muestra del aceite esencial con una mezcla de n-alcenos ( $C_8$  a  $C_{22}$ ). El cromatograma que se obtiene muestra una relación logarítmica entre el número de carbonos y los tiempos de retención, reflejando la tendencia en los puntos de ebullición entre los miembros de una serie homóloga. De esta forma se obtiene, una relación lineal cuando se grafica el logaritmo de los tiempos de retención vs los índices de Kováts (Kováts, 1958).

#### *Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)*

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) permite el análisis preciso de masas para la separación, identificación, caracterización y cuantificación de diferentes compuestos químicos, presentes en muestras complejas. En esta técnica la esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, en el cual los componentes de la esencia se separan, penetrando en

el espectrómetro de masas, que permite registrar el correspondiente espectro de cada una de las sustancias separadas (Skoog y Holler, 2001).

La identificación de los componentes de los aceites esenciales se realiza con base en sus espectros de masas (EM) gracias a los diferentes patrones de fragmentación que se observan en el detector de masas de trampa de iones (ITD), obtenidos por impacto electrónico y/o por ionización química, manteniéndose en un campo de radiofrecuencia. Luego, los iones atrapados se expulsan del área de almacenamiento hacia un barrido de función de la relación masa/carga. Las masas de los iones formados a partir de los terpenos, principales constituyentes de los aceites esenciales, son bastante parecidas. Sin embargo, difieren en su abundancia lo cual permite su identificación (Bandoni, 2000).

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que la CG-EM es uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales, debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular.

### ***Generalidades de los Hongos***

Los hongos son organismos eucariontes, cuyas células poseen núcleo diferenciado que contiene el material genético, encerrado por una membrana nuclear. Los organismos del reino Fungí pueden ser unicelulares o multicelulares. Los hongos multicelulares como las setas pueden asemejarse a las plantas. Sin embargo, no tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Algunos de estos, nombrados como hongos verdaderos, tienen membranas compuestas por una sustancia denominada quitina. Morfológicamente, los hongos y las levaduras, son microorganismos ovales más grandes que las bacterias. Algunos forman estructuras visibles denominadas micelios, compuestas por filamentos largos (hifas) que se ramifican y entrelazan. A estos últimos se les conocen como hongos

filamentosos o mohos. Estos pueden reproducirse de forma sexual o asexual (Tortora, Funke y Case, 2007).

El género *Cándida* son hongos unicelulares o levaduras. Forma parte de la familia Cryptococcaceae, presenta células ovoides de 3-5 µm por 612 µm. Se reproducen por blastoconidias, crecen generalmente en medios aerobios a una temperatura óptima entre 25 – 37 °C y a un pH entre 2,5 – 7,5. Su principal representante es *Cándida albicans*, aunque muchas otras especies son fuente bien documentada de infecciones. Esta levadura está presente en la mayoría de los humanos como un microorganismo comensal ubicuo, se encuentra normalmente en piel, estomago, colón, vagina, recto y cavidad oral. A pesar de ello, en algunos pacientes en donde su sistema de defensa está severamente comprometido por procesos tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), inmunosupresión por trasplantes de órganos, diabetes, quimioterapias, edad avanzada y anormalidades inherentes al sistema inmune, etc. puede convertirse en un patógeno que causa infecciones locales o sistémicas (Espina, Guillén, Calvo, y Meza, 2005).

*Candida albicans* es una célula ovalada, de pared delgada, gemante, del tipo de las levaduras mide de 2 a 4 milimicras de diámetro cuando se obtiene por primera vez de una lesión. Después de 4 o 5 días en agar de Sabouraud aparecen colonias de tamaño mediano, húmedas, cremosas que tienen olor dulzón y en medios de cultivos cromogénicos adopta coloración verde esmeralda (Retana, 2008). Aunque la invasión inicial y el aumento de la patogenicidad de esta levadura dependen de las condiciones y los mecanismos inmunes de los hospederos inmunocomprometidos, *C. albicans* posee factores de virulencia que promueven su habilidad de causar enfermedad. Los principales factores de virulencia con los que cuenta este microorganismo son su capacidad de transformar su morfología (polimorfismo), la producción de proteínas especializadas como las adhesinas e invasinas, la secreción de enzimas hidrolíticas como proteasas que facilitan la

penetración en las células y la formación de biopelículas sobre la superficie celular en mucosas (Panizo y Reviákina, 2001).

Los criterios tomados en cuenta para la identificación de las especies del género *Candida* según Andrade (2014) son:

1. Estudio macroscópico: Aspecto de las colonias en medios de cultivo sólidos, en cajas Petri:
  - Las colonias varían en cuanto a color, siendo generalmente blancas, cremas, ligeramente color ceniza o rosáceas. No presentan pigmentos carotenóides.
  - La textura es cremosa o membranosa, de superficie rugosa, surcada, lisa, opaca o brillante.
  - De modo general, las formas de las colonias son circulares con bordes, regulares o irregulares.
2. Estudio microscópico: Para el estudio de la forma de los blastosporos, de reproducción vegetativa y el tamaño de las células en las diferentes especies debe ser realizada a partir de los cultivos. Es empleado para el estudio de la micromorfología, las características del pseudomicelio, pseudo-hifa, hifa verdadera, forma y disposición de los blastosporos, presencia o no de clamidosporos, permiten, cuando están asociadas a su comportamiento fisiológico diferenciarlas según su especie.

*Candida albicans* se caracteriza por presentar clamidosporos globosos, terminales, de espesa pared celular, a veces en gran número. El pseudomicelio es abundante y ramificado y el micelio verdadero puede ser encontrado en los cultivos más viejos. Los Blastosporos ovoides o globosos reunidos generalmente en forma de bola. La hifa verdadera posee varios septos, al contrario de la pseudo-hifa que nos muestra un número escaso (Andrade, 2014).

Por su parte, *Candida krusei* es un hongo dimórfico que generalmente existe de forma unicelular como levaduras o pseudohifas. Las dos formas morfológicas pueden estar presentes al mismo tiempo en cultivos en crecimiento, pero son difíciles de separar. A diferencia de la mayoría de los miembros del género, las

células de *C. krusei* son alargadas y se asemejan a granos de arroz largos con una dimensión de 2,2–5,6  $\mu\text{m}$  por 4,3–15,2  $\mu\text{m}$ . La transición dimórfica de *C. krusei* contribuye a su virulencia debido a la naturaleza invasiva de las pseudohifas. En agar de extracto de malta, las colonias de *C. krusei* son mantecosas a color crema claro, crece como colonias extendidas con rugosidades y superficie amarillo blanquecina en agar Sabouraud-dextrosa, distinguiéndola de otras *Candida* spp., en medio cromo-agar-candida sus colonias aparecen rosadas pálidas, de textura rugosa, planas, secas y con bordes blancos, lo que la distingue de un cultivo mixto de *C. albicans* y otras especies patógenas. Esta levadura también forma una biopelícula adherente en la superficie, esta característica la distingue de otras especies de *Candida* (Jamiu, Albertyn, Sebolaib y Pohl, 2021).

*C. krusei* es un saprofito facultativo, ampliamente distribuido en la naturaleza, y generalmente se considera como un comensal transitorio humano y un habitante de la mucosa en individuos sanos. Sin embargo, puede ser responsable de candidiasis autolimitada en infecciones no inmunocomprometidas y potencialmente mortales en pacientes inmunocomprometidos. La forma teleomorfa de *C. krusei* generalmente se encuentra en el suelo en regiones más cálidas y en frutas, vegetales y productos alimenticios como jugos de frutas y fermentados de leche. La transformación entre las dos formas (asexual y sexual) está determinada por las condiciones ambientales, pero por lo general no está claro. *C. krusei* es responsable, entre otros, de la endoftalmitis, onicólisis, endocarditis y osteomielitis (Jamiu y cols., 2021).

### ***Mecanismos de resistencia de los hongos***

El desarrollo de la resistencia antifúngica es un complejo proceso en el que están involucrados el huésped y su estado inmunitario, el antifúngico elegido para realizar la terapia y múltiples factores microbianos del patógeno que produce la enfermedad y es una de las principales causas de fallo terapéutico en las

infecciones fúngicas invasoras. En consecuencia, la resistencia a los antifúngicos puede ser definida tanto desde un punto de vista microbiológico como clínico (Rivero, 2019).

La resistencia microbiológica de un hongo está asociada a la baja sensibilidad *in vitro* de este frente a un antifúngico, y se determina mediante los puntos de corte establecidos para cada patógeno fúngico. En función de las características particulares de cada microorganismo, la resistencia microbiológica se puede subdividir en: (I) resistencia primaria o intrínseca, la cual ocurre en cepas de una misma especie que son resistentes a un antifúngico de forma espontánea sin haber sido previamente expuestas al fármaco; y (II) resistencia secundaria o adquirida, que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se pueden manifestar de forma estable o transitoria (Pfaller, Castanheira, Lockhart, Ahlquist, Messer y cols., 2012).

La resistencia antifúngica clínica es aquella que ocurre cuando hay crecimiento o ausencia de inhibición de un hongo en el foco de infección del paciente, aunque en el mismo existan concentraciones terapéuticas de un fármaco con actividad *in vitro* frente al agente etiológico de la infección. En este caso, la resistencia depende del antifúngico, de los factores relacionados con el paciente o de ambos, más que del microorganismo que produce la infección (Rivero, 2019).

En efecto, la emergencia de hongos resistentes a los polienos se debe a la producción de cambios cualitativos y cuantitativos en los esteroides de la membrana. Así, se ha descrito la sustitución del ergosterol por otros esteroides en *Aspergillus* y *Cryptococcus* y la disminución del 74-85 % del contenido en ergosterol en *C. albicans*. También se ha descrito un aumento en la actividad catalasa que produce una disminución de la sensibilidad al daño oxidativo (Pfaller, 2012).

Por otra parte, la resistencia a los azoles puede ocurrir por una variedad de mecanismos que incluyen mutaciones que modifican la diana, sobreexpresión del gen ERG11, sobreexpresión de bombas de achique de la membrana que sacan el

antifúngico del interior de la célula fúngica, interferencia con la acción sobre la 14-*alfa*-demetilasa, alteraciones en otras enzimas de la biosíntesis del ergosterol y la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco. Probablemente uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los azoles sea el fallo en la acumulación intracelular del fármaco mediante la sobreexpresión de los genes que codifican las bombas de achique. Además, la resistencia a la terbinafina es muy infrecuente y se ha relacionado recientemente con una mutación en el gen ERG1. Asimismo, la resistencia a la caspofungina es excepcional y se produce por mutaciones en el gen FSK1. La resistencia a la flucitosina se produce tanto de forma primaria como secundaria por defectos en las enzimas permeasa, desaminasa y/o fosforibosil transferasa y se presenta especialmente en el serotipo B de *C. albicans* (Pontón y Quindós, 2006).

### ***Generalidades de los antifúngicos***

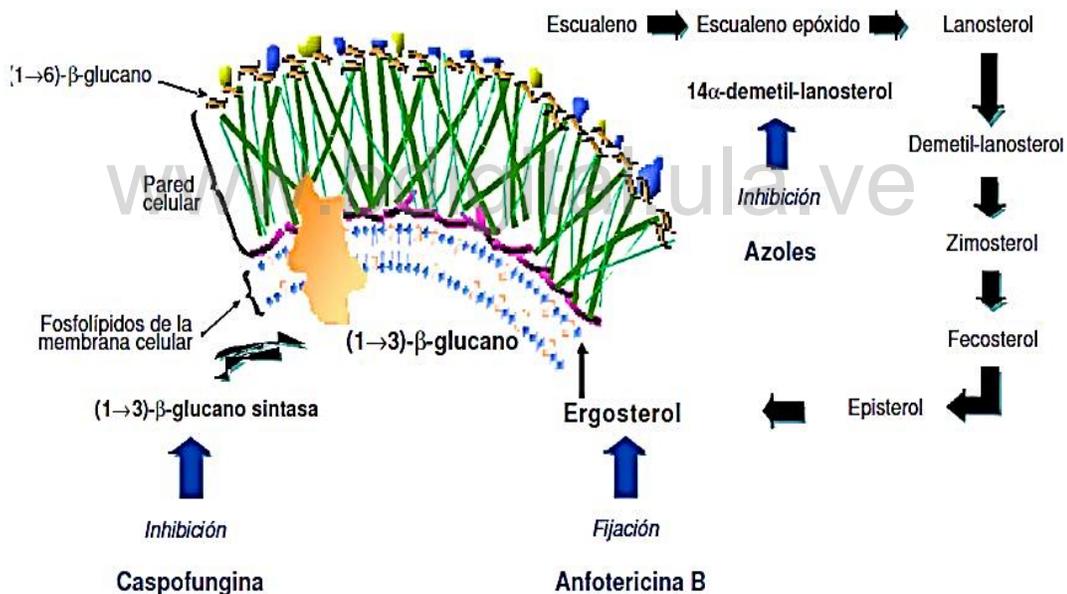
En la actualidad existen tres clases principales de compuestos con actividad antifúngica autorizados para el uso clínico, los polienos, los azoles y las equinocandinas, los cuales actúan frente a una de las dos dianas principales en los hongos: el ergosterol, componente esencial de la membrana plasmática fúngica responsable de su fluidez y permeabilidad y el  $\beta$ -glucano, polisacárido estructural que constituye más del 50 % de la pared celular de los hongos (Figura, 14) (Rivero, 2019).

### ***Clasificación y mecanismo de acción de los antifúngicos***

Los polienos son un grupo de compuestos naturales que actúan a nivel de la membrana plasmática del hongo. Aunque existen varios antifúngicos poliénicos, como la nistatina y la natamicina, el más utilizado es la anfotericina B. El mecanismo de acción de la anfotericina B no está del todo claro, pero se basa en

su unión al ergosterol, generando poros en la membrana plasmática fúngica que dan lugar a su disrupción y posterior pérdida del contenido citoplasmático, lo que resulta en la muerte celular. Además, se ha propuesto otro mecanismo de acción en el que está implicada la liberación de especies reactivas de oxígeno provocada por la inducción de estrés oxidativo y por peroxidación lipídica de las células fúngicas, viéndose afectada la permeabilidad de su membrana plasmática (Campoy y Adrio, 2017).

**Figura 14.** Mecanismos de acción de las diferentes familias de antifúngicos en uso clínico.



Tomado y modificado de Rivero, 2019.

La familia de los azoles incluye los imidazoles y los triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol). El mecanismo de acción de estos compuestos también tiene por diana el ergosterol y está basado en la inhibición competitiva de una enzima fundamental en su ruta de biosíntesis, la 14 α-esterol

demetilasa. Esta enzima pertenece a la familia de las proteínas citocromo P450 Cyp51 en hongos y P450 Erg11 en levaduras, y cataliza el paso del lanosterol a ergosterol mediante la eliminación de un grupometil en la posición C-14. Cuando un azol se une a través del grupo nitrógeno presente en el anillo azólico al grupo hemo de este citocromo se bloquea el crecimiento de la membrana plasmática fúngica como causa de la toxicidad producida por la acumulación de esteroides metilados, lo cual conlleva la muerte celular (Rivero, 2019).

Las equinocandinas constituyen la familia de antifúngicos, compuesta por la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina, que actúa comprometiendo la integridad de la pared celular fúngica. Lo hace mediante el bloqueo no competitivo de la enzima 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa, que pertenece al complejo de proteínas responsables de la producción de polímeros de 1,3- $\beta$ -glucano y 1,6- $\beta$ -glucano, componentes fundamentales de esta pared sin los cuales se debilita y se produce la lisis celular (Campoy y Adrio, 2017).

Aunque también se han descrito otras clases de compuestos antifúngicos sistémicos como son las alilaminas y tiocarbamatos, morfolinas y análogos de nucleósidos. Las alilaminas bloquean la síntesis de ergosterol, por la inhibición de la escualeno epoxidasa, permitiendo la acumulación de escualeno (que es tóxico para las células). Está representado por tiocarbamatos de uso tópico como la terbinafina, las naftifina y el tolnaftato (Pontón y Quindós, 2006).

Por otra parte, las morfolinas inhiben la síntesis de esterol reductasa e isomerasas, están representadas por la amorolfina y los análogos de nucleósidos inhiben la síntesis macrocelular de ADN y ARN por desaminación de la fluoropirimidina flucitosina (5-fluorocitosina), por acción de la citosina desaminasa, a su forma activa (5-fluorouracilo), la cual es transportada hacia el hongo susceptible por una citosina permeasa (Gupte, Kulkarni y Ganguli, 2002; Mellado, Cuenca y Rodríguez, 2002)

### ***Actividad antifúngica***

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto a la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas. Esta actividad biológica puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida (Cruz, Gómez, García, Álvarez, Cáceres y cols., 2006; Maguna, Romero, Garro y Okulik, 2006).

En efecto, la actividad antifúngica es una metodología para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de dicha actividad, con el fin de detectar cepas resistentes y determinar el mejor tratamiento para erradicar las infecciones que causan (Rivero, 2019). La determinación de la actividad fungicida de los extractos de plantas se realiza por diferentes métodos entre los cuales se pueden mencionar la dilución de agar y el de difusión en placas empleando discos de papel de filtro estériles, cromatografía y espectrofotometría (Davicino, Mattar, Casali, Correa, Pettenati y Micalizzi, 2007).

### ***Técnicas que se usan para determinar la actividad***

#### ***Método de difusión en agar***

El método de difusión en agar se considera uno de los procedimientos más utilizados para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales sobre microorganismos aerobios. También es llamado como técnica de Kirby-Bauer, la cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento del microorganismo *in vitro*, mediante la difusión del antimicrobiano en un medio de cultivo, generando una zona que se conoce como formación de halos de inhibición; zona en la que una concentración crítica del antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano (Reyes, Palou y López, 2014). El diámetro del halo de inhibición del crecimiento expresa

la sensibilidad o resistencia del microorganismo, este halo se mide en milímetros (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

A nivel metodológico, existen dos formas de realizar la difusión: impregnando un papel filtro con una solución de concentración conocida del extracto y colocándolo sobre la superficie del agar o perforando el agar, con un sacabocados, y vertiendo en el orificio una solución de concentración conocida del antimicrobiano a evaluar (Huerfano, 2018; Ramírez y Marín, 2012).

#### *Método de dilución en caldo*

La prueba de dilución y microdilución en caldo se basa en la exposición de los microorganismos a distintas concentraciones de los antimicrobianos, en diluciones a la mitad, con el objetivo de observar su crecimiento y, con base en este, definir la mínima concentración en la que no se observa turbidez (Huerfano, 2018).

La prueba de dilución y microdilución seriada se realiza en tubos o placas de pocillos con medios líquidos, que contienen concentraciones seriadas crecientes de extracto diluidas en caldo, inoculado con una concentración definida de células del microorganismo. Posterior a la incubación a temperatura y tiempo óptimo. La presencia de turbidez o sedimentación indican crecimiento visible del microorganismo (Reyes y cols., 2014).

#### *Método de dilución en agar*

Se fundamenta en inocular, en concentraciones conocidas, el microorganismo y el antimicrobiano a probar, en un medio sólido y no en caldo, con posterior incubación. La actividad antimicrobiana se detecta por la inhibición del crecimiento microbiano en toda la placa. La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la concentración másbaja del agente antimicrobiano presente en el agar que inhibe por completo el crecimiento visible (Forbes y cols., 2009).

Según la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), estándar europeo, el método de referencia estándar para determinar la sensibilidad en levaduras es el método de dilución en caldo macro o microdilución (Gennaro, 2003). Sin embargo, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), de EEUU establece la prueba de difusión en disco de *Candida spp*, los criterios para las pruebas de control de calidad y los criterios de interpretación, en el documento M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline-Second Edition (2009) (Gennaro, 2003). Ambas determinan las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antifúngicos frente a las cepas mediante la valoración del crecimiento en comparación con un pocillo control sin fármaco. Sin embargo, la inhibición de algunas especies con determinados antifúngicos, como ocurre con los hongos filamentosos y las equinocandinas, es solo parcial y el hongo es capaz de producir hifas muy cortas y ramificadas. En esos casos se determina la concentración mínima efectiva (CME) (Rivero, 2019).

Existen otras metodologías que permiten determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro*, como los comerciales Etest (bioMérieux), Vitek (bioMérieux) y Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic System) o las placas multipocillo de agar suplementados con antifúngico. Además, se ha propuesto recientemente un método, basado en el análisis comparativo de los espectros de masas de los aislados fúngicos al ser expuestos a diferentes concentraciones de antifúngico, que posibilitaría la aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI-ToF para determinar el perfil de resistencia de los hongos (Rivero, 2019).

### **Definición operacional de términos**

**Analito:** es un componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico cuya presencia o concentración se desea conocer, el cual puede ser identificado y cuantificado, a partir de una muestra que se separa de la matriz (Skoog, 2008).

**Corola:** Verticilo interno de las flores que tienen perianto heteroclámideo, puede ser dialipétala o gamopétala. Presenta una textura más fina y colores más brillantes que el verticilo externo (cáliz) (Bruneton, 2001).

**Hidrolato:** Agua destilada que se obtiene durante el proceso de destilación (Ortuño, 2006).

**Inflorescencia:** Forma de agruparse las flores en una planta, los principales tipos de inflorescencia son racimos, espiga, umbela, capítulo y cima (Bruneton, 2001).

**Pedúnculo:** Es una ramita que se prolonga de la hoja, flor o fruto (Bruneton, 2001).

**Receptáculo:** Extremo de la flor donde descansan los diversos verticilos. En una inflorescencia, parte engrosada del pedúnculo en el que se asientan las flores (Bruneton, 2001).

### **Operacionalización de las variables**

Según Palella y Martins (2010), la operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan a las variables de una investigación. Esta definición operacional asigna significado a una variable, describiéndola en términos observables y comparables para poder identificarla. Para establecer el sistema de variables es necesaria la definición

conceptual y la operacionalización de las mismas, es decir, de las dimensiones y los indicadores de cada una. En las tablas 5 y 6, se muestran las variables que se asumieron en la presente investigación y los indicadores que las definieron como tales.

**Tabla 5.** Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Espeletopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de <i>Espeletopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.	Dependiente Discreta	La actividad antimicrobiana se define como la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población microbiana o para eliminarla (Fica, 2005).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer)	Resistente Sensible Frente a cepas de <i>Candida</i> de referencia internacional.	Presencia de halo de inhibición (mm) Ausencia de halo de inhibición (mm)

**Fuente:** Lacruz y Aparicio (2023).

**Tabla 6.** Operacionalización de la variable independiente: Composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec.	Independiente Discreta	La composición de los aceites comprende una mezcla compleja de múltiples compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos, químicos o microbiológicos a partir de una fuente natural (Marcano y Hasegawa, 2002).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa	Compuestos volátiles Monoterpenos Sesquiterpenos Diterpenos Terpenos de bajo peso molecular	Tiempo de Retención (TR) Índice de Kováts (IK)

**Fuente:** Lacruz y Aparicio (2023).

### Hipótesis de la Investigación

Estudios previos de los aceites esenciales de la sub-tribu Espeletiinae, se le ha determinado actividades antifúngicas, es de esperarse que el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl) Cuatrec contenga moléculas activas responsables del efecto antifúngico frente a cepas de *Candida* de referencia internacional.

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### Tipo de investigación

Según Hurtado (2010), el tipo de investigación corresponde a la interrogante de estudio, la cual destaca lo que se quiere saber. Ya que esto marca el logro general de lo que se desea obtener durante el proceso de la investigación. Específicamente, en esta investigación se quiso saber si existe relación entre la actividad antifúngica y la composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. Es por ello que este trabajo correspondió a una investigación de tipo confirmatoria.

#### Diseño de investigación

El diseño de investigación comprende las estrategias necesarias para recolectar los datos. Concretamente, se consideran estrategias relacionados con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se recolectará (Hurtado, 2010). Con respecto al dónde, el diseño fue mixto y experimental. Asumió un diseño mixto ya que, fue un proceso de búsqueda de campo y laboratorio (natural y artificial), en la Laguna de Mucubají, Páramo Sierra Nevada, en la ciudad de Mérida y en los laboratorios: “A” de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones y el Laboratorio de Micología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Asimismo, fue experimental porque se trabajó con un grupo control, se manipuló la variable independiente para lograr efecto en la variable dependiente. Con respecto a la temporalidad, fue contemporáneo y transeccional porque se estudió el evento en el presente y en un único momento en el tiempo. En relación

a la amplitud, se consideró unieventual debido a que se analizó una variable dependiente y una variable independiente.

## **Población y muestra**

### ***Unidad de investigación***

El conjunto de seres que poseen características o eventos de interés, enmarcados dentro de criterios de inclusión, se conoce como población que, según su extensión, puede ser finita o infinita, requiriéndose la selección de una muestra (Hurtado, 2010). Partiendo de esta aseveración la población o universo fue infinita y correspondió a la planta *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., presente en la Laguna de Mucubají, Páramo Sierra Nevada del estado Mérida-Venezuela.

### ***Selección del tamaño de la muestra***

La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). De la población señalada se tomó una muestra no probabilística, la cual, según Hernández y cols., (2010) corresponde al tipo de muestra cuya selección no depende de que todas tengan la misma probabilidad de ser elegidos, sino la decisión del investigador. Esta muestra estuvo integrada por la recolección de dos kilogramos de hojas frescas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

## **Sistema de variables**

Un sistema de variables consiste en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores (Arias, 2006), partiendo del hecho que una variable es una cualidad susceptible de sufrir cambios. En base a estas definiciones, las variables relacionadas con esta

investigación fueron: Variable Dependiente (VD): Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. y Variable Independiente (VI): Composición química del aceite esencial obtenido de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. Las variables mencionadas estuvieron relacionadas con la línea de investigación y permitieron verificar el fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

### **Instrumento de recolección de datos**

Una de las técnicas usadas en la investigación es la observación directa del fenómeno estudiado. Esta consiste en visualizar, en forma sistémica cualquier hecho, fenómeno o situación que se produzca en la naturaleza, en función de los objetivos preestablecidos (Arias, 2006). Para recopilar la información de interés sobre las variables, se consideró pertinente aplicar la técnica de observación, relacionada con la visualización de un halo alrededor de los discos impregnados del aceite esencial de las hojas *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., ubicados en placas de agar previamente inoculadas con cepas de *Candida* de referencia internacional.

Con respecto al instrumento de recolección de los datos, se usaron tablas y listas de cotejo, las cuales son una herramienta que indica la presencia o no de un aspecto o conducta que será visualizada (Arias, 2006).

### **Procedimiento de la investigación**

#### ***Recolección de la Especie***

Las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., fue recolectada en la Laguna de Mucubaji, de la Sierra Nevada de Mérida estado Mérida, por el Dr. Alfredo Usubillaga e identificada por el Prof. Pablo Meléndez y depositada en el

Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo el Voucher N° 9 del 02/12/99 (Figura 15).

**Figura 15.** Voucher depositado en el herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de *Espeletiopsis pannosa* (Standl) Cuatrec.



Fuente: Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

### ***Preparación de la planta y extracción del aceite esencial por el método de hidrodestilación***

Se utilizaron aproximadamente 2,000 Kg de las hojas frescas de *Espeletiopsis pannosa*. La extracción del aceite esencial de las hojas, se realizó en el Laboratorio “A” de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio y los Profesores Alfredo Usubillaga y †Luis B Rojas. El material vegetal de la planta, se licuó y posteriormente se colocó en un recipiente de capacidad media de 12 litros, junto con 5 litros de agua aproximadamente. Posteriormente se sometió a ebullición mediante el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger (Figura 16), manteniendo la temperatura a 80 °C durante 4 horas.

Luego de culminado el proceso de extracción, se procedió a retomar el aceite esencial con una pipeta de Pasteur, se le adicionó sulfato de sodio anhídrido para eliminarle la humedad, trasvasándolo a otro recipiente, se le colocó atmosfera de argón, y se almacenó el aceite a una temperatura de 4 °C, para su posterior análisis.

**Figura 16.** Trampa de Clevenger usada para la hidrodestilación



Fuente: Lacruz y Aparicio, 2023.

***Identificación de los componentes del aceite esencial de las hojas de  
Espeletiopsis pannosa***

***Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)***

La separación e identificación de los componentes del aceite esencial de *Espeletiopsis pannosa* se realizó por medio del equipo de gases marca Hewlett Packard modelo 6890 con una columna fenil-metil-polixilosano (HP-5 MS), además un detector de masa marca Hewlett Packard MSD 5973 (Figura 17). Donde se preparó una solución al 2 % (20  $\mu$ L del aceite + 1 mL de éter dietílico) que posteriormente se inyectó 1  $\mu$ L en el equipo, el tiempo del análisis fue de 50 minutos. Con un programa de temperatura inicial de 60 °C, siguiendo intervalos de aumento de 4 °C/minutos hasta una temperatura final de 260 °C con un Split de 100:1. La caracterización e identificación de los compuestos se realizó utilizando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición (Adams, 2007).

**Figura 17.** Equipo de cromatografía de gases usado.



Fuente: Lacruz y Aparicio, 2023.

### ***Cálculos del Índice de Kováts***

Se determinaron los índices utilizando una columna de metil-fenil-silicona de (HP-5 MS), en el equipo de gases, la cual presentaba las siguientes características: 30 metros de largo con 0,25 mm de diámetro con una serie de patrones de *n*-parafinas desde la C<sub>7</sub> hasta la C<sub>22</sub> (Kováts, 1958).

### ***Evaluación de la actividad antifúngica***

#### ***Ensayo Antifúngico***

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. La investigación se realizó por el método de difusión en agar con disco descrita por Martín y cols., 2001, frente a levaduras de referencia internacional: *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

#### ***Cepas para el Ensayo***

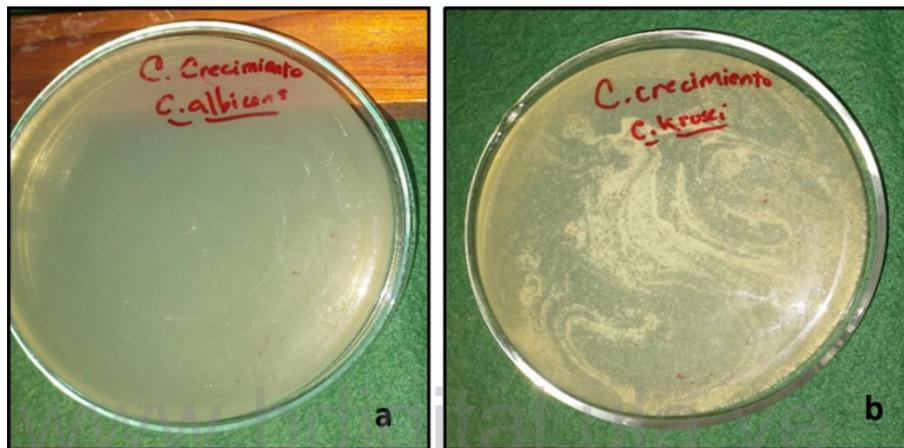
Para la evaluación de la actividad antifúngica, se usaron las especies de *Candida albicans* y *Candida kruseii* de referencia internacional (Figura 18), perteneciente a la Center for Disease Control (CDC).

#### ***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 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) descritas por (Martín, y cols., 2001).

**Figura 18.** Cepas usadas en el ensayo de referencia internacional



**Nota:** **a.** Control de Crecimiento de *Candida albicans*, **b.** Control de crecimiento de *Candida krusei*

### ***Preparación de los Discos***

Se utilizaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro estériles. Cada disco fue impregnado con 10  $\mu$ L del aceite esencial de *Espeletopsis pannosa*, sobre las placas de agar.

### ***Disco control***

Para esta investigación se utilizó de Fluconazol 25  $\mu$ g para *Candida albicans* y Voriconazol 25  $\mu$ g para *Candida krusei* como discos de controles positivos y a su vez el disco de dimetilsulfóxido (DMSO) que se utilizó como control negativo.

### ***Preparación de las Placas e Inoculación***

Las placas de Petri con 15 mL Agar de Müeller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa se sembraron con el inóculo previamente preparado se dejó solidificar a temperatura ambiente, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 °C hasta su uso y con una pinza estéril se colocaron los discos de papel de filtro posteriormente se impregnaron con el aceite puro y los discos de Fluconazol y Voriconazol. Se dejó a temperatura ambiente por 30 min y se incubó a 37 °C por 24-48 horas. La actividad antifúngica se determinó con la formación de un halo de inhibición alrededor del disco. Este ensayo se realizó por duplicado.

### **Diseño de análisis**

Hernández, Fernández y Baptista (2010), refirieron que existen tres tipos de enfoques de Investigación: cualitativo, cuantitativo y mixto. El enfoque cuantitativo que representa un conjunto de procesos, es secuencial y probatorio. Cada etapa precede a la siguiente y no se puede “brincar” o eludir pasos, el orden es riguroso. La recolección de los datos se fundamenta en la medición. Esta recolección se lleva a cabo al utilizar procedimientos estandarizados y aceptados por una comunidad científica. Para que una investigación sea creíble y aceptada por otros investigadores, debe demostrarse que se siguieron tales procedimientos. Como en este enfoque se midió, los fenómenos estudiados pudieron observarse. El análisis de los resultados de esta investigación se enfocó a través de un modelo cuantitativo, debido a que se identificaron metabolitos secundarios mediante el seguimiento de protocolos estandarizados y la observación y medición de halos de inhibición por efecto antifúngico del aceite esencial de *Espeletopsis pannosa*.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Estudio fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl) Cuatrec

El estudio fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* se realizó a partir de la muestra obtenida por hidrodestilación con la trampa de Clevenger, la cual tuvo un rendimiento de 0,088 %, además, presentó las características físicas descritas en la Tabla 7.

**Tabla 7. Características del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl) Cuatrec.**

Características del aceite esencial	<i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl.) Cuatrec
Parte usada	Hojas frescas
Cantidad (g)	2725 g
Cantidad	2,4 mL
Aspecto	Transparente
Color	Amarillo claro
Olor	Característico
Rendimiento	0,088 %
Índice de refracción	1,4712
Índice de rotación	20,770
Densidad	0,871 g/mL

Elaborado por: Lacruz y Aparicio, 2023

En la Tabla 8, se muestra los diferentes compuestos identificados, con el tiempo de retención y porcentajes de abundancia de cada pico, además de los respectivos índices de Kováts de cada uno.

**Tabla 8.** Composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl) Cuatrec

Nº Pico	COMPONENTES	TR (Min)	Área (%)	I.K tab	I.K cal
<b>1</b>	<b><math>\alpha</math>-tujeno</b>	<b>4,91</b>	<b>13,26</b>	<b>930</b>	<b>928</b>
<b>2</b>	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>5,08</b>	<b>26,89</b>	<b>939</b>	<b>937</b>
3	Sabineno	5,93	1,80	975	974
<b>4</b>	<b><math>\beta</math>-pineno</b>	<b>6,03</b>	<b>11,01</b>	<b>979</b>	<b>978</b>
5	Mirceno	6,30	3,67	990	989
6	$\delta$ -3-careno	6,83	3,86	1011	1010
7	<i>p</i> -cimeno	7,19	0,59	1024	1023
8	Limoneno	7,31	1,13	1029	1027
9	<i>Trans</i> - $\beta$ -ocimeno	7,52	0,25	1037	1035
10	<i>Cis</i> - $\beta$ -ocimeno	7,81	0,54	1050	1048
11	Nonanal	9,45	0,24	1100	1098
12	Verbenol	10,74	0,42	1141	1139
13	Terpinen-4-ol	11,76	0,67	1177	1175
14	Silfiperfol-5-eno	16,50	0,54	1328	1327
15	Silfineno	16,73	0,75	1347	1337
16	Silfiperfol-4,7(14)-dieno	17,08	0,29	1360	1357
17	$\alpha$ -copaeno	17,52	0,64	1376	1375
18	Silfiperfol	17,59	1,51	1377	1362
19	Silfiperfol-6-eno	18,11	2,96	1379	1363
20	$\beta$ -cubebeno	19,45	3,83	1388	1396
21	Iso-cariofileno	19,95	2,11	1408	1410
<b>22</b>	<b>Aristoleno</b>	<b>20,52</b>	<b>10,07</b>	<b>1419</b>	<b>1415</b>
23	<i>Trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	21,37	0,27	1434	1433
24	$\alpha$ -humuleno	21,43	0,48	1454	1455
25	$\delta$ -selineno	21,65	0,86	1492	1490
26	$\alpha$ -zingibereno	21,76	2,13	1493	1498
27	Valenceno	21,82	1,16	1496	1498
28	Biciclogermacreno	22,59	1,19	1500	1523
29	Germacreno B	23,60	0,41	1561	1555
31	Espatulenol	24,20	2,59	1578	1573
32	Oxido de Cariofileno	24,36	0,98	1583	1578
34	Selina-6-eno-4-ol	25,37	0,59	1615	1611
36	Kaurenal	40,99	0,88	-	2247*

Leyenda: T. R: Tiempo de retención de los componentes. % Área: área relativa. I.Ktab. Índice de Kováts, tomado de la bibliografía (Adams, 2007). IKcalc. Índice de Kováts calculado con la temperatura programada en la columna HP-5 MS. \*Identificado por comparación directa con una muestra auténtica.

Mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se logró identificar un total de 33 compuestos, correspondientes al 97,06 % del total del aceite. De los compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* se obtuvo con mayor abundancia  $\alpha$ -tujeno (13,26 %),  $\alpha$ -pineno (26,89 %),  $\beta$ -pineno (11,01 %) y Aristoleno (10,07 %). También se evidenció la presencia de compuestos pertenecientes al grupo de los silfiperfol. En la Tabla 9 se muestran los grupos de compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *Espeletiopsis pannosa*, con predominio de hidrocarburos monoterpénicos (63,0 %) e hidrocarburos sesquiterpénicos (27,69 %). El 2,94 % de los componentes del aceite esencial correspondieron a compuestos no identificados.

**Tabla 9.** Tipo de compuestos identificados en las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl) Cuatrec

<b>Compuesto volátiles</b>	<b>%</b>
Hidrocarburos Alifáticos oxigenados	1,13
Hidrocarburos Monoterpénicos	63,0
Monoterpenos oxigenados	1,09
Hidrocarburos Sesquiterpénicos	27,69
Sesquiterpenos oxigenados	4,16
Diterpenos	0,88
Hidrocarburos aromáticos oxigenados	0,75
<b>Total identificado</b>	<b>97,06</b>

Elaborado por: Lacruz y Aparicio, 2023.

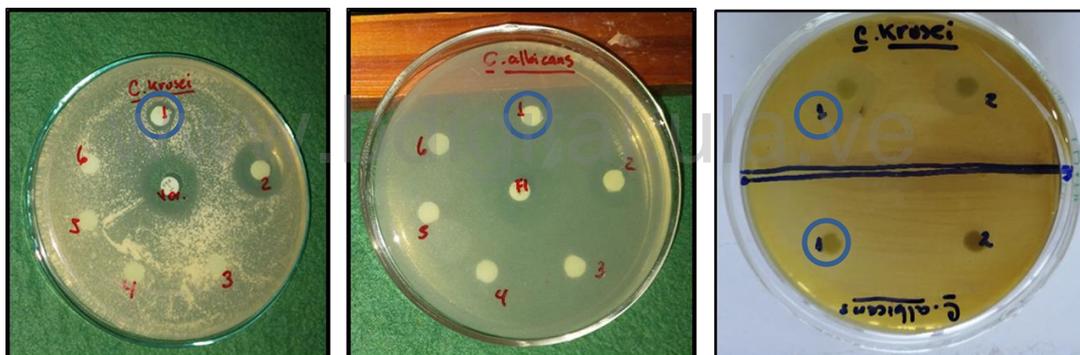
Por otra parte, en relación a la actividad antifúngica, se pudo determinar que el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* presentó actividad antifúngica para ambas cepas, se evidenció un halo de inhibición de 10 mm tanto en *C. albicans* como en *C. krusei* (Tabla 10). En la Figura 19 se puede apreciar los halos de inhibición de ambas cepas y los correspondientes controles positivos Fluconazol y Voriconazol.

**Tabla 10.** Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Espeletia pinnata* (Standl) Cuatrec.

Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)*		
	Control Positivo		
	AE (1)	FLU	VOR
<i>Candida albicans</i> CDC B-385	10*	50*	
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	10*		20*

Leyenda: AE: aceite esencial, FLU: Fluconazol® (100 µg); VOR: Vorcrum® (Voriconazol) (400 µg);  
\*Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm, media tomada de dos ensayos consecutivos.

**Figura 19.** Halo de inhibición de los discos con aceite esencial de *Espeletia pinnata*



Una vez obtenido el aceite esencial de las hojas de *Espeletia pinnata* a través del método de hidrodestilación con la trampa de Clevenger y analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se pudo identificar el 97,06 % del total de los componentes del aceite, asimismo se determinó que dicho aceite está compuesto principalmente por hidrocarburos monoterpénicos e hidrocarburos sesquiterpénicos en un 63,0 y 27,69 % respectivamente. Además, los compuestos más abundantes obtenidos fueron  $\alpha$ -tujeno (13,26 %),  $\alpha$ -pineno (26,89 %),  $\beta$ -pineno (11,01 %) y Aristoleno (10,07 %). Además, se obtuvo 5,3 % de abundancia en compuestos con el núcleo Silfiperfol, los cuales fueron

Silfiperfol-5-eno (0,54 %), Silfiperfol-4,7(14)-dieno (0,29 %), Silfiperfol (1,51 %), Silfiperfol-6-eno (2,96 %).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Aparicio y cols (2021), quienes pudieron identificar un 96,46 % de los componentes del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pozoensis* Cuatrec., así como el predominio de hidrocarburos monoterpénicos (56,09 %), seguido de los hidrocarburos sesquiterpénicos (25,66 %), siendo los compuestos mayoritarios en dicha investigación  $\alpha$ -pineno (24,17 %),  $\alpha$ -tujeno (11,43 %), *E*-cariofileno (11,39 %),  $\beta$ -pineno (9,98 %) y los compuestos del grupo Silfiperfol, Silfiperfol-5-eno (0,73 %), Presilfiperfol-7-eno (1,00 %), Silfiperfol-4,7(14)-dieno (3,66 %), Silfiperfol-6-eno (0,41 %). Estos compuestos han sido reportados en otros miembros de la familia de Asteraceae, como en *Ruilopezia lindenii* (Schultz-Bip.Ex Wedd.) Cuatrec. (Pérez y cols., 2017). Aunque Bohlmann y Jakupovic (1980) y Kowalski (2008), afirman que estos compuestos son característicos del género *Silphium*. Cabe resaltar que, aunque los componentes mayoritarios de *Espeletiopsis pozoensis* se asemejan a los del aceite esencial de *Espeletiopsis pannosa*, esta última presentó un incremento en los porcentajes de abundancia.

Por su parte, Meccia y cols (2007), produjeron 0,18 % de aceite esencial de hojas de *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. por hidrodestilación. El análisis CG-EM, permitió la identificación de 24 componentes, que constituyeron el 92,9 % del aceite total de las hojas. Los compuestos más abundantes fueron  $\alpha$ -pineno (29,9 %),  $\beta$ -cariofileno (14,1 %),  $\alpha$ -gurjuneno (9,9 %),  $\beta$ -pineno (9,6 %) y 19-oxo-*ent*-kaur-16-eno (5,3 %) (Tabla 11).

En cuanto a la sub-tribu Espeletiinae, se han identificado  $\alpha$ -pineno (38,1 %),  $\beta$ -pineno (17,2 %), mirceno (15,0 %), espatulenol (4,2 %), biciclogermacreno (4,0 %), -zingibereno (4,0 %) e himachaleno (3,7 %), de las hojas de *Espeletia nana* Cuatrec (Peña y cols., 2012).

**Tabla 11.** Compuestos mayoritarios en algunas especies de *Espeletiopsis*

<i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec Lacruz y Aparicio (2023)	<i>Espeletiopsis pozoensis</i> Cuatrec Aparicio y cols., (2021)	<i>Espeletiopsis angustifolia</i> Cuatrec Meccia y cols. (2007)
% de identificación: 97,06 %	96,46 %	92,9 %
hidrocarburos monoterpénicos: 63,0 % hidrocarburos sesquiterpénicos: 27,69 %	56,09 % 25,66 %	-
$\alpha$ -tujeno (13,26 %) $\alpha$ -pineno (26,89 %) $\beta$ -pineno (11,01 %) Silfiperfol-5-eno (0,54 %) Silfiperfol-4,7(14)-dieno (0,29 %) Silfiperfol-6-eno (2,96 %).	$\alpha$ -tujeno (11,43 %) $\alpha$ -pineno (24,17 %) $\beta$ -pineno (9,98 %) Silfiperfol-5-eno (0,73 %) Silfiperfol-4,7(14)-dieno (3,66 %) Silfiperfol-6-eno (0,41 %).	$\alpha$ -pineno (29,9 %) $\beta$ -pineno (9,6 %)

También de *Coespeletia moritziana* se identificó  $\beta$ -felandreno (28,42 %),  $\alpha$ -pineno (25,16 %),  $\beta$ -pineno (10,05 %) y kaurenal (4,63 %);  $\alpha$ -pineno (50,11 %),  $\alpha$ -felandreno (15,34 %), limoneno (14,52 %),  $\beta$ -pineno (16,28 %),  $\beta$ -mirceno (14,71%) y mirceno (12,1 %) de *Espeletia schultzii* y  $\beta$ -felandreno (48,08 %),  $\alpha$ -pineno (21,68 %),  $\beta$ -pineno (8,68 %) y  $\gamma$ -cadineno (3,98 %) de *Coespeletia timotensis* (Cordero y cols., 2017; Alarcón y cols., 2016).

Igualmente, del aceite esencial de las hojas frescas de *Libanothamnus neriifolius* (B. ex H) Ernst., fueron identificandos como compuestos principales  $\beta$ -felandreno (29,04 %),  $\alpha$ -felandreno (19,86 %),  $\alpha$ -pineno (13,57 %) y  $\alpha$ -tujeno (12,35 %) (Tabla 12 y 13) (Aparicio y cols., 2019).

**Tabla 12:** Compuestos mayoritarios en algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae.

<i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec Lacruz y Aparicio (2023)	<i>Espeletia nana</i> Cuatrec Peña y cols., (2012)	<i>Coespeletia moritziana</i> Cordero y cols., (2017)	<i>Coespeletia timotensis</i> Cordero y cols., 2017
$\alpha$ -pineno (26,89 %) $\beta$ -pineno (11,01 %) Mirceno (3,67%) Espatuleno (2,59%) Biciclogermacreno (1,19%) Zingibereno (2,13%) Kaurenal (0,88%)	$\alpha$ -pineno (38,1 %) $\beta$ -pineno (17,2 %) Mirceno (15,0 %) Espatuleno (4,2 %) Biciclogermacreno (4,0 %) Zingibereno (4,0 %)	$\beta$ -felandreno (28,42 %) $\alpha$ -pineno (25,16 %) $\beta$ -pineno (10,05 %) kaurenal (4,63 %)	$\beta$ -felandreno (48,08 %) $\alpha$ -pineno (21,68 %) $\beta$ -pineno (8,68 %)

**Tabla 13.** Compuestos mayoritarios en algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae

<i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec Lacruz y Aparicio (2023)	<i>Espeletia schultzii</i> Alarcón y cols., (2016)	<i>Libanothamnus neriifolius</i> Aparicio y cols., (2019).	<i>Ruilopezia marcescens</i> Aparicio y cols., (2018).
$\alpha$ -tujeno (13,26 %) $\alpha$ -pineno (26,89 %) $\beta$ -pineno (11,01 %) Mirceno (3,67 %) Limoneno (1,13 %) <i>p</i> -cimeno (0,59 %)	$\alpha$ -pineno (50,11 %) $\beta$ -pineno (16,28 %) $\alpha$ -felandreno (15,34 %) Limoneno (14,52 %) $\beta$ -mirceno (14,71%) Mirceno (12,1 %)	$\beta$ -felandreno (29,04 %) $\alpha$ -felandreno (19,86 %) $\alpha$ -pineno (13,57 %) $\alpha$ -tujeno (12,35 %)	Germacreno D (24,86 %) $\alpha$ -pineno (22,38 %) <i>p</i> -cimeno (7,35 %) $\alpha$ -felandreno (6,34 %)

De las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., se han identificado como compuestos principales el germacreno D (24,86 %),  $\alpha$ -pineno (22,38 %), *p*-cimeno (7,35 %) y  $\alpha$ -felandreno (6,34 %) (Aparicio y cols., 2018). En comparación con el aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia bracteosa*, esta última posee como componentes más abundantes  $\beta$ -mirceno (34,2 %),  $\alpha$ -pineno (24,3 %), 7-epi-selineno (9,1 %),  $\beta$ -pineno (8,5 %) y 6,9-guayadieno (4,4 %) (Alarcón y cols.,

2014). De igual manera, en *Ruilopezia lindenii* (Schultz-Bip.Ex Wedd.) Cuatrec. también se han identificado algunos otros compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* como son óxido de cariofileno (8,9 %) y espatulenol (13,5 %), además de silfiperfol-6-eno (11,2 %),  $\alpha$ -pineno (4,5 %) (Perez y cols., 2017) y silfiperfol-6-en-5-ona (2,6 %), silfiperfol-5-eno (2,18 %), silfiperfol-4,7(14)-dieno (1,02 %) (Tabla 14) (Bohlmann y Jakupovic, 1980; Kowalski, 2008).

**Tabla 14.** Compuestos mayoritarios en algunas especies de la sub-tribu Espeletiinae

<i>Espeletiopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec Lacruz y Aparicio (2023)	<i>Ruilopezia lindenii</i> Perez y cols., (2017); Bohlmann y Jakupovic, (1980); Kowalski, (2008)	<i>Ruilopezia bracteosa</i> Alarcón y cols., (2014)
$\alpha$ -pineno (26,89 %) $\beta$ -pineno (11,01 %) Silfiperfol-5-eno (0,54 %) Silfiperfol-4,7(14)-dieno (0,29 %) Silfiperfol-6-eno (2,96 %) Espatulenol (2,59%)	$\alpha$ -pineno (4,5 %) Óxido de cariofileno (8,9 %) Espatulenol (13,5 %) Silfiperfol-6-eno (11,2 %) Silfiperfol-5-eno (2,18 %) Silfiperfol-4,7(14)-dieno (1,02 %).	$\beta$ -mirceno (34,2 %) $\alpha$ -pineno (24,3 %) 7-epi-selineno (9,1 %) $\beta$ -pineno (8,5 %) 6,9-guayadieno (4,4 %)

De acuerdo a lo anterior, se ha observado que los hidrocarburos monoterpénicos son comunes en las Espeletiinae (Aparicio y cols., 2021), sin embargo, la variación de las concentraciones entre una u otra especie o sub-tribu podría atribuirse a cambios en las condiciones físicas (clima, temperatura, depredadores, variaciones fisiológicas, y factores genéticos, entre otros) que contribuyeron con la evolución de esta especie para adaptarse y poder sobrevivir en el medio ambiente que la rodea (Yañez y col., 2011; Upadhyay, 2010; Figueiredo y cols., 2008).

Con respecto a la actividad antifúngica se pudo determinar que hubo un pequeño halo de inhibición de 10 mm de diámetro con *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Hasta la fecha no existe reporte alguno sobre dicha actividad en esta especie, por lo tanto, este sería el primer estudio antifúngico realizado al aceite esencial de las hojas de *Espeletopsis pannosa*. Sin embargo, se ha encontrado actividad antifúngica en especies pertenecientes a la subtribu Espeletiinae, que presentan similitud en el comportamiento antifúngico frente a cepas de *Candida*.

En efecto, el aceite esencial obtenido de las hojas de *Libanothamnus neriifolius*, fue activo contra *Candida albicans* y *Candida krusei* con valores de CIM de 700 y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , respectivamente (Aparicio y cols., 2019). El aceite esencial de las hojas frescas de *Espeletia schultzii* Wedd (Asteraceae), no mostro actividad antifúngica contra especies de *Candida albicans* y *Candida sp*, mediante el método de difusión en agar de disco (Alarcón y cols., 2016). Asimismo, Cordero y cols (2017), evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Coespeletia moritziana* Sch. Bip., *Espeletia schultzii* Wedd., y *Coespeletia timotensis* Cuatrecasas., encontrando actividad de *C. moritziana* y *C. timotensis* contra *C. albicans* con una CIM entre 200 y 600  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y contra *C. krusei* con una CIM de 100 y 600  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , respectivamente (Tabla 15).

**Tablas 15.** Actividad antifúngica de algunas especies de la sun-tribu Espeletiinae

<i>Espeletopsis pannosa</i> (Standl) Cuatrec Lacruz y Aparicio (2023)	<i>Libanothamnus neriifolius</i> Aparicio y cols., (2019)	<i>Espeletia schultzii</i> Alarcón y cols., (2016)	<i>Coespeletia moritziana</i> <i>Coespeletia timotensis</i> Cordero y cols. (2017)
<i>Candida albicans</i> halo de inhibición: 10 mm	<i>Candida albicans</i> CIM: 700 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<i>Candida albicans</i> Sin actividad	<i>Candida albicans</i> CIM entre 200 y 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<i>Candida kruseii</i> halo de inhibición: 10 mm	<i>Candida kruseii</i> CIM: 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<i>Candida sp.</i> Sin actividad	<i>Candida kruseii</i> CIM entre 100 y 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Otros hallazgos encontrados dentro de la familia Asteraceae del género *Helianthus*, con actividad antifúngica han determinado inhibición contra

*Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, mostrando valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 78 µg/mL (Lawson y cols., 2019). En contraste, los aceites esenciales de *Artemisia vulgaris* L. y *Bidens pilosa* L. y *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, promovieron inhibiciones del crecimiento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* (Linhares y cols., 2018).

Aunque, la inhibición antifúngica del aceite esencial de las partes aéreas de *Lasiocephalus ovatus* frente a *C. albicans* es bajo, con un rango de concentración mínima inhibitoria de 800 a 6400 µg/mL (Araujo y cols., 2019). Lo cual corresponde con los parámetros establecidos por Holetz y cols. (2002), para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de la siguiente manera con base a la CIM: actividad antimicrobiana buena si el valor de CIM era menor de 100 µg/mL, moderada de 100 a 500 µg/mL y débil de 500 a 1000 µg/mL, inactivo valor superior a 1000 µg/mL, ya que actualmente no se han estandarizado criterios para definir la actividad antimicótica de productos naturales como los aceites esenciales (Aparicio y cols., 2019).

Cabe resaltar la evidente influencia de los monoterpenos sobre la actividad antifúngica de las diferentes especies de la sub-tribu Espeletiinae, sobre todo el  $\alpha$ -pineno como uno de los compuestos mayoritarios de todos los géneros citados. Esta incidencia corresponde con el hecho de que los pinenos exhiben actividad fungicida, teniendo actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilhermondii*, *C. krusei* y especies de *Cryptococcus neoformans*. El  $\alpha$ -pineno, ha exhibido una fuerte actividad inhibidora contra cepas de *Candida albicans*, con carácter fungicida. Además, se puede utilizar de forma asociativa a los derivados poliénicos (anfotericina B o nistatina) como alternativa en el tratamiento de la candidiasis (Nóbrega y cols., 2020).

No obstante, el mecanismo de acción de los monoterpenos no ha sido completamente aclarado. Algunos estudios mostraron el desglose de membranas citoplásmicas y organelas expuestas a ciertos aceites volátiles. La pérdida de

integridad de la membrana puede causar cambios en la función de la membrana que conduce a la actividad antifúngica. Los resultados de algunos estudios han demostrado que altas concentraciones de terpenos (cital, eugenol, nerolidol y D-pineno) también muestran la ruptura de la membrana celular, junto con anomalías en la estructura de las mitocondrias. Los hallazgos positivos de los monoterpenos en ensayos del Ergosterol por otros informes sobre el tema fuertemente sugieren que el mecanismo de acción de esta clase de metabolitos es relacionado con la unión de ergosterol y una desestabilización posterior de las membranas de las células fúngicas (Miron y cols., 2014).

Si bien se ha destacado la importancia de los componentes y clases principales de los aceites esenciales, no se deben ignorar los efectos sinérgicos de todos los constituyentes químicos. Obistoiu y cols (2014) reportaron la actividad de aceites esenciales, compuestos por 65,0 % de  $\alpha$ -tujeno y bajos contenidos de germacreno y  $\beta$ -cariofileno, sobre *C. albicans*. Por lo tanto, esta discrepancia entre la actividad antifúngica de los aceites esenciales puede explicarse por la variación en la composición de los mismos de acuerdo con los géneros y especies de plantas (Cordero y cols., 2017).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

El estudio de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., obtenido por hidrodestilación demostró que está compuesto mayormente por hidrocarburos monoterpénicos en un 63,0 % de abundancia y en un 27,69 % de hidrocarburos sesquiterpénicos, en el 97,06 % del total de compuestos identificados.

Los compuestos mayoritarios identificados fueron  $\alpha$ -pineno (26,89 %),  $\alpha$ -tujeno (13,26 %),  $\beta$ -pineno (11,01 %) y aristoleno (10,07 %).

El grupo de silfiperfol representó el 5,3 % del total de los compuestos identificados, los cuales correspondían a Silfiperfol-5-eno, Silfiperfol-4,7(14)-dieno, Silfiperfol y Silfiperfol-6-eno.

Se pudo observar halo de inhibición antifúngico de 10 mm tanto para *Candida albicans* como para *Candida krusei*, para el aceite puro usando el método de difusión en agar con disco.

Según los antecedentes de la investigación, estos son los primeros reportes sobre actividad antifúngica y estudio fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*.

## Recomendaciones

En el marco del estudio de la actividad biológica de la especie *Espeletiopsis pannosa*, se recomienda realizar estudios sobre la concentración mínima inhibitoria del aceite frente a las cepas estudiadas, así como de la actividad antibacteriana de la especie y de sus diferentes partes, además de otro tipo de actividad que pueda tener sobre el organismo, pudiendo ser anticancerígena, citotoxicidad, antiinflamatoria, antitusiva, entre otros. También se sugiere estudiar la composición química de otras partes de la planta, como flores, tallo y raíces.

Evaluar la actividad microbiana contra diferentes especies patógenas, como otros géneros fúngicos, para poder aportar información sobre dicha actividad y pueda servir como base para futuras investigaciones farmacológicas.

Divulgar los presentes resultados, para aportar información a futuros investigadores en el área y que puedan ser comparados con otras especies.

Realizar estudios sobre la influencia de los agentes externos del nicho de la planta en su composición química.

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEGRÁFICAS

- Abdulwahab, A., Othman, O., y Dastan, D. (2020). Screening of chemical characterization, antifungal and cytotoxic activities of essential oil constituents of *Tagetes erecta* L. from Erbil, Kurdistan Region-Iraq. *Polish Journal of Environmental Studies*; 29: 2317-2326
- Adams, R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois (USA): Allured Publishing Corporation.
- Alarcón, L., Peña, A., Velasco, J., Usubillaga, A., Contreras, B., Rojas, L., Ramírez, D., y Aparicio, R. (2016). Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espeletia schultzii* Wedd. (Asteraceae) recolectada en el estado Trujillo–Venezuela. *Revista Académica*, 15:69-79
- 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 Journal*; 10: 655-656
- Albornoz, A. (1980). Productos naturales sustancias y drogas extraídas de las plantas. Caracas, Venezuela: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Andrade, M. (2014). Identificación de las especies del género *Candida* en gestantes con candidiasis vulvovaginal que acuden al Hospital Gineco-obstétrico Dr. Jaime Sánchez Porcel Sucre – 2011. *Tópicos Selectos de Química*, 1:210-257.
- Aparicio, R., Rojas, L., Velasco, J., Vega, C., y Usubillaga, A. (2021). Caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pozoensis* Cuatrec. (Cuatrec). *Revista Latinoamericana de Química*, 48: 7-14
- Aparicio, R., Rojas, L., Velasco, J., Usubillaga, A, Sosa, M., y Rojas, J. (2019). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). *Revista Peruana de Biología*, 26: 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: 6-12.
- Aparicio, R., Romero, M., Khouri, N., Rojas, L., y Usubillaga, A. (2002). Volatile constituents from the leaves of three *Coespeletia* species from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*; 14: 37–39.
- 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*; 25:22-28.
- Arias, F. (2006). El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica. 6ta ed. Caracas-Venezuela, Editorial Episteme.
- Aristeguieta, L. (1964). Compositae. *Flora de Venezuela*; 10: 43–61.
- Ávalos, A., Pérez, E., y Carril, U. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca: Serie de Fisiología Vegetal*, 2:119-145.
- Badillo, V. (1997). Los Géneros de las Compositae (Asteraceae) de Venezuela: clave artificial para su determinación. *Ernstia*, 6: 51 - 168.
- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata.
- Bisht, D., Kumar, D., Kumar, D., Dua, K., y Kumar, D. (2021). Phytochemistry and pharmacological activity of the genus *Artemisia*. *Archives Pharmacal Research*; 44:439–474
- Bohlmann, F., y Jakupovic J. (1980) Neue Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe mit anomalen Kohlenstoffgerüst aus *Silphium* arten. *Phytochemistry*, 19: 259-265.
- Bolhmann, F., Suding, H., Cuatrecasas, J., Robinsón, H., y King, R. (1980). Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from *Espeletopsis* species. *Phytochemical*, 19:2399-2403.
- Bruneton, J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 1ra Ed. España: Acribia.

- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. 2da Ed. Zaragoza-España: Acribia.
- Campoy, S., y Adrio, J. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133:86-96
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E., y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22: 265-278.
- Cerpa, M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid. Valladolid-España.
- Chaverri, C., y Cicció, J. (2017). Essential oils of *Baccharis trinervis* (Asteraceae) from Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*; 65: 1307-1321
- Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., y Brielman, H. (2006). *Natural products from Plants*. 2th Edi. USA: CRC press. Boca Raton.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., y Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112:585–589
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptib (testing of yeasts; fourth informational supplement. Document M27-S4, 32. CLSI, Wayne, PA.
- Cordero, Y., Díaz, A., Velasco, J., Rojas, L. Aparicio, R., Usubillaga, A., Colmenares, C., y Carnevali, A. (2017). Composición química y efecto antifúngico de los aceites esenciales de tres especies de frailejones de Los Andes venezolanos. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 80: 60-67
- Cordero, Y., Ustáriz, L., Araujo, L., Usubillaga, A., Rojas, F., y Moujir, L. (2017). Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 59: 03-07.
- Cortez, M. (2021). Actividad antibacteriana y composición química del extracto de las hojas de *Espeletopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. (Trabajo de Grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

- Cruz, S., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., y Morales, J. (2006). Caracterización de aceites esenciales y extractos de ocho especies de Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad bioácida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales. (Tesis de Maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Cuatrecasas J. (1976). A new subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. *Phytologist*, 35: 43-61
- Cuatrecasas, J. (1996). Clave provisional de las especies del género *Espeletiopsis* Cuatrec. (Espeletiinae, compositae). *Anales Jardin Botanico de Madrid*, 54: 370-377.
- Davicino, R., Mattar, M., Casali, Y., Correa, S., Pettenati, E., y Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología*, 24: 247 - 251.
- Diazgranados, M. (2012). A nomenclátor for the frailejones (Espeletiinae Cuatrec., Asteraceae). *PhytoKeys*, 16:1-52.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ra Ed. México. Editorial Limusa.
- Ekiert, H., y Szopa, A. (2020). Biological Activities of Natural Products. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(23): 5769-83.
- Espina, M., Guillén, G., Calvo, B., y Meza, L. (2005). Caracterización morfológica y fisiológica de las especies *Cándida* aisladas de la cavidad bucal de pacientes geriátricos. *Ciencia Odontológica*, 2: 110-119.
- Fica, A. (2005). Aspectos básicos sobre antimicrobianos I. *Medwave*, 5(2), e2522-35.
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., y Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23(4): 213-226.
- Forbes, B., Sahn, D., y Weissfeld, A. (2009). Balley de Scott: diagnostico microbiológico. 12ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

- Funk, V., Susanna, A., Stuessy, T., y Bayer, R. (2009). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria. Ed. International Association for Plant Taxonomy
- García, A. (1953). Esencias naturales. 1ra Ed. Madrid: Aguilar.
- Gennaro, A. (2003). Remington Farmacia. Argentina: Ed. Médica Panamericana,
- Gennaro, A. (1998). Ciencia y práctica de la farmacia. 19ª Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Goda, Y. (2022). Regulatory science of natural products. *Journal of natural medicines*, 76(4); 732–747.
- Gupte, M., Kulkarni, P., y Ganguli, B. (2002). Antifungal antibiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58:46-57
- Gutiérrez, A., y Esteves, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en los descubrimientos de nuevos fármacos en el S. XXXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*, 100: 409-419.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. 5ta Ed. México: McGraw-Hill.
- Hidalgo, D., Ricardi, M., Gaviria, J., y Estrada, J. (1999). Contribución a la Etnofarmacología de los Páramos Venezolanos. *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences*, 7:23-32
- Holetz, F., Pessini, N., Sanches, D., García, C., Nakamura, B., y Filho, P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 97(7): 1027-1031.
- Huerfano, C. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana de cinco extractos vegetales de especies altoandinas frente a distintos microorganismos de importancia clínica. (Trabajo de Grado). Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
- Hurtado, J. (2010). El proyecto de Investigación. Compresión holística de la metodología y la investigación. Caracas: FEDUPEL

- IQR: Ingeniería Química Reviews (2020). Principales métodos de extracción de aceites esenciales. (En línea). Disponible: <https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/08/extraccion-aceites-esenciales-principales-metodos.html>
- Jamiu, A., Albertyn, J., Sebolai, O., y Pohl, C. (2021). Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, 59(1), 14–30.
- Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., y Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42: 113 - 129.
- Khouri, N., Usubillaga, A., Rojas, L., y Galarraga, F. (2000). Essential oil of *Espeletia weddellii* Sch. Bip. ex Wedd. *Flavour and Fragrance Journal*; 15:263–265.
- Kováts, E. (1958). Retentions indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, XLI, 1915.
- Kowalski, R. (2008). The chemical composition of essential oils and lipophilic extracts of *Silphium integrifolium* Michx. and *Silphium trifoliatum* L. Rhizomes. *Journal of Essential Oil Research*, 202: 55-259
- Lawson, S., Sharp, L., Powers, C., McFeeters, R., Satyal, P., y Setzer, W. (2019). Essential oil compositions and antifungal activity of sunflower (*helianthus*) species growing in north Alabama. *Applied Sciences*; 9: 3179-3185
- Linhares, M., Da Silva, R., de Oliveira, F., Costa, L., Conceição, A., y de Oliveira, R. (2018). Avaliação anti-Candida de óleos essenciais de três plantas medicinais (Asteraceae). *South African Journal of Botany*; 115: 132–137
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O., y Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. (Tesis de Grado). Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Venezuela: Editorial Torino; 67-384.

- Martín, E., Pemán, J., y Rubio, M. (2001). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 1era edición. Revista Iberoamericana de Micología - Asociación española de micología. España.
- Martínez, A. (2003). Destilación de arrastre por vapor. (En línea). Disponible en: <http://www.ioed.unam.mx/organica/1311/1311pdf10.pdf>
- Meccia, G., Rojas, L., Velasco, J., Díaz, T., y Usubillaga, A. (2007). Composition and antibacterial screening of the essential oils of leaves and roots of *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. *Natural Product Communications*; 2: 1221-1224
- Mellado, E., Cuenca, M., y Rodríguez, J. (2002). Clinical relevante of mechanisms of antifungal drug resistance in filamentous fungi. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 20: 523-529.
- Miron, D., Battisti, F., Silva, F., Lana, A., Pippi, B., Casanova, B., Gnoatto, S., Fuentesfria, A., Mayorga, P., y Schapoval, A. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 24: 660-667
- Nóbrega, J., Figueredom S., de Andrade F., Silva, P., Ramalho, P., Vilar, L., y Oliveira, E. (2020). Antifungal action of  $\alpha$ -pinene against *Candida* spp. isolated from patients with otomycosis and effects of its association with boric acid. *Natural Product Research*, 3:1-4
- Obistioiu, D., Cristina, R., Schmerold, I., Chizzola, R., Stolze, K., Nichita, I., y Chiurciu, V., (2014). Chemical characterization by GC-MS and *in vitro* activity against *Candida albicans* of volatile fractions prepared from *Artemisia dracunculoides*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Chemistry Central Journal*, 8:6-14.
- Obregón, Y., Rojas, L., Usubillaga, A., Pouységu, L., y Quideau, S. (2015). Study of chemical composition of the essential oil from the hybrid Asteraceae *Carramboa tachirensis* (Arist.) Cuatrec. *Revista de la Facultad de Farmacia*; 57: 17–21.
- OMS: Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud

- [citado 17 de abril de 2022]. Recuperado de:  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf>
- Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales aromas y perfumes. 1ra Ed. Madrid, España: Aiyana.
- Palella, S., y Martins, F. (2010). Metodología de investigación cuantitativa. Caracas, Venezuela: Fedeupel.
- Panizo, M., y Reviákina, V. (2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 21: 38-45.
- Peña, A., Rojas, L., Aparicio, R., Alarcón, L., Baptista, J., Velasco, J., Carmona, J., y Usabillaga, A. (2012). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Espeletia nana*. *Natural Product Communications*; 7: 661-662
- Peralta, J., y Royuela, M. (2018). Flora Arvense de Navarra. 1ra Ed. España; editorial Universidad Pública de Navarra.
- Pérez, A., Rojas, L., y Aparicio, R. (2017). Análisis comparativo de los componentes volátiles de *Ruilopezia lindanii* (Schultz-Bip.ex Wedd.) Cuatrec., recolectada a diferentes altitudes en Mérida-Venezuela. *Revista multidisciplinaria semestral Academia*, 16(38): 39-44.
- Pfaller, M. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*; 125: S3-13.
- Pfaller, M., Castanheira, M., Lockhart, S., Ahlquist, A., Messer, S., y Jones, R. (2012). Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 1199-1203.
- Pinto, E., y Toro, K. (2013). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de la *Coespeletia timotensis* Cuatrec. (Trabajo de Grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.
- Pontón, J., y Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina Clinica (Barc)*, 126: 56-60.

- Purizaca, K., y Condori, L. (2018). Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell “canchalagua” frente a *Propionibacterium acnés*. (Tesis de Grado). Universidad Wiener, Lima, Perú.
- Rajput, J., Bagul, S., Pete, U., Zade, C., Padhye, S., y Bendre, R. (2018). Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. *Molecular diversity*, 22(1): 225–245.
- Ramírez, L., y Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando medios de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica*; 50: 152-157.
- Retana, C. (2008). Diferentes especies de *Candida* en pacientes con estomatitis protésica en el centro de atención a ancianos “Sara Zaldivar” (Tesis Doctoral). Facultad de Odontología. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Reyes, F., Palou, E., y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8: 68-78.
- Rivero, O. (2019). Estudio de la resistencia a los antifúngicos en hongos patógenos humanos. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Rojas, L., Usubillaga, A., y Galarraga, F. (1999). Essential Oil of *Coespeletia timotensis*. *Phytochemical*, 52:1483–1484.
- Romero, M. (2000). Análisis de los ácidos kaurénicos de varias especies de *Coespeletia* y *Ruilopezia*. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Postgrado en Química de Medicamentos. Mérida, Venezuela.
- Rosilla, M. (2012). Determinación fisicoquímica y la evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis latifolia* (Asteraceae) de la Provincia de Loja. (Tesis de Grado). Universidad Católica de Loja. Ecuador.

- Saavedra, M. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana y composición química de los aceites esenciales de *Espeletopsis pannosa* (Asteraceae). (Trabajo de grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
- SAJF: Station Alpine Joseph Fourier. (2013). Asteraceae. *Espeletopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. Inventario florístico de los páramos de Venezuela. Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas y Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de los Andes (ULA), Centro de Ecología y Herbario del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Laboratoire d'Ecologie Alpine y Station alpine Joseph Fourier del Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) y de la Universidad Joseph Fourier (UJF, Grenoble, Francia).
- Schütz, K., Carle, R., y Schieber, A. (2006). Taraxacum a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology*, 107:313-323.
- Silverio, C. (2016). Determinación de flavonoides y glucósidos en *Verbena litoralis*. (Tesis de Maestría). Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- Skoog, D. (2008). Principios de Análisis Instrumental. 9a Ed. México: Reverte. Ed. McGraw-Hill.
- Skoog D., y Holler F. (2001). Principios de análisis instrumental. 5ta Ed. México: Reverte Ed. McGraw-Hill.
- Susial, P. (2011). Fundamentos y método de la destilación. Determinación experimental del E.L. V. *Vector Planta*, 1:32-40.
- Tapia, J. (2010). La familia Asteraceae. Herbario CICY, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY). México.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. 9ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Upadhyay, R. (2010). Essential oils: antimicrobial, antihelminthic, antiviral, anticancer and anti-insect properties. *Journal of Applied Biosciences*, 36 (1): 1-22.
- Usubillaga, A., Romero, M., y Aparicio, R. (2003). Kaurenic Acid in Espeletiinae. *Acta de Horticultura*; 597: 129-130.

- Usubillaga, A., Aparicio, R., Romero, M., Rojas, L., y Khouri, N. (2001). Volatile constituents from the leaves of four *Libanothamus* species from the Venezuelan Andes. *Flavour Fragrance Journal*, 9: 209 - 211.
- Usubillaga, A., Khouri, N., Rojas, L., y Morillo, M. (2001). Essential oil of the leaves from *Espeletia batata* Cuatrec. *Journal of Essential Oil Research*; 13: 450–451.
- Usubillaga, A., y Capra, M. (1988). Chemical constituents of *Espeletia semiglobulata*. *Fitoterapia*; LIX (5): 383–384.
- Vega, C. (2018). Actividad antibacteriana y composición química del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pozoensis* Cuatrec. (Cuatrec). (Trabajo de Grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
- Vit, P., Meléndez, P., y Schwartzberg, J. (2003). *Espeletia schultzii* Wedd. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 5 Frailejón. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 45: 80-82.
- Vivas, Y., y Ubierno, P. (2010). Asteraceae del Valle Morrénico de Mucubají, estado Mérida, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 27: 39-60.
- Yáñez, X., Parada, D., y Lugo, L. (2011). Variabilidad del rendimiento del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* nativo de Norte de Santander (Colombia) de acuerdo con el tratamiento de la hoja. *Bistua*. 9 (1):48-54.