



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES  
“DR. ANTONIO MORALES MÉNDEZ”



## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don. EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

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

### **Autores:**

Angelica Paola Contreras Hernandez

C.I. V-26.098.408

Estefany Karina Ortega Plaza

C.I: V-26.862.644

**Tutor:** Dr. Alexis Buitrago

**Cotutor:** PhD. Janne Rojas

Mérida, julio de 2024

# Dedicatoria

Primeramente, a Dios, por ser el principio y el fin en todo lo que hago, por darme la vida, la salud y la sabiduría, por llenarme de fuerzas para vencer cada obstáculo, por escuchar mis oraciones, por cumplir mis sueños y por enseñarme a confiar en su plan.

A mis padres por darme la vida, es especial a mi amada madre **Mirelys Plaza** por ser mi motivación y fuente de inspiración, infinitas gracias por tu gran esfuerzo por asegurarme siempre la educación, es un regalo que siempre valorare, sin ti no lo había logrado.

A mis Hermanos **Arelis Ortega** y **Flavier Ortega** por siempre estar para mí como mis cómplices y amigos sé que siempre podré contar con ustedes.

A mi Sobrino **Thiago Sebastián** que es el mejor regalo que me ha dado la vida, espero siempre ser ejemplo de lucha y superación para ti.

A mi compañero de Aventuras, risas y llantos **Jansi Maldonado** por siempre incentivarme a seguir adelante, por estar a mi lado en momentos de cansancio, gracias por acompañarme a terminar este ciclo importante en mi vida y creer en mí incluso cuando yo no lo hacía.

A **Angelica Contreras** por ser la mejor amiga y compañera que la universidad me pudo regalar, gracias por todos estos años que compartimos vivencias y llegar juntas a la meta.

***Por ese amor incondicional que me han demostrado.  
¡Este logro y felicidad es también de ustedes!***

***Estefany Ortega***

# Dedicatoria

A **Dios**, todopoderoso, principio y fin de todas las cosas, quien es mi guía constante en cada paso de mi vida. Te agradezco por iluminar mi camino y por permitirme alcanzar este sueño tan anhelado. Sin tu amor y dirección, nada de esto sería posible.

A mis padres, **Jorge Contreras** y **Zuleima Hernández**, cuya dedicación incansable y amor incondicional han sido la base de mi fortaleza. Jorge, tu esfuerzo y sacrificio no han pasado desapercibidos; gracias por ser un ejemplo de perseverancia. Zuleima, tu apoyo constante y la seguridad que me brindas han sido fundamentales para alcanzar mis metas.

A mis hermanos, **Kary Contreras** y **Omar Contreras**, les agradezco profundamente por su apoyo incondicional en mi camino gradecida por tenerlos a mi lado, por ser mis cómplices en esta travesía.

A mi esposo **Daniel Briceño**, quien ha estado a mi lado a lo largo de estos años, te agradezco por ser mi pilar y testigo cercano de cada experiencia vivida en esta etapa. Tu amor y apoyo incondicional me han dado la fuerza necesaria para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles.

A mi compañera y amiga, **Estefany Ortega**, tu carisma y ánimo han sido una fuente de inspiración constante. Gracias por recordarme la importancia de rodearme de personas que me motiven y me impulsen a seguir adelante.

Sin su amor y apoyo este camino no habría sido el mismo, les dedico este logro con todo mi corazón.

*¡Gracias por ser parte de mi historia!*

**Angelica Contreras**

## Agradecimientos

Agradecemos primeramente a Dios por darnos siempre las fuerzas para continuar y permitirnos llegar hasta este punto de nuestras carreras. A la ilustre universidad de Los Andes por abrirnos sus puertas para formarnos profesionalmente, gracias a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por rodearnos de profesionales ejemplares y regalarnos los mejores años de vida estudiantil.

Agradecemos especialmente al Tutor **Dr. Alexis Buitrago** por su tiempo, esfuerzo, consejos y dedicación constante a lo largo de todo el proceso. Sus valiosas sugerencias y perspectivas han enriquecido enormemente este trabajo.

A la Cotutora **PhD. Janne Rojas**, le agradecemos su asesoramiento metodológico, su disposición para aclarar dudas y su apoyo en la estructuración de la tesis. Sus aportes han sido cruciales para mantener la coherencia y rigor de la investigación.

Extendemos el agradecimiento al Jurado Evaluador **Dr. Julio Rojas** por su tiempo y esfuerzo en la revisión de este trabajo. Sus comentarios y recomendaciones serán de gran valor para mejorar y enriquecer la calidad de la tesis.

Un sincero agradecimiento a todos nuestros amigos: **Jose P, Isley G. Betania M. Maria G, Maite Q, Froilana V, Enmanuel B, Jessica M, Vianca G, Marlubis R, Wilmer C, Nathaly V, Jessica P**, ustedes estuvieron con nosotras en los momentos de estrés, alegría y durante todo este largo camino. Su apoyo, confianza, motivación y cariño han sido invaluable para nosotras, gracias por siempre contribuir en nuestros ánimos de una u otra manera, ustedes son la familia que nos regaló la Universidad de Los Andes Dios los Bendiga.

**Con Cariño**

**Angelica Contreras y Estefany Ortega**



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES  
“DR. ANTONIO MORALES MÉNDEZ”



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL *Pluchea carolinensis* EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

**Autoría:** Angélica Paola Contreras Hernández C.I 26.098.408  
Estefany Karina Ortega Plaza C.I 26.862.644

**Resumen**

*Pluchea carolinensis* (Asteraceae), comúnmente conocida como salvia de playa es un arbusto de hasta 3 m, distribuida en regiones tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Australia. En Venezuela crece al sur del país y es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de resfriados, reumatismos, fiebres, dolores de cabeza y bronquitis. Entre los compuestos químicos presentes en la especie se encuentran los terpenoides, los cuales son activos frente a diferentes microorganismos. El presente estudio tiene como objetivo determinar la actividad de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de *P. carolinensis* y comprobar su efecto inhibitorio frente a cepas ATCC de referencia internacional. El mismo se llevó a cabo mediante la extracción del aceite esencial de las hojas de *P. carolinensis* por hidrodestilación y su posterior análisis utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La aplicación de esta técnica permitió la identificación de 12 compuestos entre los cuales se destacan los monoterpenos cíclicos (31,94%), sesquiterpenos cíclicos (29,33%), monoterpenos cíclicos oxigenados (24,70%) y sesquiterpenos cíclicos oxigenados (8,64%). El análisis químico por CG-EM para el aceite esencial de *P. carolinensis* permitió establecer la presencia de  $\alpha$ -pineno (37,07%), biciclo-germacreno (14,76%) 2,5 dimetoxi-*p*-cimeno (12,96%) y (E)-cariofileno (9,39%) como componentes mayoritarios, así mismo, se encontró en altas proporciones el timol; un compuesto poco común para la especie. Por otra parte, el ensayo para la actividad antibacteriana reveló su efecto frente *S. aureus* y *E. faecalis* con los valores de **CIM** de 300  $\mu$ L/mL y 500  $\mu$ L/mL respectivamente.

**Palabras claves:** *Pluchea carolinensis*, Aceite esencial, Actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

## ÍNDICE

<b>Dedicatoria .....</b>	<b>i</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>3</b>
<b>EL PROBLEMA .....</b>	<b>3</b>
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	4
Objetivos de la Investigación .....	4
Objetivo General .....	4
Objetivos Específicos .....	5
Alcances de la Investigación .....	5
Limitaciones de la Investigación .....	5
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>7</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7</b>
Trabajos Previos.....	7
Antecedentes Históricos .....	9
Antecedentes Teóricos .....	9
Aproximación teórica sobre los metabolitos secundarios de las plantas ....	9
Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios .....	10
Bases Teóricas.....	11
Familia Asteraceae.....	11
Género <i>Pluchea</i> .....	12
Especie <i>Pluchea carolinensis</i> .....	12

Usos Etnobotánicos .....	13
Metabolitos secundarios presentes en la especie <i>Pluchea carolinensis</i> .....	14
Aceite Esencial.....	14
Extracción por Destilación con Arrastre con Vapor .....	14
Características de los Aceites Esenciales .....	15
Obtención y Extracción de los Aceites Esenciales.....	15
Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales	17
Componentes de los Aceites Esenciales .....	18
<i>Monoterpenos</i> .....	19
<i>Sesquiterpenos:</i> .....	20
<i>Serie de compuestos aromáticos derivados del fenilpropano</i> .....	22
<i>Serie por degradación de ácidos grasos</i> .....	22
<i>Localización de los aceites esenciales en las plantas</i> .....	22
<i>Utilidad de los aceites esenciales</i> .....	23
Las Bacterias .....	23
<i>Bacterias Gram positivas</i> .....	24
<i>Bacterias Gram negativas</i> .....	25
Tinción de Gram.....	26
Tinción de Ziehl-Neelsen .....	26
Mecanismos de Resistencia Bacteriana .....	27
Susceptibilidad Antimicrobiana.....	28
<i>Método de difusión en agar con discos de papel</i> .....	28
<i>Antibiograma</i> .....	28
<i>Método de dilución en caldo o en agar</i> .....	29
<i>Método de la cinta o epsilómetro</i> .....	29
<i>Concentración mínima inhibitoria</i> .....	30
Definición de términos .....	30
<i>Fitoquímica</i> .....	30

<i>Aislamiento</i> .....	31
<i>Actividad antimicrobiana</i> .....	31
<i>Metabolitos secundarios</i> .....	31
<i>Compuestos volátiles</i> .....	31
Operacionalización de las variables .....	32
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>34</b>
<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>34</b>
Tipo de Investigación.....	34
Diseño de Investigación.....	34
Población y Muestra .....	35
Unidad de investigación .....	35
Selección y Tamaño de la Muestra.....	35
Sistema de Variables.....	36
Metodología de Investigación .....	36
Estudio de la actividad antibacteriana .....	36
Procedimiento de la Investigación .....	36
Recolección de la muestra vegetal .....	36
Determinación taxonómica de la planta.....	36
Selección, división y preparación del material vegetal .....	37
Obtención de los aceites esenciales por hidrodestilación e identificación .....	37
Separación e identificación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) .....	37
Actividad antibacteriana .....	38
Evaluación de los resultados .....	40
Diseño de análisis de los datos .....	40
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>41</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
Composición Química del Aceite Esencial de <i>Pluchea carolinensis</i> . .....	41



Actividad antibacteriana del aceite de <i>P. carolinensis</i> .....	45
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>49</b>
Conclusiones.....	49
Recomendaciones.....	50
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> <i>Pluchea carolinensis</i> (Heike Vibrans, 2006) .....	13
<b>Fig. 2</b> Estructura $\alpha$ -pineno (PubChem CID: 6654) .....	20
<b>Fig. 3</b> Estructura $\alpha$ -humuleno. ....	20
<b>Fig. 4</b> Ruta de biosíntesis del ácido mevalónico (Marcano y Hasegawa, 2002) .....	21
<b>Fig. 5</b> Bacteria Gram positiva (Montoya, 2008).....	25
<b>Fig. 6</b> Bacteria Gram negativa (Romero, 2007). ....	25
<b>Fig. 7</b> Tinción de Gram (Koneman y cols., 2001).....	26
<b>Fig. 8</b> Mecanismos de resistencia (Quintero, 2001).....	28
<b>Fig. 9</b> Estructura de los marcadores quimiotaxonómicos (pubchem 2024) ..	43
<b>Fig. 10</b> Estructura del Timol (PubChem CID: 6989).....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Descripción taxonómica de la especie <i>P.carolinensis</i> (Mondragon, 2009). ....	13
<b>Tabla 2.-</b> Operacionalización de variable. Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Pluchea carolinensis</i> .....	32

<b>Tabla 3.-</b> Operacionalización de variable. Composición del aceite de <i>Pluchea carolinensis</i> .....	33
<b>Tabla 4.</b> Composición química del aceite esencial de la especie <i>Pluchea carolinensis</i> .....	42
<b>Tabla 5.-</b> Marcadores quimiotaxonómicos .....	44
<b>Tabla 6.-</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Pluchea carolinensis</i> . .....	46

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

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad los productos naturales han sido utilizados para el tratamiento de distintas enfermedades, los cuales, fueron desplazados con la presencia de compuestos sintéticos. Sin embargo, en la actualidad ha sido retomado el uso de las plantas medicinales como una alternativa terapéutica, debido a los diferentes mecanismos de resistencia que han presentado los microorganismos frente a los fármacos.

Una planta de gran interés es *Pluchea carolinensis* perteneciente a la familia Asteraceae la cual posee un tallo tomentoso, hojas elípticas, ovadas u oblongas con base cuneadas, contienen sustancias como los metabolitos secundarios que aportan cualidades medicinales y también la usa la planta para protegerse de otros organismos vivos o de factores externos como altas temperaturas (Villaseñor y Villareal, 2006). Algunos compuestos como monoterpenos y sesquiterpenos del tipo eudesmano se pueden obtener realizando la extracción del aceite. Por otra parte, el flavonoide, quercetina y los ácidos caféico, clorogénico y ferúlico, forman parte de esta especie y se pueden obtener a través de los extractos. (Pérez y cols., 2007).

Para la búsqueda de compuestos con efectos terapéuticos sobre ciertas enfermedades que derivan de los microorganismos los productos naturales siguen siendo una fuente inagotable de compuestos bioactivos, destacándose los que se encuentran presentes en los aceites esenciales, los cuales poseen diferentes estructuras químicas bioactivas capaces de inhibir el crecimiento de diversas cepas bacterianas.

Los compuestos farmacéuticos como los antibióticos han presentado ineficacia frente a diferentes grupos bacterianos debido a los distintos mecanismos de resistencia que se presentan como consecuencia del uso indiscriminado de los fármacos. Por esto, es conveniente seguir investigando sobre la actividad antibacteriana de la especie *Pluchea carolinensis*.

En la presente investigación, se realizó la obtención del aceite esencial por hidrodestilación por arrastre de vapor utilizando una trampa de Clevenger en el laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales” ubicado en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, el cual se caracterizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Posteriormente, el contenido oleoso fue ensayado contra diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional para determinar la concentración mínima inhibitoria contra aquellas bacterias que mostraron susceptibilidad.

El presente manuscrito se encuentra estructurado de la siguiente manera: *Capítulo I:* El Problema que comprende el planteamiento, objetivos de la investigación tanto general como específicos, justificación, alcances y limitaciones de la investigación. *Capítulo II:* Marco teórico que contiene los antecedentes de la investigación, las bases teóricas que sustentan la presente investigación, definición de términos, operacionalización de las variables, hipótesis alternativa y nula. *Capítulo III:* Marco Metodológico en el que se describen el tipo, diseño de la investigación, la población y muestra, unidad de estudio, selección y tamaño de la muestra, sistema de variables, metodología de la Investigación y aspectos administrativos.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **Planteamiento del Problema**

Los productos naturales han sido la primera alternativa utilizada para tratar algunas patologías de origen microbiano. Además de ser empleados en el campo medicinal son de gran beneficio a nivel industrial y alimenticio. A nivel terapéutico, las plantas juegan un papel importante con la capacidad que poseen para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos gracias a la presencia de diversos metabolitos secundarios (Domingo y López, 2003).

El efecto antibacteriano se determinó con el aceite esencial obtenido por hidrodestilación por arrastre con vapor, el cual presentó gran interés por sus diversas propiedades biológicas, íntimamente relacionado a la presencia de los metabolitos secundarios (terpenos) que son productos de la degradación de lípidos, carbohidratos y proteínas con funciones de mantenimiento estructural en las plantas.

De igual manera, tienen una función protectora en las plantas para defenderlas de los ataques de animales herbívoros, de microorganismos patógenos, también para atraer polinizadores, entre otras.

Las aproximaciones teóricas que sustentan esta investigación establecen como influyen en la producción de los diferentes metabolitos secundarios los factores bióticos (plantas, animales, microorganismos) y abióticos (luz, temperatura, minerales, suelo y agua), además, su acción inhibitoria sobre el crecimiento de algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sepúlveda y cols., 2003).

Después de describir la situación actual del problema los autores de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico ¿Cuál es la correspondencia entre la actividad antibacteriana y el aceite esencial de las

hojas de *Pluchea carolinensis* en diferentes cepas de referencia internacional, actividad que se realizó en el laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis desde julio 2022 hasta julio 2024?

### **Justificación de la Investigación**

Un porcentaje de los medicamentos más utilizados en los últimos 20 años derivan directamente de plantas medicinales, otros, de los productos naturales químicamente modificados. Cabe mencionar que solo una pequeña proporción de las plantas con usos medicinales han sido estudiadas para conocer sus compuestos bioactivos. Además de resaltar su uso a nivel medicinal, la cual tiene importancia a nivel industrial y alimenticio. Por otra parte, los microorganismos han desarrollado con el pasar de los años distintos mecanismos de resistencia, produciendo diferentes cuadros clínicos que no son controlados con los fármacos existentes (Rivas y cols., 2016).

Por estas razones se realizaron estudios sobre la actividad antibacteriana de la especie *Pluchea carolinensis* ya que sus compuestos generaron efectos en esos microorganismos multirresistentes. Es por esta razón que los autores eligieron este tema de investigación considerando que en Suramérica y Venezuela existen pocos reportes en la literatura sobre estudios realizados en la especie *Pluchea carolinensis* a pesar de su gran potencial.

### **Objetivos de la Investigación**

#### **Objetivo General**

Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Pluchea carolinensis* en cepas de referencia internacional en el laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales”, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde julio de 2022 hasta julio de 2024.

## Objetivos Específicos

- Extraer el aceite esencial de las partes aéreas de *Pluchea carolinensis* por hidrodestilación por arrastre con vapor de agua
- Determinar los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de *Pluchea carolinensis* por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- Establecer la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pluchea carolinensis* por el método de difusión en agar con discos de papel según Kirby-Bauer.

## Alcances de la Investigación

Los alcances de la investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que los autores se proponen, en tal sentido, se considera la propuesta de Hernández-Sampieri y cols., 2010, quienes refirieren lo siguiente:

“Si hemos decidido, una vez hecha la revisión de la literatura, que nuestra investigación vale la pena y debemos realizarla, el siguiente paso consiste en visualizar el alcance que tendrá. No se deben considerar los alcances como tipos de investigación, ya que, más que ser una clasificación, constituye un continuo de causalidad que puede tener un estudio”.

Por lo tanto, ésta investigación tuvo un alcance relacionado con el grado de elaboración evaluativa, ya que el objetivo general propuesto, corrobora la relación entre la actividad antibacteriana en correspondencia con un criterio de análisis: el aceite esencial de *Pluchea carolinensis* en cepas de referencia internacional.

## Limitaciones de la Investigación

- a) En cuanto a las limitaciones de la investigación, es importante considerar los aspectos relacionados con las teorías y los trabajos previos que la sustentan. Estas limitaciones corresponden con las mencionadas por

Hernández-Sampieri, Fernández y Baptista, tales como: teóricas, técnicas y de presupuesto. Específicamente, en esta fase de proyecto existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de trabajos previos, pues se han encontrado pocos artículos actualizados. De igual manera, limitaciones para la adquisición de algunos reactivos debido a la crisis económica que se vive en el país, así como, los efectos postpandemia por el virus SARS-CoV-2 que ha afectado en estos últimos años la economía mundial.

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



## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Castillo y cols (2019) publicaron un artículo titulado: “Actividad antibacteriana de eudesmanólidos aislados de *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don.” Su objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana del sesquiterpeno eudesmanolido en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas aplicando el método de difusión en agar con disco de papel. De la planta recolectada en Panamá, prepararon los extractos con las hojas y tallos utilizando como solventes de extracción etanol (95% v/v) y agua, los cuales después de un tiempo de maceración fueron filtrados, concentrados en rotavapor y almacenados a -15°C hasta el momento de su análisis.

El tamizaje fitoquímico para todos los extractos reveló la presencia de alcaloides, carbohidratos, cumarinas, terpenos, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, compuestos fenólicos, saponinas y taninos, de igual manera, realizaron la caracterización de algunos grupos funcionales a través de la espectroscopía infrarroja. Por otra parte, el estudio para la sensibilidad antimicrobiana ensayada mostró un efecto bactericida a las concentraciones de 100, 80 y 60 mg/mL contra *Acinetobacter* spp y *Staphylococcus* spp. Mientras que el extracto acuoso no presentó halo de inhibición.

Entre otros autores que abordaron temas con semejanza, El-Shazly y cols (2022) realizaron un trabajo titulado: “LC-MS/MS profiles, antibiofilm, antimicrobial studies and kinetics of bacterial growth of extracts of *Pluchea dioscoridis*”, el cual tuvo como objetivo general comparar mediante Perfiles LC-MS/MS, antibiofilm, estudios antimicrobianos y cinética del crecimiento bacteriano en extractos de *Pluchea dioscoridis* en bacterias y hongos en el centro nacional de investigación de Egipto.

El estudio lo realizaron con los extractos de acetato de etilo y n-butanol donde se pudieron identificar 28 y 21 compuestos respectivamente; los cuales clasificaron como: ácidos fenólicos, ácidos orgánicos, flavonoides y derivados de la cumarina. Posteriormente, evaluaron la actividad antibacteriana en diferentes géneros bacterianos, tales como: *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis* y especies de *Clostridium*, dando como resultado que los extractos obtenidos con los diferentes solventes mostraron una actividad de amplio espectro, excepto el extracto acuoso que solo mostró una leve actividad contra del género *Clostridium*

Los autores Ninh y cols (2022) realizaron un estudio titulado: “Essential Oils of the Asteraceae Plants *Blumea riparia* DC. and *Pluchea pteropoda* Hemsl. ex Hemsl. Growing in Vietnam”. Esta investigación tuvo como objetivo analizar la actividad antimicrobiana y la composición química de los aceites esenciales de (Asteraceae) *Blumea riparia* y *Pluchea ptedorata*. Los aceites esenciales de las hojas y tallos fueron obtenidos mediante hidrodestilación utilizando una trampa de Clevenger y posteriormente analizados por cromatografía de gases con detector de ionización de llama acoplado a espectrometría de masas (GC/MS-FID).

En el aceite esencial de *B. riparia* lograron identificar 36 compuestos en su mayoría hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados. Mientras tanto en la *P. ptedorata* 31 compuestos predominando monoterpenos oxigenados e hidrocarburos sesquiterpenicos. Los resultados arrojaron que- el aceite de *Blumea riparia* mostró moderada actividad contra *Fusarium oxysporum* con un valor de CIM de 50 µg/mL, por otra parte, el aceite esencial de *Pluchea pteropoda* presentó actividad contra *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* a la **CIM** de 50 µg/mL.

Estos trabajos respaldan la investigación que se desarrolló, tomando como referencia el estudio para una planta de la especie de interés y dos plantas del mismo género. Reportando la presencia de los diferentes

metabolitos secundarios presentes en los extractos que obtuvieron en diferentes solventes de extracción, así como también su actividad contra diferentes cepas bacterianas.

### **Antecedentes Históricos**

El estudio con las plantas de la familia Asteraceae se inició 300 años a. C. de la mano de Teofrasto (372-288 a.C.), quien las describió en su obra de historia *Plantarum*. No obstante, la familia fue descrita con el nombre de *Compositae* por Paul D. Giseke en 1792. El código internacional de nomenclatura botánica permite también el uso del nombre *Asteraceae* Dumortier, nombre asignado en 1822 y que deriva del género tipo, *Aster*, término que significa estrella y hace alusión a la forma de la inflorescencia. Además, las contribuciones más importantes al conocimiento y la sistemática de la familia comienzan con el francés Henri Cassini a través de numerosas publicaciones durante el período 1812-1831 que incluyen descripciones muy detalladas de la morfología de las asteráceas (Katinas y cols., 2007).

### **Antecedentes Teóricos**

#### **Aproximación teórica sobre los metabolitos secundarios de las plantas**

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico con la producción de metabolitos secundarios (**MS**) provenientes de la degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas. Estas sustancias tienen la capacidad de inhibir la actividad bacteriana por su acción sobre la síntesis de la pared celular de los microorganismos. Por otra parte, poseen la capacidad de desarrollar estructuras como espinas, espigas y tricomas con acción sobre algunos depredadores (Sepúlveda y cols., 2003).

Los **MS** se clasifican en diversas estructuras químicas con participación en los procesos de adaptación de la planta a su ambiente, así como, su establecimiento de la simbiosis con otros organismos y la atracción de insectos polinizadores. La activación en la producción de los **MS** en las plantas es

propiciada frente a condiciones adversas: tales como: ataques por herbívoros ( artrópodos y vertebrados), presencia de microorganismos (virus, bacterias y hongos), la competencia por el espacio de suelo, exposición a la luz solar y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas (Sepúlveda y cols., 2003)

En la actualidad, los **MS** son utilizados en la industria farmacéutica para la elaboración de antitumorales, antiinflamatorios, antihipertensivos, antimicrobianos, entre otros. De igual manera, se utilizan en la industria cosmética para la creación de fragancias y tintes, presentan importancia a nivel agrícola para mejorar la productividad de las cosechas con la ayuda de algunos plaguicidas e insecticidas (Lustre, 2022).

A pesar de los avances tecnológicos en el campo de la investigación de los productos naturales, el estudio de los **MS** es mínimo en comparación con la diversidad de flora y fauna presente en el planeta (Lustre, 2022).

### **Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios**

Hoy en día, un amplio conocimiento acerca de la composición química de los productos naturales es un tema de gran importancia para la comunidad científica, la cual se encuentra en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento de numerosas patologías. La actividad biológica exhibida por los extractos de origen vegetal de las distintas especies de plantas es asociada con la presencia de un número importante de **MS** que en muchas ocasiones no han sido aislados, pero que permiten perfilar objetos de estudio para la obtención, identificación y evaluación de las diferentes actividades biológicas, entre las cuales se puede mencionar la actividad antimicrobiana (Camacho y cols., 2019).

En otro orden de ideas, en la literatura especializada existen publicados diversos trabajos sobre las propiedades químicas y posible actividad biológica de diversos **MS** presentes en las diferentes especies de las plantas del género *Pluchea*. En tal sentido, un reciente estudio reveló actividad biológica de los

compuestos presentes en las plantas pertenecientes a este género, de los cuales caben mencionar los siguientes: Lupeol con actividad contra *Plasmodium falciparum*, ácido 3-O-cafeoilquínico se le plantea actividad contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Micrococcus luteus*, a las concentraciones entre 80-660 µg/mL, catequina mostró actividad antimalárica, siringetina contra el virus de la hepatitis C, pithecolobina 1 y 2 ambos mostraron actividad contra *Bacillus subtilis*, *bonducelina* mostró actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes*, y *Chromobacterium violaceum* a una concentración de 100 µg/mL, kaempferol 3-Oglucósido o astragalina dicho compuesto mostró actividad contra *Trypanosoma cruzi* y contra el virus de la influenza A (H1N1), escopoletina exhibió actividad contra *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, (Macias y González, 2019).

Los tipos de metabolitos identificados o determinados en las diferentes plantas; son del tipo alcaloide, terpenos, flavonoides; entre otros, incluyendo diferentes subtipos; su acción deriva en el efecto letal o de inhibición contra las diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos (que afectan la salud y en algunos casos el sector agroindustrial) (Macias y González, 2019).

## **Bases Teóricas**

### **Familia Asteraceae**

Asteraceae es una de las familias de plantas más grandes, comprende más de 1900 géneros y 3200 especies aceptadas, distribuidas por todo el mundo, popularmente se conoce como: la familia del aster, la margarita, las compuestas o el girasol. La mayoría de sus miembros son plantas herbáceas, sin embargo, existe un número significativo de plantas que son arbustos, trepadoras y árboles, la mayor proporción de especies de la familia antes mencionada se encuentra en regiones áridas y semiáridas de latitudes subtropicales. En otro orden de ideas, las plantas pertenecientes a esta familia

producen **MS** de tipo flavonoides y terpenoides. Algunas de estas moléculas presentan propiedades biológicas como antiprotozoarios, antimicrobiano, antioxidantes, entre otros; razón por la cual esta familia de plantas tiene un potencial en la medicina (Doring, 2022).

### **Género *Pluchea***

El género *Pluchea* Cass. pertenece a la tribu Plucheeae (Asteraceae) diversos autores describen que este género incluye al menos 80 especies. La mayoría de las especies se encuentran distribuidas principalmente en el continente americano y la otra porción se encuentra en África, Asia y Australia. Además, la tribu Plucheeae, como se define actualmente, está constituida por 28 géneros que incluyen alrededor de 220 especies (Villaseñor y Villarreal, 2006).

### **Especie *Pluchea carolinensis***

La especie *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G Don (Fig. 1), es conocida comúnmente como salvia de playa pertenece a la familia Asteraceae Dumortier (ver Tabla 1). El botánico R. K. Godfrey (1952) llamó a esta especie *Pluchea odorata* (L.) Cass; sin embargo, Gillis (1977) discutió nuevamente su nomenclatura y llegó a la conclusión de que *P. odorata* era el nombre correcto del binomio tratado por Godfrey como *Pluchea purpurascens*, demostrando que el nombre correcto de este taxón era *Pluchea symphytifolia* (Mill.) Gillis. Pero años más tarde Khan y Jarvis (1989), realizaron una evaluación crítica de la literatura concerniente a esta especie y concluyeron que el nombre de *P. symphytifolia* (Mill.) Gillis y su basónimo *Conyza symphytifolia* Mill., son nombres mal aplicados en el género *Pluchea*, y son sinónimos de *Neurolaena lobata* (L.) Cass., una especie de la tribu Heliantheae. Por todo esto, Khan y Jarvis concluyeron que el nombre correcto de esta especie es *P. carolinensis* (Jacq.) G. Don y bajo este nombre debe ser conocido (Villaseñor y Villarreal 2006).



**Fig. 1** *Pluchea carolinensis* (Heike Vibrans, 2006)

**Tabla 1.-**Descripción taxonómica de la especie *P.carolinensis* (Mondragon, 2009).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Pluchea</i>
Especie	<i>P. carolinensis</i>

## Usos Etnobotánicos

La etnobotánica es el estudio de las relaciones que existen entre el hombre y el medio ambiente vegetal (Villaseñor y Villareal, 2006). Actualmente las plantas han sido utilizadas tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico; los países que conservan viva su utilidad son aquellos sub desarrollados, casi un 80% de la población ha utilizado las plantas como medida principal en remedios medicinales, sin embargo, un 25% de los fármacos han sido elaborados a partir de extractos vegetales (Schultes, 1941).

Para la utilización de las plantas en la medicina tradicional es importante conocer los principios activos presentes en las diferentes especies, en ese

sentido, los estudios etnobotánicos tienen como objetivo orientar la investigación farmacológica hacia aquellas plantas con un mayor uso tradicional y contribuir a que la industria farmacéutica identifique nuevos agentes terapéuticos con menor toxicidad y efectos secundarios. El hecho de que la especie *Pluchea carolinensis* no aparezca tratada ni mencionada en la citada farmacopea que es la más actualizada en datos etnobotánicos, fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos, refuerza el criterio de los autores sobre la necesidad de profundizar en las investigaciones fitoquímicas y farmacológicas de esta planta (Beyra y cols., 2004).

### **Metabolitos secundarios presentes en la especie *Pluchea carolinensis***

En la especie *Pluchea carolinensis* se han podido identificar mediante diferentes extractos la presencia de compuestos como: alcaloides, taninos, saponinas y terpenos, usándose comúnmente en la medicina tradicional como terapia para los dolores de cabeza, alergias, fiebres, dolores musculares. Así mismo, demuestran actividad biológica en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Castillo y cols., 2019).

### **Aceite Esencial**

Los aceites esenciales son productos obtenidos del reino vegetal, en los que se hallan concentrados sabores y aromas característicos. Están constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles. Los aceites esenciales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies (Martínez, 2003).

### **Extracción por Destilación con Arrastre con Vapor**

Es el método más común para la obtención de aceites esenciales, es un proceso de separación mediante el uso de vapor de agua, en el cual se evaporan los componentes volátiles de la materia vegetal (Villaverde, 2018).



## **Características de los Aceites Esenciales**

Los aceites esenciales (**AE**) son una mezcla compleja de hidrocarburos alicíclicos y aromáticos volátiles de bajo peso molecular, líquidos a temperatura ambiente y con olor pronunciado y penetrante. En el reino vegetal los **AE** se encuentran ampliamente distribuidos en aproximadamente 60 familias de plantas aromáticas y cumplen diversas funciones, tales como: protección contra insectos, acción antimicrobiana, reserva alimenticia, entre otras (Marcano y Hasegawa, 2018). Los **AE** posterior a su biosíntesis son almacenados en algunos reservorios ubicados en los pelos glandulares y/o canales esquizógenos que se encuentran en las hojas, flores, frutos, semillas y rizomas (Bilia y cols., 2014).

## **Obtención y Extracción de los Aceites Esenciales**

Los diferentes métodos de extracción utilizados para la obtención de los **AE** dependen de varios factores como: cantidad de muestra, estabilidad de los componentes, fuentes de energía, tiempo de extracción, rendimiento, entre otros. En base a esto, los componentes volátiles presentes en las plantas se pueden extraer mediante diversos métodos, a saber: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage, fluidos supercríticos y microondas (Peredo-Luna y col., 2009).

Las diferentes esencias de los cítricos se obtienen por el método de expresión, que consiste en estrujar el material vegetal hasta liberar el aceite. Por su parte, la destilación por arrastre con vapor de agua, utiliza la muestra vegetal fresca y cortada en trozos pequeños, colocada en un balón para destilación, sometida a una corriente de vapor de agua; los compuestos en fase de vapor son condensados, recolectados y separados de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada por la pureza del aceite obtenido, la sencillez en el manejo y mantenimiento de los instrumentos (Palá y cols., 2002).

Con relación al método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se coloca a macerar en contacto con algún solvente orgánico (alcohol, cloroformo, entre otros). Presenta como desventaja la obtención de la esencia combinada con ácidos grasos y ceras, además, la peligrosidad por la utilización de los solventes volátiles y la toxicidad a la exposición por el operador. Por su parte, el método de enflorado o enfleurage es una técnica costosa utilizada para obtener esencias de las flores, en donde, el material vegetal es cubierto con aceite vegetal y posterior al proceso de extracción con alcohol, se purifica empleando la destilación a presión reducida hasta obtener la esencia pura y recuperar el solvente.

Con respecto al método de extracción con fluidos supercríticos, la muestra finamente dividida, licuada o molida, se coloca empacada en una cámara de acero inoxidable a la cual se le hace circular un líquido supercrítico (dióxido de carbono), lo que permite solubilizar y arrastrar las esencias libres del solvente, que se elimina por descompresión progresiva cuando alcanza la presión a la temperatura ambiente. Finalmente, se tiene la extracción asistida por microondas, técnica que combina el calentamiento por radiación y la destilación en seco, su mayor ventaja radica en la alta eficiencia energética para calentar el material vegetal y lograr una baja resistencia para la transferencia de masa.

El equipo utilizado es un extractor cerrado, donde se sumerge la materia prima molida en el disolvente, colocado dentro de un horno para microondas, el cual está conectado a un condensador y un envase colector para el aceite. Los rendimientos conseguidos son similares a la hidrodestilación, pero el tiempo de operación es mínimo y el análisis cromatográfico revela una composición ligeramente diferente a la de los aceites esenciales obtenidos por métodos convencionales (Peredo-Luna y cols., 2009; Palá y cols., 2002).

## Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales

En la actualidad el análisis de la composición química de los **AE** se realiza acoplando un método de separación con un sistema de detección. En ese sentido, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), permite en forma simultánea separar mezclas complejas de compuestos volátiles, así como también, identificar las estructuras presentes a partir de los diferentes índices de Kovats (IK) (Marcano y Hasegawa, 2002).

La técnica de CG-EM requiere que la muestra térmicamente estable se volatilice a una temperatura inferior a 250°C, para luego comenzar la separación en la columna cromatográfica. Los compuestos eluidos, son identificados por espectrometría de masas, la cual fragmenta las moléculas e identifica en virtud de la relación masa/carga ( $m/z$ ). Este sistema de detección se conecta a un registrador que genera un cromatograma con los picos de elución de los diferentes componentes del aceite y sus respectivos tiempos de retención (Skoog y Leary, 1994).

Los IK, permiten la caracterización de componentes de una mezcla problema, basándose en la comparación entre la posición del pico de la muestra y los picos de una serie de alcanos de cadena lineal. Los IK asignan un valor de 100 veces el número de carbonos de cada uno de los hidrocarburos lineales. De esta forma, cuando se realiza la separación de una serie homóloga de n-hidrocarburos, las fuerzas intermoleculares son relativamente constantes y la separación está controlada fundamentalmente por las diferencias en la presión de vapor (Valcárcel, 1994).

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 en función a los índices de Kovats.

Para un compuesto que eluye entre las parafinas de (n) y (n+m) átomos de carbono, el IK viene dado por la expresión:

$$li = \frac{100n + 100m [\log(t'R)_i - \log(t'R)_n]}{\log(t'R)_{n+m} - \log(t'R)_n}$$

En donde:

li= índice de Kovats del compuesto

i(t'R)= tiempo de retención reducido del compuesto i y de las parafinas de (n) y (n+m) átomos de carbono.

### **Componentes de los Aceites Esenciales**

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados. Ej: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico y se les cataloga como terpenos: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y carotenos (C40). Es posible encontrar en los aceites, derivados del fenil propano y compuestos formados por la degradación de ácidos grasos.

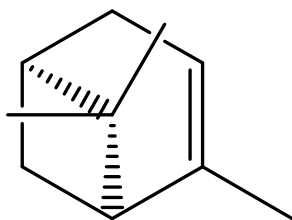
Se conoce que el ácido mevalónico es el precursor de los terpenos ( ver Fig. 4); éste se forma por la condensación de los tioésteres del ácido acético por medio de la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa (HMG-CoA sintetasa); el producto será la formación del acetoacetato, que a través de una reacción química de condensación aldólica de éste con una molécula de acetilcoenzima A catalizada por la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que efectúa la reducción NADPH dependiente de la (HMG-CoA reductasa) a ácido 3R-mevalónico (MVA). De manera más simple se puede decir que el ácido mevalónico se origina por deshidratación y descarboxilación simultánea que es ayudada por la fosforilación del OH en el C-3 de la molécula. En esta etapa se produce

isopentenilpirofosfato (IPP), el cual se equilibra con dimetilalilpirofosfato (DMAPP) por pérdida de hidrógeno y ganancia del grupo metilo. Ambos compuestos conformarán los terpenoides al sucumbir a varias condensaciones sucesivas. Así, por ejemplo, para que se originen los monoterpenos debe ocurrir la condensación de DMAPP e IPP, de la última unidad la pérdida del H sobre el C-2 origina la unión trans (geranilpirofosfato (GPP)). A su vez el GPP se condensa con una unidad de IPP formando de esta manera el farnesilpirofosfato (FPP), precursor de los sesquiterpenos. Para biosintetizar diterpenos debe ocurrir una reacción de condensación entre una unidad de FPP con una unidad de IPP, de este modo se formará el precursor de los diterpenos que es el geranilgeranilpirofosfato (GGPP). La formación de los triterpenos, esteroides y carotenos provienen del escualeno y del fitoeno. Formación del ácido mevalónico (MVA) a partir de la acetil-CoA y la acetoacetil-CoA, en la cual se forma al final el dimetil alil pirofosfato (DMAPP) y isopentenil pirofosfato (IPP); representa esquemáticamente la vía del mevalonato y el origen de los diferentes terpenos, con la formación de los precursores de cada tipo, respectivamente (Marcano & Hasegawa 1991)

### **Monoterpenos**

Son biogénicamente derivados de dos unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos, plantas, microorganismos e insectos; algunos tienen funciones específicas en el individuo, otros presentan actividades biológicas de distinta naturaleza.

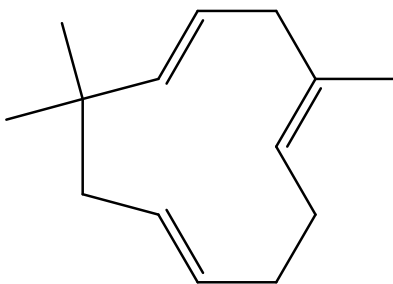
Existen varios tipos estructurales de monoterpenos (Fig. 2), los esqueletos regulares que son aquellos que siguen la regla del isopreno y los esqueletos irregulares, en los cuales no se mantiene la secuencia de los carbonos que conforman los dos fragmentos de isopreno unidos "Cabeza-Cola", y se pueden generar por, pérdida de átomos de carbono, reordenamientos del esqueleto y unión anormal de los monómeros. (Marcano & Hasegawa 1991).



**Fig. 2** Estructura  $\alpha$ -pineno (PubChem CID: 6654)

### Sesquiterpenos:

Aunque contienen sólo 15 átomos de carbono, presentan una gran diversidad esquelética como resultado de la facilidad de rearreglarse que tienen estas estructuras. Al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones posteriores, incrementan su tamaño lo que explica que estén descritos más de un millar de compuestos, relacionados con una centena de esqueletos; tales como (Fig. 3):  $\alpha$ -humuleno, germacreno,  $\alpha$ -cadinol (Marcano & Hasegawa 1991).



**Fig. 3** Estructura  $\alpha$ -humuleno.

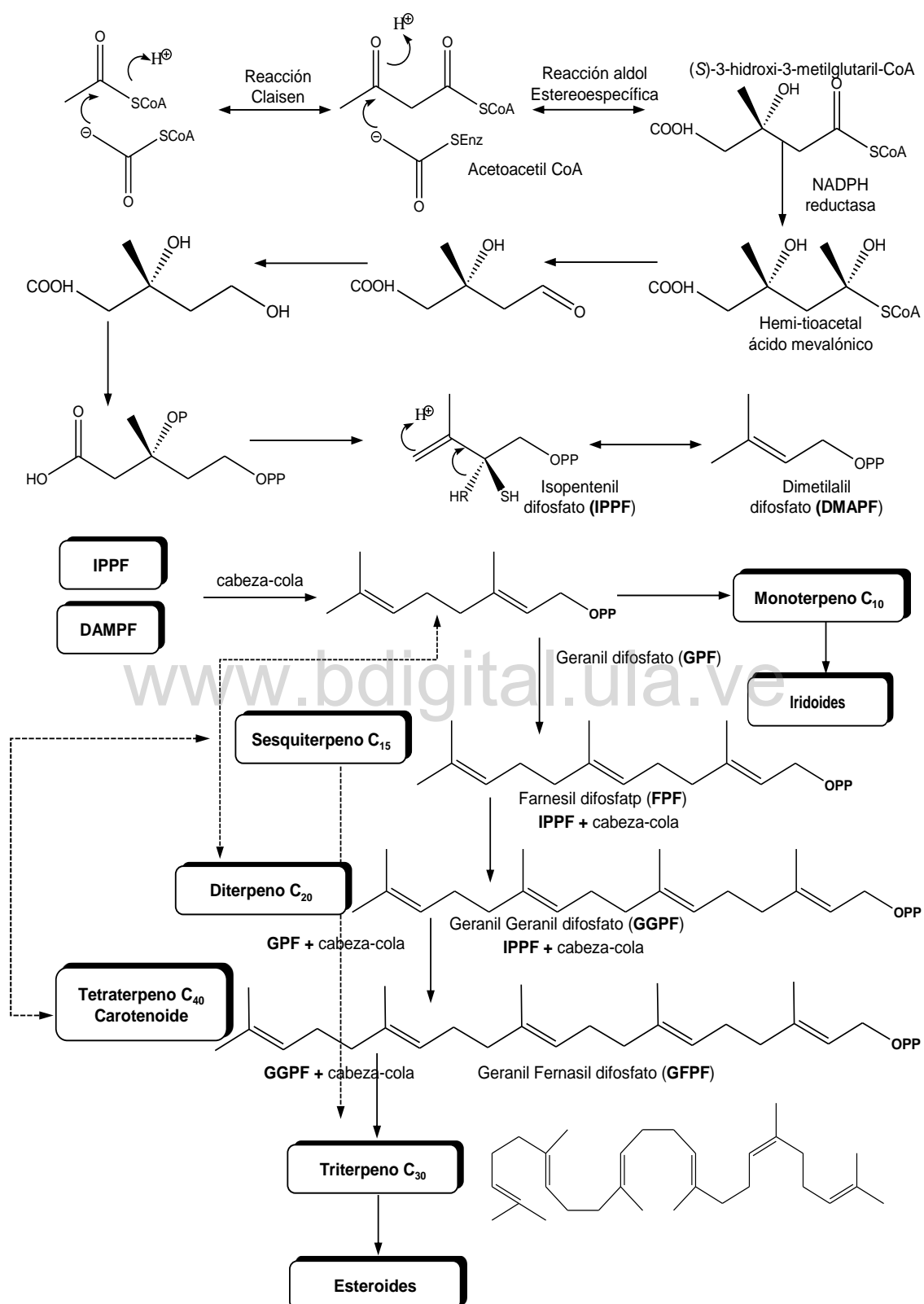


Fig. 4 Ruta de biosíntesis del ácido mevalónico (Marcano y Hasegawa, 2002)

### **Serie de compuestos aromáticos derivados del fenilpropano**

Estos se forman a través de la ruta del ácido shikímico, el cual es formado a partir del fosfoenol-piruvato más la eritrosa-4-fosfato, que por una secuencia enzimática que incluye rearrreglos intermoleculares forman dicho ácido.

Este da origen al ácido prefénico, éste a la fenilalanina y ésta al ácido cinámico. Los componentes de esta ruta encontrados en las esencias están formados por un anillo de seis miembros y una cadena de tres carbonos, son los más abundantes dentro de su clase. Ejemplo: Eugenol del aceite del Clavo, la Miristicina, la cual es el principio aromático de la nuez. A muchos de estos compuestos les son atribuidas propiedades psicotrópicas. (Marcano y Hasegawa 1991)

### **Serie por degradación de ácidos grasos**

Existen ciertos compuestos aromáticos como los aldehídos, cetonas, ácidos o alcoholes con cuatro o cinco átomos de carbono, que son formados por la degradación de ácidos grasos y se encuentran principalmente en los frutos. (Marcano & Hasegawa 1991)

### **Localización de los aceites esenciales en las plantas**

Las esencias pueden encontrarse en animales y en las plantas. En estas últimas se depositan en estructuras secretoras especializadas, como:

- a) Glándulas monocelulares, están formadas por una sola célula en la cual la esencia se encuentra bien protegida. Ejemplo en las familias Magnoliaceae, Canelaceae, Monimiaceae.
- b) Glándulas pluricelulares, las cuales están formadas por varias células, entre estas se tienen:
  - Glándulas pluricelulares aéreas o epidérmicas. Ejemplo en las familias Labitae, Solanaceae y Compositae.



- Glándulas pluricelulares internas que a su vez se dividen en:  
*F Esquizogenas*: como en las Coníferas. *Esquizolisígenas*: como en las Rutaceae y Myrtaceae

Pueden formarse directamente en el protoplasma, por descomposición de la capa resinógena de la pared celular o por hidrólisis de ciertos glicósidos. En las Coníferas pueden encontrarse aceites volátiles en todos los tejidos; en las rosas y pétalos únicamente aparecen en cantidades apreciables, en la canela sólo están en la corteza y en las hojas; en las Umbelíferas sólo en el pericarpio; en las mentas se encuentran en los leños de los pelos glandulares de las ramas y las hojas; en el naranjo, existe un tipo de esencia en los pétalos de las flores y otro en la cáscara del fruto (Marcano & Hasegawa 1991)

### **Utilidad de los aceites esenciales**

La función del aceite esencial en la planta no se conoce bien. Probablemente el aroma de las flores atrae o repele a ciertos insectos ayudando así a la fertilización. Los aceites de las raíces, leño y hojas tal vez protegen contra plantas parásitas y depredadores. También sirven de reserva alimenticia de la planta o como precursores de otros componentes y provocando la pérdida de humedad, evitando la muerte de la planta (Marcano & hasegawa 1991).

### **Las Bacterias**

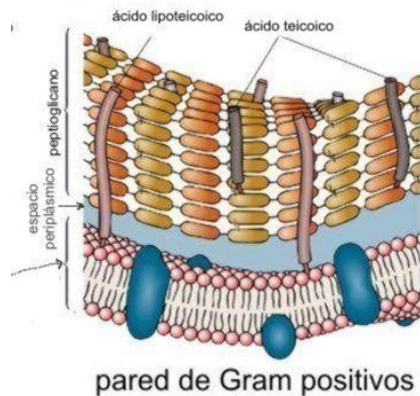
Son microorganismos procariotas con estructuras sencillas unicelulares, no poseen membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplasmático. Existen dos formas básicas de pared celular en las bacterias, una pared celular gruesa con capa de peptidoglucano y otra con pared celular delgada con menor cantidad de peptidoglucano. También algunas bacterias carecen de pared celular y sobreviven en el interior de células del hospedador.

Las bacterias se pueden clasificar de manera preliminar tomando en cuenta su tamaño (1 a 20  $\mu\text{m}$ ), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (aisladas, cadenas, formando acúmulos). Sin embargo, su clasificación definitiva toma en cuenta propiedades fenotípicas y genotípicas. Dentro de las cualidades fenotípicas se describen morfologías microscópicas y macroscópicas como la capacidad de retención de la tinción de Gram, la propiedad hemolítica que puedan presentar las bacterias y también el patrón de sensibilidad a distintos antibióticos, estas características morfológicas permiten realizar una identificación provisional del microorganismo.

Cabe resaltar que las propiedades genotípicas son más precisas para la clasificación de las bacterias, se puede realizar mediante el uso de sondas para localizar unas secuencias específicas en los ácidos nucleicos que son características de un género, especie o subespecie y así definir la identidad exacta de la cepa. (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

### **Bacterias Gram positivas**

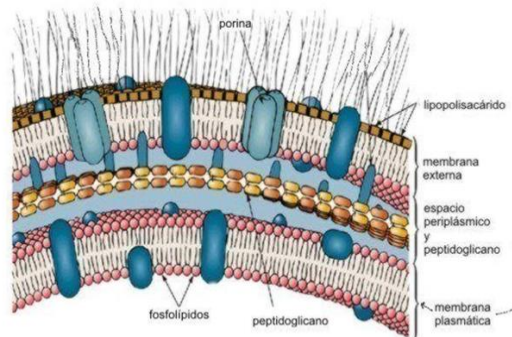
Una bacteria Gram positiva posee una pared celular gruesa que contiene varias capas conformadas en su mayoría por peptidoglucano. El peptidoglucano es un exoesqueleto con forma de malla y lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática, este elemento es muy importante en la estructura bacteriana para la replicación y supervivencia de la célula. Así mismo estas bacterias poseen también otros componentes como los ácidos teicoicos, lipoteicoicos, y polisacáridos complejos. La proteína M es característica en los estreptococos y la proteína R en los estafilococos (Fig. 5) (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).



**Fig. 5** Bacteria Gram positiva (Montoya, 2008).

### **Bacterias Gram negativas**

Son microorganismos más complejos que las bacterias Gram positivas, desde el punto de vista estructural estas solo contienen una delgada capa de peptidoglucano la cual solo representa del 5% a 10% del peso de la pared celular. La pared celular Gram negativa no contiene ni ácidos teicoicos ni lipoteicoicos, pero contiene una membrana externa que solo es exclusiva en este tipo de bacterias y tienen como función mantener la estructura externa bacteriana, esta zona externa está conformada principalmente por lipopolisacárido, que también es conocido como endotoxina (Fig. 6) (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).



**Fig. 6** Bacteria Gram negativa (Romero, 2007).

## Tinción de Gram

El médico danés Hans Christian Gram desarrolló la técnica más importante de tinción bacteriológica. Este procedimiento ahora llamado tinción de Gram (Fig. 7), demostró dos categorías generales de bacterias unas se teñían de color azul y las otras de rojo. Las bacterias coloreadas de azul son conocidas como Gram positivas, y las que adquieren una tonalidad roja como Gram negativas. Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias (Rodríguez y Arenas, 20018). Las bacterias Gram positivas contienen una capa gruesa de peptidoglucano que tiene forma de malla y rodea la célula y es allí donde queda atrapado el colorante, a diferencia de las Gram negativas que contienen esta capa de peptidoglucano en menor proporción siendo incapaces de retener el colorante (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).



**Fig. 7** Tinción de Gram (Koneman y cols., 2001).

## Tinción de Ziehl-Neelsen

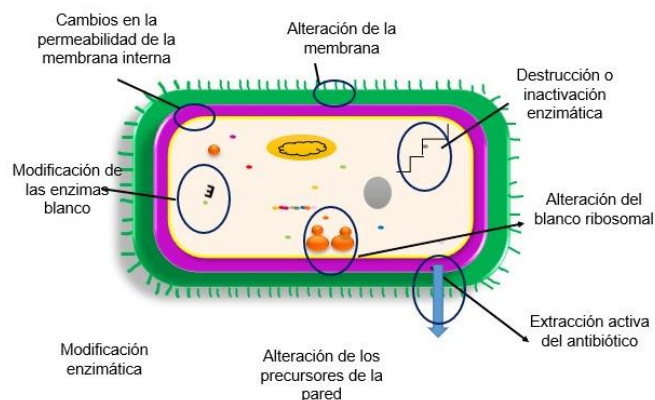
Es una técnica usada comúnmente para el diagnóstico de tuberculosis. Esta tinción permite diferenciar a las bacterias en dos grupos: aquellas que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellas que no lo son. Cabe resaltar que posee una sensibilidad para identificar bacilos acido-alcohol resistentes del 74% y una especificidad del 98%. Las bacterias que son coloreadas con esta tinción contienen en su estructura ácidos micólicos

que contienen gran afinidad con el colorante empleado en esta técnica, estos ácidos le confieren una barrera hidrofóbica al microorganismo, por lo cual se emplea el calor durante la tinción para solubilizar las ceras y permitir la entrada del colorante, una tinción positiva es aquella en la que se observan bacilos ácido-alcohol resistentes, los cuales son de color rojo-fucsia. (Jácome y cols., 2014).

### **Mecanismos de Resistencia Bacteriana**

Las bacterias pueden presentar mecanismos de resistencia naturales (Fig. 8), adquiridos o transmisibles, cabe resaltar que los dos últimos son los de más relevancia debido a que estas modificaciones alteran el punto diana donde actúan los antibióticos impidiendo que los diferentes fármacos tengan efectos. Entre estos mecanismos se destacan cuatro principalmente, a saber

- a) Enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos, impidiendo así que ejerza su acción antibacteriana sobre el microorganismo.
- b) Alteración del sitio activo, donde se diferencia un aminoácido y disminuye la afinidad de unión con el antimicrobiano.
- c) Resistencia cuando cambian su diámetro o el número de porinas para bloquear el ingreso del antimicrobiano esto es conocido como disminución de la permeabilidad de la pared celular.
- d) Efecto de las bombas eflujos que transportan al antimicrobiano sin modificarlo hacia el exterior de la célula, pero sin reacción antimicrobiana (Moreno y cols., 2009)



**Fig. 8** Mecanismos de resistencia (Quintero, 2001).

## Susceptibilidad Antimicrobiana

En la actualidad existen un número importante de bacterias que han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia a la acción de los diferentes agentes antimicrobianos, siendo necesario establecer mecanismos para predecir la susceptibilidad utilizando varios procedimientos analíticos (Velazco y Araque, 2008). Entre los métodos más utilizados se tienen:

### Método de difusión en agar con discos de papel

Es un método muy utilizado por su sencillez, se realiza mediante una técnica que consiste en la siembra de una bacteria en la superficie de una placa, sobre ella se depositan unos discos de papel que están cargados de una cantidad específica de antibiótico, se llevan a incubar por 18 horas a 37°C. El microorganismo crece en la superficie de la placa, pero alrededor de los discos se forman unos halos de inhibición, el tamaño de estos halos dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo (Prats, 2006).

### Antibiograma

ATB Rapid (por sus siglas en inglés), es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios para determinar la susceptibilidad de una bacteria frente a un grupo de antibióticos (Velazco y Araque, 2008). El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de cromatografía de placa fina (TLC) seleccionar la fase móvil que dé mejor separación, posteriormente esta

placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja en reposo durante 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; posteriormente se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium (Ramírez y Marín, 2009).

### **Método de dilución en caldo o en agar**

Es una prueba de sensibilidad en caldo, puede realizarse en tubo (macro-método) o en micro-placa (micro-método). 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 las 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 germen problema que proviene de un cultivo de no más de 24 horas de incubación. Se estandariza esa suspensión con el patrón de McFarland (equivalente a  $10^{6-8}$  UFC/mL). Se realizan diluciones seriadas del antimicrobiano a probar desde 100 µg /mL hasta 0,4 µg/mL en una serie de diez (10) tubos que contengan igual cantidad de caldo de Muller-Hinton. El tubo número 10 no posee antibiótico y sirve como control de crecimiento. Se agrega un mililitro de la suspensión de  $10^{6-8}$  UFC/mL a la serie de tubos y se incuban a 37°C, observándose el crecimiento entre las 18-24 horas (Negroni, 2009).

### **Método de la cinta o epsilómetro**

EtestR (por sus siglas en inglés), es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana, sencillo y con una buena correlación al compararla con la técnica estándar de dilución. Es una prueba que consiste en una tira de plástico no poroso de cinco cm de largo por cinco cm de ancho a lo largo de la cual se dispone un gradiente predefinido y

señalado en la tira de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Una vez que se ha sembrado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre la superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte de plástico hasta el agar, creándose de este modo alrededor y a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano (Prats, 2006).

### **Concentración mínima inhibitoria**

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se define como la concentración más baja de un fármaco que inhibe el crecimiento visible de un organismo después del periodo de incubación (este periodo se extiende más para organismos anaeróbicos, que requiere una incubación más prolongada). Clásicamente CIM de un antibiótico se determina utilizando un riguroso procedimiento, incluyendo una serie de diluciones del antibiótico en (agar o caldo cultivo) en los cuales se inocula los microorganismos y se evalúa el crecimiento (Montaño y cols., 2010).

### **Definición de términos**

#### **Fitoquímica**

La fitoquímica es el estudio de los componentes químicos que poseen las plantas, la técnica más utilizada para la obtención de estos principios activos es la extracción, que tiene como finalidad la separación de la materia soluble (componentes fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble). El estudio de los componentes químicos abarca su estructura química, metabolismo, distribución natural, función biológica, extracción y evaluación cuali-cuantitativa. Así mismo, esta rama de la ciencia tiene importancia en la industria farmacéutica y la biotecnología vegetal (Flores y cols., 2014).



## **Aislamiento**

Aislar es el proceso de separar un tipo de microorganismo de una población heterogénea de microorganismos. En las muestras clínicas rara vez se encuentra un solo tipo de microorganismo por lo cual es importante y necesario realizar alguna técnica que permita separar e identificar el microorganismo de interés, el objetivo del aislamiento es conseguir colonias separadas y obtener un cultivo puro (Valera, 2018).

## **Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población de microorganismos o para eliminarla y se puede expresar cuantitativamente con pruebas *in vitro*, se puede medir en concentración mínima inhibitoria o en concentración bactericida mínima y permite comparar diferentes compuestos. (Fica, 2005).

## **Metabolitos secundarios**

Las plantas cuentan con metabolitos secundarios que les permiten producir y almacenar diversos compuestos químicos los cuales son importantes en la adaptación al estrés ambiental y en la defensa frente a predadores y patógenos. Algunos de ellos solo se encuentran en un género o especie en particular. Los metabolitos secundarios se clasifican de manera diferente según su estructura, función y biosíntesis, se pueden agrupar en tres grandes grupos según su clase química: Terpenoides, fenólicos y alcaloides (Lustre, 2022).

## **Compuestos volátiles**

Son todos aquellos hidrocarburos que se presentan en estados gaseosos a temperatura ambiente, generalmente de bajo peso molecular. Estos compuestos volátiles pertenecen a varias clases químicas, a saber: alcoholes, éteres u óxidos, aldehídos, cetonas, esteroides, aminas, amidas y fenoles (Dhifi y cols., 2016).

## Operacionalización de las variables

Las variables de una investigación (Ver Tabla 2,3) se operacionalizaron con el fin de transformar los conceptos abstractos en empíricos, para tal fin se utilizaron las bases teóricas, las cuales permitieron reconocer los indicadores que revelan la presencia de la variable, por lo tanto, se relacionaron la definición conceptual y la definición operacional, con el propósito de identificar las dimensiones y los indicadores específicos (Espinosa y Eudaldo, 2019).

**Tabla 2.-Operacionalización de variable. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pluchea carolinensis***

1.Variable	2. Tipo de variable	3.Defincion Conceptual
Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Pluchea carolinensis</i>	Dependiente y discreta	La actividad antibacteriana es la capacidad que tiene una sustancia para inhibir o destruir un microorganismo patógeno (Sánchez y cols., 2016).
4.Definicion Operacional	5.Dimensiones	6. Indicador
Se determino mediante el método de difusión en agar con disco. (García y cols., 1995)	Presencia de la actividad antibacteriana en la especie <i>Pluchea carolinensis</i> Ausencia de la actividad antibacteriana en la especie de <i>Pluchea carolinensis</i>	Lectura de los halos de inhibición

(Contreras, Ortega y Buitrago 2023)

**Tabla 3.-Operacionalización de variable. Composición del aceite de *Pluchea carolinensis*.**

1.Variable	2. Tipo de variable	3.Definición Conceptual
Metabolitos secundarios del aceite esencial de la especie <i>Pluchea carolinensis</i>	Independiente	Componentes volátiles de bajo peso molecular, obtenidos por hidrodestilación con arrastre de vapor presentes en las plantas aromáticas (Taiz y Zeiger, 2002)
4.Definición Operacional	5. Dimensiones	6.Indicador
Se determinó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). (Taiz y Zeiger, 2002)	Monoterpenos y sesquiterpenos alifáticos, cíclicos y oxigenados presentes o ausentes en el aceite esencial de la especie <i>Pluchea carolinensis</i>	Comparación de los índices de Kovat's y la base de datos NIST

(Contreras, Ortega y Buitrago 2023)

www.bdigital.ula.ve

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### Tipo de Investigación

Hurtado (2010) refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio, es decir, lo que se quiere saber. Esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso de la investigación, en consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un resultado. Específicamente, durante esta investigación se quiso saber si hay relación entre los elementos del evento de estudio, es decir, la probable relación entre los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *Pluchea carolinensis* y la actividad antibacteriana sobre cepas de referencia internacional. Por lo tanto, este trabajo se vinculó con una investigación evaluativa.

#### Diseño de Investigación

Para la recolección de los datos se requirió de un diseño de investigación representado por las estrategias pertinentes. Al respecto, Hurtado (2012), refirió que tales estrategias están representadas por el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se quiere recolectar. Específicamente, el dónde en esta investigación está representado por el laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por lo tanto, el diseño fue de laboratorio. Respecto al cuándo, el diseño fue contemporáneo y evaluativo, ya que la información se recolectó en el presente y una sola vez en cada unidad de investigación. En cuanto a la amplitud de la información, el diseño fue multivariable, de la información relacionada con el aceite esencial de la *Pluchea carolinensis* y la actividad antibacteriana.

## **Población y Muestra**

### **Unidad de investigación**

Hernández y cols. (2010), refieren que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga. Una vez conocido en lo citado al principio, la población a estudiar fue finita, integrada por las hojas de la planta *P. carolinensis*, las cuales fueron recolectadas en la población de la Carbonera del municipio Michelena en el estado Táchira y procesadas en el laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales” ubicado en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Por su parte, el estudio antibacteriano se realizó utilizando cepas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional conservadas bajo refrigeración a la temperatura de 4°C.

### **Selección y Tamaño de la Muestra**

Los instrumentos que se utilizaron para la obtención de la información debieron ser aprobados por los expertos, con el objetivo de determinar la validez del contenido. De hecho, se estima que la eficacia constituye el procedimiento que permite establecer la consistencia interna de los instrumentos en cuanto a lo que se propone medir, de ahí se dice que la validez, se refiere al grado en que un instrumento realmente mide la variable (Hernández y cols., 2010).

Para la obtención del aceite esencial de *P. carolinensis*, se tomó una muestra representativa de las hojas. Por otra parte, para el estudio de la actividad antibacteriana se utilizaron las cepas de referencia internacional: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), repicadas en un medio de cultivo apropiado y comparada su turbidez con el patrón de referencia de McFarland

N°1 ( $1 \times 10^{6-8}$  UFC/mL). Todas las cepas son conservadas en el laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### **Sistema de Variables**

Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación fueron las siguientes: variable dependiente (**VD**): Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pluchea carolinensis*, variable independiente (**VI**): Metabolitos secundarios del aceite esencial de la especie *Pluchea carolinensis*. Estas variables correspondieron a los núcleos semánticos del problema de investigación y a la vez, permitieron la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

### **Metodología de Investigación**

#### **Estudio de la actividad antibacteriana**

Con los procedimientos que se realizaron, se determinaron ciertos patrones relacionados con el evento de estudio de la especie *Pluchea carolinensis*, los cuales permitieron conocer la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial sobre las cepas bacterianas de referencia internacional.

### **Procedimiento de la Investigación**

#### **Recolección de la muestra vegetal**

La muestra vegetal de *P. carolinensis* se recolectó en el sector la Carbonera del municipio Michelena en el estado Táchira, ubicado a 1200 m s. n. m. ( $7^{\circ}56'30''$  N- $72^{\circ}14'33''$  W).

#### **Determinación taxonómica de la planta**

La especie recolectada de *P. carolinensis* fue identificada por el Dr. Pablo Meléndez. Una muestra testigo se depositó en el Herbario “Dr. Luis Ruíz

Terán” (MERF), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes bajo el código JR 62.

### **Selección, división y preparación del material vegetal**

Se seleccionó una cantidad suficiente de las hojas que se encontraban en mejor estado para la obtención del aceite esencial.

### **Obtención de los aceites esenciales por hidrodestilación e identificación**

El estudio de los componentes volátiles presentes en *Pluchea carolinensis* se realizó en el Laboratorio B de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión del Dr. Alexis Buitrago. El material vegetal se cortó en pequeños trozos y licuó, para luego colocar la solución obtenida en un balón de destilación de 2 litros junto a 2/3 de su capacidad con agua. La suspensión acuosa del material botánico, se sometió a ebullición durante al menos 2 horas; depositándose el aceite obtenido en un reservorio tipo trampa de Clevenger. El aceite recolectado se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua, posteriormente el líquido obtenido se trasvasó a un recipiente de color ámbar rotulado y se conservó bajo refrigeración a 4°C.

### **Separación e identificación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)**

La separación e identificación de los diferentes componentes volátiles por CG-EM se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, con la colaboración del Dr. <sup>†</sup>Luis Rojas y la Dra. Rosa Aparicio.

El estudio se realizó utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5973 serie II, equipado con columna capilar HP-5 MS con las siguientes características: 30 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno, espesor de pared de 0,25 µm. Utilizando como gas portador helio a un flujo de

0,9 mL min<sup>-1</sup>, ajustado a una velocidad lineal de 34 m s<sup>-1</sup>. Un volumen de 1,0 µL del aceite diluido en n-heptano se inyectó con una relación de split de 1:100; estableciéndose la temperatura del puerto de inyección en 230°C y el cuadrupolo en 150°C. La energía de la fuente de ionización fue de 70 eV con un rango de barrido de 40-500 amu a 3,9 scans s<sup>-1</sup>.

Para la determinación de los índices de Kovats (IK) se emplearon como patrones una serie de n-alcanos desde C<sub>8</sub> a C<sub>24</sub>. La identificación de la composición química del aceite esencial se realizó por comparación entre los IK calculados e IK reportados en la literatura, además, se verificaron con los datos espectrales de la librería Wiley en su 6<sup>ta</sup> edición, almacenados en el instrumento.

### **Actividad antibacteriana**

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Lic. Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo tutoría del Dra. Judith Velazco; empleando el método de difusión en agar con discos impregnados. Para el ensayo se utilizarán bacterias y levaduras de referencia internacional, tales como: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). El método a empleado permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias patógenas frente a una sustancia o mezcla de sustancias de origen vegetal (Velasco y col., 2007). El protocolo experimental que se utilizó se presenta a continuación:

- a) **Preparación de las placas de Petri:** para las bacterias se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri. Una vez solidificada la placa, se le realizó el control de esterilidad y conservó a 4°C hasta el día del ensayo.



- b) **Adecuación de los discos**: los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 10 µL de cada aceite esencial. Luego se colocaron en una placa de Petri y esterilizaron bajo luz UV, durante 90 minutos previo al ensayo.
- c) **Preparación de los inóculos**: los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton hasta que se obtuvo una turbidez correspondiente al patrón de McFarland Nº 0,5 ( $1 \times 10^6$  UFC/mL)
- d) **Inoculación**: cada cepa bacteriana preparada se sembró en la superficie del agar con un hisopo estéril. Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con el aceite esencial, además, se colocaron discos de papel de filtro impregnados con el solvente de dilución (control negativo), así como los fármacos de referencia para cada microorganismo (controles positivos).
- e) **Incubación**: el crecimiento bacteriano se verificó incubando las placas en una estufa a la temperatura de 37°C durante al menos 48 h.
- f) **Lectura de los ensayos**: se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h. El diámetro de la zona de inhibición fue expresado en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento microbiano alrededor del disco al igual que los controles negativos.
- g) **Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)**: solo se determinó la **CIM** contra los microorganismos que mostraron susceptibilidad al aceite ensayado. Para determinar la **CIM** se prepararon diluciones en el solvente apropiado a diferentes rangos de concentración, luego se impregnaron los discos de papel de filtro con 20 µL de cada solución.

## **Evaluación de los resultados**

Los resultados mostraron la actividad antibacteriana que presentan los componentes volátiles en el aceite esencial de la especie *Pluchea carolinensis*.

## **Diseño de análisis de los datos**

Los datos recolectados fueron analizados a través del enfoque cualitativo. Tal como lo han referido Palella y Martins (2011), el dato fue medido por escala con el fin de ser analizado. Las características que se midieron tuvieron como punto de partida su naturaleza cualitativa o cuantitativa. En tal sentido, las variables cualitativas tuvieron una escala de medida nominal y ordinal. Mientras que las variables cuantitativas presentaron una escala de medida de intervalo y de razón. El universo de esta investigación estuvo representado por los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las hojas de especie *Pluchea carolinensis*, los cuales, presentaron cierta actividad antibacteriana sobre las cepas de referencia internacional. A su vez la población de estudio fue el conjunto de efectos que generó el aceite esencial sobre las cepas de referencia. La muestra fue representativa para realizar un análisis inferencial.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Composición Química del Aceite Esencial de *Pluchea carolinensis*.

El aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *P. carolinensis* (**Pc**), fue obtenido utilizando la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor de agua y conservados bajo refrigeración hasta el día de su análisis por CG-EM. La cantidad de aceite obtenida de las partes aéreas de **Pc** fue de 0,2 mL para un kg de planta, representando un rendimiento del 0.02% m/v.

El análisis químico realizado por GC-MS del aceite esencial de **Pc** permitió identificar al menos 12 compuestos químicos, los cuales fueron confirmados por comparación entre los IK y los datos espectrales de masas obtenidos con las bases de datos WILEY275.L, NIST05.L y HPCH2205.L. En la Tabla 4, se presentan la diversidad de componentes volátiles separados, en donde, un 31,94% pertenece al grupo de los monoterpenos cíclicos, 29,33% a sesquiterpenos cíclicos, 24,70% monoterpenos cíclicos oxigenados y 8,64% sesquiterpenos cíclicos oxigenados. Por otra parte, se reportó la presencia en pequeñas proporciones de una sustancia del tipo aldehídos ((2E)-hexenal). Asimismo, del aceite en estudio se obtuvieron como principales compuestos,  $\alpha$ -pineno (31,94%), timol (13,60%), biciclo-germacreno (12,64%), 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno (11,10%), (*E*)-cariofileno (8,04%) y espatulenol (5,00%).

En base a lo antes expuesto; los terpenoides son una amplia clase de compuestos orgánicos presentes en las plantas, los cuales se caracterizan por su estructura formada por la unión de al menos dos unidades de isopreno. Estos metabolitos secundarios desempeñan diversas funciones en las plantas, además, han demostrado tener propiedades antioxidantes, citotóxicas, antibacterianas, entre otras, siendo estas propiedades de gran interés para su posible utilización en la fabricación de medicamentos y producción de alimentos. En ese sentido, existe un gran interés en la investigación de los

posibles mecanismos de acción y la actividad de los diferentes tipos de terpenoides contra ciertos patógenos bacterianos, lo cual ha conllevado en la actualidad al desarrollo de nuevos fármacos. La conformación de este tipo de compuestos es variada, lo cual ha permitido clasificarlas fundamentalmente en homoterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Silva y cols.,2019).

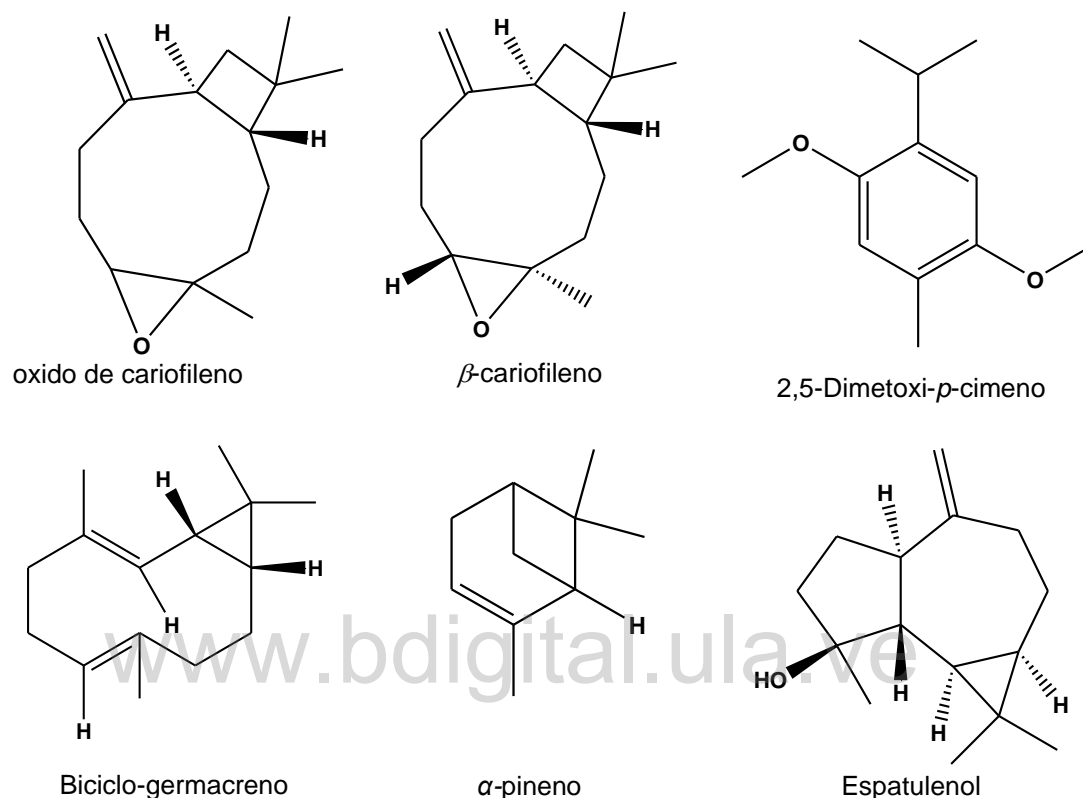
**Tabla 4.** Composición química del aceite esencial de la especie *Pluchea carolinensis*.

Compuestos	%A	IK
(2E)-hexenal	0,37	846
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>31,94</b>	<b>932</b>
<b>timol</b>	<b>13,60</b>	<b>1289</b>
modefe-2-eno	4,77	1382
$\alpha$ -isocomeno	1,33	1387
<b>(E)-cariofileno</b>	<b>8,04</b>	<b>1417</b>
<b>2,5-dimetoxi-p-cimeno</b>	<b>11,10</b>	<b>1424</b>
aristolocheno	2,55	1487
<b>biciclo-germacreno</b>	<b>12,64</b>	<b>1500</b>
butilato hidroxitolueno	1,74	1514
<b>espatulenol</b>	<b>5,00</b>	<b>1577</b>
<b>óxido de cariofileno</b>	<b>1,90</b>	<b>1582</b>

%A: porcentaje de abundancia del compuesto; IK: índices de Kovat's promedios. La composición del aceite esencial se determinó por comparación de los EM de cada compuesto con la base de datos Wiley 6<sup>ta</sup> edición y sus tiempos de retención.

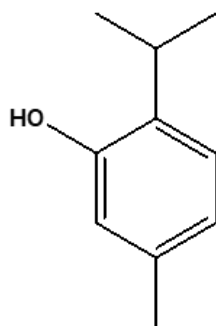
La literatura refiere que los compuestos encontrados para los diferentes aceites del género *Pluchea* (*P. eupatorioides*, *P. pteropoda*, *P. indica*, *P. arabica*, *P. carolinensis*) presentan al menos dos compuestos considerados marcadores quimiotaxonomicos (ver Tabla 5), a saber:  $\beta$ -cariofileno y óxido de cariofileno, los cuales fueron identificados en el aceite en proporciones de 8,04% y 1,90%, respectivamente (Thinh y cols.,2023; Ninh y cols.,2022; Kerdudo y cols., 2016; Widyawati y cols.,2013; Suliman y cols., 2006). De igual

manera, se reporta la presencia del 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno, espatulenol y  $\alpha$ -pineno como sustancias químicas comunes para las especies *P. carolinensis*, *P. pteropoda*, y *P. eupatorioides* (ver Fig. 9).



**Fig. 9** Estructura de los marcadores quimiotaxonómicos (pubchem 2024)

Finalmente, en esta investigación se encontró en altas proporciones el timol (ver Fig. 10), una especie química poco común para las plantas de este género, la cual presenta una excelente actividad antibacteriana.



**Fig. 10** Estructura del Timol (PubChem CID: 6989)

**Tabla 5.-** Marcadores quimiotaxonómicos

Trabajos de Investigación	Compuestos	Autores
Composición del aceite esencial, propiedades antimicrobianas y antioxidantes de <i>Pluchea eupatorioides</i> Kurz recolectada en Vietnam	$\beta$ -cariofileno óxido de cariofileno 2,5-dimetoxi- <i>p</i> -cimeno $\alpha$ -isocomeno	Thinh y col., (2023).
Aceites esenciales de las plantas asteráceas <i>blumea riparia</i> dc. y <i>Pluchea pteropoda</i> hemsl. ex-hemsl. creciendo en vietnam	$\beta$ -cariofileno 2,5-dimetoxi- <i>p</i> -cimeno biclogermacreno $\alpha$ -isocomeno	Ninh y cols., (2022)
Compuestos volátiles de los aceites esenciales de <i>Pluchea indica</i> less y <i>ocimum basilicum</i> linn, y su potencia como antioxidante	$\beta$ -cariofileno óxido de cariofileno $\alpha$ -pineno	Widyawati, y cols., (2013)
Aceite esencial de <i>Pluchea quitoc</i> Dc. (Asteraceae)	$\beta$ -cariofileno óxido de cariofileno espatulanol	Simionatto y cols., (2007)
Composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Pluchea arabica</i> de Omán	$\beta$ -cariofileno óxido de cariofileno	Suliman y cols., (2006)
Composición y bioactividad del aceite esencial de <i>Pluchea carolinensis</i> (Jack.) G. Don. de Martinica	$\beta$ -cariofileno óxido de cariofileno 2,5-dimetoxi- <i>p</i> -cimeno espatulanol $\alpha$ -pineno	Kerdudo y cols., (2016)

(Contreras, Ortega y Buitrago 2024)

Es importante mencionar que la variabilidad en la composición química de los aceites reportada en la literatura para las diferentes especies del género *Pluchea* se deben a factores ambientales como la luz, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, el estrés hídrico, entre otros, así como también por la interacción con microorganismos, herbívoros, polinizadores, entre otros. Asimismo, la producción o concentración de estos compuestos se encuentra condicionada por la plasticidad, la cual se refiere a la capacidad de las plantas de modificar la síntesis y producción de diversas sustancias químicas en respuesta a la adaptabilidad del entorno (Alfonso, 2018; Mishra, 2016).

Estudios han demostrado que el timol y el carvacrol (un isómero estructural del timol) son capaces de desintegrar la membrana externa de lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas, aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP. Abreu y cols., (2019), examinaron el efecto del timol contra *Salmonella entérica*, *S. serovares*

*S. enteritidis* y *S. typhimurium*, comprobaron que el timol se une a las proteínas de las membranas de estas bacterias, de igual manera, encontraron para el análisis antibacteriano un efecto inhibitorio susceptible con halos de inhibición entre 9 mm y 12 mm. Igualmente, determinaron que el promedio del timol en los aceites esenciales estuvo entre 10% y 64%, asimismo, la presencia de *p*-cimeno y el  $\gamma$ -terpineno en altas proporciones (Abreu y cols., 2019). Este comportamiento también fue observado en esta investigación donde el timol (13.60%) representó el segundo componente con mayor abundancia.

En el estudio de Kerdudo y cols., (2016); realizado por técnicas de GC/FID y GC-MS para caracterizar la composición química del aceite esencial para las flores (**F**) y hojas (**H**) de *P. carolinensis*, les permitió la identificación de 44 constituyentes que representaron el 64,6% y el 84,2% para cada muestra oleosa respectivamente. El análisis reveló la presencia de diversos compuestos terpénicos aromáticos, entre los que destacaron: selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (**F**:17,7%— **H**: 33,4 %),  $\beta$ -cariofileno (**F**: 5,5% – **H**:21,1%), 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno (**F**: 8,9% – **H**: 3,3 %), óxido de cariofileno (**F**: 6,6% – **H**: 3,3%),  $\alpha$ -pineno (**F**: 4.7%- **H**: 4.7%) y espatulenol (**F**: 3,8%- **H**: 3,1%).

Por otra parte, los autores Ninh y cols., (2014); estudiaron los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de *P. pteropoda*. Tras la separación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas lograron identificar 31 compuestos, encontrándose en mayor cantidad el 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno (43,5%),  $\beta$ -maaliene (14,0%) y  $\alpha$ -isocomeno (9,0%).

#### **Actividad antibacteriana del aceite de *P. carolinensis*.**

Se evaluó la actividad antibacteriana a partir del aceite obtenido por hidrodestilación de las partes aéreas, Las muestras identificadas como: **Pc**, se analizaron utilizando el método modificado de difusión en agar con disco de papel, Velasco y cols., 2007; Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**), *Enterococcus faecalis* (**ATCC 19433**), *Pseudomonas aeruginosa* (**ATCC 27853**), *Escherichia coli* (**ATCC 25922**) y

*Klebsiella pneumoniae* (**ATCC 25955**). Los resultados obtenidos revelaron que el aceite esencial de **Pc** exhibió una actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 9 mm y para la cepa de *E. faecalis* de 8 mm. De igual manera, no se observó una acción contra el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Posteriormente, se realizaron diferentes diluciones que permitieron determinar la concentración mínima inhibitoria (**CIM**) contra las cepas susceptibles. Los valores obtenidos que se presentan en la Tabla 6, permitieron establecer para *S. aureus* y *E. faecalis* un **CIM** de 300 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente.

**Tabla 6.-** Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pluchea carolinensis*.

Microorganismos	Aceite esencial	Compuestos de Referencia					CIM
		SXT	VA	GM	AZT	CEP	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)	9*	40*					300
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212)	8*		26*				500
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)	NA			34*			NP
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC (23357)	NA				42*		NP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)	NA					38*	NP

\* mm de los halos de inhibición (discos 6 mm de diámetro), promedio de dos ensayos. NA: no activo; NP: no probado; SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol (23.75/1.25 µg); VA: Vancomicina (30 µg); GM: Gentamicina (10 µg); AZT: Aztreonam (30 µg); CEP: Cefepime (30 µg); CIM: Concentración inhibitoria mínima, Rango 900-150 µL/mL.

En el año 2010 Keute estableció una clasificación de la actividad antimicrobiana para los productos naturales y compuestos puros, en la cual concentraciones inferiores a 100 µg/mL son consideradas como actividad significativa y valores de CIM entre 101 y 625 µg/mL se considera moderada, mientras que valores CIM superiores 625 µg/mL se consideran con baja capacidad inhibitoria (Silva y cols.,2019). En base a lo antes mencionado, en este estudio el aceite para *S. aureus* y *E. faecalis* exhibió una actividad antibacteriana moderada.



Diversos estudios han demostrado que el aceite esencial extraído de las plantas pertenecientes al género *Pluchea* posee actividad antibacteriana contra ciertas bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* y *Bacillus cereus*, entre otras); asimismo, no se encuentran reportes sobre su acción contra las bacterias Gram negativas. (Keturdo y cols;2016)

Esta diferencia en la actividad posiblemente está asociada a los diferentes componentes volátiles presentes en el aceite esencial y su acción sobre la pared celular de las bacterias. En ese sentido, las bacterias Gram positivas tienen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano la cual le confiere una mayor permeabilidad a ciertos compuestos químicos (Fig.5). Por otra parte, las bacterias Gram negativas poseen una pared celular delgada y compleja conformada por lipopolisacáridos (Fig.6), la cual le confiere una mayor selectividad a la acción de ciertas sustancias químicas (Murray y cols., 2009).

Un estudio reciente titulado "Composición del aceite esencial, propiedades antimicrobianas y antioxidantes de *Pluchea eupatorioides* Kurz recolectada en Vietnam" realizado por Tinh y cols. (2023), evaluaron la actividad del aceite esencial de *P. eupatorioides* frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El aceite esencial exhibió una actividad antimicrobiana significativa en el rango de CIM entre 100 µg/mL a 200 µg/mL para todas las cepas ensayadas.

En otra investigación donde evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Pluchea arabica* recolectadas en Taqah-Omán frente a las cepas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Salmonella choleraesuis* y *C. albicans*), realizado a través del método de difusión en pozo para determinar la eficacia del aceite. Los resultados revelaron que la sustancia oleosa fue activa contra tres microorganismos: *S. aureus*, *C. albicans* y *B. subtilis* con un halo de inhibición inferior a 8 mm a la concentración de 1.000µg/ml; lo que representa una baja actividad inhibitoria para el crecimiento de las cepas ensayadas. Los autores confirman que la

actividad antimicrobiana del aceite es atribuida principalmente por la presencia del óxido de cariofileno,  $\delta$ -cadinol y metileugenol; conocidos por sus propiedades antimicrobianas (Suliman y cols., 2006), observando igual comportamiento para la inhibición de las cepas Gram positivas, debido a la presencia de uno de los compuestos antes mencionados (óxido de cariofileno).

Los investigadores Kerdudo y cols. (2016) en su estudio Composición y bioactividad del aceite esencial de *Pluchea carolinensis* (Jack.) G. Don. de Martinica, evidenciaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de esta planta, mediante la evaluación de su capacidad para inhibir el crecimiento de diversos microorganismos. Se observó que a una concentración del 0.5% (p/v), el aceite presentó una inhibición significativa (superior al 60%) frente a *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *S. aureus* y *B. cereus* durante 72 horas, sin embargo, no se evidenció actividad contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. arizonae*, *L. innocua*. Además, para una concentración menor del 0,05% p/v, el aceite esencial no mostró actividad antibacteriana contra ninguno de los microorganismos evaluados.

Estos resultados contrastan con estudios previos que han reportado la actividad antimicrobiana del extracto hexánico y el fraccionamiento en diferentes solventes ( $\text{CHCl}_3$ , AcOEt y n-BuOH) de *P. carolinensis* los cuales inhibieron el crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *B. subtilis* (Perera y cols., 2006).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

El aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *P. carolinensis* fue extraído mediante la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor de agua y posteriormente analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Este análisis permitió identificar los siguientes grupos Monoterpenos cíclicos: 31,94%, Sesquiterpenos cíclicos: 29,33%, Monoterpenos cíclicos oxigenados: 24,70%, Sesquiterpenos cíclicos oxigenados: 8,64%. La composición química del aceite esencial de **Pc** se caracterizó por una mayor presencia de los siguientes compuestos  $\alpha$ -pineno (31,94%), timol (13,60%), biciclo-germacreno (12,64%), 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno (11,10%), (*E*)-cariofileno (8,04%) y espatulenol (5,00%).

El timol, un compuesto con elevadas propiedades antibacterianas, no suele estar presente en las especies del género *Pluchea*, sin embargo, en esta investigación se detectó en cantidades importantes.

La variabilidad en la composición química de las plantas se encuentra, influenciada por una variedad de factores bióticos, abióticos y a la plasticidad.

El aceite esencial de **Pc**, constituido principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, presentó la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis*. a las CIM de 300  $\mu$ L/mL a 500  $\mu$ L/mL respectivamente.

## **Recomendaciones**

Recolectar las muestras de la especie vegetal en diferentes ubicaciones geográficas, y en distintas épocas del año. Esto permitirá determinar si existe variación en la composición química y la actividad antibacteriana.

Ampliar el alcance de la investigación, evaluando la actividad antibacteriana del aceite esencial contra un mayor rango de cepas bacterianas clínicamente relevantes.

Evaluar otras actividades biológicas de la especie, como propiedades antioxidantes, citotóxicas, antiinflamatorias, entre otras. Esto ampliará el conocimiento sobre el potencial de aplicación de este recurso natural.

Proponer a las autoridades pertinentes mayor accesibilidad a los espacios físicos e instrumentos durante el desarrollo del trabajo experimental.

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

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu Pereira, A. Pamplona Pagnossa, J., Paulo Alcântara, J., Rodrigo Isidoro, S., Hilsdorf Piccoli R. (2019). Interacción entre *Salmonella* sp. y aceites esenciales: actividad bactericida y adaptabilidad. Ciencia Y Tecnología, 12(2), 1–6. <https://doi.org/10.18779/cyt.v12i2.320>
- Alfonso, A. (2018). La influencia del estrés abiótico en la síntesis de metabolitos secundarios de plantas medicinales [Tesis de grado farmacéutico, Universidad de La Laguna]. Repositorio Institucional Universidad de La Laguna. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/10257>
- Beyra, A., León, M., Iglesias, E., Ferrandiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godinez, D., Guimaraes, M., Alvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). Anales del Jardín Botánico de Madrid, 61 (2): 185-203.
- Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. Evid Based Complement Alternat Med. 1-14.
- Camacho-Campos, C., Perez, Y., Valdivia, A., Ramirez, H., Gomez, L. (2019). Propiedades Fitoquímicas y Antibacterianas de Extractos de *Tagetes erecta* L (Asteracea). Revista Cubana de Química.31 (1): 53-64.
- Casado-Villaverde, I. (2018). Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor [Tesis de grado]. Madrid. Universidad Politécnica de Madrid.
- Castillo, Y., Santannach, R., Quintero, E., Palermo, J., Patiño, L. (2019). Actividad Antibacteriana de Eudesmanólidos aislados de *Pluchea carolinensis*. Puente Biológico, 9: 1-9.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 6427071, 2,5-dimetoxi-p-cimeno. Recuperado el 26 de junio de 2024 de [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_5-Dimethoxy-p-cymene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_5-Dimethoxy-p-cymene).
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 6654, alfa-PINENE. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-PINENE>.

- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 6989, timol. Recuperado el 10 de julio de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymol>.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 1742210, ÓXIDO DE BETA-CARIOFILENO. Recuperado el 4 de julio de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-CARYOPHYLLENE-OXIDE>.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 92231, espathulenol. Obtenido el 26 de junio de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spathulenol>.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 5281515, cariofileno. Recuperado el 4 de julio de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caryophyllene>.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *medicines* (Basel, Switzerland). 2016 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines304002>
- Domingo D, López M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap.*; 16 (4): 385-396.
- Döring, M., Asteraceae Bercht, J. Presl [English Wikipedia - Species Pages. Wikimedia Foundation. Checklist dataset] Fecha [acceso 20/09/23] disponible <https://doi.org/10.15468/c3kkgh> accessed via GBIF.org.
- El-Shazly, A., Hamed, A., Kabary, A., Ghareeb. (2022). LC-MS/MS profiling, antibiofilm, antimicrobial and bacterial growth kinetic studies of *Pluchea dioscoridis* extracts. *Acta Chromatographica*. 34 (3): 338-350. Doi: 10.1556/1326.2021.00956
- Espinosa-Freire E. (2019). Las variables y su operacionalización en la investigación educativa. Segunda parte. *Conrado*, 15 (69): 171-180.
- Flores-Morales, V., Castañeda, O., Montiel, T., Hernández, G. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Ciencia*, 22 (63): 18-23.

- Hernández, M. Técnicas de Aislamiento y Recuento. Docencia Microbiología UMH. Acceso 23/09/2023; disponible en: <https://docenciamicrobiologia.umh.es/indice-de-practicas/3-tecnicas-de-aislamiento-y-recuento/>
- Hernández-Sampieri, R., Fernández, C., Batista, M. (2010). Metodología de la investigación. 5a ed. México: McGRAW-HILL.
- Katinas, L., Gutierrez, D., Grossi, M., Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 42 (1-2): 113-129.
- 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. Don essential oil from Martinique. Industrial Crops and Products. 89. 295-302. [https://doi: 10.1016/j.indcrop.2016.04.076](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.076)
- Kuete, V. (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. Planta Med. 76(14):1479-91. doi: 10.1055/s-0030- 1250027. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20533165.
- López-Jácome, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., Franco R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad, 3(1):10-18.
- Lustre, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. Revista digital universitaria. 23 (2).
- Macias-Villamizar, V., Gonzales, R. (2019). Plantas de Santa Marta con possible actividad biológica antimicrobiana. Duazary. 16(2): 414-439. <https://doi.org/10.21676/2389783X.3161>.
- Marcano, D., Hasegawa, M. (2018). Fitoquímica Orgánica. 3era ed. Caracas (Venezuela).
- Martines, J., Sulbaran, B., Ojeda, G., Ferrer, A., Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Revista de la Facultad de Agronomía. 20 (4): 502-512.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos: Ciencias y Cultura. 17 (77): 15-23.

- Moreno, C., González, R., Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. 69: 185-192.
- Muñoz, D.E., Vogel, H., Razmilic, I. (2004). Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista chilena de historia natural*. 77(1), 43-50. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100005>
- Murray, P., Rosenthal, k., Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. 7a ed. Madrid, España: Elsevier. 1-2.
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 13894537, Bicyclogermacrene. Recuperado 09 Julio, 2024, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13894537>.
- Negroni, M., (2009). *Microbiología estomatológica*. 2da ed. Buenos aires (Argentina): Editorial Médica Panamericana.
- Ninh, S., Tuan, A., Thu, T., Luyen, N., Thi, T. (2022). Essential oils of the Asteraceae plants *Blumea riparia* DC. and *Pluchea pteropoda* Hemsl. Ex Hemsl. growing in Vietnam. *Natural Product Communications*. 17(6): 1-6. DOI: 10.1177/1934578X221110662.
- Pala, J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "Eryngium" L, en la Península Ibérica
- Peredo-Luna, H., Palou, E., Lopez, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 24-32.
- Perera, W., González, L., Payo Hill, A. (2006). Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. *Revista Cubana de Farmacia*. 40(2) Recuperado en 03 de julio de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152006000200007&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152006000200007&lng=es&tlng=es).
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. 1a ed. Madrid (España): Editorial Medica panamericana.
- Ramírez, L., Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *In Vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*. 15(42): 263-268.



- Rivas-Morales, C., Oranday, M., Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona (España): OmniaScience.1-5.
- Schultes, R. (2022). La etnobotánica: su alcance y sus objetos. Caldasia. 44(3): 7-12. DOI: 10.15446/caldasias.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta, H., Rocha M. (2003). La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fisiopatología. 21(3): 355-369.
- Simionatto, E., Stüker, C., Porto, C., Dalcol, I., Silva, U., Morel, A. (2007). Essential Oil of *Pluchea quitoc* Dc. (Asteraceae). Journal of Essential Oil Research - J Essent Oil Res. 19. 494-497. 10.1080/10412905.2007.9699961.
- Skoog, J., Leary, J. (1994). Análisis instrumental. 4a ed. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Suliman, F.E.O., Fatope. M.O., Al-Saidi, S.H., Al-Kindy, S.M.Z., Marwah, R.G. (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pluchea arabica* from Oman. Flavour and Fragrance Journal. 21, 469–471. <https://doi.org/10.1002/ffj.1616>
- Valcárcel-Cases, M., Gómez, A. (1994). Técnicas de separación. Ciudad de México, México: Reverté
- Velazco J, Araque M. Manual práctico de bacteriología clínica. Mérida (Venezuela); 2008.
- Villaseñor, J., Villarreal, J. (2006). El género *Pluchea* (familia Asteracea tribu Plucheeae) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 77 (1): 59-65.
- Thinh, BB., Thin, D.B. (2023). Composición del aceite esencial, propiedades antimicrobianas y antioxidantes de *Pluchea eupatorioides* Kurz recolectadas en Vietnam. Revista de plantas que contienen aceites esenciales. 26 (3), 653–663. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2234398>
- Widyawati, P., Wijaya, C., Hardjosworo, P., Sajuthi, D. (2013). Volatile compounds of *Pluchea indica* Less and *Ocimum basilicum* Linn essential oil and potency as antioxidant. HAYATI Journal of Biosciences.; 20, 117-126. <https://doi.org/10.4308/hjb.20.3.117>