



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr José Rafael Luna”
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO II**



**Composición química y actividad antibacteriana del
aceite esencial obtenido de las partes aéreas de
Pluchea odorata frente a microorganismos de
referencia internacional**

Tesista:

Vicsabel González Cadenas

C.I. 25.154.977

Tutora:

Prof^a. Judith Velasco Carrillo

Mérida, febrero 2024

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza, salud, infinitas bendiciones, para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados y haber permitido llegar hasta aquí.

A La Santísima Virgen María, mi madre espiritual por darme paz y tranquilidad en los momentos mas duros.

A mi madre Ysabel Cristina Cadenas, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, por ser ejemplo de esfuerzo y valentía, gracias a usted he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi esposo Victor Bracho, por ser ese bastón que necesite durante todos estos años, por su apoyo incondicional, muchas gracias, realmente este logro también es tuyo.

A mis tres hermosos hijos, Diego, Mia y Liah, son el motor que me impulsa fuertemente todos los días, para ustedes y por ustedes, ¡lo logré!

A la ilustre Universidad de Los Andes por permitirme lograr dar un paso más hacia el éxito. Por convertirme en una profesional competitiva, llena de conocimientos y expectativas. También a todos esos profesores por darme una formación profesional con calidad.

Con amor: Vicsabel Gonzalez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme nacer, darme la vida, salud y por poner este sueño en mi corazón desde el principio y el amor para elegir esta carrera, por darme la fuerza de poder llegar hasta aquí, por darme la voluntad en los momentos que no podía seguir, por darme el talento que se necesita para lograr esta meta.

Mi madre, gracias por confiar y creer en mí, nunca dejar de apoyarme, por formarme con muy buenos valores, disciplina y amor a esta carrera, estoy orgullosa de ser su hija. ¡Infinitas gracias mama!

A mi esposo e hijos por ser soporte emocional y darme el apoyo necesario durante el transcurso de la realización de mi carrera. Son la razón para levantarme cada mañana y esforzarme por el presente y el futuro.

A mis hermanos Cristhian González y María Daniela González por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mis abuelos Diego Cadenas y Maria Mendez, por ser ese ejemplo de sabiduría y formación en valores, muchas gracias, por ser forjadores de buen futuro para su familia, todos sus nietos seguimos su legado.

A toda mi familia porque de una u otra manera estuvieron presentes a lo largo de esta etapa, todos son importantes para mí, gracias por su apoyo moral, ¡los amo!

A mi tutora Profesora Judith Velasco, quien con mucho amor y paciencia estuvo allí siempre para apoyarme en mi trabajo de grado. ¡Muchas gracias por su tiempo para mí!

Profesora Janne Rojas, gracias por su comprensión y apoyo en asesoría y dudas presentada en la elaboración de mi tesis.

A la Universidad de los Andes y todo su personal, la mejor casa de estudio que podre tener en mi vida, gracias por abrir sus puertas y formarme académicamente.

A mis maestros por ser facilitadores de conocimientos y contribuir al alcance de otro escalón en mi formación académica tanto moralmente como de forma integral.

A mis compañeros por ser un soporte en todo el desarrollo de nuestra formación profesional. Y con los que pude contar de manera especial: Nelianny, Andrea Paola, Génesis, gracias por todos esos momentos maravillosos, nunca las olvidare, hermanas de estudio.

Con amor: Vicsabel Gonzalez

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	II
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos presentes en las plantas	5
Aproximación teórica sobre la bioactividad de los fitoquímicos	5
Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana de los fitoquímicos	5
Aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias	5
Justificación de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Alcances y limitaciones de la investigación	8
Alcances	8
Limitaciones	8
CAPÍTULO II	9
MARCO TEÓRICO	9

Trabajos Previos.....	9
Bases Teóricas	10
Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos presentes en las plantas	10
Aproximación teórica sobre la bioactividad de los fitoquímicos	11
Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana de los fitoquímicos	11
Aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias.....	11
Antecedentes Teóricos	12
Familia Asteraceae.....	12
Distribución geográfica de la familia Asteraceae	13
Composición química de la familia Asteraceae	14
Características botánicas del género y especie en estudio	20
Género <i>Pluchea</i>	20
Especie <i>Pluchea odorata</i>	20
Descripción taxonómica.....	20
Características botánicas de	21
Composición química de <i>Pluchea odorata</i>	21
Aceites esenciales	22
Clasificación de los aceites esenciales	23
Función y usos de los aceites esenciales	24
Método de extracción de los aceites esenciales.....	24
Técnicas de separación de los compuestos químicos de los aceites esenciales.....	26

Bacterias	27
Bacterias Gram positivas y Gram negativas	27
Resistencia bacteriana	29
Actividad antimicrobiana.....	29
Métodos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana	30
Operacionalización de las variables	32
Hipótesis	35
Afirmativa.....	35
Nula	35
Alternativa.....	35
CAPÍTULO III	36
MARCO METODOLÓGICO	36
Tipo de investigación.....	36
Población y Muestra	36
Variables del Estudio	37
□ Variable independiente	37
□ Variable dependiente	37
Procedimientos o metodología	37
Material botánico	37
Bacterias de referencia internacional	37
Recolección del material botánico	37
Obtención del aceite esencial	38
Análisis de la composición química por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM).....	38

Evaluación de la actividad antimicrobiana	39
Preparación de los discos	39
Preparación del inóculo bacteriano	39
Ensayos microbiológicos	40
Diseño experimental.....	42
Diseño de análisis	43
CAPITULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Pluchea odorata</i>	33
Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente composición química de <i>Pluchea odorata</i>	34
Tabla 3. Compuestos de referencias para las pruebas de susceptibilidad	40
Tabla 4. Composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Pluchea odorata</i> .	45
Tabla 5. Composición química del aceite esencial de los tallos de <i>Pluchea odorata</i> .	46
Tabla 6. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de las partes aéreas de <i>Pluchea odorata</i> .	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS	Pág.
Figura 1. Características botánicas de plantas pertenecientes a la familia Asteraceae.	13
Figura 2. Estructura química de la Cafeína, un alcaloide estimulante.	14
Figura 3. Estructura general de una Amida	15
Figura 4. Segmento trans-poliacetileno	15
Figura 5. Fórmula química del Isopreno, unidad funcional de los Terpenos	16
Figura 6. Flavonoides. Estructura básica y tipos.	17
Figura 7. Estructura general de las Lactonas Sesquiterpénicas	18
Figura 8. Estructura química del Ácido Clorogénico.	18
Figura 9. Estructura química de la Cinarina.	19
Figura 10. Estructura química de las Cumarinas	19
Figura 11: <i>Pluchea odorata</i>	21
Figura. 12. Técnica de extracción: Destilación por arrastre con vapor de agua.	26

Figura 13. Estructura de la pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas	28
Figura 14. Método de Kirby-Bauer	31
Figura 15. Método de dilución en caldo o en agar	32
Figura 16: Diseño experimental	42

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr José Rafael Luna”
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO II



Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *Pluchea odorata* frente a microorganismos de referencia internacional

Autor: Vicsabel González Cadenas
Tutora: Prof^a. Judith Velasco Carrillo

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias multirresistentes representan un problema de salud pública a nivel mundial, la búsqueda de alternativas terapéuticas se ha enfocado en el estudio de las plantas como fuentes naturales de nuevos metabolitos con actividad antibacteriana. En tal sentido, en la presente investigación se determinó la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial (AE) obtenido de las partes aéreas de *Pluchea odorata*. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y la caracterización química se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Siendo los compuestos mayoritarios del AE obtenido de las hojas α -pineno (35,15%), β -cariofileno (13,20%), óxido de cariofileno (12,10%) y β -guaieno (10,10%); del AE obtenido de los tallos los siguientes compuestos: trans metil eugenol (39,49%) y β -cariofileno (34,43%). Este es el primer reporte sobre la composición química del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *P. odorata*. La evaluación de la actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar con discos, ambos AE no mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29912, *Escherichia coli* ATCC 25922 ni *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, información que contribuye con el conocimiento de esta especie.

Palabras clave: *Pluchea odorata*; composición química; actividad antibacteriana; aceite esencial.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbi-mortalidad en todo el mundo. En la actualidad, muchas de estas infecciones especialmente las reemergentes, son causadas por patógenos resistentes a los agentes antimicrobianos de uso convencional. En consecuencia, las terapias anti-infecciosas efectivas y disponibles comercialmente se han reducido y el costo de los cuidados en salud han incrementado sustancialmente (CDC, 2013).

La búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos con estructura y mecanismos de acción diferentes a los antibióticos de uso común, podría ser la vía para enfrentar el fenómeno de la resistencia bacteriana (Raid, 2014). En este sentido, los productos naturales en especial los aceites esenciales provenientes de plantas superiores, constituyen una fuente no tradicional importante para la investigación y desarrollo de nuevas drogas con actividad antimicrobiana (Marques, 2013).

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa, muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal (Cadby et al. 2002). Son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles o lactonas; todos ellos fácilmente separables ya sean por métodos químicos o físicos, como la destilación, refrigeración, centrifugación, entre otros (Briga 1962). Suelen ser inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad (Tripathi et al. 2009). Sufren degradación química en presencia de la luz solar, aire, calor o ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Además, son solubles en disolventes orgánicos comunes y casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Son aceptados como sustancias seguras (GRAS) por la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA, por sus siglas en inglés) (CFR 2003).

El género *Pluchea*, pertenece a la familia Asteraceae, la cual comprende más de 23000 especies, en su mayoría distribuidas en regiones templadas y en montañas de regiones tropicales a nivel mundial (Diaz, 2010). Si bien a este género se le atribuyen beneficios en salud, el extracto de diclorometano de *P. odorata* contiene constituyentes de baja polaridad que inhiben la respuesta inflamatoria y muestran actividad anti cáncer (Gridling, 2009).

Estudios fitoquímicos realizados en extractos obtenidos de flores y hojas de algunas especies de *Pluchea*, han determinado la presencia de una variedad de monoterpenos, diterpenos y sequiterpenos. Por el contrario, la composición química del aceite esencial de estas especies ha sido escasamente investigada, así como sus propiedades biológicas (Perez, 2006). Por tal motivo, en este estudio se realizó la caracterización química del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *Pluchea odorata* y se determinará la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde la antigüedad, los antibióticos han sido la intervención más importante para el control de las enfermedades infecciosas, salvando millones de vidas. Sin embargo, por su mal uso, está siendo atacada su eficacia, por un mecanismo llamado resistencia bacteriana (siendo la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibióticos que inhiben/matan a otras de la misma especie) (Alós,2015).

Los antibióticos se definen como una molécula natural derivada de un organismo vivo, constituyen un grupo de sustancias con diferentes comportamientos que ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo atacado. Se encargan de ayudar al sistema inmunológico a eliminar la totalidad de agentes patógenos. (Seija y cols, 2008).

Las investigaciones actuales han enfocado sus estudios en la búsqueda de alternativas que posean usos como agentes terapéuticos, tal es el caso de aceites esenciales obtenidos de plantas; con la finalidad de controlar las diferentes enfermedades infecciosas, que debido al uso indiscriminado de antibióticos ha traído como consecuencia el desarrollo de resistencia bacteriana (Coy y cols, 2013).

Para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial, se han descrito diversas técnicas y una de las más utilizada es el método de difusión en agar con discos, la cual evalúa la sensibilidad del microorganismo ante los agentes antimicrobianos. Es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina que solo brinda información cualitativa o semi cuantitativa, sin embargo, los resultados obtenidos son valiosos para la

industria farmacéutica, ya que ofrece nuevos metabolitos con actividad antimicrobiana (Velasco y cols, 2008).

La resistencia a los fármacos tiene particular importancia en América Latina, especialmente tres clases de bacterias relevantes en el campo clínico. Así se tienen las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, la tigeciclina no es eficaz y la resistencia a los Carbapenemos es cada vez mayor, también *Escherichia coli* y *Klebsiella* con altas tasas de resistencia a β -lactámicos (con producción de betalactamasa de espectro extenso, BLEE), resistencia de *Staphylococcus aureus* a oxacilina, quinolonas y otros grupos, *Enterobacter* y otras enterobacterias como *Serratia* y *Citrobacter* productoras de β -lactamasas cromosómicas inducibles y finalmente resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos en Gram negativos especialmente enterobacterias. Es importante resaltar que la expresión de mecanismos de resistencia puede variar de un hospital a otro, de ciudad a ciudad y de una nación a otra. Las realidades pueden ser completamente diferentes, pero con estos datos se pueden comparar los diferentes antimicrobianos, entender cómo la resistencia surge y se disemina dentro del hospital. Simultáneamente, hay un campo de investigación abierto sobre la prevención de las infecciones bacterianas (Casellas, 2001). De este modo los aceites esenciales han adquirido popularidad durante los últimos años, debido a que además de ser compuestos de origen natural, poseen propiedades bactericidas (Reyes, 2012).

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud mundial que se encuentra en constante evolución. De manera frecuente se reportan nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos, en bacterias Gram negativas y Gram positivas. La presencia de resistencia en una bacteria disminuye la posibilidad de curación clínica e incrementa los costos de tratamiento, la morbilidad y la mortalidad, por lo que es importante seleccionar un tratamiento adecuado (Noriego *et al.* 2014).

De la especie *Pluchea odorata* se obtienen aceites esenciales empleados para múltiples usos. Así entonces se define los aceites esenciales o esencias vegetales como una mezcla compleja y concentrada de moléculas aromáticas en proporciones muy variables, como lo son los hidrocarburos terpénicos o terpenos y sus derivados oxigenados. Tales aceites son empleados en perfumerías, en la industria alimenticia o como fuentes de materia prima (Stashenko, 2009).

Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos presentes en las plantas: El término Fitoquímico se refiere a sustancias químicas de las plantas que, aunque no se consideran esenciales para el metabolismo, sin embargo, son beneficiosas a largo plazo para la salud. Existen más de 2.000 fitoquímicos en las plantas, que se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales, de los cuales se considera que los terpenos, los fenoles y los tioles, son los más estudiados (Mendoza 1996).

Aproximación teórica sobre la bioactividad de los fitoquímicos: Diferentes compuestos varían en su vía de acción inhibitoria. Los indoles bloquean los carcinógenos antes de que alcancen sus sitios de acción en las células; los isotiocianatos pueden suprimir el crecimiento de tumores a través del bloqueo de las enzimas en Fase II. También pueden ser antioxidantes, antifúngicos y antimicrobianos (Mendoza, 1996).

Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana de los fitoquímicos: La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes no tradicionales como los fitoquímicos, es importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes a antibióticos (García, 1945).

Aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias: La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública. Los mecanismos pueden ser intrínsecos o

adaptativos. Los primeros pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, expresar sistemas efflux de excreción que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, modificar el sitio blanco del antimicrobiano o generar una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco. Entre los mecanismos adaptativos, se encuentran las adaptaciones fenotípicas, sea por el estado metabólico de la bacteria, o por ser secundaria a su capacidad de producir biopelículas. (Becerra, 2009)

Después de describir la situación actual del problema de estudio, los autores de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la relación entre la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la especie *Pluchea odorata*, frente a microorganismos de referencia internacional, actividad que se realizará en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde enero de 2020 hasta enero de 2023?

Justificación de la investigación

En las últimas cuatro décadas, se han realizado innumerables estudios sobre sustancias con actividad antimicrobiana, provenientes de plantas superiores con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas para contrarrestar las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos. (Ortuño, 2006)

En la actualidad se está dando importancia al uso de las plantas medicinales por diferentes razones o factores, como el alto coste de los medicamentos sintéticos o la falta de acceso a los agentes quimioterapéuticos para una gran parte de la población. Es por ello que los consumidores prefieren cada vez más productos de origen natural, principalmente por la falta de indicaciones de los efectos colaterales que pueden producir los medicamentos

sintéticos (Ramírez, 2011). A nivel mundial cerca del 80% aún depende de la medicina herbolaria para atenuar sus dolencias y enfermedades. (Lagos, 2012)

La importancia de esta investigación va encaminada a la búsqueda de nuevos productos biológicos que se puedan generar a un menor costo y que por ser productos naturales se minimicen los efectos colaterales en el tratamiento de las infecciones ocasionadas por microorganismos multirresistentes. En tal sentido, *P. odorata* representa una especie útil para caracterizar la composición química del aceite esencial y evaluar su actividad antibacteriana frente a microorganismos de referencia internacional. Información que puede ser utilizada por pobladores, en el campo terapéutico y en la agricultura.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Describir la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la especie *Pluchea odorata*, frente a microorganismos de referencia internacional, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde enero de 2020 hasta febrero de 2024.

Objetivos Específicos

- Realizar el proceso de extracción del aceite esencial de las partes aéreas de *P. odorata* por el método de hidrodestilación.
- Describir la composición química del aceite esencial de *P. odorata* por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.

- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. odorata* frente a bacterias de referencia internacional por el método de difusión en agar con discos.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de *P. odorata* frente a las bacterias de referencia internacional que muestren susceptibilidad.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances

Si el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *P. odorata* mostrara actividad antibacteriana frente a las bacterias de referencia internacional (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29912, *Escherichia coli* ATCC 25922, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), representaría un aporte importante en el estudio de esta especie y además una fuente natural de principios activos, información valiosa que puede ser utilizada por la industria farmacéutica para la elaboración de medicamentos y erradicación de enfermedades causadas por estos microorganismos.

Limitaciones

Una de las limitaciones que se puede presentar en el desarrollo de la parte experimental de esta investigación, es que el rendimiento del aceite esencial producto del proceso de extracción por hidrodestilación no sea suficiente para realizar todas las determinaciones.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Alarcón, Peña, Velasco, Usubillaga, Moreno, Rojas, Ramírez (2015) realizaron un trabajo de investigación mencionaron publicación en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes que se tituló: Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espelita schultzei* Wedd (Asteraceae). El alcance de esta investigación consistió en obtener resultados del aceite esencial de dicha planta como antimicrobiana. En primer lugar, los investigadores extrajeron el aceite esencial de la planta mediante el método de hidrodestilación. El análisis de sus componentes volátiles por cromatografía de gases-espectrofometría de masas (CG-EM) permitió la identificación de 13 componentes, que constituyeron el 100% del aceite esencial. Luego evaluaron la actividad antibacteriana del aceite empleando el método de difusión en agar con discos y microdilución en caldo contra *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella Typhi* (CDC 57), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 23357) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y la actividad antifúngica contra *Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). Teniendo como resultado que el aceite mostró solo actividad antibacteriana, con variación de acuerdo al método utilizado, por el método de difusión en agar con discos inhibió el desarrollo de las bacterias grampositivas; empleando el método de microdilución en caldo, inhibió el desarrollo de todos los microorganismos ensayados a menores concentraciones que el anterior. Estos resultados revelaron que la sensibilidad del método juega un papel preponderante en la evaluación de este aceite como antibacteriano, siendo más sensible el método de microdilución en caldo.

Villarroel, 2015, describe la Composición Química y Actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* (Asteraceae), el cual fue extraído por destilación de arrastre de vapor de agua (rendimiento 0,025 %) y analizado por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (CG/EM). Identificaron 44 compuestos. El aceite esencial mostró actividad antibacteriana moderada contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *K. pneumoniae*; se observó un efecto dosis-respuesta frente a *Bacillus subtilis*, y no ejerció actividad contra *E. coli*, *E. faecalis*; y no mostró actividad antifúngica sobre especies de hongos patógenos.

Por otra parte, González, 2012 hizo su estudio sobre la Composición química y evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip: ex C. Koch. contra bacterias de referencia internacional, donde se mostró que el aceite posee un efecto inhibidor significativo sobre las bacterias gramnegativas, especialmente frente a *E. coli*.

Xi Yin y col 2021 evaluaron el potencial antibacteriano de 49 plantas utilizadas en la medicina tradicional en Malasia, describen que el extracto metanólico de los tallos de *Pluchea indica* (L) Less probado frente *S. aureus* sensible y resistente a la meticilina (SARM), inhibió el desarrollo de *S. aureus* sensible a meticilina a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 200 µg/mL.

Bases Teóricas

Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos presentes en las plantas

El término Fotoquímico significa sustancias químicas de las plantas que aunque no se consideran esenciales para el metabolismo, sin embargo son

beneficiosas a largo plazo para la salud. Existen más de 2.000 fitoquímicos en las plantas, que se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales, de los cuales se considera que los terpenos, los fenoles y los tioles, son los más estudiados (Mendoza 1996)

Aproximación teórica sobre la bioactividad de los fitoquímicos

Diferentes compuestos varían en su vía de acción inhibitoria. Los indoles bloquean los carcinógenos antes de que alcancen sus sitios de acción en las células; los isotiocianatos pueden suprimir el crecimiento de tumores mediante el bloqueo de las enzimas en Fase II. También pueden ser antioxidantes, antifúngicos y antimicrobianos (Mendoza, 1996)

Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana de los fitoquímicos

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes no tradicionales como los fitoquímicos, es importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes a los antibióticos (García, 1995)

Aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias

La resistencia a antimicrobianos es un problema de salud pública. Los mecanismos pueden ser intrínsecos o adaptativos. Los primeros pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, expresar sistemas efflux de excreción que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, modificar el sitio blanco del antimicrobiano o generar una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco. Entre los mecanismos adaptativos, se encuentran las adaptaciones

fenotípicas, sea por el estado metabólico de la bacteria, o por ser secundaria a su capacidad de producir biopelículas (Becerra, 2009).

Antecedentes Teóricos

Familia Asteraceae

La familia Asteraceae comprende plantas conocidas comúnmente como “margaritas” o “girasoles”, anteriormente recibía el nombre de Compositae (compuesta) por su característica inflorescencia. Con más de 1.600 géneros y 23.000 especies, es la segunda familia más numerosa de plantas con flor (en cuanto al número de especies). Las asteráceas se encuentran distribuidas a nivel mundial, pero son más comunes en regiones templadas y en montañas de regiones tropicales (Díaz, 2010).

En Venezuela, consta de unos 194 géneros. En su mayoría son hierbas anuales o vivaces, aunque también se podrán encontrar arbustos y árboles (Valero y Cadahia, 2002).

Esta familia se caracteriza por ser angiospermas o plantas vasculares, formadoras de semillas (espermatofitos) (Lasser, 1964). Incluye desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m. Las asteráceas se reconocen por su estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado (Figura 1) (Cabrera, 1961).

Por su estructura floral y su composición química, se considera la familia más evolucionada de todas las dicotiledóneas. Pertenecen a esta familia algunas plantas comestibles como la lechuga (*Lactuca sativa*), la escarola (*Cichorium intybus*), la alcachofa (*Cynara scolymus*), los salsifis (*Tragopogon* sp.), el estragon (*Artemisia dracunculus*), el girasol (*Helianthus annuus*), la chicoria (*Cichorium intybus*), el ajeno, a partir del cual se obtiene la absenta (*Artemisia absinthium*), el árnica (*árnica montana*), la manzanilla (*Matricaria*

chamomilla). Plantas medicinales (*Parthenium* o *Arnica*), venosas, suculentas, malas hierbas y multitud de especies que son utilizadas en jardinería por su valor ornamental como las dalias, los crisantemos, las margaritas y los claveles de moro (Valero y Cadahia, 2002).

La familia Asteraceae es conocida por las propiedades terapéuticas, cosméticas y aromáticas. Se ha informado en la literatura médica que la familia Asteraceae tiene diferentes actividades biológicas tales como: antihelmíntico, antiinflamatorio, astringente, colestérico, antihemorrágico, antimicrobiano, diurético, analgésico y antiespasmódico (Jeon, 2010).



Figura 1. Características botánicas de plantas pertenecientes a la familia Asteraceae.

Tomado de: bioayuda.wordpress.com

Distribución Geográfica de la familia Asteraceae

La familia Asteraceae consta de 1.600 géneros de distribución geográfica cosmopolita, específicamente en Venezuela se han registrado 194 géneros los

cuales se distribuyen a lo largo de los páramos de la cordillera de los Andes que incluye los estados Táchira, Mérida y Trujillo (Briceño y Morillo, 2002).

Composición Química de la Familia Asteraceae

Alcaloides

Reciben esta denominación compuestos nitrogenados heterocíclicos, suelen poseer una marcada acción fisiológica en el hombre y en animales ya que tienen una amplia actividad farmacológica como anestésicos, analgésicos, antipiréticos, entre otros. Pertenecen a este grupo, sustancias como la cafeína, morfina, heroína y cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN de microorganismos (Figura 2)(Albornoz, 1980).

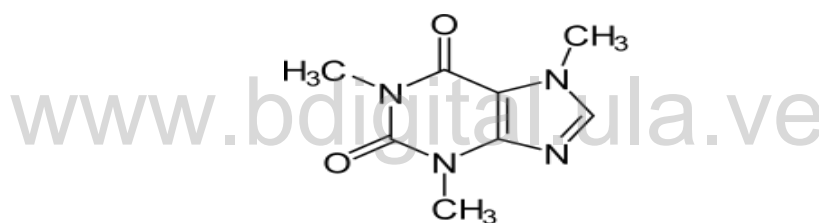


Figura 2. Estructura química de la Cafeína, un alcaloide estimulante.

Tomado de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Alcaloide>

Amidas

Son derivados funcionales provenientes de los ácidos carboxílicos, se encuentran en las plantas superiores y se les atribuye propiedades insecticidas, provienen de la condensación química de un ácido con una amina. Las amidas como productos naturales, por otra parte, no son tan abundantes. Un ejemplo interesante de este grupo de compuestos es el de las alquilamidas o alcanidas que comprenden un grupo de aproximadamente 70 estructuras conocidas y distribuidas a lo largo del reino vegetal (Molina y García, 2001).

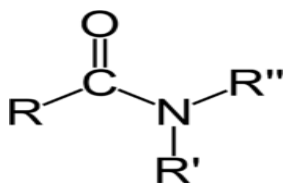


Figura 3. Estructura general de una Amida
Tomado de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Amida>

Aceites esenciales

Son responsables de la fragancia de las flores y otros órganos vegetales. Están constituidos por terpenos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles, lactonas, etc. entre otros. Son generalmente líquidos aromáticos, miscibles con lípidos y solventes lipófilos; incoloros, particularmente cuando están frescos, ya que al oxidarse se resinifican y toman color oscuro (Albornoz, 1980).

Poliacetilenos

Son compuestos que presentan triples enlaces y enlaces alélicos muy inestables y fotosensibles, frecuentes en los vegetales superiores de las familias oleáceas, umbelíferas y compuestas (Molina y García, 2001).

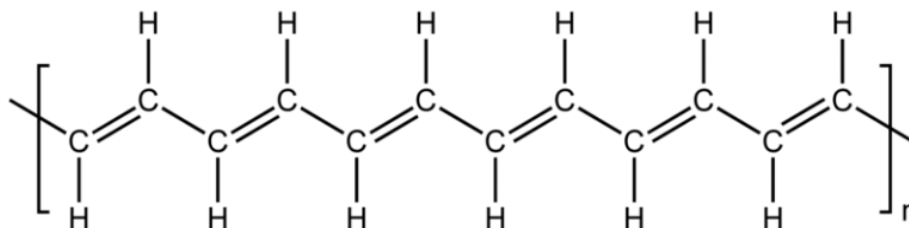


Figura 4. Segmento trans-poliacetileno Tomado de:
<http://www.wikiwand.com/pt/Poliacetileno>

Diterpenos

Pertenecen a la familia de los terpenoides, derivados de hidrocarburos $C_{20}H_{32}$, biosintetizados por la ruta del ácido mevalónico. La mayoría de los diterpenos han sido extraídos de plantas vasculares y de algunos talofitos, principalmente algas y hongos (Albornoz, 1980).

Triterpenos

Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal, pueden encontrarse en forma libre o asociados a azúcares, estos compuestos tienen como precursor común el escualeno. Presentan gran interés farmacológico ya que están relacionados con los esteroides presentes en las hormonas sexuales humanas (Albornoz, 1980).

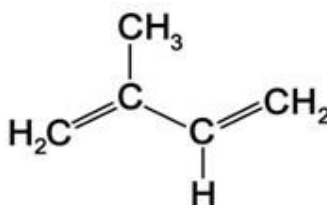


Figura 5. Formula química del Isopreno, unidad funcional de los Terpenos
Tomado de: <https://superscienceme.wordpress.com/2015/01/09/el-isopreno-se-va-de-erasmus/>

Flavonoides

Constituyen un grupo más o menos uniforme, con un esqueleto fundamental C₁₅, probablemente biosintetizado por acoplamiento de una unidad C₆-C₃ producida por el ácido shiquímico, con tres unidades acetato (C₂), resultando una estructura C₆-C₃-C₆. La palabra flavonoides deriva del latín “*flavus*” que significa amarillo, siendo la sustancia patrón la flavona, la cual por sí misma no es fenólica (Albornoz, 1980).

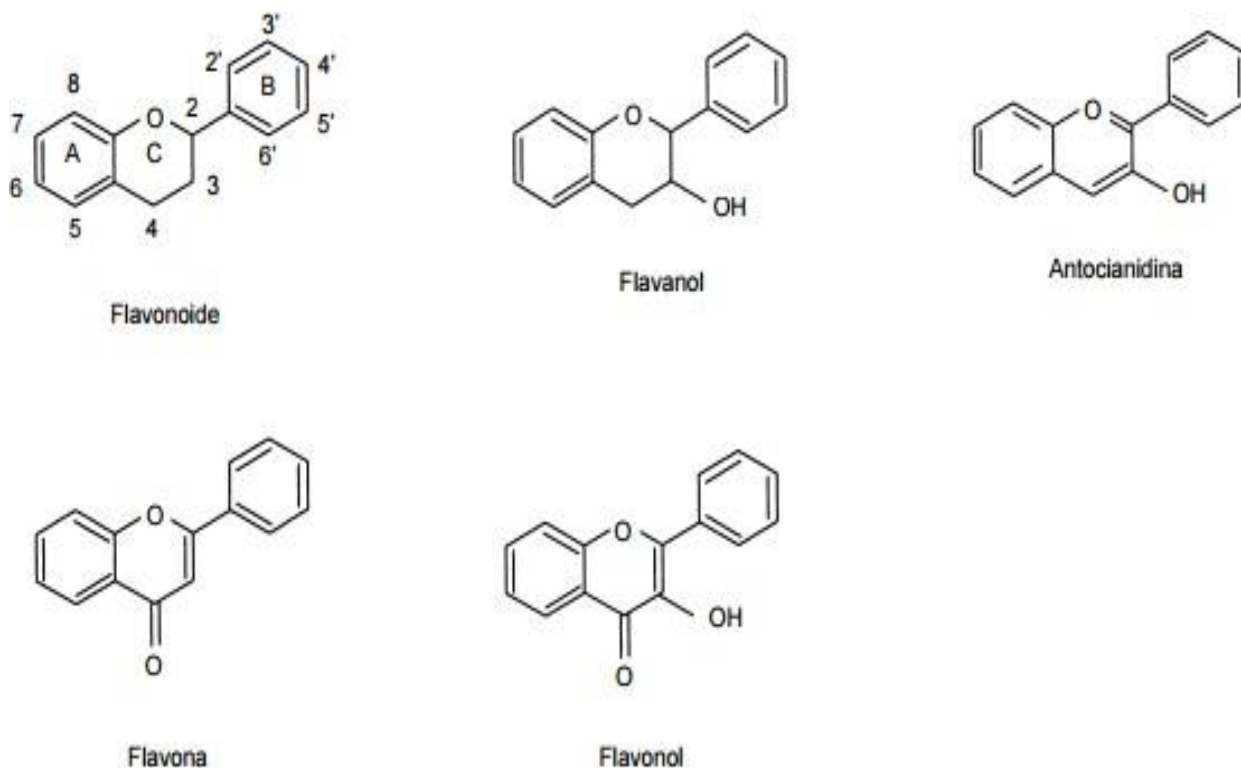


Figura 6. Flavonoides. Estructura básica y tipos.
Tomado de: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

Lactonas sesquiterpénicas

Constituyen un grupo de compuestos homogéneos amargos, difíciles de saponificar, se caracterizan por la coloración purpura que se manifiesta con la formación de hidroxantomas férricos, se originan a partir del ácido mevalónico, derivando casi todos ellos de la estructura de germacranolido (Figura 7). Estos compuestos presentan una distribución biológica bastante esporádica en familias como la Ureaceae, Magnoliaceae, Jungermaniales, y la gran mayoría se localiza en la familia de las Compuestas. (Molina y Garcia, 2001).

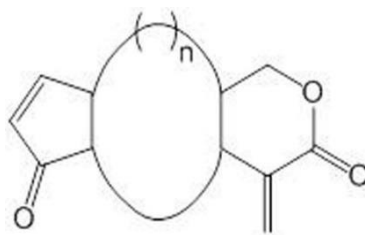


Figura 7. Estructura general de las Lactonas Sesquiterpénicas

Tomado de: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/lactonas-sesquiterp%C3%A9nicas-diversidad-estructural-y-sus-actividades-biol%C3%B3gicas-sesquiterpene>

Derivados fenólicos

El ácido clorogénico y la cinarina son ésteres del ácido cafeico, derivado de los compuestos fenólicos que tienen gran actividad antioxidante ambos se pueden encontrar en *Cynara scolymus*, L. (Asteraceae) conocida como alcachofa, planta de gran valor nutricional (Figura 8 y 9.) (Del Fresno y Martínez, 2004).

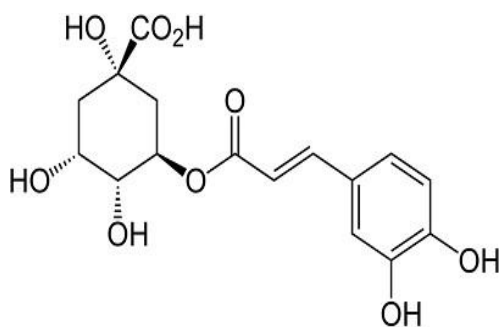


Figura 8. Estructura química del Ácido Clorogénico.

Tomado de: <http://www.lineaysalud.com/que-es/acido-clorogenico>

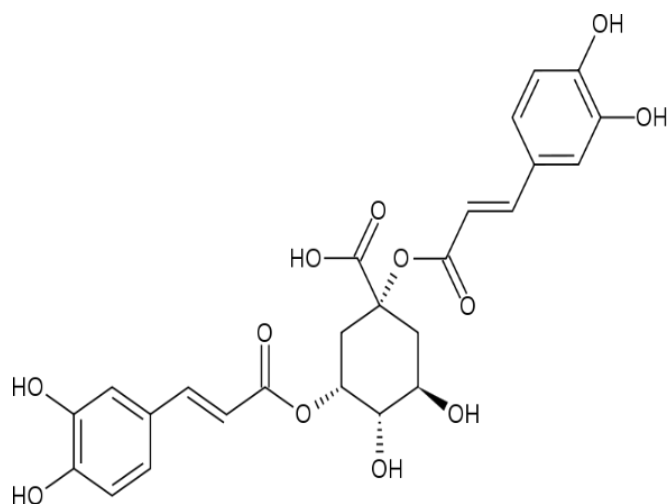


Figura 9. Estructura química de la Cinarina.
Tomado de: <http://nutribonum.es/cinarina-en-la-alcachofa/>

Cumarinas

Son compuestos derivados de la Benzo-alfa-pirona, a ellos pertenece la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Están presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, vasodilatadoras, y antiedematosa. La warfarina, un anticoagulante clásico, pertenece a este grupo. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiana es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Albornoz, 1980).

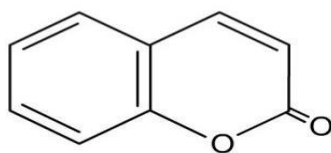


Figura 10. Estructura química de las Cumarinas
Tomado de: <http://www.plantasyhongos.es/BH/06-medicinales/cumarinas.htm>

Características botánicas del género y especie en estudio

Género *Pluchea*

Hierbas perennes o arbustos, a veces aromáticos, por lo general pubescentes, a veces también con tricomas glandulares. Hojas simples, alternas, enteras, dentadas o serradas, pecioladas o sésiles y con las bases amplexicaules o decurrentes como alas. Cabezuelas heterógamas, dispuestas en cimas o corimbos, a veces secundariamente dispuestas en panículas; involucreo campanulado a hemisférico, con brácteas imbricadas, graduadas, frecuentemente con tintes púrpura; receptáculo plano, desnudo; flores heterógamas, las periféricas pistiladas y fértiles, numerosas, en varias series, tubular-filiformes, con 3-5 lóbulos diminutos, usualmente provistos de glándulas y terminados en setas cortas; flores del disco hermafroditas pero funcionalmente masculinas, relativamente pocas, tubulares, con 5 lóbulos iguales, con tricomas cortos glandulares en la región de los lóbulos; anteras con las bases caudadas; ramas del estilo filiformes, frecuentemente sin separarse en las flores hermafroditas. Aquenios cilíndricos, fusiformes o clavados, 4-6-angulares, pubescentes o glabros; vilano formado por una serie de cerdas capilares. Género de 40-80 especies, la mayoría americanas, con algunas especies en África, Asia y Australia (Villaseñor, 2005).

Especie *Pluchea odorata*

Descripción taxonómica

- Reino: Plantae
- Phylum: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Asterales
- Familia: Asteraceae
- Género: *Pluchea*

- Especie: *Pluchea odorata* (Browner C) (Villaseñor,2015).

Características botánicas de *Pluchea odorata*

Hierba anual o perenne que crece derecha hasta una altura máxima de 1 metro. Es glandular, cubierto con tricomas rugosos (pelos) y fuertemente aromático. Las hojas ovaladas dentadas miden hasta 12 cm de largo y se disponen alternativamente en los tallos rígidos. La inflorescencia es un gran grupo de cabezas de flores. Cada cabeza mide menos de 1 cm de largo y está rellena de flores de color rosa brillante púrpura o magenta. La fruta es un diminuto aquenio con una punta abultada.



Figura 11: *Pluchea odorata*

Tomado de: <https://www.flawildflowers.org/flower-friday-pluchea-odorata>.

Composición química de *Pluchea odorata*

En las hojas de *Pluchea odorata* se han identificado los flavonoides artemína, 4'-5-7-trihidroxi-3-3'-dimetoxi-flavona, 3-7-dimetil-éter-herbacetína, 3-4'-7-trimetil-camferol, el 3-metil y 6-hidroxi-3-4'-6-trimetil derivados, 4'-metil-penduletína, cuatro derivados tri, tetra y pentametilados de quercetagetína; los sesquiterpenos 3-alfa-(2'-hidroxi-2'-rnetil-3'-cloro-bitiril-oxi)-4-alfa-II-hidroxi-6-7-dihidro-endesman-8-ona y cuatro derivados de la endesmanona; los triterpenos alfa amirina y su acetato, y los esteroides estigmasterol y beta-sitosterol. En las ramas se han identificado los monoterpenos 4-metoxi-5-iso-

propil-2-metil-anisol, (angeloil-oxi)-5-carvotagenona y dimetil-éter-timol-hidroquinona; los triterpenos cariofileno, cuauhtenuona, sus derivados 3-(2-3-epoxi-2-3-dihidro-an-gelicato) y 3-angelicato; y el triterpeno acetato de beta-amirina. En la raíz se han identificado el monoterpene éter dimetílico de la timohidroquinona, y siete componentes azufrados derivados del tiofeno.

Aceites esenciales

Son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático (refiriéndose al término aroma y no al concepto químico de aromaticidad). De los millones de plantas existentes en el planeta, se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales distintos, aunque evidentemente, no todas las plantas contienen estas sustancias, hay algunas que presentan una concentración tan baja que hace imposible su obtención práctica (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales pueden ser líquidos, la mayoría incoloros y de carácter volátil, los hay muy viscosos o semisólidos, denominados bálsamos u oleorresinas como la de pimentón y la paprica. Los aceites esenciales no son compuestos puros sino mezclas de multitud de sustancias (es fácil que un aceite esencial sea una mezcla de más de 100 sustancias químicas distintas) que se encuentran en distintas proporciones y que en conjunto le confieren a éste sus características propias (Ortuño, 2006)

Se les conoce actividad antimicrobiana, antifúngica, antiséptica y como relajante del sistema nervioso central, de allí las aplicaciones medicinales de estas sustancias (Ortuño, 2006). Los aceites esenciales, también llamados aceites volátiles o etéreos, resultan de la destilación mediante vapor acuoso de las materias aromáticas volátiles contenidas en una planta. Cuando son obtenidas de distintos órganos de una misma planta, su composición química es similar, pero cuando se obtienen de especies botánicas diferentes, su

composición difiere al igual que sus características físicas. Así mismo, la calidad de las esencias también varía de un género a otro y de una variedad a otra. Normalmente el contenido de aceites presentes en una planta es muy bajo (1-3%), aunque se han observado ciertas excepciones en algunas especies botánicas (Gilg, 1967; Guenther, 1965; Lawless, 1992).

Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

Consistencia

- Esencias: son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzóico y cinámico, así como sus correspondientes esteres. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- Resinas: dentro del grupo de las resinas se pueden encontrar una serie de posibles combinaciones o mezclas: resinas, oleorresinas, gomorresinas (Van Ginkel, 2013).

Origen

- Naturales: se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos.
- Artificiales: se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes.
- Sintéticos: son producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis químicas. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como

aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, entre otros) (Van Ginkel, 2013).

Función y usos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son de vital importancia para las plantas, ya que cumplen diversas funciones: repelentes frente a los depredadores (hongos, insectos, microorganismos), previniendo así la destrucción de las flores y hojas, o, por el contrario, sirven para atraerlos, interviniendo en la polinización (Lawles, 1992).

Por otra parte, los aceites esenciales tienen diversas aplicaciones en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica, pudiéndose emplear como agentes aromatizantes en la fabricación de perfumes y cosméticos; como agentes saporíferos en los alimentos y las confituras; como aditivos en la preservación de carnes y otros alimentos; como materia prima para la síntesis de principios activos (cital en la fabricación de la vitamina A); repelentes (citroneral); componentes en pulituras, tintas, pegamentos; o como solventes en la industria de las pinturas (trementina) (Wijesekera, 1991). En la industria farmacéutica los aceites esenciales son empleados en la elaboración de jarabes y soluciones, ya que presentan una variada actividad farmacológica producto de la heterogeneidad de sus componentes (Deans, 1991).

Método de extracción de los aceites esenciales

Destilación por arrastre de vapor de agua

Puede haber tres variantes según la textura y la fragilidad de la materia prima a tratar: la primera posibilidad consiste en sumergir directamente el material vegetal a tratar (intacto o groseramente pulverizado), en agua que se somete a ebullición. Los principios volátiles son arrastrados y después de

condensar el destilado, se separan por decantación. El segundo caso, los productos que puedan alterarse, por una ebullición prolongada, se sumergen en agua, seguidamente, los compuestos volátiles son arrastrados por el vapor producido por un generador, separado e inyectado directamente en el medio. El tercer caso es aquel en que el material está directamente sometido a la acción de una corriente de vapor, sin maceración previa. El agua saturada de aceite esencial, que se recupera en el destilado, se reenvía al destilador (en el primer caso); al final de la operación puede ser utilizada (aguas destiladas aromáticas) o re extraída con un disolvente volátil (Bruneton, 1991).

Tipos de Destilación por arrastre de vapor de agua

Entre estos podemos encontrar La Hidrodestilación simple, Destilación con vapor saturado e Hidrodifusión (Albornoz, 2001). En esta investigación se empleará como método para la obtención de los aceites esenciales La Hidrodestilación simple.

Hidrodestilación Simple

Consiste en sumergir directamente el material vegetal (intacto u ocasionalmente triturado) en un alambique con agua que posteriormente se somete a ebullición; el vapor de agua pasa a través de la hierba fresca y arrastra las gotitas de la esencia hacia la trampa de cleveger, donde se condensa y se separa por diferencia de densidad. La elección del método está dada por la condición del material vegetal (Bruneton, 1991; Varro y col, 1979).



Figura. 12. Técnica de extracción: Destilación por arrastre con vapor de agua. Tomado del Laboratorio “B” del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Técnicas de separación de los compuestos químicos de los aceites esenciales

Para la determinación de los compuestos químicos que presentan los aceites esenciales se utilizan una diversidad de métodos, en general los cromatográficos, como: de capa fina o de gases, y los espectrométricos principalmente espectrometría de masas (Valcarcel y Gomez, 1988). En este trabajo de investigación se empleará una combinación de estos métodos denominado Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas.

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases se puede combinar con otras técnicas espectroscópicas como la espectrometría de masas proporcionando de esta manera una herramienta potente para la identificación de los componentes de

una mezcla compleja. En la cromatografía gases-masas, el cromatógrafo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas de manera que los analitos separados en la columna cromatográfica penetran directamente en la cámara de ionización registrándose así el espectro de masas de cada uno de ellos. Esta técnica permite obtener, no solo el cromatograma de una mezcla compleja sino además proporciona el espectro de masas de cada componente de la mezcla. Este procedimiento ha permitido la identificación de cientos de componentes que están presentes en sistemas naturales y biológicos como por ejemplo las sustancias responsables del olor y sabor en los alimentos, la identificación de contaminantes del agua o la de metabolitos secundarios (Kliment y col, 2005).

Bacterias

Las bacterias que no forman parte de la flora bacteriana habitual son causantes de muchas enfermedades infecciosas humanas, estas producen síntomas de una enfermedad por varios mecanismos: la producción de toxinas (exotoxinas, endotoxinas) y la inducción de inflamación (Levison, 2006).

Su clasificación depende de la naturaleza de la pared celular, de las características de tinción, y la capacidad de crecer en presencia o en ausencia de oxígeno; según su forma se clasifican en tres grandes grupos básicos: cocos (esféricos), bacilos (bastones) y espiroquetas (espiral) (Levison, 2006).

Bacterias Gram positivas y Gram negativas

La pared celular de las células varía en su complejidad arquitectónica, por lo que se dividen en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Esta división se basa en que, al poseer diferencias en su estructura y composición de la membrana, estas se tiñen de colores diferentes cuando se utiliza la técnica de tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas retienen el colorante

primerio (violeta de genciana), y por lo tanto se ven de color violeta intenso; las Gram negativas pierden el color violeta con el decolorante (puede ser alcohol o una mezcla de alcohol con acetona) y toma un color rosado al teñirse con el colorante de contraste (safranina) (Garcia, 2004). Las bacterias Gram positivas no se decoloran porque la pared de peptidoglicano es gruesa y además contiene pocos lípidos por lo tanto se dificulta la penetración del agente decolorante. En el caso de las bacterias Gram negativas el alcohol o la acetona al disolver los lípidos incrementa la porosidad de la pared celular por lo cual el decolorante puede penetrar al interior de la célula teñida decolorándola, sin embargo, puede ser teñida por el colorante de contraste y verse de color rosado. Esta particularidad se debe a que las bacterias Gram negativas tienen una pared de peptidoglicano más delgada envuelta por una cobertura lipídica (Macarulla y Goñi, 1994).

El peptidoglicano, componente propio de la pared celular es una buena diana para los fármacos antibacterianos, ya que no se encuentra presente en células humanas (Levison, 2006; Murray y col, 2013).

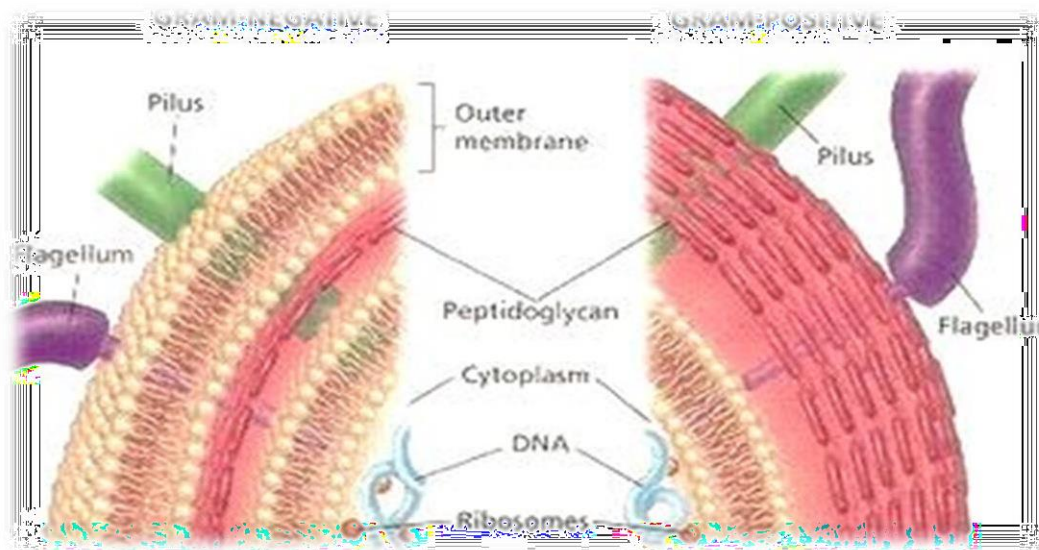


Figura 13. Estructura de la pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas

Tomado de: <https://biolucena.wikispaces.com/Pared+celular>

Resistencia Bacteriana

Es un fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso un nuevo agente antibacteriano en la práctica clínica, el laboratorio de microbiología detecta cepas resistentes. Una cepa resistente se define como aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas en dosis terapéuticas. En general, todos los mecanismos de resistencia preexisten o se modifican en la naturaleza, ya sea por transferencia de genes de resistencia o por mutaciones, que pueden localizarse en los cromosomas bacterianos o en plásmidos. Por esto se puede suponer que los antibacterianos tendrán actividad por un tiempo limitado, según la presión selectiva que este ejerza sobre la población bacteriana (García, 2003).

Actividad antimicrobiana

El crecimiento de los microorganismos puede controlarse con agentes químicos, por lo tanto, se habla de actividad antimicrobiana cuando una sustancia natural o producto químico de síntesis tiene la capacidad de detener la multiplicación de los microorganismos o destruirlos, esa sustancia también es llamada agente antimicrobiano (Romero, 2004). Los agentes que tienen la capacidad de matar a los microorganismos suelen denominarse microbicidas y los que solo inhiben el crecimiento se llaman estáticos, la suma de los dos es simplemente un agente antimicrobiano con un prefijo que indica el tipo de microorganismo que mata. Así pues, hay agentes antifúngicos (actúa sobre hongos), antivirales (sobre virus) y antibacterianos (sobre bacterias) (Madigan *et al.*, 1999).

Métodos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana

Para la evaluación antibacteriana de los aceites esenciales se aplican generalmente métodos convencionales probados con capacidades antibióticas. En los aceites esenciales estas pruebas son difíciles debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad (Velasco *et al.*, 2008).

Método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer)

Evalúa la sensibilidad de las bacterias a los agentes antibacterianos, es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina que solo brinda información cualitativa o semicuantitativa, sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibioticoterapia (Velasco y col, 2008).

En este método se emplean dos discos de papel absorbente, impregnados con una concentración de antimicrobiano conocido. Estos discos se colocan en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton de aproximadamente 4 mm de espesor, en cuya superficie se ha sembrado el microorganismo a probar. Cuando el disco se humedece, el antimicrobiano difunde radialmente hacia afuera y crea un gradiente de concentración cerca del disco la cual va disminuyendo a medida que se aleja del disco. El diámetro en milímetros del anillo de inhibición dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo (Rodríguez *et al.*, 2005).

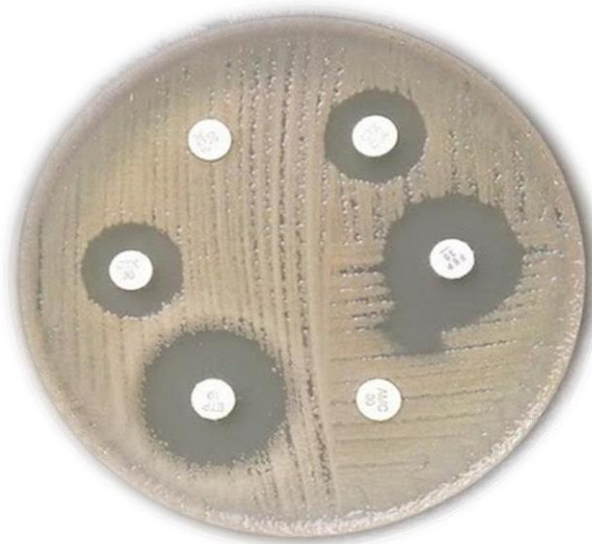


Figura 14. Método de Kirby-Bauer Tomado de:
<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/11/antibiogramas.html>

Método de dilución en caldo o en agar para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Esta prueba de sensibilidad en caldo puede realizarse en tubo (macrométodo) o en microplaca (micrométodo). Se trata de un método cuantitativo, considerado de referencia, que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). En esta técnica se recurre a tablas indicadoras para conocer el solvente, el diluyente apropiado para cada antimicrobiano selectivo y las diluciones que se van a utilizar. Se prepara una suspensión del microorganismo problema, procedente de un cultivo de no más de 24 horas. Se estandariza esa suspensión con el patrón de Mc Farland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL). Se realizan diluciones seriadas del antimicrobiano a probar, desde 100 ug/mL hasta 0,4 ug/mL en una serie de diez (10) tubos que contengan igual cantidad de caldo Müeller-Hinton. El tubo número 10 no posee antibiótico y sirve como control de crecimiento. Se agrega un mL de la suspensión de 1.5×10^8 UFC/mL a la serie de 10 tubos y se incuba a 37°C,

observándose crecimiento a las 18-24 horas. El tubo con la menor concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la CIM (Negroni, 2009).

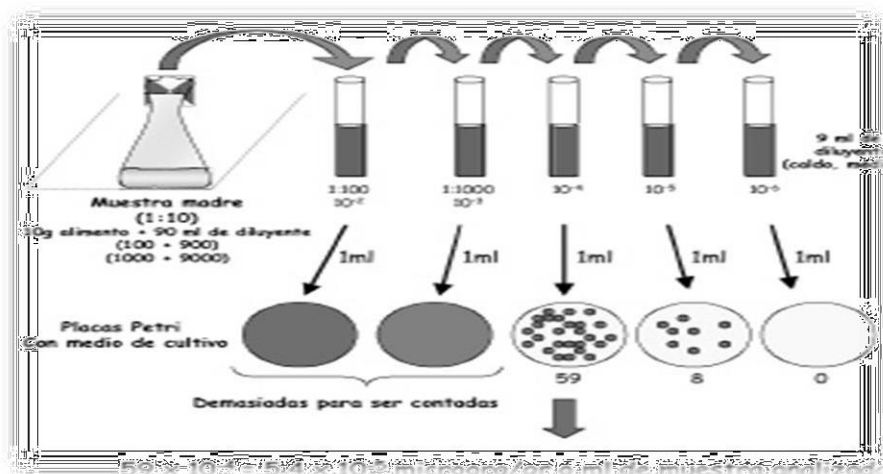


Figura 15. Método de dilución en Caldo o en Agar
tomado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>

Operacionalización de las variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas (Pérez, 2009, Hurtado 2010). En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se medirán las variables que no admiten valores intermedios (discretas) y algunas continuas con dimensiones dicotómicas y politómicas. El nivel de medición será nominal y de intervalo, los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantiza que los objetivos propuestos sean alcanzados (Tabla 1-2).

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pluchea odorata*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del aceite esencial	Dependiente cualitativa discreta	Un antimicrobiano es una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos (Florey, 1949)
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antimicrobiana de aceites esenciales se mide a través del método de difusión en agar con discos (Müller-Hinton).	Susceptible: -Sensible. -Intermedio. -Resistente	Halo de inhibición del crecimiento bacteriano en el antibiograma

Fuente: González, Velasco y Hernández, 2018

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente composición química de *Pluchea odorata*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Aceite esencial de la <i>Pluchea odorata</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Mezcla compleja y concentrada de moléculas aromáticas en proporciones muy variables, como lo son los hidrocarburos terpénicos o terpenos y sus derivados oxigenados (Stashenko, 2009).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
		Presencia de sustancias y su porcentaje dentro de la muestra

Fuente: Gonzalez, Velasco y Hernández, 2018

Hipótesis

La hipótesis verifica el estatus de teoría o conocimiento científico. Siendo así, sistemático, objetivo y metódico el proceso de verificación, comprobación o constatación, la hipótesis se constituye en un núcleo esencial de la investigación. (Núñez, 2007).

“En su mayor parte, los enunciados que constituyen las teorías científicas son hipótesis y, en tal sentido, tiene un carácter provisional por cuanto pueden resultar a la postre verificadas o refutadas” (Núñez, 2007).

De acuerdo a lo antes explicado se formula la siguiente hipótesis.

Afirmativa: El aceite esencial de *P. odorata* presenta actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia internacional (ATCC).

Nula: El aceite esencial de *P. odorata* no presentan actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia internacional (ATCC).

Alternativa: El aceite esencial de *P. odorata* presenta otro tipo de actividad biológica: antitumoral, antioxidante, entre otras.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2000) el tipo de investigación está dado por el objetivo general y se han conceptualizado diez categorías generales o tipos de investigación: Exploratoria, descriptiva, comparativa, analítica, explicativa, predictiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa.

En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Específicamente, en esta investigación se describió la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Pluchea odorata* y la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional (bacterias Gram positivas y Gram negativas) en función de un periodo y contexto determinado, por lo tanto, se puede decir que esta investigación fue de tipo descriptiva.

Población y Muestra

La población de una investigación está constituida por el conjunto de seres en los cuales se va a estudiar el evento, y que además comparten, como características comunes los criterios de inclusión; es la población a quien estará referida las conclusiones del estudio. (Hurtado, 2000). De acuerdo a lo antes explicado la población en este estudio será la especie *Pluchea odorata* perteneciente a la familia Ateraceae. De igual manera Hurtado (2000) afirma que: “La muestra es una porción de la población que se toma para realizar el estudio, la cual se considera representativa” (p.154).

El grupo de estudio está representado por las partes aéreas (hojas y tallos) de *P. odorata*, la muestra fue identificada por el profesor Pablo Meléndez (Ingeniero Forestal, PhD), adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Variables del Estudio

- **Variable independiente:** Composición química del aceite esencial de *P. odorata*
- **Variable dependiente:** Actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. odorata* frente a las cepas de referencia internacional objeto de este estudio.

Procedimientos o Metodología

Material Botánico

Partes aéreas de *P. odorata*: Hojas 1250 g y tallos 850 g.

Bacterias de Referencia Internacional

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29912
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Recolección del Material Botánico

El material botánico se recolectó en el mes de agosto del año 2023, en la Laguna de Urao, Lagunillas, municipio Sucre, estado Mérida- Venezuela.

Determinación Taxonómica de la especie

El material vegetal colectado fue identificado por el Dr. Pablo Meléndez, director del Herbario “Dr. Luis Ruiz Terán” (**MERF**) Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Una muestra testigo se encuentra en la colección bajo el código **JR61**.

Obtención del aceite esencial

Para obtener el aceite esencial de la planta en estudio se recolectaron y separaron las hojas y tallos del material vegetal fresco, se pesaron y se licuaron con agua para lograr un mayor rendimiento del aceite esencial.

Una vez preparado el material vegetal, se colocó en un recipiente redondo de 12 litros de capacidad conteniendo 5 litros de agua aproximadamente, luego dicho material fue sometido a hidrodestilación empleando una trampa de Clevenger. Con una temperatura de 80 °C durante 8 horas. Al culminar el proceso de extracción, se le adicionó al aceite recolectado, sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de agua y se almacenó a 4°C en un envase estéril hermético, resguardado de la luz y del oxígeno (Guenther, 1948).

Este procedimiento fue realizado con la asesoría de la Profa. Janne Rojas en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Análisis de la composición química por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM)

Los componentes del aceite esencial de *P. odorata* se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), y una vez obtenido el cromatograma de los mismos se procedió a la identificación de sus componentes por comparación con los espectros de masas existentes en

las librerías del equipo CG-EM. Este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en agar con discos, descrita por Velasco y col. 2007. Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” (S.G.U), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Preparación de los discos

Para realizar la actividad antibacteriana se utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor, los cuales se esterilizaron en autoclave. Previo a la preparación del inóculo, se impregnaron los discos de papel filtro con 10 µL del aceite esencial de la especie *P. odorata*.

Preparación del inóculo bacteriano

Las bacterias de referencia internacional se mantuvieron en agar conservación a temperatura ambiente (Weng y col. 2003). Para su reactivación se sembraron en agar Tripticasa de Soya se incubaron a 37°C durante 18 horas, a partir de este cultivo fresco se prepararon los inóculos bacterianos con solución salina fisiológica (SSF) estéril a una turbidez equiparable al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (1.5×10^8 UFC/mL) (Velasco y col. 2007).

Ensayos microbiológicos

Para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. odorata* se procedió a tomar una placa de Petri con agar Müller Hinton (Liofilchem), en la cual se inocularon la bacteria en la superficie del agar con un hisopo estéril, luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel filtro previamente impregnados con 10 µL del aceite y el disco control con el compuesto de referencia de acuerdo al microorganismo (Tabla 3).

Tabla 3 Compuestos de referencias para las pruebas de susceptibilidad.

Microorganismos	Compuesto de referencia
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Ciprofloxacina® Liofilchem (5 µg)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29912)	Vancomicina® Liofilchem (30 µg)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Ceftazidima® Liofilchem (30 µg)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Ceftolozano/tazobactam® Liofilchem (40 µg)

Posteriormente, los medios de cultivo se incubaron a 37 °C durante 24 horas, realizando la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas. El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antimicrobiana del aceite, se expresaron en mm, en el caso de los controles positivos que corresponden a los antibióticos comerciales, los resultados se cotejaron con los valores establecidos por el CLSI (de sus siglas en inglés: Clinical and Laboratory Standards Institute 2023).

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se realizó con aquellas cepas que mostraron zonas de inhibición, siguiendo la metodología descrita por Velasco y col. 2007. La CIM se realizó diluyendo el aceite esencial con el

solvente dimetil sulfóxido (DMSO), luego se impregnaron los discos de papel filtro con 10 μ L de cada dilución, se incorporó un disco impregnado con DMSO como control negativo.

La CIM se define como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CLSI, 2023). Los ensayos se realizaron por duplicado.

www.bdigital.ula.ve

Diseño Experimental

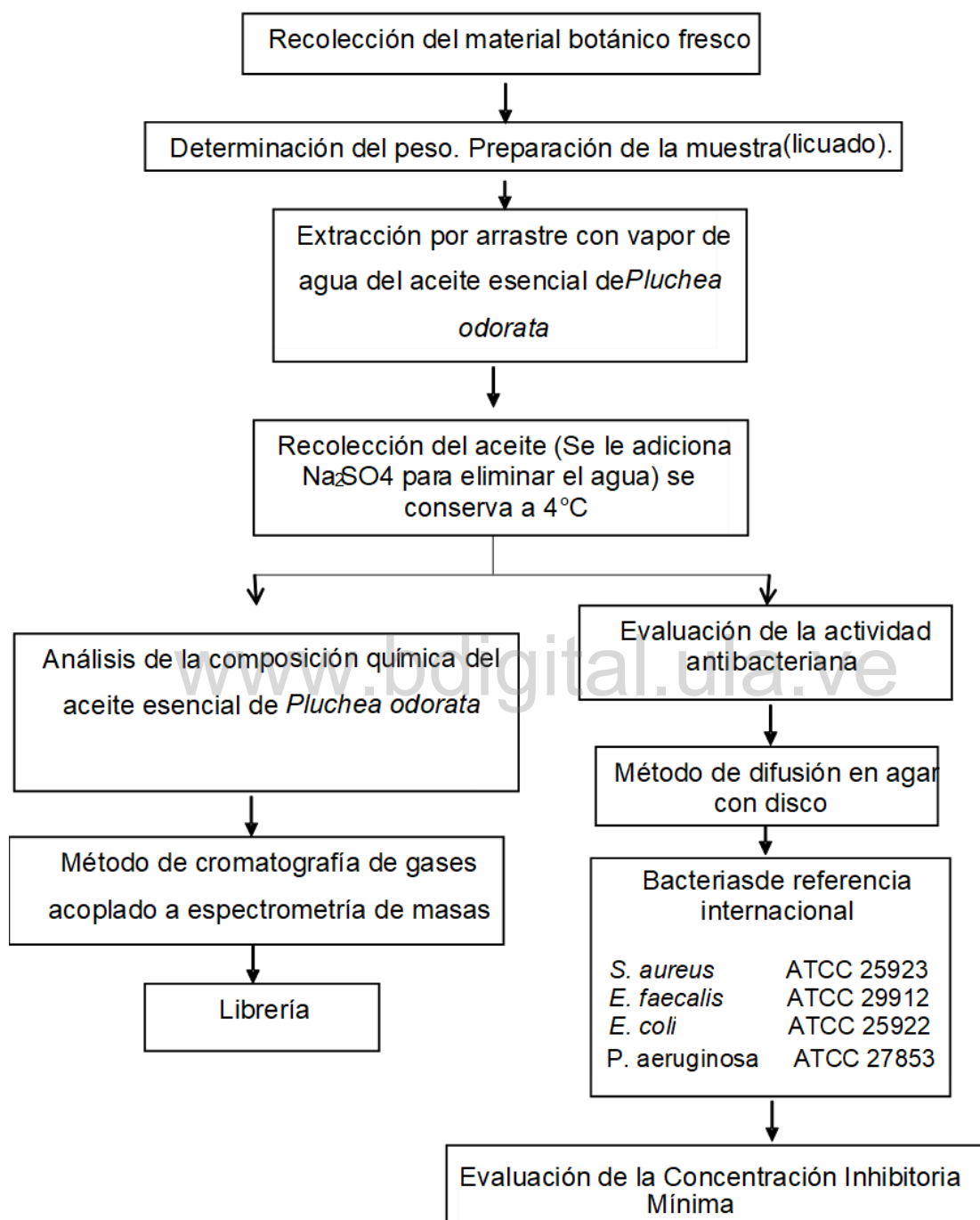


Figura 16: Diseño Experimental

Diseño de Análisis

Los datos recolectados se pueden analizar por medio de enfoques cualitativos o cuantitativos. Específicamente, si los datos se miden numéricamente y a través de modelos matemáticos el enfoque es cuantitativo. Mientras que si los datos obtenidos se expresan por descripción del evento el enfoque es cualitativo (Hurtado, 2010). Finalmente, los datos se analizaron a través de un diseño cualitativo, univariante y multicategórico.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez sometido las partes aéreas de *P. odorata* al proceso de hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger, se obtuvo 0,5 mL de aceite esencial de las hojas (0,04% de rendimiento) y 0,4 mL de los tallos (0,04% de rendimiento). Rendimiento similar al reportado por Miller y col 2015, para el aceite esencial obtenido de las hojas de *P. odorata* recolectada en Guatemala con un rendimiento de 0,03%. Al respecto, Kerdudo y col 2016, quienes estudiaron el aceite esencial de las hojas y flores de la especie *Pluchea carolinensis* recolectada en Martinica, señalan un rendimiento de 0,08-0,11%.

En la tabla 4 se muestra la composición química del aceite esencial obtenido de las hojas de *P. odorata*, con la presencia de 20 compuestos, con la identificación del 89,54% de los mismos, dentro de los cuales los componentes mayoritarios corresponden a α -pineno (35,15%), β -cariofileno (13,20%), óxido de cariofileno (12,10%) y β -guaieno (10,10%).

Tabla 4 Composición química del aceite esencial de las hojas de *Pluchea odorata*.

Pico	Compuestos	RT	AREA %	IK
1	Trans-2-hexenal	3,87	2,98	846
2	1-hexanol	4,08	1,71	863
3	α -pineno	5,45	35,15	932
4	Sabineno	6,32	0,74	969
5	1-octen-3-ol	6,39	2,01	974
6	Mirceno	6,70	0,71	988
7	p-cimeno	7,63	2,14	1020
8	Linalool	9,80	0,82	1095
9	timol metil eter	14,11	1,09	1232
10	Timol	15,96	1,14	1289
11	β -elemeno	19,20	0,80	1389
12	β -cariofileno	20,09	13,20	1408
13	α -guaiano	21,76	2,10	1437
14	β -guaiano	21,97	10,10	1489
15	Valenceno	22,06	1,77	1496
16	α -selineno	22,32	3,09	1498
17	germacreno A	22,68	3,73	1508
18	tridecanal	22,74	1,13	1509
19	espatunelol	24,81	3,23	1577
20	óxido de cariofileno	24,99	12,10	1582
	Total identificados		99,74	

TR: tiempo de retención. % Área: área relativa. IK: índice de Kováts(Adams, 2007).

El análisis de la composición química del aceite esencial obtenido de los tallos de *P. odorata*, reveló la presencia de 10 compuestos (identificación del 92,99%), siendo los componentes mayoritarios: trans metil eugenol (39,49%) y β -cariofileno (34,43%) (Tabla 5).

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de los tallos de *Pluchea odorata*.

Pico	Compuestos	RT	AREA %	IK
1	α -felandreno	7,09	1,15	1002
2	Isoforona	12,27	1,19	1118
3	γ -terpineol	14,13	0,94	1199
4	Timol metil eter	15,73	6,07	1232
5	β -elemeno	18,85	1,80	1389
6	β -cariofileno	20,22	34,43	1408
7	β -selineno	22,11	0,81	1489
8	Trans metil eugenol	29,61	39,49	1491
9	Decanoato de metilo	30,49	10,39	1524
10	Trans-2-Hexenil benzoato	31,11	3,65	1587
	Total identificados		99,92	

TR: tiempo de retención. % Área: área relativa. IK: índice de Kováts(Adams, 2007).

De acuerdo a la literatura consultada este estudio es el primero que describe la composición química del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *P. odorata*. Son escasos los trabajos realizados sobre la composición química de aceites esenciales en este género, al respecto, al comparar estos resultados con la composición química descrita en el aceite esencial obtenido de las hojas de *P. carolinensis*, Kerdudo y col 2016 también reportaron β -cariofileno como uno de los compuestos mayoritarios 21,1%.

Wollenweber y Mann (1985), describen la composición química de la resina obtenida de las hojas de *P. odorata* recolectada en el estado el edo. Tamaulipas, México el 3 de mayo de 1983, con predominio de flavonoides y terpenemos.

La composición química de un aceite esencial varía dependiendo del sitio de recolección, de la época del año y de la parte de la planta analizada.

Estas variaciones están influenciadas por el medio ambiente donde se desarrollan las mismas (Villanueva y col 2022).

El estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *P. odorata* no mostró actividad frente a las bacterias de referencia internacional (Tabla 6). Resultado similar al reportado por Miller y col 2015, quienes estudiaron la actividad antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales utilizadas en Guatemala, frente a *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 6538P, *Streptococcus mutans* ATCC 33402, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 11975 y *Candida albicans* ATCC 90028. Para la determinación de la CIM utilizaron las siguientes concentraciones de los aceites esenciales: 5,00; 2,50; 1,25; 0,63 y 0,31 $\mu\text{L/mL}$. El aceite esencial obtenido de las hojas de *P. odorata* no mostró actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*, resultado que coincide con el comportamiento observado por el aceite esencial de la especie objeto del presente estudio. Sin embargo, la especie de Guatemala solo inhibió el desarrollo de *S. mutans* a una CIM de 0,31 $\mu\text{L/mL}$, microorganismo no incluido en la presente investigación.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de las partes aéreas de *Pluchea odorata*.

Bacterias	Halos de inhibición (mm)						CIM μL/mL
	Aceite esencial		Compuestos de referencia				
	Hojas	Tallos	CIP	VA	CAZ	C/T	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	NA	NA	22	NP	NP	NP	NP
<i>E. faecalis</i> ATCC 29912	NA	NA	NP	25	NP	NP	NP
<i>E. coli</i> ATCC 25922	NA	NA	NP	NP	25	NP	NP
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	NA	NA	NP	NP	NP	27	NP

NA: No activo, NP: No probado; CIM: Concentración inhibitoria mínima; CIP: Ciprofloxacina® (5μg; Liofilchem); VA: Vancomicina® (30μg; Liofilchem); Cefatzidime® (30μg; Liofilchem); Ceftolozano/tazobactam (40μg; Liofilchem).

Los resultados de este estudio contribuyen con el conocimiento de las plantas con posible actividad antibacteriana y es especial con especies poco estudiada como *P. odorata*.

CONCLUSIONES

1. El rendimiento de los aceites esenciales obtenido de las hojas y tallos de *P. odorata* fue bajo, cantidad que limita los estudios que se desean realizar.
2. El análisis de la composición química realizado por CG-EM permitió la identificación de un elevado porcentaje de los compuestos, siendo los compuestos mayoritarios en el aceite esencial obtenido de las hojas los siguientes: α -pineno (35,15%), β -cariofileno (13,20%), óxido de cariofileno (12,10%), β -guaieno (10,10%) y de los tallos: trans metil eugenol (39,49%) y β -cariofileno (34,43%).
3. Los aceites esenciales obtenidos de las hojas y tallos de *P. odorata* no inhibieron el desarrollo de las bacterias de referencia internacional probadas en el presente estudio, resultado que contribuye con el conocimiento del estudio de la actividad antibacteriana de esta especie recolectada en Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R., (2007). Identificación de compuestos de aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas. 4ta Edición. Illions, Usa, pp. 1-804.
- Alarcón L., Peña A., Velasco J., Usubillaga A., Contreras B., Rojas L., Ramírez D., Aparicio R. (2016). Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espeletia schultzii* (Asteraceae) recolectada en el estado Trujillo-Venezuela.69-79.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales: estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela. Caracas. 165, 203, 206, 212-215, 246, 248.
- Briceño, B., Morillo, G. (2002). Catálogo abreviado de las plantas con flores de los páramos de Venezuela. Parte I. Dicotiledóneas (Magnoliopsida). *Acta botánica Venezuelica*.87.
- Briga J. (1962). *Los aromáticos en la industria moderna* Barcelona, España. 2ª edición. Editorial Sintet.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia*. España: Acribia.
- Cabrera, A. (1961). Compuestas Argentinas: Clave para la determinación de los géneros. *Revista Mus. Argent. Ci. Nat., Bernardino Rivadavia Instituto Nacional de Investigación*. 291-362.

Casellas, J.M (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev. Panm Salud Pública*. 519-528.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33 rd ed ed. **CLSI** supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; **2023**.

Deans, S. (1991). Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential (Volatile) Oils. *Modern Methods of Plant Analysis*, 12. 309-320

Díaz, G. (2010). *Plantas toxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Colombia: Universidad nacional de Colombia.

Florey, H. (1949). Antibiotics. *London: Oxford Medical Publications*. 580.

García, E., Ramírez, C., Matinéz, R., Flores, A., Del Rio, R., Martínez, M. (2015). Actividad antibacteriana de algunas especies medicinales de Eupatorium contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Revista Polibotánica*, 39. México.15-18.

González F., Hernández F., Rojas L., Araque M. (2015). Composición química y evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Kock. contra cepas bacterianas de referencia internacional. *Ciencia*.14-22.

Hurtado, J. (2010). *El Proyecto de Investigación. Comprensión Holística de la metodología y la investigación*. Caracas, Bogota: Quiron ediciones.

Jeon, H. (2010). Antiinflammatory activity of Taraxacum officinale. *Journal of Ethnopharmacology*. 82-8.

- Kerdudo, A., Gonnot,V., Ellong, E., Boyer, L., Chandre, F., Adenet, S., Rochefort, K., Michel, T., Fernandez, X. (2016). Composition and bioactivity of *Pluchea carolinensis* (Jack.) G. essential oil from Martinique. *Industrial Crops and Products* 89 (2016) 295–302.
- Lasser T. (1964). *Flora de Venezuela*, X. Edición Especial del Instituto Botánico. Caracas.
- Lawles, J. (1992). *The Encyclopedia of Essential Oils*. Inglaterra: element books.
- Levison, W. (2006). *Microbiología e Inmunología Médica*. España: Mc.Graw Hill.
- Macarulla, J., Goñi, F. (1994). *Bioquímica Humana*. Editorial Reverté. España: Barcelona.
- Madigan, M., Mortinko, J., Parker, J. (1999). *Brock biología de los Microorganismos*. Editorial Prentice Hall Iberia. España: Madrid.
- Miller, A., Cates, R., Lawrence, M., Soria, J., Espinoza, L., Martinez, J., Arbizú, D. (2014). The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. *Pharm Biol*, 2015; 53(4): 548–554.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Editorial Médica Panamericana. Argentina: Buenos Aires.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de Aceites Esenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana.

- Raid A., Yazeed A., Ayesha M., Rabbani S., Janardhan K., Gupta V.(2014). *Saudi J Biol Sci*.
- Reyes, F., Palou, E. (2012). Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 29-39.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., García, J. (2005). *Bacteriología General: principios y práctica de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica: San José.
- Stashenk, E. (2009). *Aceites esenciales*. Bucaramanga, Bogotá.
- Tripathi A., Upadhy S., Bhuiyan M., Bhattacharya P. (2009). *A review on prospectsof essential oils as biopesticide in insect-pest management. J. Pharmacognosy Phytother.*
- Van Ginkel, A. (2013). Apuntes del Master y diplomatura de postgrado de la UAB. *Plantas Medicinales y Fitoterapia*, 2. 235-236.
- Valero, A., Cadahia, A. (2002). *Polinosis: polen y alergia*. España: Mra ediciones, SL.
- Velasco, J., Araque, M, C., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A, C., Sánchez, K., y Velazco, E. (2008). *Manual Práctico de Bacteriología Clínica*. Mérida, Venezuela: Editorial Venezolana.
- Villanueva, J., Molina, A., Aluja, M., Analco, J., (2022). La química de las plantas y su uso. Instituto de Ecología. Veracruz, México.

- Villarroel H., Guzman W., Crescente O., Lanza J.(2015). *Aceite esencial de Wedelia calycina (ASTERACEAE): composición química, actividad antibacteriana y antifúngica*. Universidad de oriente. Cumaná, Venezuela.87-93.
- Villaseñor, J., Villarreal, J. (2005). El género *Pluchea* (Familia Asteraceae, tribu plhucheead en México). *Revista Mexicana en Biodiversidad*.59-65.
- Weng, Z., Alvarez, I., Diaz, O., Rodriguez, M., (2003). Recobrado de Salmonella sp. Conservada por método simple a temperatura ambiente. Instituto de Higiene, Epidemiología y microbiología (INHEM). Ciudad de La Habana, Cuba.
- Wollenweber E., Mann K., Arriaga F.J., Yatskievych G.: Flavonoids and terpenoids from the leaf resin of *Pluchea odorata*. *Z. Naturforsch.* 40c, 321–324 (1985).
- Yi Xin, L., Hui, T., Mohd Zin, P., Pulingam, T., Appaturi, J., Parumasivam, T., (2021). Antibacterial potential of Malaysian ethnomedicinal plants against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (2021) 5884–5889. Penang, Malaysia.