



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr. José Rafael Luna”**



**ANALISIS Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Baccharis trinervis*.**

Trabajo de grado para optar al Título de Licenciada (o) en Bioanálisis

Autores:

Andreina del C. Mendoza Atencio

C.I. V-18.498.404

Jesús Alberto Leen Pérez

C.I. V-18.902.792

Tutor: Prof. Yndra Cordero

Mérida, Noviembre de 2021

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen del Carmen por brindarme salud, sabiduría y el entendimiento necesario, para llegar hasta aquí y así alcanzar tan anhelada y deseada meta.

A mis padres, Betty y Salomón, no tengo palabras agradecerles todo lo que han hecho y hacen por mí, sin su apoyo esto no sería hoy posible, este logro es de ustedes.

A mi hijo, Juan Eduardo, mi vida entera se resume en ti, gracias por ser ese motor que me impulsa día a día, cada esfuerzo y sacrificio que hice para llegar hasta aquí fue por ti, ¡TE AMO...!

A mis tíos, en especial a mi tío Atilano Mendoza, gracias por apoyarme siempre, por tener esa palabra de aliento, ese consejo y ese chiste de las situaciones más fuertes cuando más lo necesite, muchas gracias¡!

A mis primos, Luis Alberto, Maira Alejandra, Carlos Eduardo, Ricardo, Juan José y Luis Daniel por ser y estar en mi vida.

A mis amigas, Edianny, Lisset, Williana, Yuliana, Patricia, Rebeca y Maira, por estar en las buenas y no tan buenas, por esa amistad incondicional llena de tantos momentos inolvidables.

A Maydoly Villegas, por ser una segunda madre, gracias por tanto amor y cariño, por cuidarme y aconsejarme como si fuera tu hija, ¡te quiero mucho!

Y, por último, pero no menos importante a mi abuelo Juan Eduardo Atencio, mi viejo sé que desde el cielo me cuidas e intercedes por mí ante papito Dios, te amo y te extraño cada día de mi vida, lo prometido es deuda. ¡Lo Logre!

Andreina

Dedicatoria

A Dios por darme vida, salud, entendimiento y tenacidad para llegar hasta aquí.

A mi madre María Elena Pérez, por darme la vida y estar allí cuando más los necesite gracias por toda mamá.

A mi padre José Leen que está en el cielo.

A mis hermanos gracias por todo el apoyo brindado

A mis sobrinos para que mi esfuerzo y logro les sirva de ejemplo a lo largo de sus vidas.

A mis compañeros por siempre estar.

A la Universidad de Los andes por abrirme sus puertas y resguardarme en sus aulas, dejando en mí una huella imborrable, muchas gracias.

A Todas aquellas personas que participaron en este logro a los que siguen estando presentes y a los que ya se fueron a una mejor vida.

¡Mil Gracias!

Jesús

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad De Los Andes, en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por habernos recibido y cobijado en todo este tiempo, para hacer de nosotros un excelente profesional lleno de valores humanos y académicos, orgullosos de pertenecer a esta gran casa de estudios

A nuestra tutora, Profesora Yndra Cordero, por su cariño, confianza y dedicación para lograr la presentación de nuestro trabajo de grado, gracias profe por cada consejo, orientación y dedicación y sobre todo por compartir con nosotros sus conocimientos.

Al profesor Luis Rojas, gracias por la orientación, dedicación y esfuerzo para realizar parte de los objetivos de dicha investigación y que hoy ya no se encuentra presente en este plano terrenal, ¡que Dios lo tenga en la gloria profe!

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por los conocimientos brindados para la culminación de este trabajo de grado.

Andreina y Jesús.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	pp.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCION.....	1
CAPÍTULO I.....	4
EL PROBLEMA	4
Planteamiento del problema.....	4
Justificación e importancia de la investigación	5
Objetivo de la investigación.....	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	7
Alcances y limitaciones de la investigación	7
Alcances de la investigación	7
Limitaciones de la investigación	8
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	12
Bases Teóricas	13
Familia <i>Asteraceae</i>	13
Descripción Botánica de la familia <i>Asteraceae</i>	14
Distribución Geográfica.....	14
Género <i>Baccharis</i>	15
Descripción Botánica del Género <i>Baccharis</i>	17

Composición Química del Género <i>Baccharis</i>	17
Usos medicinales de géneros de <i>Baccharis</i>	18
Especie <i>Baccharis trinervis</i>	19
Taxonomía	21
Usos y Manejos	21
Importancia de los metabolitos secundarios	22
Metabolismo secundario	23
Moléculas activas en el ámbito medicinal e industrial.....	24
Sesquiterpenos	25
Aceites Esenciales	26
Definición	26
Métodos extracción de aceites esenciales	28
Procesos a escala de laboratorio	29
Conservación del aceite esencial	30
Métodos de identificación de compuestos químicos de los aceites esenciales	30
Análisis cromatográfico	31
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	31
<i>Las Bacterias</i>	32
Bacterias Gram positivas	33
Bacterias Gram negativas	34
Los Antibióticos	37
<i>Clasificación de los Antibióticos</i>	38
Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana	38
Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática	38
Inhibidores de la síntesis de proteínas	39
Actividad Antibacteriana.....	40
Clasificación y Mecanismo de Acción	40
Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	42

Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana ...	43
Definición Operacional de Términos	44
Operacionalización de las variables	45
Hipótesis	48
CAPÍTULO III.....	49
MARCO METODOLOGICO	49
Tipo de Investigación	49
Diseño de la Investigación	49
Procedimientos de la Investigación	51
Obtención del Aceite Esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	51
Identificación de los Componentes Químicos del Aceite Esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	52
Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Baccharis trinervis</i> por el Método de Difusión en Disco (Kirby- Bauer)	53
Bacterias Estudiadas	53
Diseño de Análisis	58
CAPITULO IV	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
Extracción y Obtención del Aceite Esencial de <i>Baccharis trinervis</i> ..	59
Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	64
Discusiones	66
CAPÍTULO V	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
Conclusiones	69
Recomendaciones	70
REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla	Título	Pág.
1	Nombres comunes de la especie <i>B. trinervis</i>	21
2	Taxonomía de la especie <i>B. trinervis</i>	21
3	Operacionalizacion de variable dependiente. Actividad antibacteriana presente en el aceite esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	46
4	Operacionalizacion de la variable independiente Composición química del aceite esencial en la especie vegetal	47
5	Bacterias Gram positivas y Bacterias Gram negativas.....	54
6	Discos de Antibioticos.....	54
7	Diluciones del Aceite Esencial.....	56
8	Características del Aceite Esencial.....	59
9	Composicion quimica de <i>Baccharis trinervis</i>	62
10	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

N° figura	Título	Pág.
1	Distribución y habitat de la familia Asteraceae.....	15
2	Terpeno presente en Especies Vegetales.....	18
3	Especie vegetal <i>Baccharis trinervis</i>	20
4	Compuesto Terpénico identificado en Especies Vegetales (Caroteno).....	24
5	Compuesto monoterpénico identificado en Especies Vegetales (limoneno).....	25
6	Compuesto sesquiterpénico identificado en Especies Vegetales.....	25
7	Pared Celular de las Bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	34
8	Trampa de Clevenger.....	60
9	Cromatograma del aceite esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	61
10	Componentes mayoritarios del Aceite Esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	63
11	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Baccharis trinervis</i> frente a bacterias Gram positivas.....	65
12	Actividad antibacteriana del aceite esencial <i>Baccharis trinervis</i> frente a bacterias Gram negativas.....	65



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr. José Rafael Luna”



**ANALISIS Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Baccharis trinervis*.**

Trabajo de grado para optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

Autor:

Br. Andreina Mendoza.

C.I 18.498.404

Br. Jesús Alberto Leen

C.I. V-18.902.792

Tutor:

Dra. Yndra Cordero

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química del aceite esencial de las hojas de *Baccharis trinervis* y la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas. La planta utilizada para el estudio fue colectada en La Culata estado Mérida, y posteriormente su aceite esencial fue obtenido mediante la técnica de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger. Sus componentes fueron identificados y cuantificados a través de la técnica de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM), obteniendo como compuestos mayoritarios: *trans*-cariofileno con (20,43 %), Limoneno (15,18 %), Germacreno β (11,70 %) y Mirceno (8,71 %). La evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial se realizó mediante la técnica de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer) frente a 5 cepas ATCC de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Los resultados obtenidos, mostraron actividad antibacteriana cuyos halos de inhibición fueron de 7 mm para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* mientras que para *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* fue de 8 y 12 mm, respectivamente.

Palabras clave: *Baccharis trinervis*, aceite esencial, actividad antibacteriana.

INTRODUCCION

Desde tiempos muy remotos las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permiten la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies *vegetales* (Lizcano y Vergara, 2008).

Los aceites esenciales son concentrados obtenidos con solventes apropiados como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y de sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca. Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los compuestos encontrados en el material vegetal; por ejemplo, para sustancias de baja polaridad como los lípidos se utilizan solventes como éter de petróleo y cloroformo y para sustancias de mediana y alta polaridad acetato de etilo, etanol y acetona (Lizcano y Vergara, 2008).

Globalmente las plantas producen más de 100.000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocido como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente los ataques de microorganismos insectos y otros animales (Domingo y López, 2003).

Hasta el siglo XVIII se conocieron las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, desconociendo en muchos de los casos la composición y caracterización de principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución, herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias como la

fitoquímica, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de principios activos de muchas especies vegetales. La gran mayoría de los principios activos se han obtenido sintéticamente en laboratorios, para su posterior uso en la preparación de medicamentos químicos. Con el paso de los años el consumo de medicamentos sintéticos se incrementó, desplazando cada vez más el uso directo de plantas medicinales alejándose así de la medicina tradicional (Lizcano y Vergara, 2008).

Una sustancia antibacteriana se refiere a un producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio para otros microorganismos en muy pequeñas cantidades y que de acuerdo con su forma de actuar puede ser microbicida o microbiostático. Estas sustancias químicas se han empleado desde el siglo XVIII para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Lizcano y Vergara, 2008).

Dentro de esta perspectiva se deduce que la importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en los efectos farmacológicos o quimioterapéuticos que los extractos y aceites vegetales pudieran poseer, sino también en la posibilidad que representan para el desarrollo de nuevas drogas y la cura de diversas enfermedades (Roger, 2006).

Cabe considerar que, gran variedad de especies que pertenecen a la familia Asteraceae están dadas por extractos y aceites esenciales que presentan relevantes propiedades farmacológicas, por ello, en esta investigación se estudió la especie *Baccharis trinervis*.

Se ha verificado que en esta planta se encuentran principios activos que podrían funcionar como alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias resistentes. De allí la necesidad de determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. trinervis* contra cepas Gram positivas y Gram negativas.

El siguiente trabajo de investigación ha sido estructurado en V capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes

elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, nombrado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Operacionalización del evento de estudio e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Instrumento de Recolección de Datos y Procedimientos de la Investigación. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión. El Capítulo V, titulado Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

De acuerdo con la nueva tendencia en la investigación en Venezuela de explorar las propiedades proporcionadas por la flora de nuestro país, se ha venido buscando opciones que permitan encontrar nuevas alternativas que favorezcan la acción frente a los diferentes microorganismos que han venido desarrollando resistencia a los antibióticos y que por lo tanto hace que crezca la dificultad para su tratamiento (Zaraza, 2012).

Las bacterias incluidas en el estudio a lo largo de la historia se han adaptado y son resistentes a los medicamentos de uso para su control, de igual manera se han convertido actualmente en un problema de salud pública ya que muchas de ellas ocasionan enfermedades transmitidas por alimentos, infecciones nosocomiales o sencillamente son oportunistas, y por lo tanto constituyen un riesgo significativo para la salud de la población tanto en los países en vía de desarrollo como en los desarrollados. Se ha demostrado que todas estas infecciones son sumamente costosas y prevenibles y que, por su cotidianidad, buscar la manera efectiva de controlarlas sería un avance en la medicina y se mejoraría la atención de los eventos, (Zaraza, 2012).

Desde 1975 la OMS ha reconocido la importancia de las medicinas tradicionales en el control de la salud y ha generado un programa orientado a la promoción de la medicina tradicional en los países en desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 1978).

Así mismo, se estima que para el año 2020, el 75 % de las personas vivirá en países en desarrollo y consumirá solo el 15 % de los medicamentos

de síntesis químicas totales en el mercado, por lo que dependerán de los fitofármacos (Barcos, 2018).

En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y dentro de esta, la medicina natural, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones, apreciada principalmente por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad (Gallegos, 2016). Lo cual llevó a plantear la presente investigación, dirigida a la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis*. De esta manera, se planteó el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la composición química del aceite esencial de *Baccharis trinervis* y la actividad antibacteriana, frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas?

Justificación e importancia de la investigación

En la actualidad, el gran desafío para los países ricos en biodiversidad es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad (Lizcano y Vergara, 2008).

Las plantas medicinales representan un valioso recurso para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, todo esto gracias a los principios activos que la conforman los cuales poseen un alto potencial farmacológico, por lo cual merecen un interés especial con respecto a la búsqueda de medicamentos y agentes antimicrobianos. Más del 25 % de los medicamentos modernos proceden de plantas y menos del 2 % de todas las especies de plantas han sido estudiadas con fines medicinales (Brown, 2010).

Por otra parte, el aumento de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos es uno de los principales problemas al que se enfrenta la ciencia médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Por lo cual, la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos potentes con mecanismos de acción novedosos que actúen contra bacterias u hongos resistentes a los antibióticos disponibles en la actualidad, es de vital importancia (Kummerer, 2004).

Con base a lo anterior en aras de buscar alternativas de aprovechamiento y conocer la presencia de principios activos en especies como *Baccharis trinervis*, se hace necesario la evaluación de la composición química del aceite esencial de esta planta y la determinación de la actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas, con la finalidad de proporcionar una alternativa que sea capaz de proporcionar antibacteriano.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Confirmar la relación entre la composición química del aceite esencial de *Baccharis trinervis* y la actividad antibacteriana frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos específicos

Obtener el aceite esencial de las hojas de *Baccharis trinervis*, por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger.

Identificar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *Baccharis trinervis*, por el método de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).

Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis*, en correspondencia con el halo de inhibición, por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Determinar el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Baccharis trinervis* en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, así, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcance exploratorio, descriptivo, correlacional o explicativo (Hernández, Fernández y Baptista, 2008).

El alcance de esta investigación, es decir, la profundidad del logro obtenido fue analizar el aceite esencial de *Baccharis trinervis* y determinar su actividad antibacteriana, específicamente, el criterio de análisis está representado por el aislamiento e identificación de los componentes del aceite esencial. Por tal razón durante la investigación se describen las características de cada uno de los compuestos presentes en el aceite esencial de *Baccharis trinervis*, el criterio esta en confirmar la actividad antibacteriana del aceite esencial en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas y su relevancia en el crecimiento de los mismos.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones vienen a constituir factores externos al equipo de investigadores que se convierten en obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan al control del investigador mismo (Avila, 2001). En tal sentido en la presente investigación se pueden mencionar limitaciones en el orden de ideas de la situación país, el alto costo de los reactivos (agar, antibióticos entre otros), pocos trabajos previos e información sobre la especie en estudio y el elevado costo de las impresiones para lograr culminar con las pautas exigidas el trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Gómez y cols. (2018), realizaron un trabajo titulado Caracterización fitoquímica del aceite esencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) y evaluación de la actividad antibacteriana, El alcance de esta investigación consistió en evaluar la actividad antibacteriana y moduladora de antibióticos del aceite esencial de *Baccharis dracunculifolia* (DC). La cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) reveló los principales terpenoides: Germacreno D (18,4 %), (E) -Nerolidol (14,0 %), Mustacon (11,2 %), Spatulanol (11 %), β -pineno (9,5 %) y Biciclogermacreno (8,4 %). Se observó una actividad antibacteriana directa entre el aceite esencial de *B. dracunculifolia* contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, ya que moduló sinérgicamente con el antibiótico Norfloxacin, de igual manera modificó sinérgicamente la actividad de Norfloxacin contra *E. coli*.

Chaverri y Ciccio (2017) realizaron un trabajo titulado: Constituyentes de los aceites esenciales de *Baccharis trinervis* (Asteraceae) de Costa Rica. El alcance de la investigación consistió, en caracterizar la composición química de siete aceites esenciales hidrodestilados de diversas partes morfológicas de *B. trinervis*. Para ello, se obtuvieron muestras de tres localidades de Costa Rica y se siguieron análisis estándar de laboratorio. Los aceites esenciales se analizaron mediante cromatografía de gases capilar-detector de ionización de llama y cromatografía de gases-espectrometría de masas(CG-EM). Los aceites esenciales consistieron principalmente en terpenoides (92,3 a 97,8 %). Los principales componentes de los aceites de

hojas fueron óxido de cariofileno (0,1-22,5 %), viridiflorol (8,8-21,0 %), D germacreno (0,5-19,1 %), germacreno B (0,2-16,0 %), β -cariofileno (3,5-9,1 %), espatulenol (0,1-8,3%), δ -3-careno (2,0-6,8 %) y α -pineno (2,5-5,9 %). La composición del aceite esencial difería notablemente de la de los aceites de plantas que crecen en Brasil, estudiados previamente, que contienen dos compuestos estereoisoméricos característicos de metil dec-2-en-4,6-ditionito no detectados en este estudio. Este es el primer informe sobre la composición química de los aceites esenciales obtenidos de esta especie que crece en forma silvestre en Costa Rica.

De Oliveira y cols. (2016), realizaron un trabajo titulado: Actividad antimicrobiana y Biopelículas del aceite esencial de *Baccharis psiadioides* contra cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a los antibióticos. El alcance de esta investigación consistió, en confirmar las actividades antimicrobianas y Biopelículas del aceite esencial de *B. psiadioides* frente a cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a los antibióticos. El efecto antibiofilm se determinó mediante la aplicación de Aceite Esencial de *Baccharis psiadioides* en las células adherentes anteriores y se evaluó mediante ensayos de violeta cristal, viabilidad y microscopía electrónica de barrido. La composición química se determinó mediante cromatografía de gases, El Aceite Esencial fue obtenido mediante un proceso de hidrodestilación, usando la trampa de Clevenger, cuyo análisis se realizó por triplicado, mediante CG/EM. El monoterpeno β -pineno fue el componente principal identificado en el aceite esencial de *Baccharis psiadioides*. Por otra parte, los valores de CMI fueron al menos 1,25 % y 4-16 % para los ensayos de agar y microdilución respectivamente. El aceite esencial *Baccharis psiadioides* redujo la adherencia microbiana y la viabilidad de las células, pero no provocó la interrupción completa de las biopelículas. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) indicaron que El aceite esencial

Baccharis psiadioides influye en la adherencia de las células a una superficie.

Rojas y cols. (2007), realizaron un trabajo de investigación titulado: Composición Química y actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae) recolectado en Venezuela, 2006, el objetivo general de la investigación fue analizar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Baccharis trinervis*. La muestra de estudio fue recolectada en mayo de 2006; cuarenta y tres componentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos Wiley cromatografía de gas-espectrometría de masa (CG-EM) Library), obteniéndose un rendimiento de 0,2 % de aceite por hidrodestilación. Los componentes principales D germacreno (20,4 %), limoneno (15,4 %), -cadineno (5,2 %), cariofilleno (4,8 %), pineno (4,5 %) y biciclogermacreno (4,0 %). El aceite esencial mostró actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas patógenos humanos importantes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria de 80 y 200 mg/mL, respectivamente.

Antecedentes Históricos

El género *Baccharis* es uno de los más ricos en especies dentro de la familia *Asteraceae*. Está compuesto por más de 400 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales del continente como: Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México. Su distribución es exclusivamente americana, va desde el Sur de los Estados Unidos hasta el extremo austral de Chile y Argentina. La sistemática del género, básicamente neotropical, es muy confusa, debido a la gran cantidad de especies publicadas y sus distintas y variadas formas, además de la falta de estudios formalmente rigurosos (Prada, Orduz y Coy, 2016).

Desde la prehistoria se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones, este conocimiento ha sido transmitido de padre a hijo, de brujo a médico, de sacerdote a los aprendices, principalmente de manera verbal (Marcano y Hasegawa, 2002).

En 1803 se aísla el primer alcaloide, la nicotina, y le siguieron muchos otros como morfina, estricnina y emetina. Fue entonces hasta mediados del siglo XX, el principal empeño en cuanto a la química de los productos naturales, siguió siendo el aislamiento y determinación de la estructura de una amplia gama de compuestos. A partir de entonces, la atención de los químicos respecto a los productos naturales derivados de la planta fue virando hacia la disolución de las rutas biosintéticas halladas en la planta (Lizcano y Vergara, 2008).

Las plantas con atributos medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre (Marinoff, 2006).

Desde el siglo XVIII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, Paul Ehrlich quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconoció las reacciones químicas específicas entre microorganismos y medicamento, la aparición de la

resistencia a estos, y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos. Seguidamente se descubrieron las sulfonamidas y se acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano llamadas antibióticas, de allí surgió la penicilina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol entre otras (Manrique y Mosquera, 1997).

Posteriormente en el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica. Pero en la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, y por la disminución de efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras (Marinoff, 2006).

Es por ello que la medicina tradicional es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, y la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2009).

Bases Teóricas

Familia Asteraceae

Las Asteraceae son una familia cosmopolita, que se distribuye en casi todas las latitudes, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta las zonas alpinas, por lo tanto, es posible encontrar sus representantes en casi todos los tipos de vegetación y climas (Tapia, 2010).

La familia de las compuestas (Asteraceae), constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta. Se estima su riqueza en aproximadamente 25.000 especies y más de 1.500 géneros (Tapia, 2010).

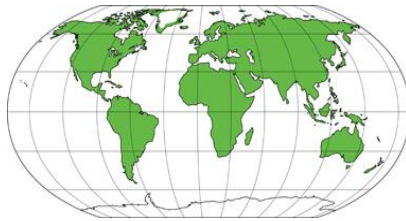
Descripción Botánica de la familia Asteraceae

Las plantas que integran esta familia son un grupo altamente heterogéneo respecto a la morfología de sus partes vegetativas (raíces, tallos, hojas, indumento, etc.), ya que presentan casi todos los tipos de formas, disposición y arreglo; en cambio, es conspicuamente homogéneo en cuanto a la morfología de la inflorescencia que las hace verdaderamente inconfundibles, y se presenta como una cabezuela o capítulo (estructura altamente especializada, con funciones de atracción de los vectores de polinización que generalmente es entomógama) que aparenta ser una sola flor si se le mira superficialmente, pero vista en detalle, resulta estar compuesta de decenas o incluso centenares de flores diminutas insertadas en una base carnosa (receptáculo), donde los “pétalos” que rodean la cabezuela son flores zigomorfas, pentámeras con una porción inferior tubular y uno de los lóbulos prolongado de forma cintiforme llamada lígula; estas flores generalmente son funcionalmente unisexuales o estériles y las flores del centro o disco que son actinomorfas, tubulares coronadas por 5 lóbulos, y son hermafroditas (el ejemplo típico es el “girasol” [*Helianthus annuus* L.] especies (Tapia, 2010).

Distribución Geográfica

Su distribución se da por todo el mundo, excepto en la Antártida. Son abundantes en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales, Provincia del

Cabo, Sur de América, Australia y Región Mediterránea, Rusia y Estados Unidos, se encuentra en hábitats abiertos y/o secos (Funk y cols., 2011) (Figura 1.).



Fuente: Laboratorio de sistemática de plantas vasculares por M. Botánico, M. Rosado, y A. Souza, 2017, Uruguay.

Figura 1. Distribución y hábitat de la familia Asteraceae.

Composición Química de la Familia Asteraceae

La familia Asteraceae (Compositae) es una de las familias de plantas angiospermas más diversificadas, con 1.600 géneros y aproximadamente 23.000 especies, que presentan gran variabilidad en morfología, hábitos, formas de reproducción y fisiología, lo que ha permitido conquistar la mayoría de los ecosistemas terrestres, excluyendo la Antártida. Esta familia ha sido ampliamente estudiada a nivel químico debido a la gran variedad de metabolitos secundarios que produce, principalmente terpenos, cumarinas, alcaloides y sus derivados que presentan propiedades antimicrobianas (Funk y cols., 2009).

Género *Baccharis*

El género *Baccharis* es uno de los más ricos en especies dentro de la familia *Asteraceae*. Está compuesto por más de 400 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales del continente como: Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México. Su distribución es exclusivamente americana, va desde el Sur de los Estados Unidos hasta el extremo austral de Chile y Argentina, la sistemática del género, básicamente neotropical, es muy confusa, debido a la gran cantidad de especies publicadas y sus distintas y variadas formas, además de la falta de estudios formalmente rigurosos (Prada, Orduz y Coy., 2016).

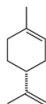
El género *Baccharis* es uno de los más ricos en especies dentro de la familia *Asteraceae*. Está compuesto por más de 400 especies, distribuidas principalmente en regiones tropicales del continente como: Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México. Su distribución es exclusivamente americana, va desde el Sur de los Estados Unidos hasta el extremo austral de Chile y Argentina. Su alta concentración de especies en Brasil y los Andes indica que una de estas áreas es probablemente el centro de origen, pero este hecho todavía no es claro, dado que se pueden encontrar ampliamente diversificado en gran variedad de ambientes. A pesar de todo esto, este género no ha sido monografiado y, por lo tanto, no se tiene el número correcto de especies que lo conforman. Sin embargo, Malagarriga, en 1976, pese a la fecha lejana, fue quien a ese momento realizó uno de los mayores aportes al incluir la mayor cantidad de nombres válidos y sinónimos publicados hasta ese día, donde se reconoció un total de 431 especies y 80 entidades intraespecíficas (Prada, Orduz y Coy, 2016).

Descripción Botánica del Género *Baccharis*

Las especies del género *Baccharis* generalmente son arbustos, que miden en promedio de 0.5 a 4.0 m de altura, aunque se extiende también a plantas perennes herbáceas y subarbustos. No obstante, la mayoría de las plantas de *Baccharis* se pueden distinguir por su hoja o tallo alado siendo las hojas morfológicamente diferentes, lo que ayuda bastante a la identificación. Además, todas las hojas de las especies del género se caracterizan por ser pubescentes, solo unas pocas como *B. dracunculifolia* y *B. trinervis* son subglabro en la madurez (Prada, Orduz y Coy, 2016).

Composición Química del Género *Baccharis*

Las propiedades que han demostrado especies del género *Baccharis* se deben por supuesto a su composición química, basada principalmente en flavonoides, diterpenos y triterpenos), donde los flavonoides se distinguen por conferir protección/resistencia frente al ataque de microorganismos. También se han obtenido, aunque en menor proporción, cumarinas y aceites esenciales. A pesar de todo lo anterior, hasta el momento no se ha establecido un marcador químico para caracterizar a las especies de *Baccharis*. Dado este contexto y panorama el género *Baccharis* ha sido objeto de una variedad de estudios fotoquímicos y de actividad biológica, iniciando su estudio a principios de 1900 y, hoy en día, hay más de 150 compuestos aislados e identificados de este género (Abad y Bermejo, 2007). Estudios fitoquímicos de plantas de este género revelan la presencia fundamentalmente de:



Limoneno

Fuente: Elaboración a partir de PubChem

Figura N° 2. Terpeno presente en Especies Vegetales como *Baccharis salicifolia* (Prada, Orduz y Barrera, 2016).

Usos medicinales del género *Baccharis*

Las especies de *Baccharis* tienen gran importancia socioeconómica en los estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo y Rio Grande del Sur, entre otras regiones de Brasil, porque es usada en la medicina tradicional para el control y tratamiento de diferentes enfermedades. La consumen principalmente como té, para aliviar dolencias de estómago, el hígado, inflamaciones, anemia, diabetes, desintoxicación del cuerpo y también para enfermedades de la próstata (Correa, 1984).

En otros lugares del continente, diversas especies de este género son también utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de varias dolencias, tales como contusiones, inflamaciones, también como antimicrobiano y desinfectante (Martines y cols, 2010).

Especie *Baccharis trinervis*

Las plantas de la especie *Baccharis trinervis* suelen ser arbustos escandentes o subescandentes, trepando hasta 4 m. de altura (figura 3.

Especie vegetal *Baccharis trinervis*); dioicas. Ramitas y hojas esparcidas pubescentes.

- Hojas con peciolo entre 0.1 y 1 cm de largo; lámina entre 1 y 10 cm de largo y entre 0,2 y 3,5 cm de ancho, elípticas, nervadura palmada o plinervada.
- Inflorescencia en paniculadas, entre las hojas o sobresaliendo ligeramente, pedúnculo entre 0,5 y 7 cm. de largo, cabezuelas sobre pedicelos entre 0,1 y 0,8 mm. de largo. Cabezuelas discoides; pistiladas con brácteas involucrales en 3 o 4 series, más grandes hasta 4,5 mm. de largo; receptáculo entre 1 y 2 mm. de diámetro, paláceo; flores entre 2,5 y 3 mm. de largo, erosas en el ápice; cabezuelas estaminadas con brácteas involucrales con 3 o 4 series, más largas hasta 3,5 mm. de largo; receptáculo entre 1 y 1,25 mm. de diámetro, desnudo; flores pseudohermafroditas, entre 3 y 3,5 mm. de largo.
- Aquenio (fértiles) entre 1 y 1,5 mm. largo, esparcido pubescentes; vilano compuesto de 1 serie de cerdas entre 3,5 y 5 mm. largo.



Fuente: Mendoza y Leen, Paramo La Culata.
Figura N° 3 Especie vegetal *Baccharis trinervis*.

Hábitat y Distribución: Bosques secos y húmedos, común en en bosques húmedos. De México a Perú y hacia el norte de Argentina. Una especie común, ampliamente distribuida en América Tropical (Ríos, 2014).

Debe señalarse que dependiendo del lugar donde se encuentre la especie de *Baccharis trinervis* la misma recibe nombres comunes o coloquiales los cuales se describen en la tabla N°1:

Tabla 1.: Nombres comunes de la especie *B. trinervis*.

Nombres Comunes	País
Rasga trapo, alcotán, jalapatras	Costa Rica

Chiñi, kimsa, kuchu, kichua	Bolivia
Barzalito, Chilca, varejón	Colombia
Santa Maria	Panamá
Caniche, chikquita, niquitaito	Venezuela

(Cardenas,Isaza y Perez, 2013.)

La especie *Baccharis trinervis* se ha clasificado taxonómicamente y al respecto, Rodríguez y colabores, 2005 señalada en la tabla N°2:

Tabla 2.: Taxonomía de la especie *B. trinervis*.

Taxonomía	
Reino	Plantae
Filo	MAGNOLIOPHYTA
Clase	Magnolioosida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Baccharis</i>
Especie	<i>Baccharis trinervis</i>

Fuente:(Linares, 2000)

Usos Etnobotánicas o Tradicionales

Usos: Los campesinos la han utilizado para quitar el vómito, empleando la infusión de sus hojas.

- En esta especie, la decocción de toda la planta se ha utilizado como tónico en las enfermedades hepáticas y en forma de baños o paños para desinflamar los ojos. Todas las partes de la planta en cataplasmas se han usado para calmar los dolores de cintura (Correa y Bernal, 1990).

- El tallo por vía oral se ha usado para combatir la fiebre tifoidea (Correa y Bernal, 1990).
- La decocción de hojas y tallos frescos, o secos, se han empleado contra la impotencia sexual y la esterilidad femenina. La decocción con adición de Cola de caballo (*Equisetum* sp), se ha utilizado para la evacuación de cálculos biliares. También la infusión se ha tomado contra la ictericia.
- Macerados en alcohol de 90 grados y aplicado en fricciones se han utilizado contra el reumatismo (Correa y Bernal, 1990).
- Se informa que el uso de las hojas en forma de bebidas y vapores se ha usado como purgante y para combatir las hemorroides (Correa y Bernal, 1990).
- También, se registra que la especie goza de buena fama apícola (Correa y Bernal, 1990).

Importancia de los metabolitos secundarios

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre. Así mismo es importante destacar que a pesar de todos los esfuerzos de naciones, instituciones gubernamentales y no gubernamentales e investigadores en aumentar el nivel y el caudal de conocimientos adquiridos sobre las metodologías de transformación secundaria (de frutos, flores, semillas hojas y tallos) y de la identificación y caracterización de los metabolitos secundarios de especies vegetales priorizadas, en la actualidad solo unos pocos metabolitos se

utilizan de forma industrial, por lo que se ha creado la necesidad de generar opciones alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en el entorno trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisoras que pueden tener aplicación en la industria cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria (Lizcano y Vergara, 2008).

Metabolismo secundario

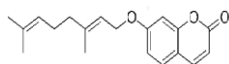
Según Lizcano y Vergara (2008) el metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada y no son universales. Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural. Algunas porciones de esta química son comunes para un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de los metabolitos secundarios es usualmente diferente de una planta a otra, pues precursores químicos comunes pueden conducir a resultados totalmente diferentes.

La clasificación de los productos naturales, puede hacerse de acuerdo a su estructura, bioformación, fuente de producción y acción biológica, algunos de ellos se describen a continuación:

Los terpenoides

Son compuestos a menudo no saturados formados por carbono, hidrogeno y oxigeno de estructura no aromática y que se encuentran sobre todo en los aceites esenciales y en las resinas. Muchas de las plantas, deben sus compuestos terpénicos de las esencias, sus propiedades aromáticas. Pero estas sustancias, poseen también propiedades farmacodinámicas muy variadas en relación con las diferentes funciones ligadas a su esqueleto

terpénico. Algunas, son irritantes de la piel y de las mucosas, utilizándose como rubefacientes (pineno en la esencia de trementina). Los azúlenos tienen propiedades antiinflamatorias. El geraniol, cineol y linalol tienen propiedades antisépticas. El ascaridol, tiene propiedades vermífugas. La tuyaona tiene propiedades abortivas y estupefacientes. Las cucurbitáceas, poseen propiedades tóxicas y necrosantes. El ácido glicirricético tiene propiedades antiinflamatorias (Lizcano y Vergara, 2008).



Fuente: Elaboración a partir de PubChem

Figura 4: Compuesto Terpénico identificado en Especies Vegetales (Caroteno)

Monoterpenos

Son los principales componentes de los aceites esenciales de los vegetales, y los fitoquímicos inhibidores de crecimiento, más abundantes que han sido identificados en las plantas superiores. Casi todos tienen una estructura de 10 átomos de carbono, los cuales derivan a partir de dos unidades de isopreno (Ávalos y Pérez, 2009).



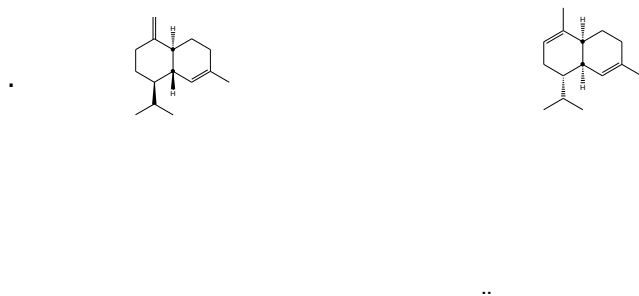
Limono

Fuente: Elaboración a partir de PubChem

Figura 5: Compuesto monoterpénico identificado en Especies Vegetales (limono).

Sesquiterpenos

Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por tanto tres unidades de isopreno. Aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en los aceites esenciales, al igual que los monoterpenos, pero con mayor frecuencia que éstos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*. Este grupo presenta gran variabilidad natural pudiendo encontrar hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos (Palá, 2002).



Fuente: Elaboración a partir de PubChem

Figura 6: Compuestos sesquiterpénicos identificados en Especies Vegetales.

Aceites Esenciales

Los antepasados no le daban el nombre de aceites esenciales a las plantas que utilizaban para medicina, ornamentación, etc., ellos solamente los conocían por sus propiedades curativas. Se ha encontrado vasijas con ungüento, cremas y perfumes en las tumbas de los antiguos egipcios, en especial, en los pertenecientes a las familias reales. A los romanos se les atribuye este descubrimiento. Los griegos también utilizaron las plantas aromáticas. Con el transcurso del tiempo, los aceites esenciales se perfeccionaron en su proceso de extracción y combinación, particularmente durante la Edad Media. El químico René-gattefossé y el Dr. Jean Valnet ambos franceses, denominan aromaterapia a la terapéutica a base de aceites esenciales (Tol, 2005).

Definición

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles provenientes del metabolismo secundario de las plantas. Todas las especies vegetales poseen la capacidad de producir compuestos de naturaleza volátil, sin embargo, en la mayoría de los casos lo hacen en proporciones traza excepto las denominadas “plantas aromáticas” son las especies que producen esencias que tienen algún tipo de interés comercial. Más del 90 % de la producción de aceites esenciales se utiliza como materia prima en la industria de la cosmética (perfumes y productos para la piel y el cabello), alimentaria (aromatizantes), farmacéutica (antimicrobianos principalmente) y herboristería (aromaterapia) (Alemany, Paul, Díaz, 2014).

Son compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano, como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la capsina de la planta conocida como el pimiento rojo o chile *Capsicumm annum*. Los aceites esenciales muestran un amplio rango de actividades biológicas y 31 de ellos tienen monografías específicas en la última edición de la Farmacopea Europea (2007). Alrededor de 3000

especies de plantas pertenecientes a 10 familias botánicas se utilizan para la obtención de aceites esenciales. (Lizcano y Vergara, 2008).

Los idioblastos secretores son células individuales que producen aceite esencial y otras sustancias lipófilas en grandes cantidades y lo retienen en las vacuolas dentro de la misma célula. Éste es el caso de las raíces de *Vetiveria zizanoides* Nash. Similar son las fragancias de la mayoría de las flores, donde éstas pueden sintetizarse en células concretas o en áreas dispuestas en la epidermis de los pétalos. Los conductos o cavidades secretoras son estructuras menos visibles, ya que se encuentran dentro de los tejidos de las plantas. Estos conductos consisten, básicamente, en grandes espacios extracelulares rodeados de un epitelio de células secretoras que excretan sus productos en la cavidad extracelular. Estos conductos están presentes en diversas familias como Myrtaceae, Asteraceae, Rutaceae o Umbeliferae, entre otras. Por último, otras especies almacenan los compuestos volátiles sintetizados en estructuras especializadas denominadas tricomas glandulares. Estas glándulas liberan su contenido en respuesta a un daño en los tejidos. Estas estructuras están presentes en familias como Lamiaceae, Asteraceae o Solanaceae, entre otras (Lizcano y Vergara, 2008).

Los tricomas glandulares varían morfológicamente entre las distintas familias, aunque por lo general existen dos tipos de estructuras básicas. Las estructuras más sencillas son los denominados coléteres o pelos glandulares (“capitate trichomes”), formados por una célula basal, varias células pedunculares y una o varias células secretoras (de 1 a 4 células) que dejan un pequeño espacio subcuticular. Las glándulas más complejas son los denominados tricomas glandulares sensu stricto (“peltate trichomes”), formados por una célula basal de sostén, una o varias células pedunculares y varias células secretoras (de 4 a 16 células) en el ápice que dejan un gran espacio subcuticular donde se acumula el aceite esencial. La secreción se

acumula bajo la cutícula de las células secretoras y se vierte cuando la cutícula se rompe (Usano, 2012).

Muchos de los constituyentes de los aceites esenciales se encuentran presentes sólo en trazas y no suelen ser citados cuando se expresa la composición química de una determinada esencia, a no ser que sean origen de alguna característica distintiva concreta de aceptación o desagrado. Aunque se han llevado a cabo numerosos experimentos sobre la biosíntesis y la actividad biológica de los terpenos y otros metabolitos secundarios, “la mayoría han estado enfocados hacia áreas como la industria o la medicina. Todavía, por tanto, se sabe muy poco sobre su papel en la naturaleza (Usano, 2012).

Métodos extracción de Aceites Esenciales

Un número muy elevado de especies vegetales contienen compuestos volátiles que pueden ser extraídos y aislados como aceites esenciales. Según la “International Standard Organization” (I.S.O.), un aceite esencial se define como “un conjunto de productos volátiles que se obtienen de materiales naturales por destilación con agua o por corriente de vapor o, si se trata de frutos de cítricos, por un proceso mecánico de extrusión, con un proceso posterior de separación de la fase acuosa”. Por lo tanto, productos obtenidos por otras técnicas como extracción con disolventes o extracción con fluidos supercríticos no son técnicamente considerados aceites esenciales (Usano, 2012).

En base a las propiedades del material vegetal de trabajo, pueden emplearse los siguientes métodos extractivos para los compuestos orgánicos volátiles: destilación por arrastre en corriente de vapor.

- Destilación por hidrodestilación.
- Extracción con disolventes.
- Extracción fraccionada con disolventes.
- Maceración.
- Métodos de prensado.
- Enfleurage.
- Extracción con fluidos supercríticos.
- Extracción con líquidos presurizados.
- Extracción-destilación simultánea.
- Extracción con Soxhlet o hidrodestilación asistida por microondas (MAHD).

Por otro lado, existen algunos métodos como son la evaporación de aromas asistida con disolventes (SAFE), la microextracción sólido-fase (SPME) o la deserción térmica directa (DTD), que se aplican directamente a la planta para analizar su composición volátil. En este apartado sólo se expondrán los métodos más empleados (Usano, 2012).

Procesos a escala de laboratorio

Estos procesos se utilizan fundamentalmente para trabajar a pequeña escala y para la determinación de la composición química de los aceites esenciales. El método más utilizado en los laboratorios es la hidrodestilación. Este método permite una rápida determinación cuantitativa de los aceites esenciales y, por ello, las diferentes farmacopeas han adoptado esta metodología (Usano, 2012).

El diseño consiste en un balón de fondo redondo donde se introduce el material vegetal y el agua. En este caso, el material a destilar está sumergido. Una vez que hierve el agua, el vapor arrastra los compuestos

volátiles que, al pasar por un serpentín con refrigerante, condensan y se pueden separar por diferencia de densidades. Normalmente, el condensador vertical suele estar graduado para la medición del volumen de aceite esencial extraído. El tiempo de destilación depende del material vegetal, normalmente 3-4 horas. Para la determinación volumétrica de aceites esenciales, de acuerdo con la mayoría de las farmacopeas, debe ser añadida una pequeña cantidad de xileno (normalmente 0,5 mL) al agua de destilación antes de comenzar la ebullición. Con la adición de xileno se pueden separar hasta las más pequeñas gotas de aceite esencial durante la destilación (Usano, 2012).

Conservación del aceite esencial

Para una óptima conservación del aceite esencial es importante que no reciba luz natural directa y que el recipiente utilizado para su conservación esté completamente lleno y herméticamente cerrado. El aire en el interior del recipiente puede ocasionar la alteración de algunos principios activos con la consiguiente pérdida de calidad. Los recipientes más adecuados son los de vidrio de color topacio, aunque para el transporte a gran escala se utilizan recipientes metálicos con el interior vitrificado. Para su conservación y almacenamiento en frigorífico se deben mantener sin humedad y a una temperatura entre 0-4° C (Usano, 2012).

Métodos de Identificación de Compuestos Químicos de los Aceites Esenciales

Los métodos empleados en la caracterización química de los aceites esenciales se basan en las características físico-químicas que presentan. La mayoría de los métodos aplicados para el análisis de aceites esenciales radican en técnicas cromatográficas que permiten una separación e identificación de los compuestos que los forman. Sin embargo, son necesarias pruebas confirmatorias para una identificación fiable, evitando

caracterizaciones tentativas o equívocas. Estas técnicas adicionales son la espectrometría y espectroscopia (Usano, 2012).

El principal objetivo de cualquier técnica de separación cromatográfica es la completa resolución de la muestra problema en el menor tiempo posible. Para llevar a cabo esta tarea, la cromatografía más adecuada para el análisis de los aceites esenciales es la cromatografía de gases (CG). En esta técnica, los compuestos analizados son evaporados y arrastrados por una fase móvil, el gas portador, a través de una columna capilar, son separados en base a sus presiones de vapor relativas y a su afinidad por la fase estacionaria. Al final de la columna capilar, los agregados eluyen separados en el tiempo. Los medidos individuales son entonces detectados dando lugar cada uno de ellos a una señal en forma de pico (idealmente gaussiano). El conjunto de estos picos para los distintos componentes de la muestra constituye el cromatograma, que enfrenta la intensidad de pico frente al tiempo de elución del compuesto. Cada señal está directamente relacionada con la cantidad de muestra presente, mientras que el tiempo de retención está relacionado únicamente con la identidad química del compuesto. Por este motivo, la información que contiene un cromatograma puede interpretarse desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo. Para una aproximación más completa a la cromatografía de gases (Usano, 2012).

Análisis Cromatográfico

Cromatografía De Gases Acoplada a Espectrometría De Masa (CG-EM)

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (CG-EM) se utiliza frecuentemente debido a su efectividad para identificar los componentes del aceite esencial mediante el uso de las librerías de base de datos empleando los índices de retención y las fragmentaciones de los espectros de las masas de los patrones. Uno de los recientes avances tecnológicos es el uso combinado de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, (CG-EM), el cual ofrece en tiempo real, información adicional sobre la identificación de masas moleculares sin la necesidad de la separación macroscópica de mezclas (Albarracín y Gallo, 2003).

La Espectrometría de Masas consta de una técnica analítica para identificar la composición química de un compuesto basado en la relación masa/carga de las partículas cargadas. La muestra se somete a un fraccionamiento químico para obtener los iones o partículas cargadas. La relación de carga a masa de las partículas es calculada haciendo pasar los iones a través de campos eléctricos y magnéticos. El espectrómetro de masa está constituido por un ionizador, para descomponer las moléculas de la muestra en fragmentos ionizados, un analizador de masa para agrupar los iones según sus masas, y un detector para cuantificar los diferentes componentes (Albarracín y Gallo, 2003).

Las Bacterias

Son microorganismos procariotas unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico, se reproducen por división asexual. Poseen membrana citoplasmática, citoplasma, ADN y ARN, ribosomas y pared celular. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: una pared

celular Gram positiva y una pared celular Gram negativo. Su tamaño es variable entre 1 – 5 μm (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Las Bacterias de acuerdo a la Tinción de Gram se clasifican en: Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas

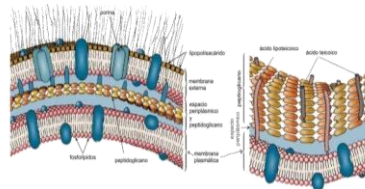
- **Bacterias Gram positivas:** Son aquellas bacterias que poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática, este es un elemento clave para la estructura, la replicación y supervivencia de la célula. Posee también otros componentes como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos. Los ácidos teicóicos son unos polímeros hidrosolubles de fosfato de poliol que están unidos al peptidoglicano mediante enlaces covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular. Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplasmática, estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que diferencian los serotipos bacterianos (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Estas bacterias cuya pared celular de peptidoglicano es más densa, al ser deshidratadas cierran sus poros impidiendo la salida del complejo violeta de genciana-yodo (colorante primario), adquiriendo así un color púrpura que le atribuye su característica Gram positiva (Ramírez y cols., 2010).

- **Bacterias Gram negativas:** Son bacterias que poseen una capa de peptidoglicano delgada, una membrana externa que contiene fosfolípidos, proteínas, y lipopolisacaridos, los cuales están formados

por tres regiones estructurales: el lípido A, región central del polisacárido, y antígeno O, el espacio periplásmico existente entre la membrana citoplasmática y la membrana externa contiene las proteínas de transporte, degradación, y síntesis de la pared celular. La membrana externa está unida a la membrana citoplasmática en unos puntos de adhesión; asimismo está fija al peptidoglicano por enlaces de lipoproteínas (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Estas bacterias cuya pared celular es rica en lípidos, al decolorar quedan poros en su pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana-yodo y al adicionar la safranina (colorante de contraste) toman el colorante por lo que se observan color morado, característica bacteriana Gram negativa (Ramírez y cols., 2010).



**Gram
negativas**

**Gram
positivas**

Fuente: Tomado y modificado de Arellano, Cardona y Zuñiga, 2017.

Figura 7. Pared Celular de las Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Bacterias Gram Positivas

- *Staphylococcus aureus*

Los *Staphylococcus* son bacterias aeróbicas presentes en el medio ambiente y en la flora normal de humanos y animales. Son cocos Gram positivos que crecen como racimo de uvas y se diferencian de los estreptococos por ser catalasa positiva. Las especies se clasifican en *Staphylococcus aureus* que son coagulasa positivos y *Staphylococcus Epidermidis* y *Saprophyticus* que son coagulasa negativo (Arteaga y Arteaga, 2005).

Los *S. aureus* son causa común de infecciones piógenas en piel y otros padecimientos como osteomielitis, artritis séptica, infecciones profundas, abscesos, neumonía, empiema, endocarditis, pericarditis, meningitis y enfermedades mediadas por sus toxinas incluyendo intoxicación alimenticia, fiebre escarlatina, síndrome de piel escaldada y síndrome de choque tóxico (Arteaga y Arteaga, 2005).

- *Enterococcus faecalis*:

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, encontrados solos, en pares o formando cadenas y eventualmente pueden tener una morfología cocobacilos. Son anaerobios facultativos y tienen un rango óptimo de crecimiento entre 30 y 35 °C. Todas las especies crecen en caldos con 6,5 % de NaCl e hidrolizan la esculina en la presencia de sales biliares. Son organismos catalasa negativa, pero en algunas oportunidades pueden ser catalasa positiva y el ácido láctico es el producto final de la fermentación de la glucosa (Herrera, Vargas y Campos, 1998).

Las bacterias del género *Enterococcus* han adquirido un papel relevante en las dos últimas décadas, principalmente debido al aumento del número de casos intrahospitalarios, representando en la actualidad la tercera causa de infección nosocomial. La incidencia anual aproximada de bacteriemia por *E. faecalis* es de uno a dos episodios por cada 1.000

pacientes hospitalizados. Su prevalencia como patógeno nosocomial ha aumentado debido a la selección de estos microorganismos en relación con el uso de antibióticos de amplio espectro sin actividad frente a enterococos, al incremento de procedimientos terapéuticos y de monitorización invasivos en pacientes graves y al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, fundamentalmente neutropénicos (Herrera, Vargas y Campos, 1998).

Bacterias Gram negativas

- *Escherichia coli*

Son bacilos Gram-negativos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos. La bacteria se presenta como bastones Gram-negativos, son pequeños, oblongos, finos; se mueven por medio de flagelos periticos, algunas cepas pueden tener cápsulas y ser inmóviles. Se estima un periodo de incubación de 12 a 60 horas, siendo la media de 48 horas. Causa principalmente colitis hemorrágicas que afectan a cualquier grupo de edad, pero las tasas de infección son máximas en niños menores de cinco años y van decreciendo con la edad. La sintomatología son calambres abdominales seguidos de diarreas acuosas y sanguinolentas (López y Guevara, 2002).

- *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, aerobio obligado, móvil, con forma de bastón y con un solo flagelo. Posee una membrana citoplasmática interna y una celular externa. Entre ambas se encuentra el espacio periplásmico que contiene peptidoglicano (Farías, Medina y Chavarría, 2005).

Para demostrar la existencia de *P. aeruginosa* en infecciones del aparato respiratorio inferior pueden utilizarse diversas técnicas, como: muestra de esputo, aspiración traslaríngea-trastraqueal, broncoscopia y lavado broncoalveolar. Los cultivos de sangre deberán tomarse siempre durante la fase aguda de la neumonía. También existen pruebas de detección directa rápida con anticuerpos fluorescentes para identificar antígenos en improntas, extendidos y secciones de tejidos (Farías, Medina y Chavarría, 2005).

- *Klebsiella pneumoniae*

Es una bacteria Gram-negativa. Poseen una cápsula prominente que da un aspecto mucoso a las colonias aisladas. Producen neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad e infecciones de heridas y del aparato urinario (Murray, Rosenthal y Phaller, 2009).

Los Antibióticos

Son sustancias derivadas de un organismo vivo, generalmente un microorganismo o una modificación química de la misma, que inhibe la reproducción, crecimiento, o incluso, destruye otros microorganismos y células anormales (Cruz, 2001).

Los antibacterianos han facilitado el tratamiento de enfermedades que eran mortales hasta hace poco más de medio siglo. Ello ha contribuido enormemente al aumento de la esperanza de vida y a mejorar la calidad de

la misma en la población de muchos países (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

Clasificación de los Antibióticos

De acuerdo a las investigaciones realizadas por distintos autores se han diseñado varios esquemas para la clasificación de los antibióticos, sin embargo, la más utilizada es la que los agrupa de acuerdo con su mecanismo de acción y estructura química:

Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana

Las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemos, pertenecen a la familia de los β -lactámicos ya que la base de su estructura química es el anillo β -lactámico. Los antibióticos β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a enzimas que actúan en la fase final de la síntesis del peptidoglucano inactivándolas, es decir inactivan a las proteínas ligadoras de las penicilinas (PBP), además, inducen un efecto autolítico, por lo tanto, su efecto es bactericida (Marín y Gudiol, 2003).

Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática

Los polipéptidos son antibióticos bactericidas altamente nefrotóxicos, por lo que están restringidos a uso tópico, es decir, para el tratamiento de infecciones cutáneas, oftálmicas y óticas, ya que no se absorben. En microbiología se utilizan principalmente para la identificación de algunos bacilos Gram negativos no fermentadores y para la elaboración de medios selectivos. Su estructura química está conformada por polipéptidos que se unen a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, alterando su permeabilidad y ocasionando su destrucción (Pigrau, 2003).

Inhibidores de la síntesis de proteínas

Este grupo de antibióticos actúa uniéndose a la unidad 30S ribosomal o a la unidad 50S ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas (Mensa, García y Vila, 2003):

- Antibióticos que actúan en la unidad 30S ribosomal: aminoglucósidos y tetraciclinas.
- Antibióticos que actúan en la unidad 50S ribosomal: fenicoles, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas, ketólidos, oxazolidinonas. En líneas generales, los antibióticos pertenecientes a estos grupos son bacteriostáticos excepto los aminoglucósidos y streptograminas que son bactericidas.

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Se dividen en rifamicinas, quinolonas y sulfamidas:

- Las rifamicinas son un grupo de antibióticos de estructura compleja que inhiben la síntesis de ARN bacteriano mediante la inhibición de la enzima ARN polimerasa, su acción es bactericida.
- Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos que actúan sobre la replicación del ADN bacteriano inhibiendo la acción del ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV, que se encargan del superenrollamiento de la molécula de ADN y separación de las cadenas de la doble hélice durante la replicación bacteriana. Su acción es bactericida.
- Las sulfamidas son un grupo de antibióticos con actividad contra bacterias y protozoarios. El trimetoprim, que tiene actividad contra bacterias, es un análogo del ácido dihidrofólico, compuesto esencial en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, inhibe competitivamente la enzima

dihidrofolato reductasa, impidiendo así la síntesis de ADN y ARN. Su efecto es bactericida. Este grupo de antibióticos fueron los primeros quimioterápicos eficaces que se administraron por vía sistémica para prevenir y tratar infecciones en humanos. Las sulfonamidas son análogos del ácido para-aminobenzoico (PABA), compuesto necesario en la síntesis del ácido fólico, que actúan inhibiendo la enzima dihidropteroato sintetasa, enzima que incorpora el PABA en la síntesis del ácido fólico. Su efecto es bacteriostático (González y Saltigeral, 1992).

Actividad Antibacteriana

Es la capacidad que poseen los antibióticos de inhibir o propagar el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de cultivo agarizado frente a un antibiótico específico, caracterizados por la sensibilidad o resistencia ante los mismos (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

Clasificación y Mecanismo de Acción

En la práctica diaria, las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, las que los clasifica según su mecanismo de acción, y al tener en cuenta la coloración de Gram y las que los agrupa según su estructura química, según el efecto que ejerzan sobre la bacteria pueden ser:

a) Bacteriostáticos: aquéllos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento.

b) Bactericidas: poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica irreversible.

Estas designaciones de bacteriostático o bactericida pueden variar según el tipo de microorganismo: la penicilina G suele ser bactericida para cocos Gram positivos, pero sólo es bacteriostático contra enterococos (*Streptococcus faecalis*), en tanto que el cloranfenicol suele ser bacteriostático, incluso a concentraciones muy altas, pero puede ser bactericida contra *Hemophilus Influenzae* (Jackson, Machado, Hamilton, 1998).

Resistencia Bacteriana

El consumo excesivo de antibióticos sin previa autorización médica, ha traído como consecuencia la resistencia de los gérmenes patógenos a esos antibióticos mejor conocida como resistencia bacteriana, creándose un problema mundial, y por tanto el empeoramiento de los síntomas de la enfermedad, que además crean serias dificultades para la eliminación de los gérmenes, sin hablar de los efectos secundarios que pueden provocar enfermedades adversas (Cruz, 2001).

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. Existen diferentes tipos de resistencia entre ellos están: (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

- Natural o intrínseca: todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación.

- **Adquirida:** Constituye un problema en la clínica, se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles.

La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. La transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

Mecanismos de Resistencia Bacteriana

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivadoras de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando

el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana

Método de Difusión en Agar

Es llamado técnica de Kirby-Bauer, y se basa en la inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de un disco de papel de filtro impregnado con cantidades conocidas de los agentes antimicrobianos. Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en la superficie de una placa con medio de cultivo, sobre él se depositan los discos de papel impregnados, los cuales difunden casi instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente, se lleva a incubar a 37 °C durante 18 horas. El microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los discos cuya concentración de antimicrobiano es inhibitoria. El diámetro de halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo, (este halo es medido en milímetros) (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

Métodos de Dilución

El método de dilución, en agar o en caldo, como test de susceptibilidad microbiana, es utilizado para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia, que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo, después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, respectivamente (Ramírez y Marin, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución), que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. Por otra parte, en el método de dilución en agar, las placas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las placas; la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Ramírez y Marin, 2009).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica, en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además, permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramírez y Marin, 2009).

Definición Operacional de Términos

Metabolitos Secundarios

Son una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que produce una planta y no parecen tener función directa con su crecimiento y desarrollo (Torres, 2004).

Actividad Antimicrobiana

Es la capacidad que poseen los antibióticos de inhibir o propagar el crecimiento de determinados organismos en un medio de agar frente a un antibiótico específico. Caracterizados por la sensibilidad o resistencia ante los mismos (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

Bactericida

Se entiende por bactericida, toda sustancia, capaz de provocar una acción letal sobre las bacterias, es decir, que genera su muerte (Calvo y Martínez, 2009).

Bacteriostático

Es la capacidad que tienen ciertas sustancias, de sólo inhibir transitoriamente, el crecimiento bacteriano, sin causar la muerte del microorganismo (Calvo y Martínez, 2009).

Taxonomía

Es una ciencia que procura identificar, delimitar, nombrar y clasificar las especies (Llosa, 2003).

Toxicidad

Es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él (Peña, 2005).

Operacionalización de las Variables

Las variables son características o magnitudes que pueden sufrir cambios y son el objeto de análisis, medición, manipulación y control en esta investigación. En este trabajo de las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos con el fin de medirlos a través de un instrumento y una metodología pertinente. A continuación, se describen dos variables: La variable dependiente (Tabla 3) está relacionada con la actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. trinervis* y la variable independiente (Tabla 4), está relacionada con la composición química del aceite esencial de *B. trinervis*.

Tabla 3. Operacionalización de variable dependiente. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis*

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Baccharis trinervis</i> .	Dependiente Cuantitativa	La actividad antibacteriana, se define como la habilidad específica de ciertas sustancias que forman un compuesto, de lograr su efecto planeado. Y se basa, en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo. Se determina por el método analítico más adecuado (Pedraza y Castellanos, 2009).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. dimensiones	6. indicador
	Cepas Grampositivas	Sensible
Método de difusión en agar (Kirby-Bauer)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Resistente
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas Gram positivas y Gram negativas
	Cepas Gramnegativas	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	

Fuente: Mendoza, Leen y Cordero, 2021.

Tabla 4. Operacionalización de la variable independiente Composición química del aceite esencial en la especie vegetal.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química del aceite esencial de <i>Baccharis trinervis</i>	Independiente Cuantitativa Discreta	Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, terpenoides. Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes (Cerpa, 2007).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales. Espectros de masas.	- Tiempo de retención y abundancia obtenida de los diferentes compuestos presentes en el aceite esencial de la planta <i>Baccharis trinervis</i> . - Comparación de los espectros de masas con la base de datos Nist 05, Wiley 6ta edición.

Fuente: Mendoza, Leen y Cordero, 2021.

Hipótesis

Debido a que varios aceites esenciales del genero *Baccharis* extraídos mediante la técnica de hidrodestilación poseen actividad antibacteriana se estima que el aceite esencial de *Baccharis trinervis* obtenido mediante esta técnica, presente una relación causal entre la composición química y la actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLOGICO

Tipo de Investigación

De acuerdo con Hurtado (2010) el tipo de investigación parte del objetivo, pues debe existir una relación profunda con el resultado que se persigue, cada tipo de investigación tiene sus propias características y procesos; en este caso el tipo de investigación es confirmatoria; ya que, se establecerá la relación causa - efecto entre la composición del aceite obtenido de las hojas de *Baccharis trinervis* y la actividad antibacteriana, frente a cepas Gram positivas y Gram negativas

Diseño de la Investigación

Vara (2012) expresa: “Los diseños son planes y estrategias de investigación concebidos para obtener respuestas confiables a las preguntas de investigación. El diseño, entonces, plantea una serie de actividades sucesivas y organizadas, que deben adaptarse a las particularidades de cada tesis”. (p.202). La presente investigación posee un diseño experimental, debido a que se sometió el aceite esencial de *Baccharis trinervis* a determinadas condiciones y de tal manera se observaron los efectos y reacciones que se produce en la determinación de actividad antibacteriana frente a diversas cepas Gram positivas y Gram negativas.

Población y Muestra

Según Palella y Martins (2012), “la población es el conjunto de elementos que se quiere conocer o investigar alguna de sus características”. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población. La unidad de investigación estuvo representada, por la planta *Baccharis trinervis*, recolectada en el sector La Culata, del Municipio Libertador, del Estado Mérida. La muestra está representada por las hojas de la especie *Baccharis trinervis* perteneciente a la familia Asteraceae.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral estuvo representada por 1.000 g de hojas frescas de *Baccharis trinervis*. La muestra utilizada, fue no probabilística, a lo que Fernández, Hernández y Baptista (2014), señalan que: “... la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o los propósitos del investigador” (p. 176).

Sistema de Variables

Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación fueron las siguientes: Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis* y la variable independiente (VI): Composición química del aceite esencial de *Baccharis trinervis*.

Instrumento de Recolección de Datos

La recolección de datos se emplea con el fin de obtener información que permita verificar las hipótesis, o responder las interrogantes formuladas. Todo en correspondencia con el problema, los objetivos y el diseño de investigación. Cualquier recurso, dispositivo o formato (en papel o digital), que sea utilizado para obtener, registrar o almacenar información, es considerado un instrumento de recolección de datos (Arias, 2012). Al respecto, Hurtado (2015) señala que:

“Si se trata de eventos poco estudiados, puede ser necesario que el investigador elabore sus propios instrumentos, y éstos pueden ser listas de cotejo, escalas o cuestionarios, entre otros. En algunas áreas del conocimiento se requiere de instrumentos de medición mecánicos o electrónicos, dependiendo del evento estudiado (p. 161)”.

Existen diferentes tipos de instrumentos de recolección de datos. Esta investigación se enfocó en las listas de cotejo, las cuales son un instrumento propio de la técnica de observación, consisten, en una lista de compuestos encontrados en el aceite esencial de *Baccharis trinervis*, así como la presencia o ausencia del halo de inhibición, como característica de la actividad antibacteriana, expresado en milímetros (mm).

Procedimientos de la Investigación

Obtención del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis*

Recolección y Preparación del Material Vegetal

El material vegetal utilizado de *Baccharis trinervis*, fue recolectado en su hábitat natural, en el sector La Culata, Municipio Libertador, del Estado Mérida; e identificada botánicamente por el profesor Pablo Melendez, de la

Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA). Aproximadamente 1.000 g de la planta, fueron deshojados y licuados para el posterior procesamiento en el equipo de hidrodestilación.

Extracción del Aceite Esencial

La obtención del aceite esencial se realizó a partir de material fresco, del cual se tomaron las hojas. Éstas, fueron licuadas y sometidas a extracción por hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger, durante 3 horas, aproximadamente. Así, el aceite extraído fue arrastrado junto con el vapor de agua hacia el condensador y la trampa de Clevenger, ubicada al final del refrigerante. El aceite una vez recolectado, fue almacenado a una temperatura de 4-6 °C, en un frasco hermético y resguardado de la luz. Y tratado con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), para eliminar cualquier residuo de agua, y asegurar de esta manera su pureza.

Identificación de los Componentes Químicos del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis*

Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

El análisis por CG/EM, se realizó en un equipo marca Hewlett Packard 6890, equipado con columna de fenilmetil-polixilosano de 30 metros de largo y 0,25 mm de diámetro (HP-5), y un detector de masas Hewlett Packard MSD 5973. El programa de temperatura usado en el procesamiento, fue el siguiente: 60 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta alcanzar 260 °C con un Split de 100:1. El inyector se mantuvo a 260 °C y el detector a 280 °C. El volumen de aceite puro utilizado, fue de 0,1 µL. La identificación de los

componentes se estableció utilizando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición.

Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis* por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer)

La determinación de la actividad antibacteriana, se realizó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), originalmente descrito por Bauer y cols (1966), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

Bacterias Estudiadas

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias Gram positivas y tres a las bacterias Gram negativas, de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), las cuales fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA), a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (**tabla 5**).

Tabla 5. Cepas de referencia internacional ATCC.

Bacterias Gram positivas (ATCC).	
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212
Bacterias Gram negativas (ATCC).	
<i>E. coli</i>	ATCC 25922
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 23357
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853

.Fuente: Elaborado por Cordero y Obregón, 2021.

Preparación de los Inóculos Bacterianos

El inóculo bacteriano se preparó con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera, una pequeña cantidad de colonias, a partir de las cepas frescas y purificadas, para luego ser suspendidas en tubos 13x100, previamente estéril, que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 %, hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán N° 0,5 equivalente a 10^{6-8} UFC/mL.

Inoculación de las Placas

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos

bacterianos (bacterias en estudio), previamente preparados en solución de NaCl al 0,85 %, utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los Discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann Nº 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizarán con luz ultravioleta (LUV), por 24 horas. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel de filtro con 10 µL de la muestra en estudio (aceite esencial puro y diluido). También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar, Posterior a esto se procedió a buscar los controles positivos (Tabla 6) en este caso utilizamos:

Tabla 6. Discos de antibióticos comerciales usados como control positivo.

Bacterias (ATCC).	Antibióticos comerciales
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	E (15 µg)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AMP (10µg)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	PIP (100 µg)
<i>Klebsiella pneumoneae</i> ATCC 23357	PIP (100 µg)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	PIP (100 µg)

Leyenda: E: Eritromicina ®. AMP: Ampicilina ®. PIP: Piperacilina ®.

Fuente: Elaborado por Cordero y Obregón, 2021.

Dilución del aceite esencial para la preparación de los discos.

Para poder obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se prepararon diluciones a partir del aceite esencial puro, para así observar las diferentes respuestas de sensibilidad o resistencia de dicho aceite midiendo su halo de inhibición (Tabla 7).

Tabla 7. Diluciones del aceite esencial

<i>Baccharis trinervis</i>
Aceite esencial puro
1000 ppm
500 ppm
250 ppm
125 ppm
62,5 ppm

Fuente: Mendoza, Leen, Cordero y Obregón 2021.

Colocación de los Discos Impregnados

Una vez preparados los discos, con una pinza estéril se colocaron hasta 6 discos de papel filtro en forma equidistante, presionándolos suavemente contra la superficie del agar. Se utilizaron como controles para las bacterias Gram positivas Ampicilina sulbactam® y Eritromicina® con una concentración de 10 mg/mL, y 15 mg/mL y para las bacterias Gram negativas Piperacilina® 100 mg/mL para ambos ensayos DMSO.

Se incubaron las placas a 37° C en una atmosfera aeróbica durante 24 horas, y posteriormente se realizó la lectura, utilizando una regla milimetrada para medir la zona clara (halo de inhibición) alrededor del disco, el cual corresponde con la inhibición del crecimiento bacteriano. La lectura se realizó con la placa invertida e iluminación directa evitando el reflejo de la luz.

Pre-incubación e Incubación de las Placas

Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müeller Hinton previamente inóculados, éstas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras

difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a temperatura de 37 °C en posición invertida, en atmósfera aeróbica (incubación).

Lectura de las Placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas, por un lapso de tiempo de 24 horas, fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm).

Diseño de Análisis

Los resultados de esta investigación fueron analizados desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo. Se recolectaron y analizaron datos, con el fin de contestar preguntas de investigación y probar la hipótesis establecida previamente. El objetivo fue, relacionar el crecimiento de las cepas en estudio, contra la acción antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis*, así como la identificación de los componentes químicos presentes en el aceite esencial de esta especie, y que pudieran ser responsables de dicha actividad.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y Obtención del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis*

Baccharis trinervis, fue recolectada en el sector La Culata, del Municipio Libertador, del Estado Mérida. Fue sometida a un proceso de extracción por hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger (**figura 13**), con la finalidad de obtener su aceite esencial. A partir de 1.000 g de hojas frescas de la planta, se obtuvieron 5 mL de aceite esencial, con las características siguientes (**Tabla 8**):

Tabla 8. Características del Aceite Esencial

Características	<i>Baccharis trinervis</i>
Aspecto	Transparente
Color	Ámbar
Olor	Característico
Peso de hoja	1000 g
Vol. Del aceite	5 ml
Rendimiento del aceite	0.5 ml

Fuente: Elaborado por Mendoza y Leen 2021

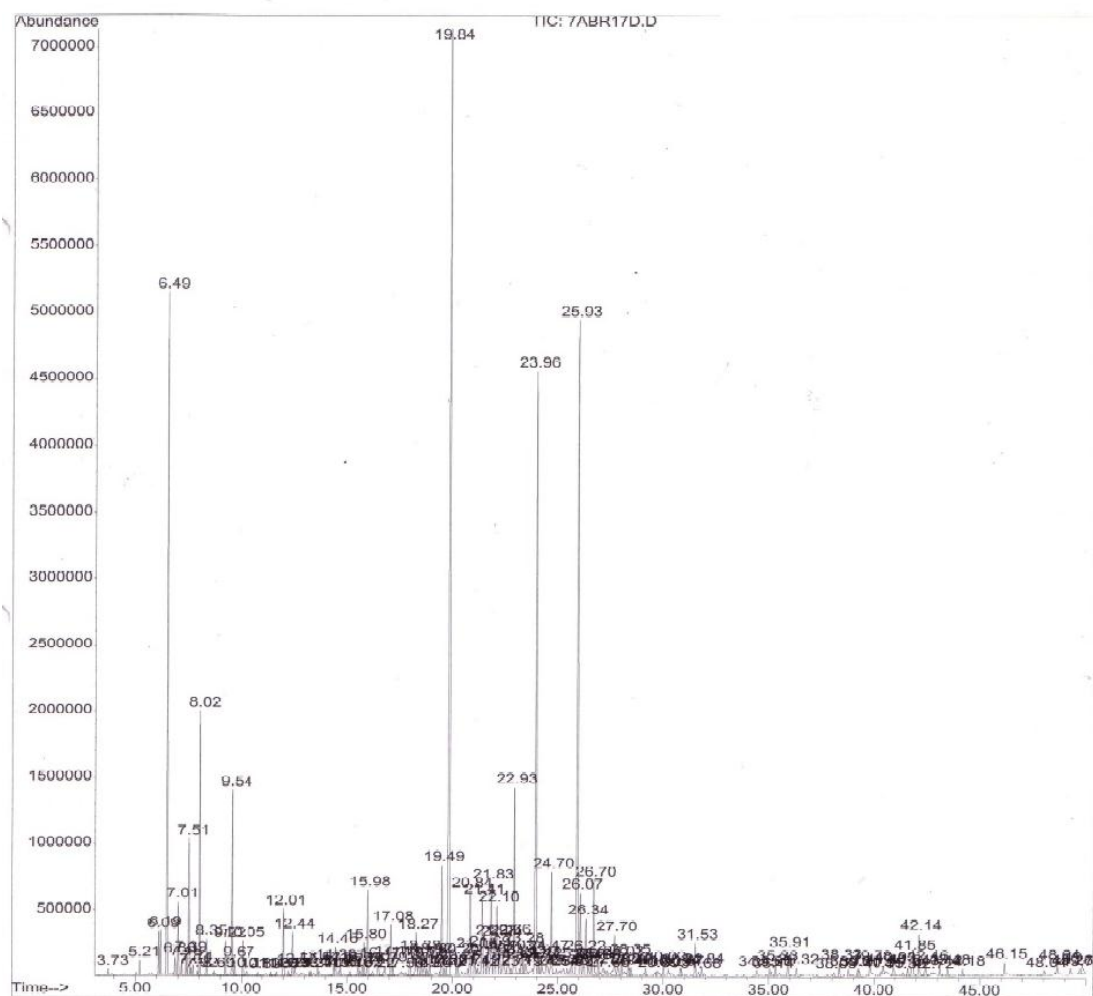


Figura 8. Trampa de Clevenger

Fuente: Mendoza y Leen 2021

Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis*

El proceso de análisis por Cromatografía de Gases a Espectrometría de Masas o análisis químico del aceite esencial de *Baccharis trinervis*, se realizó por medio de un equipo de CG/EM (figura 14), el cual permitió conocer la composición química y abundancia relativa de los principales componentes, identificándose exitosamente el 97,9 % de la muestra, representado por 33 compuestos (tabla 9). El componente mayoritario del aceite esencial resultó ser Trans- cariofileno (figura 15) (20,43 %), seguido de Limoneno (figura 15) (15,18 %), Germacreno (figura 17) (11,70 %), Mirceno (figura 17) (8.71%), β - cariofileno (figura 18) (4,82%) y α - pineno (figura 19) (4,16%).



Fuente: Cordero y Obregón 2021

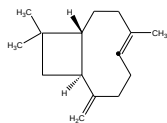
Figura 9: Cromatograma del aceite esencial de *Baccharis trinervis*

Tabla 9. Composición química de *Baccharis trinervis*

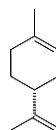
COMPUESTO	TR(min)	Area %
α - pineno	5,21	4,16
Sabineno	6.09	2,48
β -pineno	6,19	2,55
Mirceno	6,49	8,71
α - felantreno	6.86	0,25
Delta-3-careno	7,01	3,6
α - terpineno	7,17	0,19
Limoneno	7,51	15,18
Trans-ocimeno	8,02	3,23
γ -terpineno	8,35	0,50
α - terpinoleno	9,22	0,48
Linalool	9,54	2,59
3- ciclohexano	12.01	1,03
α - terpineol	12,44	0,65
Geraniol	14,46	0,41
Fenol	15,98	1,43
α - Ylongene	18,27	0,83
α - fenchene	18,38	0,51
β - Elomeno	18,92	0,39
α - Gurjuneno	19,49	1,88
Trans-cariofileno	19,84	20,43
γ - Elemeno	20,20	0,45
α -Humeleno	20,84	1,43
γ - Gurjuneno	20,41	1,35
β – Selineno	21,83	1,72
Cadineno	21,97	0,61
α – selineno	22,10	1,61
α - Muuroleno	22,24	0,54
Delta- Cadineno	22,94	3,18
γ - Selineno	23,28	0,30
Germacreno β	23,96	11,70
β- cariofileno	20,70	4,82
T- Muurolol	26,70	4,61

Leyenda: TR: Tiempo de retención, Area % **Fuente:** Elaborado por Mendoza y Leen 2021

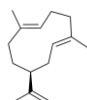
trans-cariofileno.



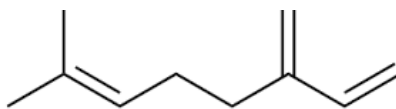
Limoneno



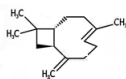
Germacreno



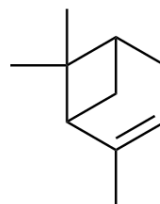
Mirceno



β – cariofileno



α – pineno



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 10. Componentes mayoritarios del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis*

Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Baccharis trinervis*

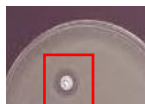
La actividad antibacteriana se determinó a través del Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer), utilizando cepas bacterianas de referencia internacional ATCC. De esta manera, la actividad biológica del aceite esencial, fue probada frente a dos bacterias Gram positivas (figura 21) y tres Gram negativas (figura 22), mostrando efecto inhibitorio sobre los microorganismos probados (tabla 10). Los controles positivos se emplearon según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), el cuál indica el tipo de antibiótico a usar para cada una de las especies estudiadas. Tras el ensayo, se obtuvieron halos de inhibición superiores al tamaño del disco (6mm) e inferiores a los controles positivos.

Tabla 10. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. trinervis*.

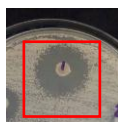
	Bacterias (ATCC)				
	Gram negativas			Gram positivas	
	Piperacilina®			Eritromicina®	Ampicilina sulbactam®
	<i>E. coli.</i> ATCC 25922	<i>K. pneumonia.</i> ATCC 23357	<i>P. auriginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus.</i> ATCC 25923	<i>E. fecalis.</i> ATCC 29212
Aceite esencial de <i>B. trinervis</i>					
Aceite puro	7mm	9mm	9mm	17mm	9mm
1000 µL	7mm	8mm	8mm	7mm CMI	7mm
500 µL	7mm	8mm	8mm	0mm	7mm
250 µL	7mm	8mm	8mm	0mm	7mm CMI
125 µL	7mm	8mm	8mm	0mm	0mm
62,5 µL	7mm	8mm	8mm	0mm	0mm
Halo de inhibición (mm)					

Leyenda: mm: milímetros. **E:** Eritromicina ®. **AMP:** Ampicilina ®. **PIP:** Piperacilina ®.

Fuente: Elaborado por Mendoza y Leen 2021



Enterococcus fecalis



Staphylococcus aureus

Fuente: Proceso investigativo.

Figura 11: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis* frente a bacterias Gram positivas.



Escherichia coli



Klebsiella pneumoniae



Pseudomonas aeruginosa

Fuente: Proceso investigativo.

Figura 12: Actividad antibacteriana del aceite esencial *Baccharis trinervis* frente a bacterias Gram negativas.

Discusiones

La obtención del aceite esencial de *Baccharis trinervis*, se llevó a cabo por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, además, fue realizado, un análisis de su composición química mediante Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). Encontrando como compuestos mayoritarios, monoterpenos (limoneno y mirceno), sesquiterpenos (*trans* cariofileno, Germacreno, β cariofileno) y en menor proporción terpenos (α -pineno). Así mismo se realizó un análisis antibacteriano completo el cual permitió conocer la actividad antibacteriana de dicho aceite esencial y su Concentracion Minima Inhibitoria.

Chaverry y Ciccio (2017), tras su investigación, revelaron características organolépticas del aceite esencial de *Baccharis trinervis*, similares a las encontradas en el aceite esencial de la presente investigación, tales como: un aspecto transparente, color ámbar, olor característico, rendimiento de 0,5 % para el aceite esencial de *Baccharis trinervis*. De igual forma se encontró similitud, respecto a la presencia de otros compuestos como: oxido de cariofileno (22,5%), viridiflorol (21%), Limoneno (6,8%), D Germacreno (19,1%), Mirceno (6,8%) , β - cariofileno (9,1%) y α - pineno (5,9%).

La actividad antibacteriana se refiere a la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, o aún de destruirlos. En esta investigación, dicha actividad fue evaluada por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer). En este sentido, es importante mencionar, que debido a los pocos estudios sobre la actividad antibacteriana de la especie *Baccharis trinervis*,

los resultados fueron comparados con otros estudios, basándose en la presencia de los compuestos mayoritarios.

En tal sentido, Gómez y cols., (2018) indicaron la presencia de compuestos mayoritarios como los terpenoides Germacreno D (18,4 %), (E) - Nerolidol (14,0 %), Mustacone (11,2 %), Spatulanol (11 %), β -pineno (9,5 %) y Bicyclgermacreno (8,4 %) en aceites esenciales de hojas de *Baccharis dracunculifolia* (DC), coincidiendo con los encontrados en la especie estudiada *Baccharis trinervis*, a excepción del (E)-Nerolidol, Mustacone, Spathulenol y Bicyclgermacreno. Los mismos autores demostraron que el aceite presentó actividad antibacteriana directa frente a *Staphylococcus aureus* con una CMI de 102 μ g/mL, en concordancia con la presente investigación, donde el aceite esencial de *Baccharis trinervis*, mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

En tal sentido, De Oliveira y cols., (2016), en su investigación sobre *Baccharis psiadioides*., identificaron como principal compuesto del aceite esencial de esta planta, el monoterpeno β -pineno (25,3%), coincidiendo con la presente investigación. Del mismo modo, estos autores, evaluaron la actividad antibacteriana de dicho aceite frente a *Enterococcus faecalis*, inhibiendo el crecimiento bacteriano de dicha cepa, los valores de concentración mínima inhibitoria fueron al menos 1,25% y 4-16% para los ensayos de agar y microdilucion respectivamente, coincidiendo con los resultados de la presente investigación, frente al cual, el aceite esencial de *Baccharis trinervis* mostró su mayor efecto.

Por otra parte, Rojas y cols (2007), en su investigación sobre la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. identificaron como principales compuestos del aceite esencial de esta planta, germacreno D (20,4 %) , limoneno (15,4 %), -cadineno (5,2 %), cariofileno (4,8 %), pineno (4,5 %) y

biciclogermacreno (4,0 %), coincidiendo con la presente investigación, a excepción del biciclogermacreno. Del mismo modo, estos autores, evaluaron la actividad antibacteriana de dicho aceite frente a *Staphylococcus aureus* con un halo de inbicion de 8mm y una concentración mínima inhibitoria de 80µg/mL, *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 11mm y una concentración mínima inhibitoria de 200 µg/mL, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* no presentaron actividad y no fueron testeadas. Coincidiendo con los resultados de la presente investigación. Este trabajo de investigación guarda relación con nuestro tema ya que es nuestro trabajo confirmatorio, los autores realizaron la obtención del aceite, identificación de los principios activos y la determinación de la actividad antibacteriana de *Baccharis trinervis* en cepas Gram positivas y Gram negativas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Una vez finalizado el trabajo se presentan las conclusiones como parte del cierre para dar una visión general sobre el trabajo de investigación, en este caso se presentan a partir de los objetivos que orientaron el estudio:

De las hojas frescas de *Baccharis trinervis*, se obtuvieron 5,0 mL de aceite esencial, con un rendimiento del 0,05 %. Lográndose identificar 97,9 % del total de compuestos del aceite esencial.

Se identificaron un total de 33 compuestos. El componente mayoritario del aceite esencial resultó ser *trans*- cariofileno (20,43 %), seguido de Limoneno (15,18 %), Germacreno (11,70 %), Mirceno (8,71 %), β - cariofileno (4,82 %) y α - pineno (4,16 %).

El aceite esencial puro obtenido de las hojas de *Baccharis trinervis*, mostró actividad antibacteriana frente a: *Staphylococcus aureus* (17 mm) , *Enterococcus faecalis* (9 mm), *Escherichia coli* (7 mm), *Klebsiella pneumoniae* (9 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm).

El ensayo de la actividad antibacteriana mostró mayor efecto sobre las cepas Gram positivas, respecto a las Gram negativas. Siendo *Enterococcus faecalis*, y *Staphylococcus aureus* los microorganismo más sensibles con una concentración mínima inhibitoria para ambas cepas bacterianas (7 mm) en 1000 ppm y 250 ppm, respectivamente.

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de *Baccharis trinervis*, abren la posibilidad de que esta planta pueda ser incluida como base en la formulación de fármacos, proporcionando una alternativa terapéutica en enfermedades causadas por agentes resistentes a los antibióticos convencionales.

Recomendaciones

Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis trinervis* frente a microorganismos multirresistentes, causantes de enfermedades nosocomiales.

Ensayar otras actividades biológicas al aceite esencial de *Baccharis trinervis*, tales como: actividad antifúngica, antiinflamatoria, antiparasitaria, antioxidante, entre otras.

Dar a conocer a la comunidad científica farmacéutica los resultados encontrados de actividad antibacteriana en el aceite esencial de la especie *Baccharis trinervis* para la formulación de fármacos alternativos a enfermedades que requieran de antibióticos.

Realizar comparaciones de la composición química de las hojas de *Baccharis trinervis* y la actividad antibacteriana con plantas recolectadas en otra región del país.

REFERENCIAS

- Abad M, Bermejo P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7:76-96.
- Albarracin y Gallo (2003). Composicion de Dos Metodos de Extraccion de Aceite Esencial Utilizando *Piper aduncum* (Cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Colombia.
- Alemaný Jaime Usano, Paul Jesus Palá, Diaz Silvia. (2014). Aceites Esenciales: conceptos Básicos y Actividad Antibacteriana, Reduca (Biología) vol.7
- Alvarez L. Maria Elena, Isaza M Gustavo, Acosta A Sandra Milena, Yopez Andres Gilberto . (2005). Actividad antimicotica de *Phenax rugosus* (LAM) pers y *Baccharis trinervis* (SW) weed. Biosalud Revista Cientifica de Salud ,pp 38- 45.
- Anon. (2003). Determination of minimun inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, vol 9, pp1.
- Arellano, J., Cardona, L. y Zuñiga, Y. (2017). Tinción de Gram y su importancia en la clasificación de bacterias para el tratamiento de patologías relacionadas. *Ciencia en blog*. Recuperado de: <http://cienciaenunitolima.blogspot.com/2017/08/blog-post.html>.
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de Investigacion Introducción a la Metodología Científica*. Caracas-Venezuela: Editorial Episteme, C.A.
- Arteaga, R. y Arteaga, M. (2005). Infecciones estafilocócicas. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, vol 44(3), pp178-180. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?s=sci_arttext&pid=S10.
- Avalos-García A, y Perez-Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*. Vol 2(3): pp119-145.

- Avila Acosta, R.B. Metodología de la Investigación . Edición Estudios y Ediciones R.A., Lima-Peru, pp. 237.
- Barcos D. (2018). Actividad Antimicrobiana Del Extracto Natural De *Crescentia cujete* en Cepas de Bacterias y Hongos Patógenos. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Betés, M., Durán, M., Mestres, C. y Nogués, R. (2008). Farmacología para Fisioterapeutas. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
- Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismo de acción de los antibióticos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, vol 27 (1). Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000177>.
- Cardenas, A., Isaza, G., Perez, J. (2013). Especies Vegetales Investigadas Por Sus Propiedades Antimicrobianas, Inmunomoduladoras, Hipoglucemiantes en el Departamento de Caldas (Colombia Suramérica). Revista Biosalud Vol 12
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización* (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid.
- Chaverri Carlos y Ciccio Jose F. (diciembre 2017) revista de biología tropical volumen 65 n.4.
- Corrêa MP. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional - Rio de Janeiro. pp1-6.
- Correa, J y Bernal, H. 1990. Especies Vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Talleres de editorial Guadalupe Lyda. Bogotá, Colombia.
- Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of

lignocellulosic materials. Journal of agricultural and food chemistry, vol.49 (5), pp.2459-2464

De La Rosa, M., Prieto, J., Navarro J. (2011). Microbiología en ciencias de la salud. España: Elsevier.

De Oliveira, A., Oliveira, A., Cortez, L., Pessoa, M., Melo, H., y Figueredos, M. (2016). Actividad moduladora de los extractos de etanol de hojas de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) en medicamentos antimicrobianos. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol21 (1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000100001

Domingo D Lopez, B. M. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana . Esp Quimioterap, pp.385- 393.

Farías, E., Medina, R. & Chavarría, J. (2005). Neumonía nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista de Medicina Interna*, vol21, pp.368-379. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2005/mim055f.pdf>

Fernández, C., Hernández, R. y Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación*. México: Editorial Mc Graw Hill.

Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, vol 32 (1): pp 41.

Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). Diagnostico microbiológico. Buenos aires. Editorial: medica panamericana. pp1160.

Funk, V. A, Sussana, A., Stuess, T.F., y Bayer, R. (2009). *Evolucion Sistematica y Biogeografica de las compositae: Asociacion Internacional para la taxonomía de las Plantas*. Viena.

Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud en la población de Babahoyo, Ecuador. *Anales de*

la Facultad de Medicina, vol.77 (4). Recuperado de:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002.

Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case (2008) *Introducción a la Microbiología*, Buenos Aires Argentina.

Gerson Javier Gómez Salazar y otros (2018). *revista Industrial Crops and Products*, Vol 122, pp 591-595.

González, N. y Saltigeral, P. (1992). *Guía de antimicrobianos, antiparasitarios, antivirales y antimicóticos*. 3ra. Edición. México: McGrawhill Interamericana.

Granados, R., Villaverde, M. (2003). *Microbiología*. España: Paraninfo XXI.

Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 96(2–3), pp.67-202.

Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2008). *Metodología de la investigación* (4a. ed.). México: McGraw-Hill.

Herrera, L., Vargas, A. & Campos, M. (1998). Aislamientos de *Enterococcus* spp., resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, vol.33(1-2), pp.29-38. Recuperado de:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461998000100004&lng=en&tlng=es
<http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM.MEX.1061696>.

Hurtado, H. (2010). *El proyecto de investigación. Comprensión Holística de la Metodología y la Investigación* (6ta ed.). Venezuela: Quirón-Sypal.

Hurtado, J. (2015). *El Proyecto de Investigación*. Caracas-Venezuela: Ediciones Quirón.

- Jackson L, Machado L y Hamilton M. (1998). Principios Generales de la terapeutica antimicrobiana . Acta Medica, pp13- 27.
- Rojas J, Velasco J, Morales A, Rojas L, Diaz T, Rondon M, Carmona J. (2007). Composicion Quimica y actividad antibacteriana del aceite esencial de la Baccharis trinervis (LAM) en Venezuela. Natural Product Communications, pp369- 372.
- Garcia J, Cristiano T, Lima E, Guecheva T, Villela II , Martinez W, Correa D, De Bf A, Moura S, Quintana M, Da Silva J, Pegas J. (2018) Caracterizacion química, genotoxicca, citotóxica y propiedades mutagenicas deBaccharis trinervis (Lam, Person) de Colombia y Brasil, Journal of Ethnopharmacology, pp.210-220.
- Linares, J. Departamento de Botanica, Instituto de Biología (IBUNAM) Baccharis tyrinervis Pers, ejemplar de Herbario Nacional de Mexico. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), Mexico, Universidad Nacional Autonoma de Mexico..
- Lizcano A y Vergara J. (2008). Evaluacion de la actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides, Passiflora manicata frente a microorganismos patogenos y fitopatogenos. Bogotá.
- Llosa, Z. (2003). *Zoología general*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. Pág. 04.
- López, W. y Guevara, J. (2002). Infección Por *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*, vol.3(1), pp.38-41. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rfmh_ urp/v03_n1/a12.htm.
- Manrique, E. y Mosquera, O. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de Espeletia murilloii cuatr y Espeletopsis guacharaca (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Marcano, D; Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica, Caracas-Venezuela: Torino.
- Marín, M. y Gudiol, F. (2003). Antibióticos β -lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol.21 (1) pp.42-55.
- Marinoff, M. (2006). *Las Plantas Medicinales desde la Biblia a la actualidad*. Universidad Nacional del Noreste. Argentina.
- Martínez S, Terraza E, Álvarez T, Manani O, Vila J, Mollinedo P. 2010. Actividad Antifúngica in Vitro de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. *Revista Boliviana de Química*, vol. 27(1) pp.13-18.
- De Oliveira M, Pawlowski A, Gonçalves G, De Souza A Motta, Guedes A. Nov 2015, *Pharmaceutical Biology*. Vol 54.
- Mensa, J., García, E. y Vila, J. (2003). Macrólidos, cetólidos y estreptograminas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol.21 (4) pp.200-208.
- Muñoz, (2015). *Distribucion Geografica de la Familia Asteraceae*.
- Murray, M., Rosenthal, S. y Pfaller, A. (2009). *Microbiología Médica*. 6ta. Edición. Editorial Elsevier.
- OMS (2009). Medicina tradicional: definiciones. [Base de datos en línea]. Consultada el 01 de noviembre de 2018 en: <http://www.who.int/topics/traditional-medicine/definitions/es/>.
- Organización Mundial de la Salud. (1975). Reporte. Promoción y desarrollo de la medicina tradicional. Conferencia Internacional sobre atención primaria a la salud, Ginebra Pedrique.
- Mgaly (2002). Determinación de la Sensibilidad de las Bacterias a los Antibióticos (Antibiograma) Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

- Palella, S. y Martins, F. (2006). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas-Venezuela: FEDUPEL.
- Palella, S. y Martins, F. (2010). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas-Venezuela: FEDUPEL.
- Pedraza, P. y Castellanos, H. (2009). *Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro* (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.
- Peña, C. (2005). Tipos de toxicidad y escalas de valoración. *Oncología*, vol. 28 (2). Recuperado de: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352005000200004`](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352005000200004).
- Pigrau, C. (2003). Oxazolidinonas y glucopeptidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol.21 (3): pp.157-165.
- Prada, J. Ordaz, L, y Coy, E, (2016). *Baccharis latifolia. Una Asteraceae poco Valorada con Potencial Químico y Biológico en el Neotrópico*. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá-Colombia.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M. y Mosqueda, N. (2010). Manual práctico de bacteriología general. Mérida, Venezuela: Colección Textos Universitarios de la Universidad de Los Andes.
- Ramírez, L. y Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Redalyc*, vol. 15 (42). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Rios, J (2014). Blog Plantas Medicinales de Panama.
- Rodríguez, A. (04 de abril de 2011). *Biodiversidad de Costa Rica*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018, de <http://atta2.inbio.ac.cr/neoportal-web/species/baccharis%20trinervis>.

- Roger, J. (2006). Salud por las plantas medicinales. Madrid, España: Safeliz, S.L.
- Tamayo, M. (2001). El proceso de investigación científica (4a ed.). México: Limusa.
- Tapia muñoz jose luis (2010) La Familia Asteraceae. Herbario CICY, Unidad de Estudios Naturales.Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan – Mexico
- Tol, V. (2005). Comparación de la calidad del aceite esencial crudo de Citronella (*Cymbopogon winteriana jowitt*) en funcion de la concentracion de geraniol obtenido por medio de extraccion por arrastre de vapor y maceracion. Guatemala.
- Torres Salaza , Pereira de Sousa Fernandes Lima Izabel Cristina, Santiago Lemos Thiago Sampaio, De Freitas Henriquel, MeloCoutinho Douglas^bLuiz Eversonda Silva^cWanderleido Amaral^cCíceroDeschamps^d revista Industrial Crops and Products, Vol.122, pp 591-595.
- Torres, C. (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Jardín Botánico José Celestino. Bogotá, Colombia.
- Usano, J. (2012). Estudio del efecto de los factores ambientales y agronomicos sobre la poducción de los aceites esenciales de Salvia lavandutifolia VAHL. Madrid.
- Vara, H. (2012). Desde La Idea hasta la sustentación: Siete pasos para una tesis exitosa. Un método efectivo para las ciencias empresariales. [Libro en línea]. Consultado el 15 de abril del 2018 en: <http://www.administracion.usmp.edu.pe/investigacion/files/7-PASOS-PARA-UNA-TESIS-EXITOSA-Desde-la-idea-inicial-hasta-la-sustentaci%C3%B3n.pdf>.

Vivas K. (2013). Determinación de la Actividad Citotóxica Producida por Extractos de Plantas Obtenidas en la Región Andina. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Zaraza, M. (2012). Actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Conocarpus scoparioides* frente a cinco cepas bacterianas de interés clínico en Colombia. Bogotá.