



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE LAS HOJAS *CALLISTEMON SPECIOSUS* (MYRTACEAE).**

www.bdigital.ula.ve

AUTORA: Mata, Ariana

TUTORA: Prof. Cordero, Yndra

Mérida, octubre 2021



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE LAS HOJAS *CALLISTEMON SPECIOSUS* (MYRTACEAE).**

www.bdigital.ula.ve

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Licenciado (a) en Bioanálisis**

AUTORA: Mata, Ariana

TUTORA: Prof. Cordero, Yndra

Mérida, octubre 2021

DEDICATORIA

Dedico la investigación fruto de mi esfuerzo a:

Dios todopoderoso, por darme salud y fuerzas para seguir adelante día a día y ser la luz que ilumina mi camino.

Mi Madre Beatriz Cardona por ser el pilar más importante, este triunfo también es suyo.

Mis Hermanas Andreina y Alejandra, quienes estuvieron presentes en cada momento vivido durante mi formación profesional.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

La culminación satisfactoria del presente Trabajo Especial de Grado hubiese sido imposible sin la participación de diversas personas. Por ello, es para mí un verdadero placer expresarles el más sincero agradecimiento:

Primeramente, a Dios Padre Celestial, por bendecirme, guiarme, darme salud y sabiduría para alcanzar esta meta.

A mi madre, por encomendarme a Dios en cada una de sus oraciones, por el apoyo brindado, por los ejemplos de perseverancia y constancia, por el amor incondicional que cada día me ofrece, por sus consejos y por siempre estar pendiente de cada paso que doy. Te amo.

A mis hermanas en ustedes he encontrado el consuelo, la esperanza y la confianza para alcanzar mi sueño. Por compartir cada una de mis alegrías y tristezas dándome palabras de aliento para seguir adelante.

A mis amigas, gracias porque siempre estuvieron apoyándome en las buenas y en las no tan buenas.

A la Profesora Yndra Cordero, por su colaboración y apoyo, le estaré agradecida infinitamente.

A mi tutor Profesor Luis Rojas (†), por su apoyo, paciencia, asesoría y ayuda en la realización de este trabajo.

A la ilustre Universidad de Los Andes y de manera especial al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por permitirme la adquisición de nuevos saberes en mi formación profesional.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron para que este Trabajo Especial de Grado llegara a finalizar.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pp.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE IMÁGENES	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación e Importancia de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	15
Bases Teóricas	17
Definición Operacional de Términos	54
Operacionalización de Variables	55
Hipótesis	58
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	59
Tipo de la investigación	59

Diseño de la Investigación	59
Población y Muestra	60
Unidad de Investigación	61
Selección del Tamaño de la Muestra	61
Instrumentos de Recolección de Datos	61
Procedimiento de la Investigación	62
Diseño de Análisis	66
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
Resultados y Discusión	67
Obtención del Aceite Esencial	67
Análisis Cromatográfico del Aceite Esencial	67
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
Conclusiones	76
Recomendaciones	77
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	79
ANEXOS	92
A. Evidencias Fotográficas	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Pp.
1. Usos de los Aceites Esenciales	39
2. Variable Independiente	56
3. Variable Dependiente	57
4. Componentes Identificados del Aceite Esencial de <i>Callistemon speciosus</i> .	68
5. Mezclas de las Diferentes Diluciones del Aceite Esencial Puro y Timol	70 71
6. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial Puro y las Diferentes Diluciones con Timol.	

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráficos	Pp.
1. Efecto Sinérgico de Aceite Esencial con Timol sobre <i>S. aureus</i>	72
2. Efecto Sinérgico de Aceite Esencial con Timol sobre <i>K. pneumonia</i>	73
3. Efecto Sinérgico de Aceite Esencial con Timol sobre <i>E. coli</i>	73
4. Efecto Sinérgico de Aceite Esencial con Timol sobre <i>E. faecalis</i>	74
5. Efecto Sinérgico de Aceite Esencial con Timol sobre <i>P. aeruginosa</i>	74

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pp.
1. Distribución de Myrtaceae a Nivel Mundial	22
2. Myrtaceae	23
3. Inflorescencia de <i>Callistemon speciosus</i>	27
4. Estructura Química del 1,8 cineol	29
5. Componentes Aislados del Género <i>Callistemon speciosus</i> .	30
6. Ejemplos de Monoterpenos	33
7. Ejemplos de Sesquiterpenos	34
8. Estructura Química del Timol	52
9. Partes Aéreas de <i>Callistemon speciosus</i>	61
10. Cromatograma General de los Compuestos Mayoritarios del Aceite Esencial de <i>Callistemon speciosus</i>	68
11. Estructura Química del 1,8 cineol, α -terpineol y α -pineno	
12. Equipo de Hidrodestilación con Trampa de Clevenger	69
13. <i>S. aureus</i>	94
14. <i>E. coli</i>	95
15. <i>K. pneumoniae</i>	95
16. <i>E. faecalis</i>	96
17. <i>P. aeruginosa</i>	96
	97



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE LAS HOJAS *CALLISTEMON SPECIOSUS* (MYRTACEAE).

AUTORA: Mata, Ariana

TUTORA: Prof. Cordero, Yndra

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la composición química y la actividad antibacteriana y sinérgica del aceite esencial de las hojas de *Callistemon speciosus*, (Myrtaceae), recolectada en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes del Estado Bolivariano de Mérida. El aceite esencial se obtuvo mediante la técnica de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger. El análisis de los componentes se efectuó por cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP MSD 5973 (CG-EM). Los principales componentes químicos mayoritarios presentes en el aceite esencial fueron 1,8-Cineol (53,3 %), α -Terpineol (12,5 %) y α -Pino (9,9 %). La determinación de la actividad antibacteriana y sinérgica, en unión con el timol a una concentración de 100 ppm, se realizó por el método de difusión en agar, empleando la técnica de pozo (prueba de Kirby-Bauer modificada), contra 5 bacterias ATCC Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumonia* y *P. aeruginosa*). Los halos de inhibición obtenidos reveló que tanto el aceite esencial puro y el timol resultaron tener una excelente actividad antibacteriana, y el efecto sinérgico evaluado a cuatro diferentes concentraciones (12,5; 25; 50; 75 %) resultó ser apreciable a las concentraciones de 50 y 75 % respectivamente, y sensible en las de 12,5 y 25 %, contra todas las bacterias evaluadas. El aumento significativo de los halos de inhibición demostrado en este trabajo se puede atribuir a presencia del 1,8-Cineol, α -Terpineol y α -Pino en el aceite esencial de las hojas de *C. speciosus*.

Palabras Claves: *Callistemon speciosus*, Aceite Esencial, Actividad Antibacteriana y Sinérgica.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre sustancias con actividad antimicrobiana, provenientes de plantas superiores, entre estas los aceites esenciales, con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Hammer, Carson y Riley, 1999).

Los aceites esenciales son sustancias químicas presentes en un gran número de vegetales. Estos concentrados aceitosos se extraen de las hojas, flores, semillas, corteza, raíces o frutos de diversas plantas; generalmente se evaporan al contacto con el aire, por lo que también son conocidos como aceites volátiles. Son en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general no son oleosos al tacto. Pueden agruparse en varias clases, dependiendo de su estructura química: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, lactonas, óxidos e hidrocarburos (Domínguez, 1979; Marcano y Hasegawa, 2002).

En la actualidad se han realizado estudios referidos con sustancias provenientes de plantas en relación con la actividad antibacteriana en miras de abordar infecciones que ocasionan enfermedades letales, las cuales requieren de un tratamiento determinado. En tal sentido, los investigadores se han interesado en estudiar lo relacionado con sustancias activas contra bacterias de origen vegetal y clínicamente útiles (Kabera, Semana, Mussa y He, 2014)

Sobre el particular, existe una tendencia a nivel poblacional a tratar sus patologías en la medicina natural utilizando plantas medicinales, que poseen entre sus compuestos principios activos con actividad farmacológica capaces de mitigar la sintomatología, por lo cual se ha incrementado el interés del estudio de estas plantas. De manera que las plantas medicinales pueden poseer actividad antibacteriana, motivo por el cual se ha expuesto su

potencial, lo cual constituye una alternativa terapéutica frente a las cepas bacterianas que presentan múltiples resistencias a antibióticos (Cañigüeral, Dellacassa y Bandoni, 2003).

El sinergismo es una forma de interacción medicamentosa que da como resultado efectos combinados o aditivos con la administración de dos o más fármacos, que resultan ser mayores que aquellos que podrían haberse alcanzado si alguno de los medicamentos se hubiera administrado solo. El efecto sinérgico muestra la relación entre dos agentes antibióticos cuando son utilizados al mismo tiempo, y que producen un efecto antimicrobiano que puede ser mayor que la suma de los efectos de los agentes individuales (Williamson, 2001).

Una de las familias de plantas medicinales más numerosas es la familia Myrtaceae, y su importancia radica principalmente en la gran diversidad de compuestos químicos y sus múltiples usos y actividades farmacológicas, esta familia reúne cerca de 240 géneros y aproximadamente 3.000 especies, principalmente árboles y arbustos tropicales, siendo los principales centros de distribución las zonas tropicales de América y Asia, además de Australia (Parra, 2014).

Callistemon speciosus es un arbusto que predominan en los países cálidos; cultivada en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; originario de Australia y Tasmania. Se adapta bien entre los 1000 y los 2500 m.s.n.m. en zonas húmedas, requiere libre exposición solar, además de tolerar suelos pobres, secos y algo de salinidad. Los aceites esenciales presentes en la especie *C. speciosus*, se han utilizados como agentes antibacterianos y antifúngicos, asimismo exhiben propiedades antidiabéticas y antivirales.

Ante lo expuesto, la industria farmacéutica ha utilizado una gran variedad de plantas medicinales para desarrollar medicamentos altamente efectivos contra diversas enfermedades, los cuales hubieran sido difíciles de

encontrar sin los conocimientos que ofrece la medicina tradicional (Albornoz, 1980).

Por consiguiente, el objetivo central de la investigación consiste confirmar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) contra diversas cepas bacterianas y su actividad sinérgica frente al timol.

Con base a lo expresado, surge el interés de la investigadora en realizar un estudio experimental estructurado en cinco (5) capítulos:

Capítulo I, denominado El Problema con su Planteamiento, Justificación e Importancia de la Investigación, también se encuentra el Objetivo General y los Específicos, además de los Alcances y Limitaciones del estudio.

Capítulo II, llamado Marco Teórico, está compuesto por los Antecedentes de la Investigación, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de Variables y su correspondiente Hipótesis.

Capítulo III, presenta el Marco Metodológico con su correspondiente Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra junto con la unidad de investigación y la selección del tamaño de la muestra, seguidamente del Sistema de Variables, los Instrumentos de Recolección de Datos y el Procedimiento de la Investigación.

Capítulo IV, designado como Resultados y Discusiones, que contiene los datos experimentales y su análisis con los antecedentes de la investigación.

Capítulo V, hace referencia a las Conclusiones y Recomendaciones pertinentes al estudio. Por último, las Referencias Bibliohemerografías y los anexos que sirven de soporte a la investigación.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La resistencia antibacteriana ha sido demostrada por investigadores, motivo por el cual, en forma permanente se estén estudiando nuevos compuestos, particularmente y en consideración a las investigaciones genéticas que han demostrado genes de resistencia en microorganismos. De manera tal, que la resistencia bacteriana de algunas especies de microorganismos a diversos antibióticos, en los últimos años se han convertido en uno de los principales problemas a los que se enfrentan hoy en día los especialistas de la salud porque no cuentan con alternativas terapéuticas para combatir infecciones por microorganismos resistentes. Situación que con lleva a realizar estudios que permitan la determinación de nuevas opciones terapéuticas de origen natural. (Valdez, 2017)

Tomando en consideración la actividad antibacteriana en función de los aceites esenciales, varios estudios reportan sobre las diferentes actividades biológicas que presentan los aceites esenciales, tales como insecticidas, antioxidante, y efecto antibacteriano. Si profundizamos un poco se pueden mencionar trabajos sobre el aceite esencial de Menta (*Mentha piperita*), Orégano (*Origanum sp.*), Salvia (*Salvia fruticosa*) donde los autores enumeran propiedades tales como carminativo, antiinflamatorio,

antiespasmódico, antiemético, analgésico, emenagogo, estimulante, anticatarral, entre otros. Cabe destacar que, estos trabajos fueron llevados a cabo utilizando los aceites esenciales y diversos extractos de ellos, es decir, que la actividad biológica no se puede atribuir a un compuesto en particular. Esta actividad biológica de la que se habla puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida. Sin embargo, según estudios realizados, se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides” (Marcano y Hasegawa, 2002)

Resulta oportuno agregar que, la resistencia antimicrobiana puede presentarse mediante diversos mecanismos, siendo intrínsecos o adaptativos. Por lo tanto, los intrínsecos capacitan a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, además expresan sistemas efflux de excreción que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, por otra parte, modifican el sitio blanco del antimicrobiano o generan una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco. Con relación a los mecanismos adaptativos se encuentran las adaptaciones fenotípicas, sea por el estado metabólico de la bacteria, o por ser secundaria a su capacidad de producir biopelículas (Becerra, Plascencia, Luévanos, Domínguez y Hernández, 2009).

En consecuencia, el uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades infecciosas ha constituido un acontecimiento sin precedentes para el control de las infecciones permitiendo modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del adulto (Barclay, Begg y Chambers, 1992).

Justificación e Importancia de la Investigación

Actualmente se han realizado investigaciones basadas en productos naturales, los cuales requieren de diversos métodos para determinar su efectividad. En tal sentido, el estudio de sustancias de origen natural tales como extractos y aceites esenciales se han llevado a cabo para evaluar su efecto antimicrobiano. De allí, la importancia de analizar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) contra diversas cepas bacterianas y su actividad sinérgica frente al timol, enfocado hacia la determinación de la actividad antibacteriana y sinérgica del aceite por el método de difusión en pozo contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *E. coli*, las cuales las hacen promisoras para su uso en actividades antibacterianas, además de establecer una mezcla con timol.

En su acción práctica, esta investigación se convierte en una alternativa de solución del problema planteado, el cual refiere la actividad antibacteriana y sinérgica del aceite esencial de *Callistemon speciosus* (Myrtaceae). De manera tal, que el aporte de este estudio servirá para determinar el efecto sinérgico con el timol. Además, facilita los medios necesarios para que pueda cumplir con los objetivos propuestos.

De igual manera, el estudio tiene un aporte de carácter teórico-práctico porque pretende a través de la teoría argumentar cada una de las variables. Es de señalar, que los conceptos y proposiciones que conforman este apartado sustentan y explican el problema. Por lo tanto, la línea temática está conformada por los contenidos referidos a *Callistemon speciosus* (Myrtaceae), actividad antibacteriana y mezcla con timol.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) contra diversas cepas bacterianas y su actividad sinérgica en relación con el timol.

Objetivos Específicos

- Obtener el aceite esencial de las hojas frescas *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) mediante la técnica de hidrodestilación empleando la trampa de cleverger
- Determinar la composición química del aceite esencial de *C. speciosus* a través de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)
- Evaluar mediante el método de difusión de agar en pozo modificado (Kirby-Bauer) la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. speciosus* frente a diferentes cepas grampositivas y gramnegativas
- Valorar la actividad sinérgica del aceite esencial de *C. speciosus* combinada con el timol a diferentes concentraciones.
- Relacionar la actividad antibacteriana y sinérgica del aceite esencial de la *C. speciosus* con el timol.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances

Los alcances de esta investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que los investigadores pretender obtener. En tal sentido, el estudio busca confirmar la composición química y la actividad antibacteriana

y sinérgica con el timol y el aceite esencial de *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Por lo tanto, su alcance es positivo porque los resultados tuvieron un efecto significativo para la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas que favorezcan las alternativas terapéuticas existentes.

Limitaciones

Un estudio puede presentar limitaciones, de acuerdo con Arias (2012) estas “Son obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador”. (p.106). Por lo tanto, esta investigación consideró pertinente referir como limitaciones los escasos recursos materiales que limitaron su desarrollo; los problemas de transporte, internet, electricidad, gas y la situación presentada por la pandemia que se vive a nivel mundial.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Los antecedentes de la investigación están referidos a los conocimientos obtenidos a través de estudios rigurosos, sistemáticos y organizados en relación con una temática en particular, en este caso, se realizó una revisión bibliográfica y electrónica orientada a la búsqueda de estudios similares referidos a la actividad antibacteriana y sinérgica del aceite esencial de *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) entre los cuales se cita:

Vaca, Quispillo, Tubon, Viteri y Rodríguez (2020), realizaron un estudio titulado “Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo)”. Este estudio refiere que *C. speciosus*, es una especie ampliamente distribuida en la región de los Andes, es una planta medicinal usada comúnmente por sus propiedades antisépticas, expectorantes y broncodilatadoras. Su objetivo consistió en identificar los metabolitos secundarios presentes y evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico (CSEE) frente a cepas de bacterias y hongos. Se empleó todas las partes de la planta seca, a excepción de la raíz, se preparó un extracto etanólico (CSEE) al cual se realizaron subextracciones usando etanol y cloroformo (1:1). Sucesivamente a través de cromatografía en capa fina y columna se separaron los metabolitos secundarios. Finalmente usando espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) se determinó la absorción de

cada fracción purificada. La actividad microbiológica del extracto (CSEE) se realizó empleando el método Mitscher.

Los resultados obtenidos siguieron las reglas de Woodward y Fisher, se identificaron tres (3) estructuras denominadas como: 7-metoxi-flavona, 7-hidroxi-flavona y miricetina. El extracto CSEE inhibió el crecimiento microbiano en una concentración dependiente, asimismo, a una concentración de 10000 µg/mL mostró actividad contra *S. aureus* y *C. albicans*, y actividad parcial para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Mientras que a una concentración de 1000 µg/mL solo presentó actividad frente a *C. albicans* y *S. aureus*, Finalmente a una concentración de 100 µg/mL fue parcialmente activo para *S. aureus*. Del estudio se concluye que los resultados proporcionan datos sobre la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana de CSEE. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios usando técnicas más específicas para tener un perfil fitoquímico completo de la planta y confirmar su actividad antimicrobiana.

Lo expuesto en el antecedente citado, tiene incidencia con el objeto de estudio porque aborda el problema planteado, el cual se refiere a *Callistemon speciosus*, específicamente hacia la evaluación de sus propiedades es de señalar, que su contenido favorece la línea temática.

De igual manera, Ventura (2017) presento un trabajo de investigación titulado “Comparación de tres métodos en la extracción de aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia* spp.)”. En este estudio se evaluó la obtención de aceite esencial de *Lippia* spp. (Orégano silvestre), mediante tres métodos de extracción (arrastre de vapor, hidrodestilación e hidrodestilación asistida con microondas). Los métodos fueron evaluados en función a el porcentaje de rendimiento (% p/v), tiempo de extracción (h) y calidad [índice de refracción (IR) y poder antioxidante (DPPH)] del aceite esencial obtenido por triplicado.

Se trabajó con muestras de orégano silvestre recolectadas en el distrito de Luya, región Amazonas. El método de destilación por arrastre de vapor

permitió obtener un mayor rendimiento (2,41 mL/g), la hidrodestilación requiere de menor tiempo (2,24 h) y el aceite esencial obtenido por el método de hidrodestilación tuvo mayor actividad antioxidante. El método de extracción influye en la actividad antioxidante, obteniéndose mayor IC₅₀ con el método por hidrodestilación normal. La actividad antioxidante encontrada en el aceite esencial de *Lippia spp* posibilita la realización de posteriores estudios, en la búsqueda de su aplicación en la industria de alimentos como posible sustituto de los antioxidantes sintéticos, dada la potencial capacidad para atrapar radicales libres.

El aporte de la presente investigación se relaciona con la temática referida al aceite esencial, lo cual coincide con el estudio. De manera tal, que su contenido apoya la metodología, específicamente lo referido al método de hidrodestilación, el cual fue utilizado para la extracción del aceite favoreciendo los objetivos propuestos.

Así mismo, Rotimi, Okoh, Sadimenko y Okoh (2017), realizaron un estudio titulado “Constituyentes terpénicos de las partes aéreas, contenido fenólico, potencial antibacteriano, eliminador de radicales libres y antioxidante actividad de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (Myrtaceae) de la provincia de Eastern Cape de Sudáfrica”. Este estudio examina los componentes volátiles del aceite esencial obtenidos de las partes aéreas de la planta, así como su actividad antioxidante captador de radicales libres, contenido fenólico y el potencial antibacteriano de los aceites.

Se empleo una porción de 500, 250 y 150 g de las hojas, flores y tallos de esta planta respectivamente se sometido a un proceso de hidrodestilación durante tres horas. Los aceites recolectados de las diversas partes de la planta fueron inmediatamente sometidos a análisis CGH-EM. El contenido fenólico general del aceite de hojas, captador de radicales, Acción antibacteriana y antioxidante de los aceites esenciales tanto de las hojas como de las flores de *Callistemon citrinus* se determinaron utilizando

métodos estándar, con los radicales libres DPPH y ABTS como antioxidante de referencia.

Los análisis de los tres aceites revelaron un total de veintiséis componentes para el aceite de hojas que representan el 96,84 % de la composición total del aceite, cuarenta y un componentes para el aceite de flores que representan el 98,92 % de la composición total y diez componentes para el aceite de vástago que representan el 99,98 % de todos los componentes del aceite. Los compuestos dominantes en los aceites de las hojas fueron eucaliptol (48,98 %) y α -terpineol (8,01%), mientras que α -eudesmol (12,93 %), cariofileno (11,89 %), (-) - acetato de bornilo (10,02 %) y eucaliptol (8,11 %) fueron los principales componentes del aceite de las flores. En la misma línea, los principales componentes del aceite de los tallos fueron eucaliptol (56,00 %) y α -pineno (31,03 %). Las capacidades antioxidantes de se evaluaron tanto los aceites de hojas como de flores de la planta y sus IC₅₀ fueron (1,49 y 1,13) para DPPH y (0,14 y 0,03) para el ensayo ABTS respectivamente. Las actividades antibacterianas de los aceites de (hojas y flores) también fueron examinadas y se encontró que tenían una amplia gama de actividades contra las cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Del estudio se concluye que las observaciones extraídas de este experimento muestran claramente que las hojas y flores de *Callistemon citrinus* poseen compuestos fenólicos y éter cíclico de varios comportamientos farmacológicos.

El antecedente citado, alude a los componentes de los aceites esenciales de *Callistemon citrinu* perteneciente a la familia Myrtaceae, lo cual apoya de manera directa en la metodología, aunado a la sustentación teórica cubriendo requerimientos de la línea temática del presente estudio.

También, Andrade (2015), realizó un trabajo de investigación titulado "Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia organoides* y

Sinergismo en Combinación con Timol". En la presente investigación, se evaluó la actividad antibacteriana y sinérgica en combinación con timol, del aceite esencial de la especie *Lippia origanoides*, perteneciente a la Familia Verbenaceae. La especie se localiza en varios estados de Venezuela, en Mérida se ubica principalmente en el Municipio Sucre y ha sido muy estudiada encontrando en su aceite esencial diversas propiedades antimicrobianas, de allí la importancia en la realización de esta investigación. Para la obtención del aceite esencial, se utilizó 870 gramos de material fresco y se sometió a hidrodestilación por 4 horas, obteniéndose 7,2 mL de aceite con un rendimiento de 0,82 %.

El análisis químico se realizó por medio de Cromatografía en capa fina, identificándose el compuesto mayoritario representado por timol. La actividad antibacteriana y la evaluación del sinergismo se hicieron mediante el método de microdilución en placa, frente a cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), encontrándose actividad antibacteriana del aceite esencial frente a la mayoría de estas cepas con rangos de Concentración inhibitoria mínima (CIM) que oscilaron entre 50-6400 µg/mL dependiendo de cada cepa.

Siendo más sensible *Staphylococcus aureus*, con el aceite esencial y el timol se obtuvo CIM entre 175 y 87,5 µg/mL, *Escherichia coli* con CIM entre 400-800 µg/mL y 100-150 µg/mL, Las bacterias más resistentes en los ensayos fueron *Pseudomonas aeruginosa*, con el aceite esencial se obtuvo una CMI entre 3200-6400 µg/mL y con el timol esta cepa se manifestó resistente a concentraciones menores a 400 µg/mL anudado a *Enterococcus faecalis*.

La determinación del sinergismo del aceite esencial de *L. origanoides* en combinación con timol, se realizó mediante el cálculo de la Concentración Fraccionada Inhibitoria (CFI), evidenciándose por medio del resultado un

antagonismo al combinar el aceite esencial con su componente mayoritario, esto se traduce como una disminución de la actividad por parte del aceite esencial al ser combinado con el timol, este ensayo se probó frente a *Staphylococcus aureus*, especie bacteriana que fue seleccionada por su importancia clínica y por ser la bacteria que se mostró más sensible ante el aceite esencial en los ensayos previos.

El estudio referido alude a las variables planteadas en la presente investigación, específicamente lo relacionado con la actividad antibacteriana y el Sinergismo en Combinación con Timol, elementos fundamentales para la determinación de resultados al abordar el contenido teórico y metodológico, lo cual favorece la formulación de conclusiones y recomendaciones pertinentes una vez concluido la misma.

Por otra parte, Granados, Santafé y Acevedo (2015), presentaron un trabajo de investigación titulado “Composición Química y Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Eucalyptus camaldulensis* de Norte de Santander”. Este estudio refiere que el aceite esencial (AE) foliar de la especie *Eucalyptus camaldulensis*, recolectada en el departamento de Norte de Santander (Colombia), fue estudiado con el fin de caracterizar su composición química y determinar su actividad antioxidante. La extracción del AE, se realizó por arrastre con vapor y la identificación de los componentes mayoritarios, se hizo por Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a espectrometría de masas, para establecer su variabilidad en la composición química, dada las condiciones climáticas que presenta la región. El AE posee mezclas de mono y de sesquiterpenos, siendo el 1,8-cineol, el componente con mayor concentración, con un 81,0 %, seguido del α -pineno, con un 5,26 %.

Para precisar la actividad antioxidante de los AE, se usaron dos métodos: capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS⁺ y del radical DPPH. El porcentaje de inhibición (% Inh), con la metodología del radical

DPPH, no superó el 10 % y, en los ensayos frente al radical ABTS, se observó que sólo alcanza valores suficientes a muy altas concentraciones (>250 ppm).

Lo citado tiene una vinculación con el presente estudio en función de los componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis* perteneciente a la familia (Myrtaceae), lo cual apoya la metodología utilizada y argumenta la línea temática ampliando su contenido.

Antecedentes Históricos

El estudio necesita de un basamento histórico en relación con la población en estudio, aludiendo a la evolución de *Callistemon speciosus*, por lo tanto, su nombre proviene del griego y significa: de bellos estambres. En Melilla (África) es muy difícil encontrar los colores del otoño, porque casi todo su arbolado autóctono u ornamental es de hoja perenne. Aun así, se encontró alplátan o de sombra. El botánico, Manolo Tapia, identifico al *Callistemon speciosus* o rojo, también llamado limpia tubos o cepillo, porque sus flores recuerdan a los “cepillos” para limpiar las flautas, o las pipas para fumar tabaco (González y Enrique 2015).

El uso de la medicina natural tiene su origen en la época prehistórica, y es una de las formas más extendidas de medicina presente en todas las culturas conocidas. Si bien es cierto que la definición data de finales del siglo XIX, las raíces de la filosofía de la medicina natural son milenarias (Pascual, Pérez, Morales, Castellanos y González, 2014).

La medicina natural tiene su basamento en la sabiduría de muchos países, entre los cuales está la India (Yajur-veda), China (taoísmo) y Grecia (Hipócratas). En la Biblia se describen aproximadamente 200 plantas de uso medicinal y además sus aplicaciones. El papiro de Ebers, escrito hace unos

3500 años, describe enfermedades e indicaciones para solucionarlas, mediante el empleo de especies vegetales (Marinoff, 2006).

En los siglos XII y XIII la Escuela Árabe (célebre por sus renombrados médicos), así como la de Salerno en Italia, prescribían numerosas drogas vegetales de las cuales muchas son utilizadas en la actualidad. Para el siglo XV eran conocidas las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia, lavanda entre otras. Un siglo después, más de sesenta nuevas esencias se añadían a éstas. En 1511 se publicó en Barcelona la “Concordia Pharmacopolarum” que es la primera farmacopea territorial del mundo. Durante Edad Media los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria Farmacia. 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. Nace la farmacoquímica; en 1811 se aísla la morfina a partir del opio (Marinoff, 2006).

Hoy en día, existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos, muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones; en lo que se destaca, el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos, adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad (Marinoff, 2006).

Desde la antigüedad, el ser humano ha utilizado compuestos orgánicos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como el extracto de algunas plantas y hongos de algunos quesos. En el siglo XIX, el prestigioso francés Louis Pasteur, descubrió que algunas bacterias saprofitas podían

destruir la bacteria del ántrax. En 1900, el bacteriólogo alemán Rudolf Von Emmerich aisló una sustancia que podía destruir los microbios causantes del cólera y la difteria en un tubo de ensayo, pero no pudo aplicarlo en el tratamiento de las enfermedades. La actividad antibacteriana tiene vinculación con el descubrimiento de los antibióticos, que según la historia se remonta al año 1928, cuando Alexander Fleming descubrió casualmente la penicilina, en una placa de Petri contaminada por hongos, dando inicio a una nueva era de la medicina. Este compuesto natural producido por el hongo *Penicillium* demostró ser tóxico para las bacterias, pero seguro para el ser humano. El uso de la penicilina durante la Segunda Guerra Mundial permitió salvar cientos de miles de vidas (Acuña, 2003).

Bases Teóricas

La intención de la sustentación teórica es situar la investigación en un contexto de conocimientos sólidos para ampliar la descripción del problema y guiar sobre los aspectos teóricos más relevantes para el estudio, al respecto, Arias (2012) define a las bases teóricas como “Un desarrollo amplio de los conceptos y proposiciones que conforman el punto de vistas o enfoque adoptado, para sustentar o explicar el problema planteado” (p.107). Por lo tanto, el estudio presenta la línea temática referida a la planta *Callistemon speciosus*, aceites esenciales, actividad antibacteriana y sinergismo, además de la mezcla con timol siendo la siguiente:

Plantas Medicinales

Al considerar las plantas medicinales, Albornoz (2001) refiere las consideraciones que defienden el uso de plantas medicinales y sus extractos o derivados en terapéutica afianzando las siguientes premisas:

- Trabajan en la reactivación de funciones o procesos orgánicos alterados.
- Estimulan las defensas de los organismos, no las reemplazan ni las fuerzan a actuar.
- Ajustan el flujo armónico de la energía vital.
- Refuerzan el funcionamiento óptimo de órganos y tejidos en funciones nutritivas, regenerativas.
- Pueden contribuir a la remineralización, en los casos necesarios. Eliminan toxinas o sustancias indeseables (depuración y limpieza) favoreciendo la circulación sanguínea.
- Son útiles en terapias de prevención, de conservación y de regeneración, ya como terapia de primer orden, o como medicación auxiliar o complementaria de otras.
- Por lo general, no causan reacciones alérgicas, de acumulación o de habituación (p.1).

En consecuencia, se puede agregar que hoy en día, el conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales se ha extendido de tal forma, que muchas personas las utiliza en calidad de medicina alternativa y en oportunidades sirven de apoyo a la medicina tradicional. Por lo tanto, su importancia se hace más evidente en la actualidad en los países en vías de desarrollo.

Modalidades de Uso de las Plantas Medicinales

Las plantas medicinales asumen unas modalidades en función de su uso, al respecto, Albornoz (2001) plantea las siguientes:

- a) Directamente como yerbas, en su forma natural, para tratar síntomas específicos (indigestión, dolor de cabeza, fiebre, tos, etc.). La manera de administrarlas es como: infusiones, decocciones, cataplasmas, compresas, emplastos, baños.
- b) Como droga cruda mejorada, preparadas en forma de extractos fluidos, extractos blandos, tinturas, jarabes, vinos, polvos, lociones, cápsulas, etc. Son elaboradas con fines directos e inmediatos, de utilidad social y requiere de una tecnología menor, manejada por farmacéuticos o especialistas expertos. Aquí las sustancias contenidas en una o más drogas crudas, se asocian por sinergización para producir un efecto terapéutico determinado, suave, confiable y de nula toxicidad.
- c) Industrializadas por una alta tecnología farmacéutica. Así se logran aislar sustancias de alta potencia farmacológica, moléculas puras de una estructura química conocida que ejercen acciones definidas y mensurables sobre las células del organismo. Generalmente, dado los costos elevados de la siembra, recolección y procesamiento de las plantas medicinales, la industria procede a estudiar las técnicas conducentes a la síntesis química de las moléculas aisladas con fines de comercialización (p.1).

Es de señalar, que las plantas medicinales tienen un efecto positivo en la salud, así lo demuestran las referencias encontradas en relación con su uso por más de miles de años empleándose semillas, raíces, bayas, cortezas, hojas o flores para preparar los remedios con los que tratar los diferentes problemas de salud que puedan aparecer e incluso para prevenir la aparición de cualquier enfermedad. De manera tal, que existen diferentes formas de uso de las plantas medicinales y son muy eficaces en el tratamiento de algunas patologías.

Familia Myrtaceae

Familia abundantemente representada en la flora del país, encontrándose en forma silvestre o bajo cultivo varias especies productoras de frutos comestibles en los géneros (*Psidium*, *Eugenia*, *Syzygium* etc.). Los géneros más ricos en especies para el país son: *Eugenia*, *Myrcia*, *Marlierea*, y *Calypttranthes*, y se encuentran distribuidos ampliamente en las regiones andinas bajas. Solamente pocas especies de esta familia sobresalen regularmente en el límite superior de las selvas (Vareschi, 1970).

La familia Myrtaceae se caracteriza por poseer hojas indivisas, de posición variable, glandulosas punteadas, sin espículas o raras veces con espículas muy pequeñas. Flores generalmente regulares y hermafroditas. Sépalos libres o unidos en la base, de prefloración abierta, imbricada o cerrada. Pétalos de 3 a 6, generalmente libres imbricados a veces concrescentes en forma de gorro o pétalos ausentes. Estambres por lo común numerosos. Anteras generalmente versátiles, abriéndose por 2 hendiduras longitudinales o por poros terminales. Ovario generalmente inferior, de 1-5 lóculos. Óvulos 2 o más en cada celda, anatropos o campilotropos. Estilo y estigma indivisos. Fruto en baya o cápsula, raras veces drupáceo o nuciforme. Semillas raramente con poco albumen. Embrión recto o curvo (Badillo y Schnee, 1965).

Está compuesta por alrededor de 120 géneros con cerca de 3.000 especies originarias de zonas tropicales y subtropicales de Australia principalmente, Asia y América. En Venezuela existen 20 géneros nativos con más de 130 especies (Badillo y Schnee, 1965). Tiene gran importancia económica al encontrarse en ella plantas de gran interés y utilidad por sus frutos comestibles, obtención de especias, aceites, maderas, etc. Algunas especies de los géneros *Agonis*, *Angophora*, *Callistemon*, *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Feijoa*, *Lophomyrtus*, *Luma*, *Melaleuca*, *Metrosideros*, *Myrciaria*,

Pimenta, *Psidium*, *Syncarpia*, *Syzygium*, *Tristania*, se caracterizan porque en ellos, se han encontrado componentes químicos con diversas propiedades farmacológicas: con efecto analgésico, antidiarreico, antifúngico y antibacteriano (Font, 1973).

Otra característica importante de las Myrtaceae es la presencia de glándulas que contienen aceite en casi todos los tejidos, lo que determina su utilización como especias o fuentes de aceites esenciales. Hay dos regiones en los trópicos especialmente ricas en frutas: como son el centro de Brasil y la región Indo Malaya. Los géneros principales son *Eugenia*, proveniente del continente americano y su contraparte asiática *Syzygium*, *Psidium*, *Myrciaria*, *Feijoa* y otros de los trópicos americanos. Hay especies silvestres cuyos frutos se recolectan, pero no han sido sometidas al cultivo, como *Myrcia spp* (León, 2000).

Existen generalidades de la familia Myrtaceae, constituida en su mayor parte por árboles y arbustos de elevado tamaño, está formada por cerca 2800 especies las cuales contienen numerosos y diminutos depósitos de esencias aromáticas. Dentro de estos se encuentra el género *Callistemon*, compuesto por 34 especies, que se caracteriza por poseer flores cilíndricas, con forma de pincel que se asemejan a un cepillo de botella. Mediante diversos análisis fotoquímicos de este género se han podido identificar la presencia de flavonoides C-metílicos, triterpenos y derivados del floroglucinol. Adicionalmente, ha sido estudiada la actividad biológica de diversas especies de *Callistemon*, mediante la cual se ha podido comprobar un efecto antimicrobiano, antiestafilococal, insecticida y nematicidad (Quijano, Gaviria, Vanegas y Pino, 2010)

Aspectos Botánicos de Myrtaceae

Es una familia muy extensa formada por un gran número de plantas leñosas que van desde matas hasta grandes árboles. Tienen hojas persistentes, simples, enteras, generalmente opuestas, provistas de glándulas aromáticas, con consistencia coriácea muchas veces. Flores regulares, bisexuales, en inflorescencia de tipo cima, umbela, racimo o panícula, raras veces solitarias. Cáliz constituido generalmente por 4 a 5 lóbulos libres o a veces más o menos soldados, en ocasiones formando una caperuza (opérculo) que tapa el capullo y que se desprende al abrirse la flor. Corola constituida por 4-5 pétalos libres, pequeños y orbiculares, pocas veces soldados. Estambres numerosos, rara vez menos de 20, pudiendo constituir fascículos. Fruto generalmente en baya o capsula, pudiendo contener de 2 a numerosas semillas (Pérez, Mitchell y Vargas, 2008; Yoo, Han, Cho, Ha, Park, Nam, 2005).

Distribución Geográfica de Myrtaceae



Leyenda: Myrtaceae



Figura 1. Distribución de Myrtaceae a Nivel Mundial

Fuente: Cabañas, De la Luz, Lamothe, Suárez y Domínguez, (2005)

Taxonomía de la Familia Myrtaceae

La familia Myrtaceae a nivel de la sistémica botánica presenta una taxonomía, que según Laurent (1789) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae



Figura 2. Myrtaceae

Fuente: Naturalista, (2021)

Compuestos Químicos Aislados de Myrtaceae

Dentro de los compuestos más abundantes de la familia Myrtaceae se han encontrado: Flavonoides, compuestos fenólicos, monoterpenos, sesquiterpenos, carotenoides, triterpenos, compuestos lignanos, taninos; cabe destacar que algunas de estas especies combinan sus componentes con glicosido (Pérez, Mitchell y Vargas, 2008 y Yoo, Han, Cho, Ha, Park, Nam, 2005)

Usos Etnobotánicos y Actividades Biológicas de la Familia Myrtaceae

Las Myrtaceae constituyen especial interés por su gran endemismo, elevado contenido de aceites esenciales y otros principios activos. La presencia en compuestos secundarios diferentes especies de esta familia en Cuba ha posibilitado que sean numerosas las plantas utilizadas por los campesinos de manera artesanal y con demostrada efectividad en el control de plagas. Su utilización tradicionalmente por productores en la provincia de Cienfuegos como alternativas ecológicas para el control de insectos plagas es un aspecto que confirman a las Myrtaceae como alternativa con enfoque ecológico y viable para el control de plagas donde la mayor cantidad de especies con actividad insecticida se encuentran en los varios géneros. La utilización de estas especies botánicas para el control de plagas resulta de interés por la presencia de metabolitos secundarios y provocarles diferentes efectos a los insectos. Esta alternativa no provoca daños a la salud, generan un cambio hacia la utilización de una fuente promisoría, segura y sostenible (Pérez, Valdés, Castellanos, López y León 2020).

Callistemon

Tomando en consideración el género *Callistemon*, Sánchez (2003) refiere:

El género *Callistemon* comprende arbustos y algunos árboles siempreverdes con la corteza fisurada o papirácea y los brotes jóvenes a menudo con pubescencia rojiza o plateada. Las hojas son alternas, enteras, sésiles o escasamente pecioladas, agudas o acuminadas, con frecuencia de textura coriácea. Las inflorescencias están formadas por espigas pseudoterminalas compuestas de pequeñas flores insertas a lo largo del tallo, a semejanza de un limpiatubos, lo que les da su nombre popular. Cada flor tiene 5 sépalos formando un tubo ovoide, acampanado o urceolado y 5 pétalos orbiculares que pueden ser de color verde, amarillo, blanco, rosa o rojo; tanto los sépalos como los pétalos

son diminutos y caducos. El androceo, que es lo que hace vistosa a la inflorescencia, está formado por numerosos estambres libres o ligeramente unidos en la base, mucho más largos que los pétalos. Los filamentos suelen ser rojos, pero también pueden ser blancos, verdes, amarillos, rosados, malvas o púrpureos. El eje de la inflorescencia continúa creciendo después de la floración formando un nuevo tallo con hojas. Los frutos son cápsulas leñosas dehiscentes por el ápice, que persisten a lo largo de los tallos durante varios años, conteniendo numerosas semillas muy pequeñas. Comprende una treintena de especies nativas del suroeste y este de Australia y Tasmania. Su nombre proviene de las palabras griegas *kalli* = hermoso y *stemon* = estambre, aludiendo a su belleza. Los *Callistemon* fueron introducidos en la horticultura europea a partir de 1788, año en que se introdujeron en Inglaterra *C. citrinus*, *C. linearis* y *C. salignus*. En años posteriores, y hasta 1848, fueron introduciéndose: *C. rigidus*, *C. brachyandrus*, *C. phoeniceus*, *C. pinifolius*, *C. rugulosus*, *C. pallidus* y *C. viridiflorus*, que son prácticamente casi todas las especies que solemos ver en cultivo (p.1).

Es evidente entonces, que *Callistemon* pertenece a la familia Myrtaceae y en Venezuela es conocido con el nombre de Cepillo y son reconocidas solo 37 especies. Es de señalar, que el género es endémico de Australia y cultivadas en otras partes del mundo por sus flores vistosas.

Callistemon speciosus

Al abordar *Callistemon speciosus* Medina y Romero (2005) refieren generalidades tales como:

Arbusto perennifolio, erecto y compacto, de 2-3 (5) m de altura, con ramas erguidas y las ramillas jóvenes sedoso-pelosas; corteza rugosa, agrietada o papirácea, de tonalidad oscura.

Hojas de 2,5-11 cm x 4-10 mm, alternas, cortamente pecioladas, gruesas, rígidas, de color verde oscuro, de lineares a elípticas, de ápice con punta estrecha, con nerviación y márgenes prominentes y abundantes glándulas esenciales.

Inflorescencias de 5-15 x 2,5-7 cm, en espigas densas, con ejes pelosos.

Flores hermafroditas, actinomorfas, con 5 sépalos y 5 pétalos

verdosos; filamentos libres, de alrededor de 2-2,5 cm de longitud, de color rojo brillante, con anteras amarillas; estilo ligeramente más largo que los estambres.

Fruto de 5,5-7 (10) mm de diámetro, tipo cápsula, cupuliforme, serotino (permanece sobre la rama durante mucho tiempo). Florece a mediados de primavera-verano.

El nombre genérico se compone de los términos griegos kallos = bello y stemon = estambre, refiriéndose al colorido de los estambres.

El nombre popular lo recibe por el parecido de sus inflorescencias con un limpiatubos. Los *Callistemon* fueron introducidos por primera vez en Europa como plantas ornamentales por Joseph Banks en 1789.

Callistemon speciosus tiene aplicaciones terapéuticas semejantes a las de *Eucalyptus globulus*, como broncodilatador, expectorante y antiséptico.

Área de origen Nativo del oeste de Australia.

Uso arbusto ornamental (p.1).

Ante lo expuesto, es conveniente indicar que esta planta tiene un aspecto muy atractivo y florece casi todo el año, por lo general es empleado en la jardinería de exteriores, camellones y parques públicos, sin embargo, es utilizado para estudios científicos debido a su composición química, lo cual favorece la presente investigación en relación con los aceites esenciales y la actividad antibacteriana.

Se trata de una especie endémica de Australia, desde donde fue traída a Europa como árbol o arbusto ornamental. Su madera es muy dura y se emplea para fabricar utensilios de labranza, mientras que las infusiones de sus flores tienen propiedades antisépticas, broncodilatadoras y expectorantes. Su floración suele producirse en primavera, aunque tampoco resulta extraño que florezca en otras épocas del año (Goyal, Jain, Jain, Sharma, 2012).

Descripción Botánica de la Especie *Callistemon speciosus*.

La descripción botánica de la especie *Callistemon speciosus* está representada en la Figura 3, donde López (2013) puntualiza lo siguiente:

Árboles o arbustos perennifolios originarios de Australia, pertenecientes a la familia Myrtaceae. Pueden alcanzar los 3-4 m de altura. Presenta hojas alternas lanceoladas-oblongas con margen entero. Inflorescencias terminales en espiga densa con flores sésiles con 5 sépalos y 5 pétalos que pueden tener una coloración verde, blanquecina, amarillo, rojo-rosado. Numerosos estambres con los filamentos libres o soldados en la base (según especie), que le da vistosidad a la planta por sus coloraciones. Las inflorescencias pueden ser de diversos colores, según la especie. Las especies más conocidas son: *C. citrinus* (rojo brillante), *C. speciosus* (rojo intenso, raras veces color crema), *C. salignus* (amarillo blanquecino), aunque este género comprende más de 30 especies. Floración de Marzo a Julio. Frutos en cápsulas dehiscentes cupuliformes leñosas, conteniendo numerosas semillas diminutas. Nombre común: Limpiatubos.

En general, son plantas que necesitan suelos bien drenados, con riego abundante en épocas calurosas. Necesitan un espacio soleado, aunque pueden tolerar sombra con temperaturas bajas, pero no responden bien a las heladas.

Para obtener plantas de *Callistemon*, se puede realizar por esquejes (método más sencillo) a partir de esquejes de unos 10 cm de longitud, eliminando las hojas basales. Impregnar la parte inferior del esqueje con hormonas de enraizamiento (seguir las recomendaciones del fabricante).

También se puede obtener planta a partir de semillas. Para ello, guardar los frutos secos del año anterior en un sobre de papel y esperar a que se abran para extraer las semillas. Espolvorear las semillas sobre un sustrato ligero (fibra de coco, etc) húmedo con una temperatura cercana a los 20 °C. La germinación comenzará 2 ó 3 semanas después. Regar siempre en una bandeja bajo la maceta o semillero, nunca superficialmente para no arrastrar las semillas / plantulitas. No exceder el riego para evitar la aparición de hongos y algas (p.1).



Figura 3. Inflorescencia *Callistemon speciosus*

Fuente: Universo Botánico (2013)

Distribución Geográfica de la Especie *Callistemon speciosus*

Callistemon speciosus es un arbusto perteneciente a la familia Myrtaceae, que predominan en los países cálidos; cultivada en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; originario de Australia y Tasmania. Se adapta bien entre los 1000 y los 2500 m.s.n.m. en zonas húmedas. No es caducifolio. Crecimiento medio. Requiere libre exposición solar. Tolerancia a suelos pobres, secos y algo de salinidad. De longevidad - 6 - prolongada, esta familia está constituida principalmente por árboles y arbustos, actualmente se describen más de 30 especies. Los *Callistemon* fueron introducidos por primera vez en Europa como plantas ornamentales por Joseph Banks en 1789. En Venezuela, la especie se ha encontrado en los siguientes estados: Aragua, Bolívar, Carabobo, Distrito Federal, Falcón, Guárico, Lara, Miranda, nueva Esparta, Sucre, Táchira, Zulia y en Mérida. (Hoyos, 1992)

Clasificación Taxonómica de *Callistemon speciosus*

Reino:	Plantae.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Magnoliopsida.
Orden:	Myrtales.
Familia:	Myrtaceae.
Subfamilia:	Mirtoideae.
Tribu:	Melaleuceae.
Género:	<i>Callistemon</i> spp.
Especie:	<i>C. speciosus</i> (Hoyos, 1992)

Composición Química de la Especie *Callistemon speciosus* (Aceites Esenciales)

Tomando en consideración, la composición química de *Callistemon speciosus* Brophy, Goldasak, Forster, Craven y Lepschi, 1988; Al-Azizi, El-Olemy, El-Sayed y Al-Yahya, 1995; Wasicky y Saito, 1972; Pino, Rodríguez y Beldarraín, 2013, señalaron que, en estudios anteriores realizados en Australia, Egipto, Brasil y Cuba, respectivamente, sobre el aceite esencial de *Callistemon speciosus*, se encontró el 1,8 cineol como compuesto (**1**), Figura. 4 en un 57,7 % (Australia), 37,7 % (Egipto), 81,5 % (Brasil) y 57,0 % (Cuba).

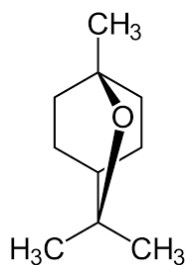
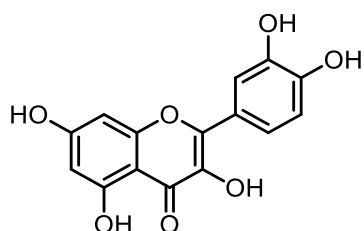


Figura 4. Estructura Química del 1,8 cineol (**1**)

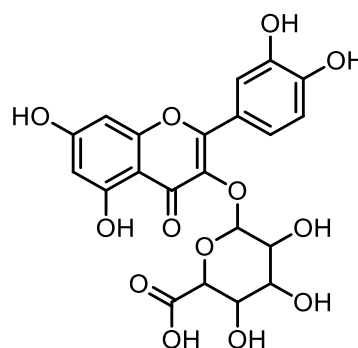
Fuente: Marcano y Hasewaga (2002)

Por otra parte, Praveen, Renuka, Shweta y Archana (2012) manifiesta que:

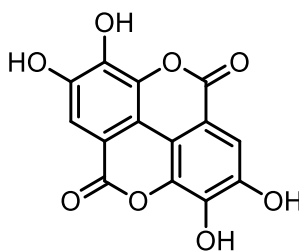
Existen otros componentes de las hojas de *Callistemon speciosus* se han aislado también flavonoides como quercetina (**2**) y quercetina-3-O-glucuronido (**3**). También se han aislado polifenoles como el 2,3-(S)-hexahidroxi-difenil-D-glucosa, taninos como el ácido elágico (**4**), catequina y casuarinina y triterpenos como el ácido betulínico (**5**) y ácido ursólico (**6**) Fig. 5 (p.95).



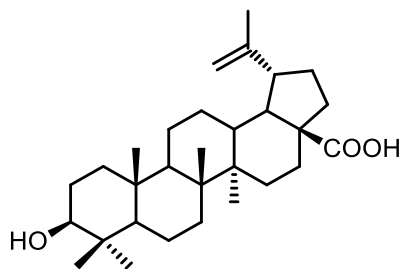
Quercetina (**2**)



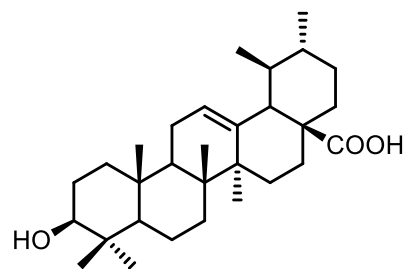
Quercetina-3-O-glucuronido (**3**)



Ácido Elágico (4)



Ácido Betulíco (5)



Ácido Ursólico (6)

Figura 5. Componentes Aislados del Género *Callistemon speciosus*

Fuente: Marcano y Hasewaga (2002)

Usos Etnobotánicos y Actividad Biológica de la Especie *Callistemon speciosus*

Las especies de *Callistemon* producen aceites esenciales. En medicina popular, *Callistemon* es bien reconocido por sus actividades insecticidas, así como contra la tos y la bronquitis. Los aceites esenciales poseer antimicrobiano, antifúngico, insecticida, antihelmíntico, antioxidante, antiinflamatorio y actividades antinociceptivas (Goyal, Jain, Jain, Sharma (2012). En China, *Callistemon speciosus*, principalmente se utiliza *C. viminalis* en medicina tradicional China para el tratamiento de las hemorroides. 1,8-Cineol figurado como la preconstituyente dominante informado en los aceites esenciales de *Callistemon*. Otros metabolitos incluyen α - pineno, β - pineno, limoneno, linalol, mirceno y acetato de mentilo. (Oyedeji, Lawal, Shode, Oyedeji, 2009). La actividad biológica de un aceite esencial no puede atribuirse a un solo componente, sino a los efectos sinérgicos del fitocomplejo. Esta complejidad química contribuye a su actividad biológica, ya que cada constituyente del fitocomplejo está involucrado en la actividad general o puede modular los efectos de los otros componentes (Russo, Corasaniti, Bagetta, Morrone, 2015).

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas. Se encuentran localizadas en células y órganos particulares, o se producen mediante reacciones químicas, en un determinado momento. Se caracterizan por estar constituidos por compuestos volátiles con aspecto aceitoso, tales como: terpenos, sesquiterpenos, sus derivados oxigenados, y a veces, compuestos aromáticos. Son solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales, e insolubles en agua, sin embargo, al agitarlos con ella, le transfiere parcialmente su olor (Albornoz, 2001).

Componentes de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos químicos, que pueden ser clasificados en tres grupos principales: Terpenos, Monoterpenos y Sesquiterpenos.

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen. Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes de los aceites esenciales (Ávalos y Pérez, 2009).

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). Presentan gran variabilidad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban gran cantidad de isómeros, no sólo funcionales sino también de posición y geométricos. Están considerados como una de las más grandes familias de productos naturales (Palá, 2002). En la figura 6 se muestran ejemplos de monoterpenos: α -pineno (7), Sabineno (8), β -pineno (9) y α -terpineol (10).

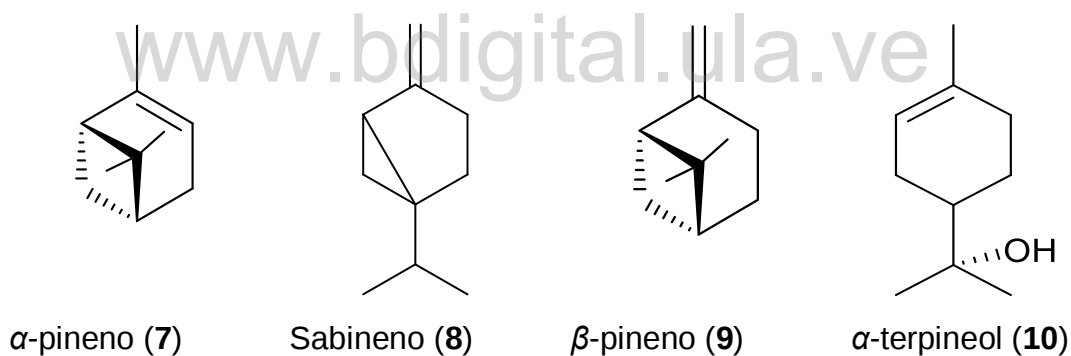


Figura 6. Ejemplos de Monoterpenos

Fuente: Marcano y Hasewaga (2002)

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). En la figura 7 se muestran ejemplos de Sesquiterpenos: α -humuleno (**11**), Germacreno-D (**12**), α -cadinol (**13**).

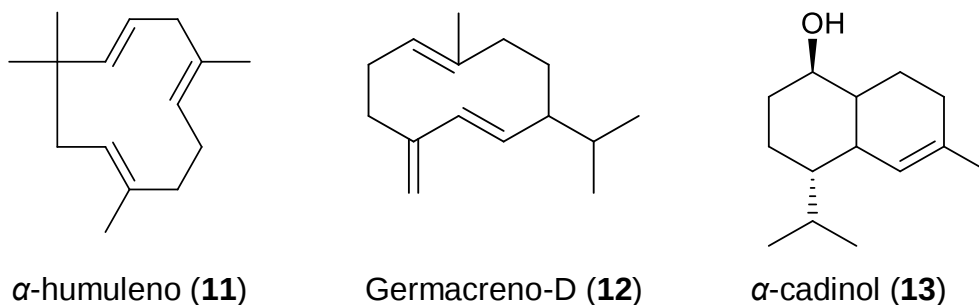


Figura 7. Ejemplos de Sesquiterpenos

Fuente: Marcano y Hasewaga (2002)

www.bdigital.ula.ve

Fuentes Naturales de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales tienen un origen en este sentido, Marcano y Hasegawa (2002) refiere:

Los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales. El aceite de espliego, por ejemplo, procede de una flor, el de pachulí, de una hoja, y el de naranja, de un fruto. Los aceites se forman en las partes verdes (clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportados a otros tejidos, especialmente a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; puede ser para atraer los insectos para la polinización, o para repeler a los insectos nocivos, o simplemente un producto metabólico intermedio (p.588).

Lo citado, conlleva a indicar que los aceites esenciales tienden a ser los principales productos aromáticos que existen en diversas partes de las plantas porque se evaporan por exposición al aire a temperatura ambiente,

además tienen una denominación, en este caso, la de aceites volátiles, aceites etéreos, aceites esenciales o esencias

Procesos de Obtención de Aceites Esenciales

La extracción de los aceites esenciales se puede obtener de las muestras vegetales mediante varios métodos tales como: expresión, destilación con vapor de agua, hidrodestilación, extracción con solventes volátiles, enfleurage, extracción con fluidos supercríticos, entre otros.

Expresión (Método Mecánico)

Es una técnica que se emplea a ciertos aceites esenciales, que no pueden ser destilados sin que se descompongan. Consiste en exprimir las cáscaras de los frutos y obtener la esencia desprendida; se emplea principalmente con los cítricos y se obtiene la esencia sin ninguna modificación química. (Claus y Tyler, 1965),

Destilación con Vapor de Agua

Es el proceso más común para extraer aceites esenciales, más no es aplicable a flores ni a materiales que se apelmazan. En esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado gaseoso, de asociarse con moléculas de aceite. La extracción se efectúa cuando el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal y libera la esencia, para luego ser condensada. Con el fin de asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas de aceite, se requiere picar el material según su consistencia (Sierra, Barros, Gómez, Mejías y Suárez, 2018).

Hidrodestilación

Consiste en sumergir el material vegetal (intacto u ocasionalmente triturado) en agua en ebullición, donde las gotitas de esencia son arrastradas hacia la trampa de Clevenger, donde se condensan y se separan por diferencia de densidad. La característica principal de este proceso es el contacto directo del agua y el material del cual se extraerá el aceite esencial (Cerpa, 2007).

Extracción con Solventes Volátiles

En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos, tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias, tales como, grasas y ceras; obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias, y, además, por el riesgo de explosión e incendio, característico de muchos disolventes orgánicos volátiles (Peredo, Palou y López, 2009).

Enfleurage

La extracción con grasa en frío o enfleurage, es un método antiguo de obtención de aceites esenciales. Se basa en el hecho de que las grasas absorben sustancias aromáticas con facilidad. Este procedimiento se utiliza para flores, cuyo contenido en aceite esencial es tan bajo que se queda en el agua de destilación, o bien, que tienen un aceite esencial sensible al calor y también, para otras flores como el nardo o el jazmín que siguen produciendo aceite esencial después de la recolección (Sierra, Barros, Gómez, Mejías y Suárez, 2018).

Extracción con Fluidos Supercríticos

Consiste en utilizar como material de arrastre, sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. El material vegetal se corta en trozos pequeños, se licua y se empaca en una cámara de acero inoxidable por donde se hace circular un líquido supercrítico. Los aceites esenciales se solubilizan y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene un aceite puro (Peredo, Palou y López, 2009).

Localización de los Aceites Esenciales en las Plantas

Las esencias pueden encontrarse en animales y en las plantas. En estas últimas se depositan en estructuras secretoras especializadas, al respecto, San Martín (1968) señala:

- a) Glándulas monocelulares, están formadas por una sola célula en la cual la esencia se encuentra bien protegida. Ejemplo en las familias Magnoliaceae, Canelaceae, Monimiaceae.
- b) Glándulas pluricelulares, las cuales están formadas por varias células, entre estas tenemos:
 - ❖ Glándulas pluricelulares aéreas o epidérmicas. Ejemplo en las familias Labitae, Solanaceae y Compositae.
 - ❖ Glándulas pluricelulares internas que a su vez se dividen en:
 - Esquizogenas: como en las Coníferas.
 - Esquizolisígenas: como en las Rutaceae y Myrtaceae.

Pueden formarse directamente en el protoplasma, por descomposición de la capa resinógena de la pared celular o por hidrólisis de ciertos glucósidos. En las Coníferas pueden encontrarse aceites volátiles en todos los tejidos; en las rosas y pétalos únicamente aparecen en cantidades

apreciables, en la canela sólo están en la corteza y en las hojas; en las Umbelíferas sólo en el pericarpio; En las mentas se encuentran en los leños de los pelos glandulares de las ramas y las hojas; en el naranjo, existe un tipo de esencia en los pétalos de las flores y otro en la cáscara del fruto (Bruneton, 1991, Marcano y Hasegawa, 2002).

Utilidad de los Aceites Esenciales

La función del aceite esencial en la planta no se conoce. Probablemente el aroma de las flores atrae o repele a ciertos insectos ayudando así a la fertilización. Los aceites de las raíces, leño y hojas tal vez protegen contra plantas parásitas y depredadores (Albornoz, 1980). También sirven de reserva alimenticia de la planta o como precursores de otros componentes y provocando la pérdida de humedad, evitando la muerte de la planta (Urdang, 1948).

Beneficios para el Hombre

Existe una gran cantidad de aceites esenciales empleados en las industrias como perfumes, jabones y repelentes de insectos; en medicina se emplean como carminativos y antihelmínticos, bactericidas y fungicidas. En farmacia son empleados al natural (infusiones) o en forma de preparaciones galénicas. En alimentación: como especies y aromatizantes (Tabla 1).

Tabla 1.

Usos de los Aceites Esenciales.

Nº	Nombre Botánico	Usos
1	<i>Menta piperita</i> (Menta)	Eupéptica, carminativa y antiséptica.
2	<i>Syzygium aromaticum</i> L. (Clavo)	Estimulante digestivo.
3	<i>Chenopodium ambrosioides</i> (Pazote)	Antihelmíntico.
4	<i>Coriandrum sativum</i> L. (Cilantro)	Carminativo, estomáquico, digestivo, euforia y luego sueño profundo
5	<i>Myristica fragans</i> Houtt. (Nuez Moscada)	Estimulante digestivo, condimento
6	<i>Illicium verum</i> H. (Anís Estrellado)	Expectorante, estomáquico, carminativo, convulsiones dolorosas del estómago e intestino.

Fuente: (Albornoz, 1995).

Técnicas de Análisis Utilizadas

Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Skoog y Leary 1994; García, Álvarez, Tornos, Fernández y Sáenz, 2002).

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas químicamente inerte, entre estos tenemos: helio, nitrógeno, hidrógeno, etc. La columna se

empaca con un material poroso cubierto por una fina película de la fase líquida (estacionaria). También puede estar constituida por un tubo capilar largo con las paredes cubiertas con una fina capa de líquido (Robards, Haddad y Jackson, 1994).

La muestra se introduce en la cámara de inyección, el gas inerte pasa a través de un regulador de presión y llega a la cámara de inyección, arrastrando desde allí la muestra a la columna. Los componentes de la muestra se separan a medida que pasan por la columna, emergen de ésta a intervalos (característicos de cada componente) y pasan a un detector que manda una señal a un registrador. Finalmente, el gas inerte pasa a través de un medidor de flujo y sale a la atmósfera y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Se aplica esta técnica a la separación de sustancias volátiles y termoestables (Davies, 1990, Skoog y Leary, 1994).

Con los cromatógrafos preparativos para gases es posible separar los componentes de un aceite esencial como si se usaran columnas de destilación fraccionada con alto poder de resolución. Existen dos tipos de CG: la cromatografía gas-sólido (CGS) y la cromatografía gas-líquido (CGL). La cromatografía gas-líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia como cromatografía de gases; se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. En 1995 aparece en el mercado el primer aparato comercial para cromatografía gas-líquido; desde entonces, las aplicaciones de esta técnica han crecido de una forma espectacular (Karasek, y Clement, 1988).

Espectrometría de Masas

Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga. La espectrometría de masas es probablemente de entre todas las herramientas analíticas al alcance científico de aplicación más general en el sentido que la técnica es capaz de suministrar información sobre:

- La composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas.
- Las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas.
- La estructura y composición de superficies sólidas (Karasek y Clement, 1988).

Los fundamentos de las medidas espectrales son sencillos y fácilmente comprensibles; aunque desafortunadamente, esta simplicidad no se extiende a la instrumentación. Los espectros de masas a menudo están acoplados con sistemas cromatográficos de gases o de líquidos de alta resolución que permiten la separación y determinación de los componentes de mezclas complejas (Karasek y Clement, 1988).

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Se ha convertido en una de las más poderosas herramientas al alcance de los químicos para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas, volátiles y estables a altas temperaturas. El acoplamiento de una columna cromatográfica a un espectrómetro de masas requiere la utilización de sistemas de entradas especiales. En este caso, se efectúan los espectros de los compuestos que salen de la columna cromatográfica, estos espectros son almacenados en un ordenador para el subsiguiente procesamiento. Por medio de esta técnica se separaron los componentes y se identificaron por

espectrometría de masas con la ayuda de la base de datos Wiley EM (Ramaswami, Briscese, Gargiullo y Von, 1988; Allemann, Andres, Borquin y Clerc, 1989).

Cálculo de los Índices de Kováts

Se emplea una serie de *n*-parafinas desde la C₇ hasta la C₂₂ colocando en el eje de las “*y*” los tiempos de retención y en el de las “*x*” el número de carbonos del *n*-alcano multiplicados por 100. Los cálculos se hacen entre dos parafinas continúa empleando la ecuación general de la recta para dos puntos fuera del eje (Kováts, 1958).

Toxicidad de los Aceites Esenciales

Este aspecto del conocimiento de los aceites esenciales es muy importante debido al desarrollo de ciertas prácticas como la aromaterapia. La connotación “producto natural” destinada a las esencias y el hecho de que muchas, son expeditas al público, fuera del sector farmacéutico, por tanto, sin ningún control serio, llevan a una utilización a veces abusiva, a una automedicación peligrosa. Los datos de que se dispone sobre la toxicidad crónica de las esencias son muy fragmentarios, no se han estudiado sus posibles efectos secundarios, ni tampoco se ha demostrado la usencia de efectos cancerígenos (Bruneton, 1991).

La toxicidad de aceites esenciales con tuyona (tanaceto, *Tanacetum vulgare* L) o con pinocanfona (hisopo, *Hyssopus officinalis* L), son cetonas monoterpénicas, psicoanalépticos que, ingeridos a dosis elevadas, desencadenan crisis epileptiformes y tetaniformes, trastornos psíquicos y sensoriales. También presenta toxicidad el mentol, 2 gramos del mismo pueden ser mortales para un adulto; en un niño, gotas nasales de mentol, pueden inducir espasmo de la glotis con el consiguiente riesgo de asfixia refleja (Bruneton, 1991).

Bacterias

En función de la actividad antibacteriana y sinérgica resulta oportuno definir el término bacteria, las cuales son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros, casi siempre del orden de $1\mu\text{m}$ de diámetro, y la ausencia de membrana nuclear. El ADN de casi todas las bacterias en un círculo con una longitud aproximada de 1mm ; este es el cromosoma procariótico, la mayor parte de las células procarióticas posee un solo cromosoma. No tienen núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Por lo general, poseen una pared celular que debe su resistencia a una capa compuesta de diversas sustancias conocidas como mureína, mucopéptido o peptidoglucano, que es un polímero complejo que consiste en tres partes: una estructura básica, compuesta de moléculas alternadas de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilmurámico y un grupo idéntico de enlaces peptídicos cruzados. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamientos y son móviles (Brooks, Carroll, Morse, Mietzner, Jawetz, Melnick y Adelberg, 2011).

De igual manera, la mayor parte de las bacterias se clasifican como grampositivas o gramnegativas con base en su respuesta al procedimiento de tinción de Gram, que depende de la capacidad de ciertas bacterias (grampositivas) para retener un complejo de cristales de color violeta (un colorante de color violáceo) además de yodo después de un breve lavado con alcohol o acetona. Las bacterias gramnegativas no retienen el complejo de colorante-yodo y se vuelven translúcidas, pero pueden volverse a teñir con safranina (un colorante de color rojo). Así, las bacterias grampositivas adquieren un aspecto violáceo bajo el microscopio, en tanto que las bacterias gramnegativas se ven de color rojo o rosado (Brooks, Carroll, Morse, Mietzner, Jawetz, Melnick y Adelberg, 2011).

En la actualidad, existen métodos que determinan la clasificación de las bacterias, que, sumados al método de la morfología, también se utiliza la secuenciación del ADN, asegurando un efectivo método para clasificar a las bacterias. Es de señalar, que otros métodos de clasificación incluyen las actividades metabólicas, las condiciones requeridas para su crecimiento, o bien sus reacciones bioquímicas (Brooks, Carroll, Morse, Mietzner, Jawetz, Melnick y Adelberg, 2011).

Pared Celular de las Bacterias grampositivas

La mayor parte de las paredes celulares de las bacterias grampositivas contienen cantidades considerables de ácidos teicoico y teicurónico, los cuales pueden constituir hasta 50 % del peso seco de la pared y 10 % del peso seco de la totalidad de la célula; además, algunas paredes de bacterias grampositivas pueden contener moléculas de polisacáridos. El término ácido teicoico abarca la totalidad de la pared celular, membrana o polímeros capsulares que contienen glicerofosfato o residuos de ribitol fosfato. Estos polialcoholes están conectados por enlaces fosfodiéster y por lo común se encuentran unidos con otros carbohidratos y con D-alanina. También tienen carga negativa en la superficie celular de su conjunto. Hay dos tipos de ácidos teicoico: ácido teicoico de la pared y ácido teicoico de la membrana, como estos últimos tienen asociación estrecha con los lípidos, se han denominado ácidos lipoteicoicos. En conjunto con los peptidoglucanos, el ácido teicoico de la pared y el ácido teicoico de la membrana constituyen una red polianiónica o matriz que proporciona funciones relacionadas con la elasticidad, porosidad, fuerza tensil y propiedades electrostáticas de la envoltura (Ryan, Ray, Ahmad, Lawrence, Plorde y Sherris, 2011).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus constituye un tipo de bacteria que se encuentra comúnmente en la piel y cabello además de las fosas nasales y garganta de personas y animales, son cocos grampositivos, que se presentan solos, en pares o en agrupaciones, inmóviles, catalasa positiva, anaerobios facultativos, con presencia de coagulasa, crecen en cloruro de sodio al 10 %, mesofílicos (temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20 °C y 45 °C). *Staphylococcus* es un género importante en humanos, produciendo un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en riesgo la vida, infecciones de la piel, tejidos blandos, entre otros. Causa enfermedad mediante la producción de toxinas o a través de la invasión directa y de la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas son casi exclusivamente el resultado de la actividad de la toxina, mientras que otras enfermedades resultan de la proliferación de los microorganismos, dando lugar a la formación de abscesos y a la destrucción tisular, en presencia de un cuerpo extraño es necesario la presencia de un número significativamente menor de estafilococos para producir enfermedad (Murray, 2008).

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis es una bacteria grampositiva comensal, disponen en parejas y cadenas cortas, se clasificaron previamente como estreptococos del grupo D debido a que poseen el antígeno de la pared celular del grupo D, un ácido teicoico con glicerol que se asocia a la membrana citoplasmática. Coloniza en el aparato digestivo de los humanos y los animales. La virulencia está mediada por la capacidad de adherirse al huésped, secretar citolisinas y proteasas que producen una lesión localizada del tejido y resistencia del antibiótico. El hábitat normal de este microorganismo es el tubo digestivo de

animales de sangre caliente. Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos, esta bacteria es la principal causante de infecciones del tracto urinario, bacteriemia, infecciones intraabdominal y endocarditis (Murray, 2008).

Pared Celular de las Bacterias gramnegativas

Las paredes celulares de bacterias gramnegativas contienen tres componentes que se encuentran fuera de la capa de peptidoglucanos: lipoproteínas, membrana externa y lipopolisacáridos. La membrana externa es diferente desde el punto de vista químico de todas las demás membranas biológicas. Es una estructura con una bicapa cuya hoja interna tiene una composición similar a la de la membrana celular. La capacidad de la membrana externa para que excluya moléculas hidrófobas es una característica poco común entre las membranas biológicas y sirve para proteger a la célula de sustancias nocivas, como las sales biliares. Por su naturaleza lipídica, es de esperarse que la membrana externa excluya también a moléculas hidrofílicas. Sin embargo, dicha membrana posee conductos especiales, formados por proteínas denominadas porinas, que permiten la difusión pasiva de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos y ciertos iones. Las moléculas grandes de antibióticos penetran la membrana externa con relativa lentitud, lo que explica la resistencia relativamente elevada a los antibióticos de las bacterias gramnegativas (Ryan, Ray, Ahmad, Lawrence, Plorde y Sherris, 2011).

Escherichia coli

La mayoría de las variedades de *Escherichia coli* son inofensivas o causan diarrea breve en términos relativos. Sin embargo, algunas cepas particularmente peligrosas, como la *E. coli* pueden causar cólicos abdominales intensos, diarrea con sangre y vómitos. Son bacilos gramnegativos de 1 a 3 μm de largo por 0,5 μm de ancho, anaerobios facultativos, fermentadores, oxidasa negativa, son móviles por la presencia de flagelos, es relativamente resistente y uno de los microorganismos más estudiado por el ser humano. Es una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, es un organismo ubicuo. Entre las enfermedades más comunes que puede ocasionar esta bacteria se encuentra: Infecciones gastrointestinales, infecciones del tracto urinario y meningitis neonatal (Murray, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Pseudomonas aeruginosa

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* constituye una de las principales causas de infecciones y sepsis en personas que sufren quemaduras graves porque es difícil, si no imposible, de combatir. Este microorganismo, ampliamente presente en el medio ambiente, aprovecha un debilitamiento del huésped para establecer diversos mecanismos que facilitan su multiplicación, los bacilos gramnegativos no fermentadores de 1 a 2 μm de largo por 0,3 μm de ancho, pequeños, rectos o ligeramente curvados, que suelen disponerse en parejas, sicrofílos (crecimiento a bajas temperaturas), oxida la de glucosa y de requerimientos nutricionales sencillos. Esta bacteria es común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, y en aguas residuales. Este microorganismo representa una fuente conocida e infecciones intrahospitalarias y pueden producir complicaciones graves. En pacientes inmunocomprometidos es un patógeno oportunista, puede infectar

el tracto pulmonar, tracto urinario, tejidos, heridas y también causas otras infecciones en sangre (Murray, 2008).

Klebsiella pneumoniae

Las bacterias del género *Klebsiella* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae que se caracterizan, entre otros aspectos, porque son bacilos Gram negativos que no poseen movimiento. Tienen forma de bastón. Es corta, mide entre 1 – 2 por 0,5 – 0,8 micrometros. Las células pueden encontrarse dispuesta individualmente, en pares, en cadenas y algunas veces en grupo. No presenta flagelo (por lo que no es móvil) y posee una cápsula prominente. Esta bacteria se desarrolla una gran colonia de consistencia mucoide cuando es cultivada en un medio de aislamiento primario, en agar Mac Conkey y en Agar Sangre. La cápsula de polisacáridos es la responsable de la apariencia mucoide de la colonia de *K. pneumoniae*. Es un microorganismo propio del microbiota de los humanos y otros vertebrados. Se puede encontrar en la boca, la piel y el tracto intestinal, donde inicialmente no causa problemas infecciosos (Prescott, Harley y Klein, 2009).

Resistencia Bacteriana

En relación con la resistencia bacteriana, Fernández, López, Ponce y Machado (2003) puntualizan que “Es el proceso mediante el cual un microorganismo o bacteria es capaz de disminuir la acción de los agentes antimicrobianos, la misma puede darse por diferentes factores, la resistencia bacteriana constituye un problema clínico” (p.72). Es de señalar, que algunos autores afirman que la resistencia bacteriana se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más grandes del mundo.

Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana es definida por Pedraza y Castellanos (2009) señalando que es:

La capacidad que tiene un agente de inhibir o eliminar el crecimiento de un microorganismo ante un fármaco o una droga en específico (antibiótico), el cual puede ser producido de forma natural o sintética con la finalidad de disminuir el crecimiento de bacterias y/o microorganismos o eliminarlos por completo (p. 42).

Métodos que Determinan la Actividad Antibacteriana

Método de dilución en caldo o en agar: Se preparan tubos con la concentración definida de antibiótico y se le agrega a cada tubo una cantidad conocida del agar Müeller-Hinton, este tubo se homogeniza y se vierte en una placa de Petri con lo que se logra una placa de agar Müeller-Hinton con el antibiótico diluido a una concentración determinada (Reyes, Palou y López, 2014).

Generalmente se inicia a una concentración de 128 µg/mL y se hacen diluciones dobles hasta obtener el gradiente decreciente en la concentración de antibiótico (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 µg de droga activa). La elección de la concentración en la que se inicia el gradiente depende del antibiótico y del tipo de cepa a probar (Reyes, Palou y López, 2014).

Adicional a esto, se inocula una placa de Müeller-Hinton sin antibiótico, que sirve como control positivo de crecimiento. La placa se incuba a 35°C por 18 a 24 horas y se revisa el crecimiento, siempre contra el control positivo. Si la cepa logra crecer en la superficie del medio de cultivo, se reporta como resistente a esa concentración del antibiótico. Si, por el contrario, no crece, se reporta como sensible a esa concentración de antibiótico (Reyes, Palou y López, 2014).

Preparar un gradiente de medios de cultivo con una concentración decreciente de antibiótico, hace que esta técnica sea muy engorrosa por lo que se utilizan sólo dos diluciones, una arriba del punto de quiebre del antibiótico y otra debajo de este valor. El punto de quiebre es un valor matemático, que expresa un punto o concentración arriba del cual la cepa se debe interpretar como resistente al antibiótico. Basándose en este criterio, al escogerse dos concentraciones, una abajo y otra arriba del punto de quiebre, si la cepa crece en las dos concentraciones es resistente, si crece sólo en la concentración bajo el punto de quiebre, la cepa es intermedia y sensible si no crece en ninguna (Reyes, Palou y López, 2014).

Método Epsilométrico (Etest): Este método emplea una tira con una matriz plástica que tiene una concentración decreciente de un antibiótico determinado. El medio que se usa es agar sangre con sangre de caballo al 5 % y con una base de Müeller-Hinton o puede utilizarse agar HTM (Medio Test Haemophilus) o agar chocolate suplementado; se determina solamente la concentración mínima inhibitoria y ésta se encuentra en la interfase de la elipse. La lectura debe ser muy cuidadosa y puede hacerse con la ayuda de una lupa. Se recomienda que, si la interfase cae entre dos puntos, se elija la concentración más alta y también es muy importante la observación de pequeñas colonias presentes en las zonas de bajo crecimiento, lo que puede indicar resistencia o bajos niveles de esta (Alippi, Reynaldi y López, 2013).

La técnica empleando las tiras de Etest es considerablemente más rápida y requiere una menor cantidad de medio de cultivo que la técnica de dilución en agar, por lo que puede adaptarse fácilmente al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas (Alippi, Reynaldi y López, 2013).

Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer): Esta técnica fue estandarizada por Kirby y Bauer en 1966. Aunque es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina, solo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibióticoterapia. El microorganismo de ensayo debe provenir de un cultivo puro y el inóculo bacteriano debe estar ajustado al patrón 0,5 de turbidez de McFarland; posteriormente se realiza el inóculo en un medio predeterminado para el microorganismo (Ramírez, García, Longa, Sánchez, Nieves, Velasco, Araque y Mosqueda, 2010).

El Método Kirby - Bauer consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación a temperatura óptima, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Ramírez, García, Longa, Sánchez, Nieves, Velasco, Araque y Mosqueda 2010).

Timol

El timol es un fitoconstituyente clasificado como un monoterpeno es el componente principal en el aceite esencial de algunas especies de la familia Lamiaceae (*Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* y *Monarda*) y en otras especies pertenecientes a las familias Verbenaceae, Scrophulariaceae, Ranunculaceae y Apiaceae. Algunos estudios muestran que el timol es

antiinflamatorio, antioxidante, anestésico local, antinociceptivo, cicatrizante, antiséptico y especialmente antibacteriano y antifúngico (Marchese, Orhan, Daglia, Barbieri, Di Lorenzo, Nabavi, Gortzi, Izadi y Nabavi, 2016).

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) (**14**), suele ser considerada una sustancia perteneciente al grupo de los terpenos y un isómero del carvacrol (Sánchez, Turina, García, Nolan y Perillo, 2004), Figura. 8

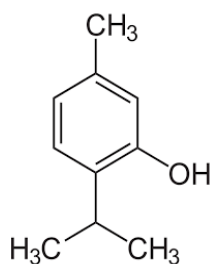


Figura 8. Estructura Química del Timol (**14**)

Fuente: Marcano y Hasewaga (2002)

Callistemon speciosus es una especie que contiene aceites volátiles, situación que permite establecer la actividad sinérgica en combinación con timol debido a que es un compuesto aromático de la familia de los fenoles. El timol se encuentra sobre todo presente en solución en varios aceites esenciales vegetales, en particular el timol. En su forma sólida el timol adquiere la forma de unos cristales sin color pero que desprenden un olor muy pronunciado. El timol forma parte de la composición de diversos medicamentos por su poder antibacteriano y antiséptico. (Pillou, 2015)

Cabe acotar, que el timol posee características propias en calidad de desinfectante y fungicida, además suele ser utilizado para la elaboración de productos por su sabor agradable, también contra infecciones por hongos. Por lo tanto, el timol constituye una sustancia activa insecticida natural, de origen vegetal (Quattrocchi, 2012). De allí, la importancia del sinergismo del aceite esencial de *Callistemon speciosus* y la mezcla con timol.

La acción combinada de diferentes causas para dar un efecto distinto al que cabe esperar de la suma de dichas acciones individuales, define al sinergismo, así una mezcla estabilizadora sinérgica proporciona una mayor protección a un mineral contra los efectos de la degradación que la esperada de los estabilizantes individuales. Es de señalar, que el sinergismo implica la realización de una combinación de sustancias para obtener un resultado que dependerá de la mezcla en función de las sustancias empleadas, en este caso, el estudio pretende combinar el aceite esencial de la *Callistemon speciosus* con timol para establecer una relación con la actividad antibacteriana (Costa, 2005).

La acción es de tipo sinérgico (cuando el efecto aumenta) o antagonista (cuando el efecto disminuye). De aquí se deduce la importancia de las interacciones farmacológicas en el campo de la medicina. En el caso del timol, este se ha ensayado en conjunto con antibióticos como tetraciclina, esta combinación disminuyó el valor de la CIM sobre las bacterias testadas (Miladinovic, Ilic, Kocic, Ciric y Nikolic, 2015).

Definición Operacional de Términos

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).

Actividad Farmacológica: Se conoce como interacción farmacológica a la modificación del efecto de un fármaco por la acción de otro cuando se administran conjuntamente. Esta acción puede ser de tipo sinérgico (cuando el efecto aumenta) o antagonista (cuando el efecto disminuye). De aquí se deduce la importancia de las interacciones farmacológicas en el campo de la medicina. (Miladinovic, Ilic, Kocic, Ciric y Nikolic 2015).

Antibiótico: Sustancia que tiene la capacidad de eliminar o de interrumpir el crecimiento y la proliferación de diversos microorganismos patógenos. (Pérez y Gardey, 2017)

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).

Extractos Vegetales: Es un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruíz y Susunaga, 2000).

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).

Sustancias Químicas: Una sustancia química es cualquier sustancia con una composición química definida, sin importar su procedencia. Una sustancia pura no puede separarse en otras sustancias por ningún medio mecánico (Alberca y Leiva 2015).

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

Según Arias (2012), la operacionalización de variables “se emplea en la investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores” (p.62). De manera tal, que en este estudio se presentan las variables en dos (2) tablas (Taba 2 y 3) en función de las variables independiente y dependiente.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: Composición química del Aceite esencial de *Callestemon speciosus*.

Variable	Tipo	Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del Aceite esencial de <i>Callestemon speciosus</i> .	Independiente Cuantitativa Discreta	Son productos químicos que forman las esencias aromáticas de un gran número de vegetales (Chanjin, 1999)
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
-Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). -Índice de Kovats (IK).	-Características organolépticas -Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales. -Espectros de masas.	Color, olor, sabor y densidad. Tiempo de retención y abundancia obtenida de los diferentes compuestos presentes en el aceite esencial de la planta <i>Callestemon speciosus</i> Comparación de los espectros de masas con la base de datos Wiley MS Data Library 6ta edición.

Fuente: Mata y Cordero (2021).

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del Aceite esencial de *Callestemon speciosus* y su actividad sinérgica frente al timol.

Variable	Tipo	Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del Aceite esencial de <i>Callestemon speciosus</i> y su actividad sinérgica en combinación con el timol.	Dependiente Cuantitativa	Actividad antibacteriana: Capacidad que tiene un agente de inhibir o eliminar el crecimiento de un microorganismo ante un fármaco o una droga en específico (antibiótico), el cual puede ser producido de forma natural o sintética (Pedraza y Castellanos, 2009). Sinergismos: Es una mezcla estabilizadora sinérgica proporciona una mayor protección a un mineral contra los efectos de la degradación que la esperada de los estabilizantes individuales. (Costa, 2005)
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador

La actividad antibacteriana se puede medir por: - Método de difusión de agar Kirby-Bauer en pozo modificado. Sinergismo frente al timol a diferentes concentraciones.	Cepas Gram negativas: -<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 -<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 -<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Cepas Gram positivas: -<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 -<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-Sensible -Sensibilidad Intermedia -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas Gram positivas y Gram negativas -Efecto sinérgico positivo o negativo
--	---	---

Fuente: Mata y Cordero (2021).

Hipótesis

Investigaciones previas reportan que varias especies de la familia Myrtaceae contienen metabolitos secundarios de interés biológico, por lo cual, es de esperar que exista una relación causal entre la composición química del aceite esencial de las hojas de *Callestemon speciosus*, con la actividad antibacteriana y sinérgica en combinación con el timol.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación se basa en un estudio de tipo confirmatoria, en este sentido, Hurtado (2007) señala que:

Este tipo de investigación requiere de una explicación previa o una serie de supuestos o hipótesis. Su objetivo es verificar una o más hipótesis derivadas de una teoría, a partir de la experiencia directa. La experiencia puede decir si una hipótesis es aceptable, pero sólo temporalmente, pues el conocimiento está sujeto a constante revisión (p.61).

Sobre el particular, se puede indicar que la investigación es de tipo confirmatoria estudia las relaciones entre las variables, manipulándolas bajo condiciones controladas para evaluar el efecto sinérgico que causan el aceite esencial de *Callistemon speciosus* en combinación con timol contra los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*.

Diseño de la Investigación

La investigación presenta un diseño mixto debido a que es un diseño de campo y de laboratorio. De acuerdo con Arias (2012) el diseño de campo “Es aquel que consiste en la recolección de datos directamente de los sujetos investigados, o de la realidad donde ocurren los hechos (datos primarios), sin manipular o controlar variable alguna.” (p.31). Es de señalar que se empleó la especie *Callistemon speciosus* para extraer el aceite esencial, la cual fue

recolectada del Jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Mérida-Venezuela y se procesó en el laboratorio de productos naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”. Respecto al cuándo y la amplitud, es contemporánea, longitudinal y bivariable respectivamente.

Población y Muestra

En relación con la población, Arias (2012) señala que “es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación.” (p/81). Por lo tanto, la población en este estudio estuvo representada por la especie de *Callistemon speciosus* del Estado Mérida, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el Estado, se puede encontrar en jardines y en las principales avenidas de la ciudad y la muestra consistió en ejemplares del jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Así mismo, Arias (2012) define que la muestra “Es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible.” (p.83). En este estudio, la muestra corresponde a las hojas frescas de *Callistemon speciosus*.

Unidad de Investigación

La unidad de investigación de este estudio se encuentra representada por las hojas obtenidas de la planta *Callistemon speciosus* conocido como limpia tubo Figura (9), que se recolectó en el Jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Mérida-Venezuela.

Selección de Tamaño de la Muestra

Las muestras de esta investigación están representadas por el aceite esencial, obtenidos de las hojas en función de 800 g de *Callistemon*

speciosus, recolectadas en el Jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Mérida-Venezuela.



Figura 9. Partes aéreas de *Callistemon speciosus*.

Fuente: Tomada y Modificada de Universo Botánico (2013)

Técnica e Instrumento de Recolección de Datos

En esta investigación se empleó la observación como técnica, la cual consiste en visualizar o captar mediante la vista, en forma sistemática, cualquier hecho, fenómeno o situación que se produzca en la naturaleza o en la sociedad, en función de unos objetivos de investigación pre-establecidos. (Arias, 2012). De manera tal, que la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Callistemon speciosus* contra diversas cepas bacterianas y su actividad sinérgica frente al timol para lo cual se utilizó una matriz de observación en forma de tablas y figuras que registraron los resultados.

Procedimiento de la Investigación

Recolección de la Planta y Preparación Previa del Material Vegetal

Las hojas frescas de *Callistemon speciosus* fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Se

preparó un *Voucher Specimen*, siguiendo el método tradicional de prensado y secado, y una vez etiquetado, el mismo se depositó en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. La planta fue botánicamente identificada por el Ingeniero Juan Carmona Arzola.

Extracción y Aislamiento del Aceite

La extracción del aceite se realizó en el laboratorio “A” de productos naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro, las hojas frescas 800 g de *Callistemon speciosus*, fueron cortadas, licuadas y sometidas a hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger durante un lapso de tiempo de tres (3) horas a 80 °C. Una vez que se obtuvo el aceite se guardó, se procedió a eliminar el exceso de humedad con sulfato de sodio anhidro y seguidamente fue almacenado a una temperatura de 4-6 °C en un frasco hermético y resguardado de la luz para su posterior análisis.

Separación e Identificación de los Componentes Volátiles de los Aceites Esenciales del *Callistemon speciosus*

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Esta técnica permite la separación e identificación de los componentes volátiles del aceite esencial, esta se realizó en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 6890 equipado con columna de fenil-metil-polixilosano (HP-5) de 30 metros de largo y 0,25 mm de diámetro, con un espesor de pared de 0,25 mm y un detector de masas Hewlett Packard MSD 5973. Para el análisis se preparó una solución de 20 µL de aceite en 1 mL de éter-dietílico. De la muestra se inyectó 1,0 µL, el programa de temperatura utilizado fue el siguiente: Temperatura inicial: 60 °C (0 min), con incremento de temperatura de 4 °C/min hasta una temperatura final: 260 °C. Se utilizó helio como gas portador, a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector

a 250 °C y del detector a 280 °C. Ver anexo 2-3 La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición (Adams, 2007).

Cálculos de los Índices de Kováts

En el equipo mencionado se usaron como patrones una serie de *n*-parafinas desde la C7 hasta la C22 (Kováts, 1958).

Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite en Estudio.

Bacterias de Ensayo: Se seleccionaron 5 especies de las cuales 2 son bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y 3 especies bacterianas son Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Preparación de los Pre-inóculos Bacterianos: Las cepas a ensayar se incuban en agar Müeller-Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano porque es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003). Una vez, que se obtienen las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa en aro estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de NaCl al 0,85 % previamente estéril, hasta alcanzar la turbidez del patrón de MacFarland N=0,5 equivalentes a 10^{6-8} UFC/mL.

Preparación de las Placas: A cada placa se le colocan 20 mL del agar Müeller-Hinton previamente preparado y esterilizado a una temperatura que

no supere los 40 °C mezclado con 2 mL del inoculo bacteriano, posteriormente se deja solidificar a temperatura ambiente.

Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión de Agar (Kirby – Bauer) en Pozo Modificado: Cada placa solidificada preparada con el medio e inoculo bacteriano se les procede a realizar los pozos con la inversa de una pipeta Pasteur estéril quedando unos pozos de (6 mm), a cada pozo se le adicionan 20 µL de la muestra (aceite esencial, extracto o compuesto puro); el control positivo representado por el antibiótico comercial con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a evaluar y el control negativo representado por el Dimetil sulfóxido (DMSO) el cual se utilizo para disolver el timol.

Preincubación e Incubación: Después de preparadas las placas con, éstas se dejan a temperatura ambiente por 30 minutos para que las muestras difundan (preincubación); y finalmente se incuban a 37 °C por 24 horas en atmósfera aeróbica.

Lectura de los Halos de Inhibición: Finalizado el tiempo de incubación se procede a medir con una regla milimetrada la zona clara alrededor del pozo de cada una de las placas que contienen las cepas bacterianas a estudiar, el control positivo y el control negativo.

Determinación de la Resistencia Bacteriana

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar cada una de las placas, de acuerdo con la sensibilidad o resistencia de las cepas. Se consideró como resultado positivo (actividad antibacteriana) cuando un halo de inhibición de crecimiento bacteriano se observó alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de halo se interpretó como resultado negativo o no activo (sin actividad antibacteriana). El diámetro de la zona de inhibición,

producto de la actividad antibacteriana de los aceites, se expresó en milímetros (mm). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Determinación de la Actividad Sinérgica.

Una vez realizadas las diferentes diluciones estudiadas y determinadas las CIM (Concentraciones Inhibitorias Mínima) para cada una de las cepas bacterianas, se procedió a evaluar la actividad sinérgica utilizando el aceite esencial puro y timol para cada bacteria. Para realizar el sinergismo se tomó la primera (1000 ppm) y última dilución que presenta la CIM.

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. Por lo tanto, se relacionó el crecimiento de las cepas en estudio contra la acción antibacteriana del aceite esencial de *Callistemon speciosus*, así como la identificación de los componentes químicos presentes en el aceite esencial de esta especie y que pudieran ser responsables de dicha actividad. Los datos fueron analizados a través de operaciones matemáticas (Palella y Martins, 2006)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Callistemon speciosus* se obtuvo a partir de las hojas de la planta, las cuales se sometieron a un proceso de hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger. El peso aproximado obtenido fue de 800 g el cual proporcionó 3 mL de aceite esencial, con un rendimiento del 0,3 %.

Análisis Cromatográfico del Aceite Esencial

Los componentes del aceite esencial de *Callistemon speciosus* fueron separados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, obteniéndose un cromatograma (Figura 10) con los diferentes tiempos de retención y áreas de cada compuesto. La identificación de los componentes se hizo mediante comparación computarizada de sus espectros de masas con los de la base de datos Wiley (6ta ed.). Posteriormente se determinaron los índices de Kováts los cuales fueron calculados en relación con una serie de *n*-alcanos de C₇-C₂₂ y comparados con valores reportados en la literatura (Adams, 2007).

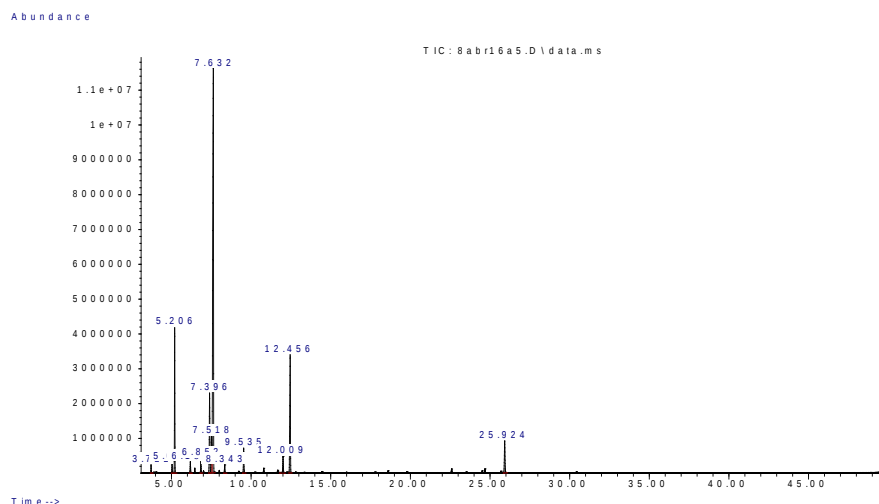


Figura 10. Cromatograma General de los Compuestos Mayoritarios del Aceite Esencial de *Callistemon speciosus*.

Tabla 4. Componentes Identificados del Aceite Esencial de *Callistemon speciosus*.

Pico	Componentes	TR	%	IKcal	IKtab
1	<i>cis</i> -3-hexenol	3,72	0,5	858	850
2	α -tujeno	5,04	0,7	930	924
3	α-pineno	5,20	9,9	939	932
4	β -pineno	6,19	0,9	983	974
5	Mirceno	6,47	0,4	991	988
6	α -felandreno	6,85	1,2	1005	1005
7	<i>p</i> -cimeno	7,39	7,5	1009	1020
8	Limoneno	7,52	4,0	1031	1024
9	1,8-cineol	7,63	53,3	1033	1026
10	γ -terpinene	8,34	0,7	1046	1054
11	Linalool	9,53	2,1	1098	1095
12	<i>trans</i> -Verbenol	10,79	0,5	1131	1140
13	Terpineol-4	12,01	1,8	1177	1174
14	α-terpineol	12,45	12,5	1189	1186
15	Óxido de Cariofileno	24,69	0,5	1581	1582

TR= Tiempo de retención; %= porcentaje; IKcal= Índice de Kovàst Calculado;

IKtab= Índice de Kovàts tabulado.

La tabla 4 muestra los compuestos químicos aislados del aceite esencial, junto con sus tiempos de retención, porcentajes e índices de Kováts calculados y tabulados. Se identificaron 15 componentes los cuales representan el 96,2 % de la mezcla. El 25,1 % son hidrocarburos monoterpénicos y el 70,1 % monoterpenos oxigenados, un sesquiterpeno oxigenado (óxido de cariofileno) con un 0,5 % y un hidrocarburo oxigenado de seis átomos de carbono (*cis*-3-hexenol) con un 0,5 %. En su mayoría el aceite esencial está formado por monoterpenos oxigenados siendo su principal representante el 1,8-cineol (**1**) 53,3 % seguido del α -terpineol 12,5 % (**15**) y α -pineno (**16**) 9,9 % Fig. (**11**)

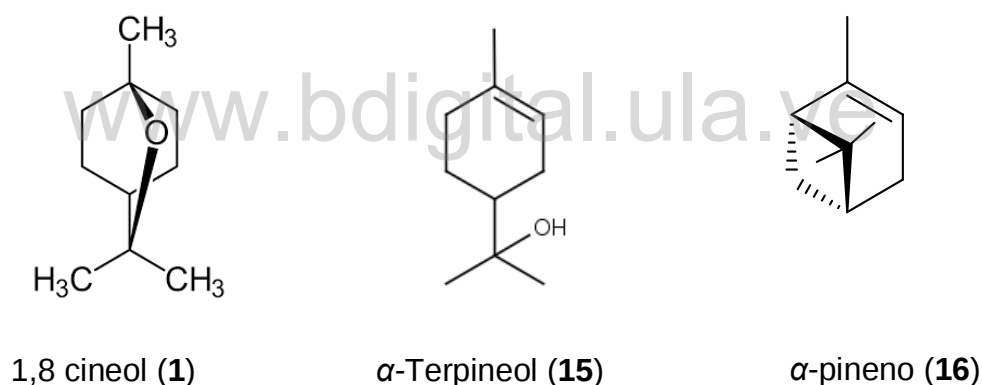


Figura 11. Estructura Química de los monoterpenos mayoritarios del 1,8 cineol, α -Terpineol, α -pineno

Fuente: Marcano y Hasewaga (2002)

El componente mayoritario de *Callistemon speciosus* correspondiente al 1,8-cineol, coincide con lo reportado por Granados, Santafé y Acevedo (2015) Composición Química y Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Eucalyptus Camaldulensis* de Norte de Santander cuyo aceite esencial es *Eucalyptus Camaldulensis*, el cual posee componentes de mono y de sesquiterpenos, siendo el 1,8-cineol, el componente con mayor concentración, con un 81,0 %, seguido del α -pineno, con un 5,26 %. Por lo tanto, resulta el compuesto con mayor presencia en ambos aceites, además es característico del género y se le atribuyen las propiedades plaguicidas.

Por otra parte, el estudio de Rotimi, Okoh, Sadimenko y Okoh (2017) Constituyentes terpénicos de las partes aéreas, contenido fenólico, potencial antibacteriano, eliminador de radicales libres y antioxidante actividad de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (Myrtaceae) de la provincia de Eastern Cape de Sudáfrica, tiene similitud con la presente investigación en los componentes α -terpineol (8,01 %) y α -pineno (31,03 %). Las actividades antibacterianas de los aceites de (hojas y flores) examinadas se encontró que tenían una amplia gama de actividades contra las cepas bacterianas utilizadas en ambos estudios.

Tabla 5. Mezcla de las Diferentes Diluciones del Aceite Esencial Puro y Timol

Solución de Timol (%)	Mezcla	Cantidades
75	AP + timol	750 + 250
50	AP + timol	500 + 500
25	AP + timol	250 + 750
12,5	AP + timol	125 + 875

Leyenda: Solución de Timol (%), Mezcla (AP+timol), Cantidades

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 6. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial puro y Mezclado a Diferentes Diluciones con Timol.

Halos de inhibición en milímetros (mm) de las muestras estudiadas							
	Antibió. 5 mg/mL	Timol 100 ppm	AP	75 % AP+T	50 % AP+T	25 % AP+T	12,5 % AP+T
Disco	1	2	3	4	5	6	7
<i>S. aureus</i>	11	7	30	30	<u>35</u>	18	22
<i>E. coli</i>	11	7	16	<u>25</u>	<u>26</u>	<u>25</u>	12
<i>K. pneumonia</i>	11	7	15	15	<u>20</u>	12	8
<i>E. faecalis</i>	12	7	22	<u>36</u>	<u>32</u>	<u>28</u>	<u>25</u>
<i>P. aeruginosa</i>	11	7	18	<u>30</u>	<u>32</u>	<u>28</u>	<u>21</u>

Leyenda: Antibiótico (Antibio.) = oxitetraciclina 5 mg/mL. Aceite Esencial Puro (AP), Aceite Esencial Puro más Timol (AP+T), Porcentaje (%), Partes por millón (ppm), Halos de inhibición en milímetros (mm).

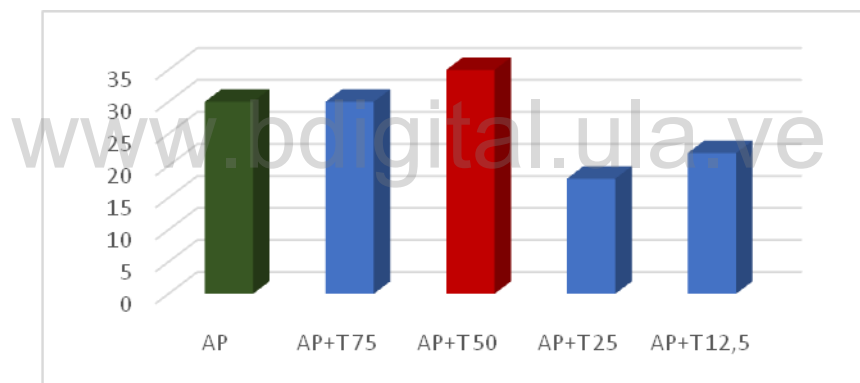
Fuente: Elaboración Propia

En relación con la tabla 6 esta muestra la actividad del timol a 100 ppm, el cual fue efectivo contra todas las bacterias al igual que el aceite esencial puro con halos entre 15 y 30 mm, siendo superior a los antibióticos empleado (oxitetraciclina) a 100 ppm. La tabla 5 muestra las diferentes diluciones realizadas de las mezclas de timol y el aceite esencial puro (AP). Volviendo a la tabla 5 se indican los resultados de la actividad sinérgica.

El efecto sinérgico del aceite esencial más timol ensayado a diferentes concentraciones fue efectivo contra todas las bacterias ensayadas en diluciones 75 % y 50 %. En dos casos se mantuvo igual: *S. aureus* más Timol-aceite esencial puro a 75 % con un halo de 30 mm y *K. pneumonia* más Timol-aceite esencial puro a 75 % con un halo de 15 mm.

La misma mezcla aceite esencial puro más timol empleado a concentraciones de 75 %, 50 %, 25 % y 12,5 % resultó ser efectiva, en todas las diluciones, contra las bacterias *E. faecalis* y *P. aeruginosa*. Los halos de inhibición de la mezcla aumentaron en comparación con los halos del aceite esencial puro mostrando así el efecto sinérgico con un máximo de 63 % presentado contra *P. aeruginosa*.

Con la bacteria grampositiva *S. aureus* la mezcla mostró actividad a la concentración de 75 % igual a la del aceite esencial puro y presentó un aumento a la concentración de 50 %, y a concentraciones más bajas de 25 % y 12,5 % el efecto fue antagónico (Grafico 1).

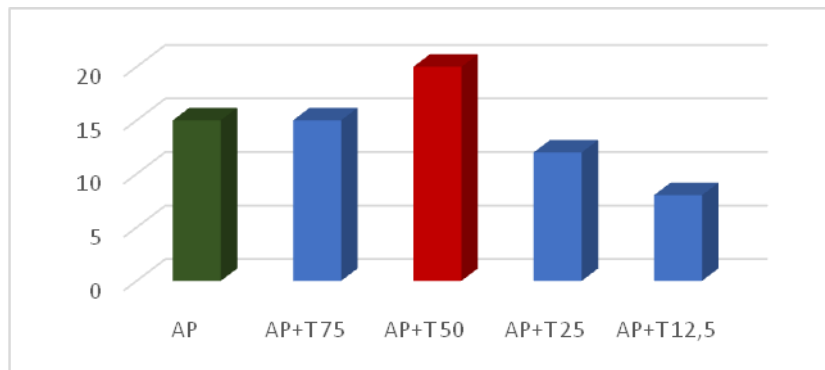


Ap= aceite puro; AP+T = aceite esencial más timol al 75 %, 50 %, 25 % y 12,5 %.

Gráfico 1. Efecto sinérgico de aceite esencial con timol sobre *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia.

Con la bacteria gramnegativa *K. pneumonia* la mezcla mostró actividad, a la concentración de 75 %, igual a la del aceite esencial puro y presentó un aumento a la concentración de 50 %, y a concentraciones más bajas de 25 % y 12,5 % el efecto fue antagónico (Grafico 2).

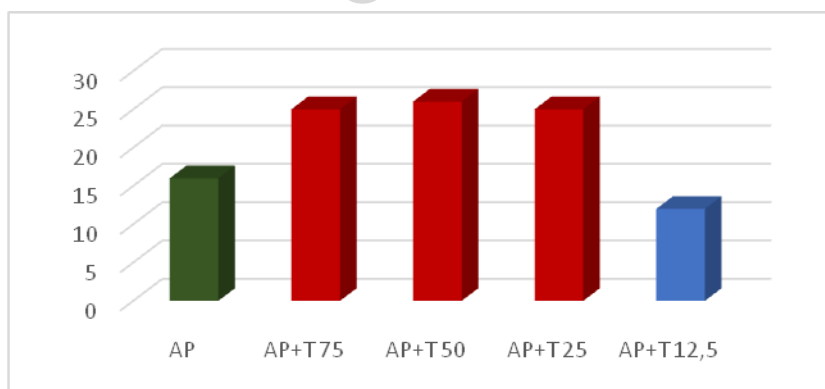


Ap= aceite puro; AP+T = aceite esencial más timol al 75 %, 50 %, 25 % y 12,5 %.

Gráfico 2. Efecto sinérgico de aceite esencial con timol sobre *K. pneumonia*

Fuente: Elaboración propia.

Para la *E. coli* se presentó sinergismo de la mezcla aceite esencial puro más timol a 75 %, 50 % y 25 %, el Grafico 3, muestra la actividad y el antagonismo a la concentración de 12,5 %.

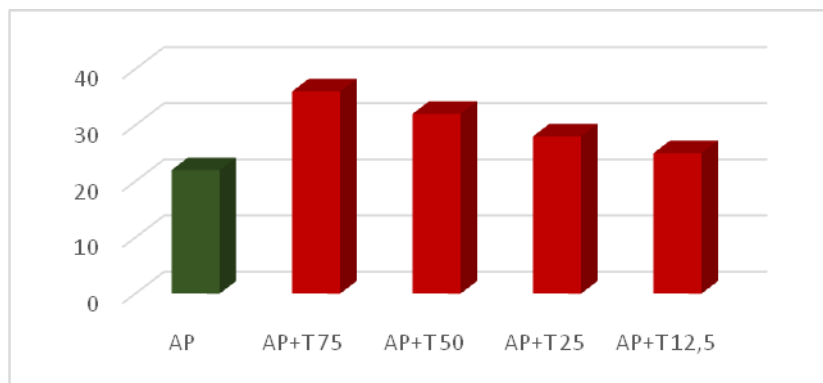


Ap= aceite puro; AP+T = aceite esencial más timol al 75 %, 50 %, 25 % y 12,5 %.

Gráfico 3. Efecto sinérgico de aceite esencial con timol sobre *E. coli*.

Fuente: Elaboración Propia.

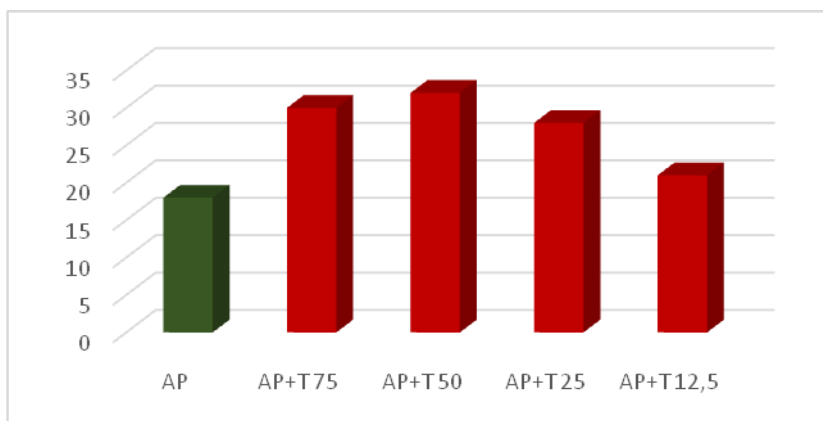
En el caso de las bacterias, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, se observa una muy buena actividad sinérgica en todas las concentraciones empleadas del aceite esencial más timol (Grafico 4 y 5).



Ap= aceite puro; AP+T = aceite esencial más timol al 75 %, 50 %, 25 % y 12,5 %.

Gráfico 4. Efecto sinérgico de aceite esencial con timol sobre *E. faecalis*

Fuente: Elaboración Propia.



Ap= aceite puro; AP+T = aceite esencial más timol al 75 %, 50 %, 25 % y 12,5 %.

Gráfico 5. Efecto sinérgico de aceite esencial con timol sobre *P. aeruginosa*

Fuente: Elaboración Propia.

En las gráficas 4 y 5 se muestra el sinergismo realizado del aceite esencial puro más timol sobre las bacterias *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, las cuales son normalmente más resistentes a los componentes de los aceites esenciales.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Las conclusiones que se presentan a continuación son producto de analizar la actividad antibacteriana y sinérgica del aceite esencial de *Callistemon speciosus* (Myrtaceae) recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes del Estado Bolivariano de Mérida, el cual condujo a referir:

- Se logró aislar el aceite esencial (3 mL) a partir de las hojas frescas del *Callistemon speciosus* con un rendimiento del 0,3 %.
- A partir del aceite esencial se lograron identificar quince (15) componentes, los cuales representan el 96,2 % de la mezcla. El 25,1 % son hidrocarburos monoterpénicos y el 70,1 % monoterpenos oxigenados, un sesquiterpeno oxigenado (óxido de cariofileno) con un 0,5 % y un hidrocarburo oxigenado de seis (6) átomos de carbono (*cis*-3-hexenol) con un 0,5 %. En su mayoría el aceite esencial está formado por monoterpenos oxigenados siendo su principal representante el 1,8-cineol (53,3 %) seguido del α -terpineol (12,5 %).
- El aceite esencial puro resulto ser activo contra todas las bacterias ensayadas con halos entre 15 y 30 mm. (*S. aureus* (30 mm), *E. coli* (16 mm), *K. pneumonia* (15 mm), *E. fecalis* (22 mm) y *P. aeruginosa* (18 mm)).

- El timol a 100 ppm resulto ser efectivo contra todas las bacterias ensayadas.
- Contra la bacteria grampositiva *S. aureus* la mezcla timol-aceite esencial y aceite esencial puro mostraron actividad a las concentraciones de 75 % (30 mm), además presentaron un aumento la concentración de 50 % (35 mm) y a concentraciones más bajas de 25 % (18 mm) y 12,5 % (22 mm), por lo tanto, el efecto fue antagónico.
- Para la *E. coli* se presentó sinergismo la mezcla del aceite puro más timol a las concentraciones de 75 % (25 mm), 50 % (26 mm) y 25 % (25 mm), pero a la concentración de 12,5 % (12 mm) se observándose un efecto antagónico.
- Con la bacteria gramnegativa *K. pneumonia* la mezcla y el aceite puro mostraron actividad a la concentración de 75 % con un halo de (15 mm), además presentó un aumento a la concentración de 50 % (20 mm) y a las concentraciones más bajas de 25 % (12 mm) y 12,5 % (8 mm) el efecto fue antagónico.
- En el caso de las bacterias, *E. faecalis* y *P. auriginosa*, se observó una muy buena actividad sinérgica en todas las concentraciones empleadas de aceite esencial más timol.

Recomendaciones

En concordancia con las conclusiones se presentan a manera de recomendaciones las siguientes:

- Ensayar otros métodos de extracción del aceite esencial que favorezca el proceso de obtención.

- Ensayar el aceite esencial obtenido de las hojas de *Callestemon speciosus* frente a otras bacterias nosocomiales y hongos
- Estudiar la composición y actividad antibacteriana del *Callestemon speciosus* recolectada en otras localidades del país.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFIA

Acuña, G. (2003). Evolución de la terapia con agentes antimicrobianos: qué fue, qué es y será. *Revista Chilena de Infectología*, Vol. 20 (1). Consultado el 11 de noviembre de 2020. Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003020100001

Adams, P. (2007). *Identification of essential oil componenets by gas chromatography/ mass spectrometry*. 4th Ed. USA: Allured Pub Corp

Alippi, A., Reynaldi, F. y López, A. (2013). Evaluación del método epsilométrico E-test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*. *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 45 (4): 257-261.

Al-Azizi, M. El-Olemy, M. El-Sayed, A. y Al-Yahya, M. (1995). GC/MS. Analysis of the volatile oil of the leaves of *Callistemon speciosus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 35 (16): 10-17.

Alberca, J. y Leiva, J (2015). *Sustancias Químicas* Consultado el 11 de noviembre de 2020. Recuperado en: <https://www.monografias.com/trabajos105/sustancias-químicas/sustancias-químicas.shtml#ixzz4ag3bLXI5>

- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales sustancias y drogas extraídas de las Plantas*. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Albornoz, A. (1995). *Medicina tradicional Herbaria*. Caracas. Instituto Farmacoterápico Latino.
- Albornoz, A. (2001). *Medicina Tradicional Herbaria*. Caracas: Instituto Farmacoterápico Latino.
- Allemann, D. Andrés, R. Borquin, D. y Clerc, J. (1989). Computer-Aided GC/MS Analysis of Essential oils in Complex Vegetable Drugs for Quality Control. *Planta Médica*. Vol. 55 (7): 632-633.
- Andrade, M. (2015). Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Lippia origanoides* y Sinergismo en Combinación con Timol. *Trabajo de Grado Bioanálisis-ULA*.
- Anon, (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol.1 (9): 1-2.
- Arias, F. (2012). *El proyecto de Investigación*. Caracas: Episteme.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2 (3). Consultado el 11 de noviembre de 2020. Recuperado en: https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- Badillo, V., Schnee, L. (1995). *Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela*. Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.

- Barclay, L., Begg, J. y Chambers, T. (1992). Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Quimioterapia de Agentes Antimicrobianos*, Vol.75 (36): 1951-1957.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., y Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 29 (2): 70-76.
- Betés, M., Durán, M., Mestres, C. y Nogués, R. (2008). *Farmacología para Fisioterapeutas*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Brooks G, Carroll K, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick y Adelberg. 2011). *Microbiología Médica*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Brophy, J., Goldasak, R., Forster, P., Craven, L. y Lepschi, B. (1988). The leaf essential oils of the Australian members of the genus *Callistemon* (Myrtaceae). *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 43 (10): 595-606.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza: Acribia.
- Cabañas, M., de la Luz, M., Lamothe, A., Suárez, D. y Domínguez, Y. (2005). *Prácticas de Botánica Morfológica y Sistemática*. Consultado el 11 de noviembre de 2020. Recuperado en: <https://www.ecured.cu/Zingiberaceae>
- Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismo de acción de los antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 27 (1).

Consultado el 11 de noviembre de 2020 y recuperado de:
<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000177>

Cañigüeral, S., Dellacassa, E. y Bandoni, A. (2003) Plantas medicinales y fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Revista: Acta Farmacéutica Bonaerense* Vol. 22 (3): 265-278

Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización* (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid.

Claus, E. y Tyler, V. (1965). *Farmacognosia*. Buenos Aires, Argentina. El Ateneo Editorial.

Costa, J. (2005). *Diccionario de Química Física*. España: Diaz de Santos.

Davies N. (1990) Gas Chromatographic retention indices of Monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silica and carbowax 20 M. Phases. *Journal of Chromatography A*. Vol. 503 (45):1-24.

Domínguez, X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa

Fernández, F., López, J., Ponce, L. y Machado, C., (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Medica Militar*. Vol. 32 (1): 44-48

Font, Q. (1973). *Plantas Medicinales*. Barcelona, España: Editorial Labor S.A.

González, A y Enrique, C. (2015). *Paseos botánicos por Melilla*. Consultado el 11 de noviembre de 2020. Recuperado en: <https://elalminardemelilla.com/2015/11/18/callistemon-speciosus/>

García D, Álvarez A, Tornos P, Fernández A, Sáenz T. (2002). Gas Chromatographic-Mass Spectrometry Study of the Essential Oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *P. racemosa* var. *grisea*. *Natur Forsch*. Vol. 57 (12): 449-450.

Granados, C., Santafé, G. y Acevedo, D (2015). Composición Química y Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Eucalyptus Camaldulensis* de Norte de Santander. Trabajo de Grado Universidad de Cartagena. Colombia.

www.bdigital.ula.ve

Goyal, P., Jain, R., Jain, S., & Sharma, A. (2012). A Review on biological and phytochemical investigation of plant genus *Callistemon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 2 (3): S1906-S1909.

Hoyos, F, (1992). *Arboles Tropicales Ornamentales Cultivados en Venezuela –Caracas*. Caracas – Venezuela. Nacional Venezuela.

Hammer, A. Carson C., and Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol J*. Vol. 86 (6): 985-990

Hurtado, J. (2007). *El proyecto de Investigación. Quinta edición*. Caracas: Ediciones Quirón-Sypal.

Kabera, J., Semana, E., Mussa, A. y He, X. (2014) *Metabolitos secundarios de plantas: biosíntesis, clasificación, función y propiedades farmacológicas*. *Revista de Farmacia y Farmacología*, Vol 2 (7): 377-392.

Karasek, F. y Clement, R. (1988). *Basic gas chromatography-mass spectrometry*. Elsevier, Amsterdam.

Kováts, E. (1958). *Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retention indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*. *Helvetica Chimica Acta*. 41.

Laurent, A. (1789). *Myrtaceae*. Consultado el 21 de enero 2019. Recuperado de: <https://www.ecured.cu/Myrtaceae>

León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. San José, Costa Rica: Agroamericana.

López, J (2013). *Callistemon*. Consultado el 21 de enero 2019. Recuperado de: <http://universobotanico.blogspot.com/2013/11/callistemon-sp.html>.

Llosa, Z. (2003). *Zoología general*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

Marchese, A., Orhan, E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, F., Gortzi, O., Izadi, M. y Nabavi, SM. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, Vol.210 (1): 402-414.

Marcano, D y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Marinoff, M. (2006). Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Vol.53 (755). Consultado el 11 de noviembre de 2019. Recuperado de: <https://wouzi.com/document/2006-e-053-pdf-edami9f>

Medina, N. y Romero, C. (2005) *Callistemon speciosus*. Consultado el 11 de noviembre de 2019. Recuperado de: http://asignatura.us.es/abotcam/especies/Callistemon_speciosus.html.

Miladinovic, L., Ilic, S., Kocic, D., Ciric, M., & Nikolic, M. (2015). Antibacterial investigation of Thyme essential oil and its main constituents in combination with tetracycline. *Journal of medicinal food*, Vol.18 (8): 935-937.

Murray, P. (2008) *Microbiología Medical*. España: Elsevier.

Naturalista (2021). *Eucaliptos, Pimientos, Guayabas y Parientes Familia Myrtaceae*. Consultado el 21 de enero 2019. Recuperado de: <https://www.naturalista.mx/taxa/51816-Myrtaceae>.

- Oyededeji, O., Lawal, O., Shode, F., Oyededeji, A., (2009). Composición química y actividad antibacteriana del Aceites esenciales de *Callistemon citrinus* y *Callistemon viminalis* de Sudáfrica. *Moléculas*. Vol. 14 (6): 1990–1998.
- Palá, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “Eryngium” L, en la Península Ibérica*. Trabajo de Grado Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España.
- Palella, S. y Martins, F. (2006). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas: FEDUPEL.
- Parra, C. (2014). Sinopsis de la familia Myrtaceae y clave para la identificación de los géneros nativos e introducidos en Colombia, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* Vol. 38 (148): 261-77.
- Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I. y González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *Medisan*, Vol.18 (10). Consultado el 11 de noviembre de 2019. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014001000019
- 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*. Parte X Cefoperazona- Sulbactam. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Peña, C. (2005). Tipos de toxicidad y escalas de valoración. *Oncología*, Vol. 28 (2). Consultado el 11 de noviembre de 2019. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352005000200004

Peredo, H., Palou, E. y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 1 (3). Consultado el 11 de noviembre de 2019. Recuperado de: [https://udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

Pérez, J. y Gardey, A. (2017). *Definición de antibiótico* Consultado el 10 de febrero de 2019. Recuperado de: <https://definicion.de/antibiotico/>

Pérez, M., Mitchell, S. y Vargas, R. (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*; In Press, Corrected Proof:1130.

Pérez, Y., Valdés, R., Castellanos, L., López, A., y León, J. (2020). Myrtaceae alternativa para el control de plagas. *Revista Científica Agroecosistemas* Vol. 8 (3): 33-36

Pillou, J. (2015) *Timol*. Consultado 18 de enero 2019. Recuperado de: <https://salud.ccm.net/faq/21561-timol-definicion>

Pino A, Rodríguez K y Beldarraín T. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Callistemon speciosus*

(Sims), DC. Leaves from Cuba. *The Journal of Essential Oil Research*. Vol. 25 (5): 418–422.

Praveen, K. Renuka, J. Shweta, J. y Archana, S. (2012). A Review on biological and phytochemical investigation of plant genus. *Callistimon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 2 (3):1906-1909.

Prescott, M. Harley, J. y Klein, G. (2009). *Microbiología, 7ma edición, Madrid, México, Mc GrawHill-Interamericana*. Consultado el 10 de febrero de 2019. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/klebsiella/>

Quattrocchi, U. (2012). *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms and Etymology*. London: Taylor and Francis Group.

Quijano. C., Gaviria, M., Vanegas, C. y Pino, JA. (2010) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Callistemon viminalis* (Gaertn.) g. don leaves from Colombia. *J Essent Oil Bearing Plants*. Vol.13 (6): 710–6.

Ramaswami, S. Briscese, P. Gargiullo, R. y Von Geldern, T. (1988). Sesquiterpene Hydrocarbons: from Mass Confusion to Orderly Line-Up. In *Flavors and Fragrances: A World Perspective*, Lawrence, B. M.; Mookherjee, B. D.; Willis, B. J., Eds. Amsterdam.

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.

Reyes, F., Palou, E. y López, A. (2014). *Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales*. Puebla, México: Temas Selectos.

Robards, K. Haddad, R. Jackson, P. (1994). *Principles and practice of modern chromatographic methods*. Academic press, London.

Rotimi, A., Omobola, O., Sadimenko, A y Okoh, A. (2017). Constituyentes terpénicos de las partes aéreas, contenido fenólico, potencial antibacteriano, eliminador de radicales libres y antioxidante actividad de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (Myrtaceae) de la provincia de Eastern Cape de Sudáfrica. *Trabajo de Grado. Universidad de Fort Hare, Alice, Sudáfrica*.

Ruiz, M. y Susunaga, C. (2000). Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens*, frente a microorganismos: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinérea* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.

Russo, R., Corasaniti, M., Bagetta, G y Morrone, L. (2015). *Aprovechamiento de la citotoxicidad de algunos aceites esenciales para Traducción en terapia del cáncer. Medicina alternativa y complementaria basada en*

evidencias. Consultado el 21 de enero 2019. Recuperado de: <https://doi.org/10.1155/2015/397821>.

Ryan K, Ray C, Ahmad N, Lawrence W, y Plorde J. Sherris. (2011). *Microbiología Médica*. España: The McGraw-Hill Companies

Sánchez, J. (2003). Las especies del género *Callistemon* cultivadas en España. Consultado el 21 de enero 2019. Recuperado de: <https://www.arbolesornamentales.es/Callistemon.htm>

Sánchez, A., Turina, V., García, A., Nolan, V. y Perillo, A. (2004). Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 34 (2): 77–86

www.bdigital.ula.ve

San Martín, R. (1968). *Farmacognosia con Farmacodinamia*. Segunda Edición. Barcelona España Editorial Científico Médica.

Serra, M. (2017) *La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana*. Revista Habanera de Ciencias Médicas. Vol.16 (3): 1-2.

Skoog, A. y Leary, J. (1994). *Análisis Instrumental*. Madrid: McGraw-Hill.

Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejías, A. y Suárez, D. (2018). *Productos Naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Bogotá D.C-Colombia: Fundación Universitaria Agraria de Colombia: UNIAGRARIA

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.

Universo Botánico (2013). Inflorescencia del *Callistemon*. Consultado el 21 de enero 2019. Recuperado de: <http://universobotanico.blogspot.com/2013/11/callistemon-sp.html>.

Urdang, G. (1948). *The Origin and development of the Essential Oil Industry*. In The Essential oils, Guenther, E., Ed. New York.

Vaca, G., Quispillo, J., Tubon, I. y Viteri, J Rodríguez. (2020) Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo) *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* (revista en línea) Vol. 39 (2). Consultado el 8 de marzo de 2021 en: www.revistaavft.com.

Vareshi, V. (1970). *Flora de los páramos de Venezuela*. Mérida, Venezuela: Edición del Rectorado.

Ventura, A. (2017). Comparación de tres métodos en la extracción de aceite esencial de Orégano silvestre (*Lippia ssp.*). Trabajo de Grado. Universidad Nacional Toribio Rodríguez De Mendoza De Amazonas, Perú.

Wasicky, R. y Saito, T. (1972). Analise dos components do oleo essencial de *Callistemon speciosus* D. C. *Revista de farmacia e bioquímica da Universidade de São Paulo*. Vol.10 (1): 63-72.

Williamson, E. (2001). *Sinergia y otras interacciones en fitomedicina*. Revista Phytomedicina. Vol. 8 (3): 401–409.

Yoo, B., Han,T, Cho, S., Ha. J., Park, J. y Nam, H. (2005) Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*; Vol. 225 (1): 41-42.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve

Anexo A
Evidencias Fotográficas

www.bdigital.ula.ve



Figura 12. Equipo de Hidrodestilación con Trampa de Clevenger

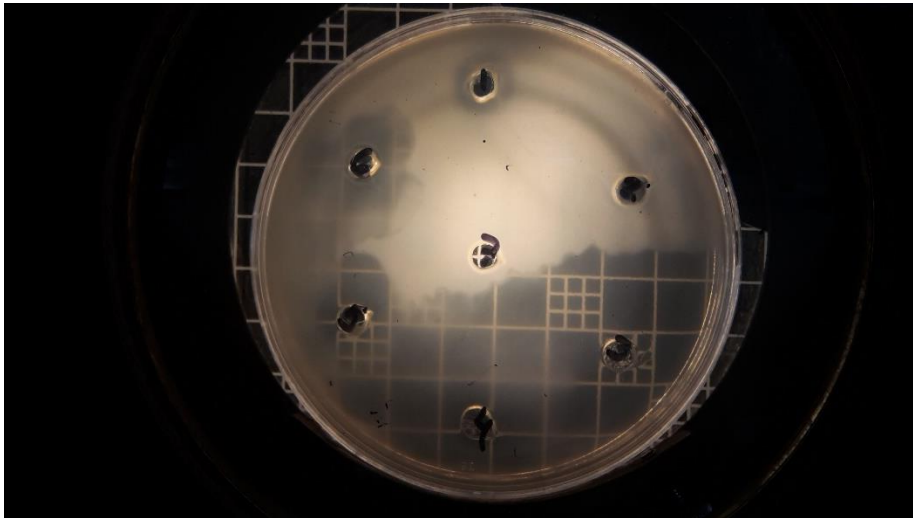


Figura 13. *S. aureus*

www.bdigital.ula.ve

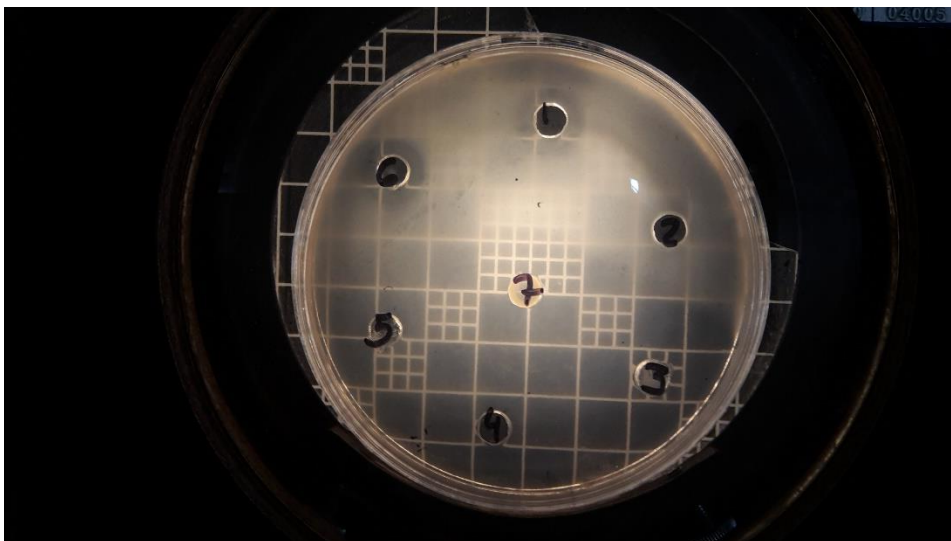


Figura 14. *E. coli*

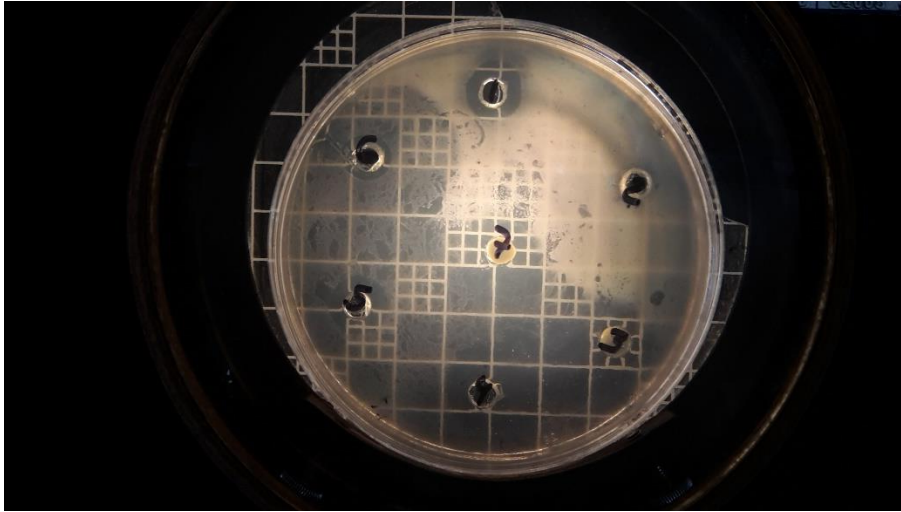


Figura 15. *K. pneumoniae*

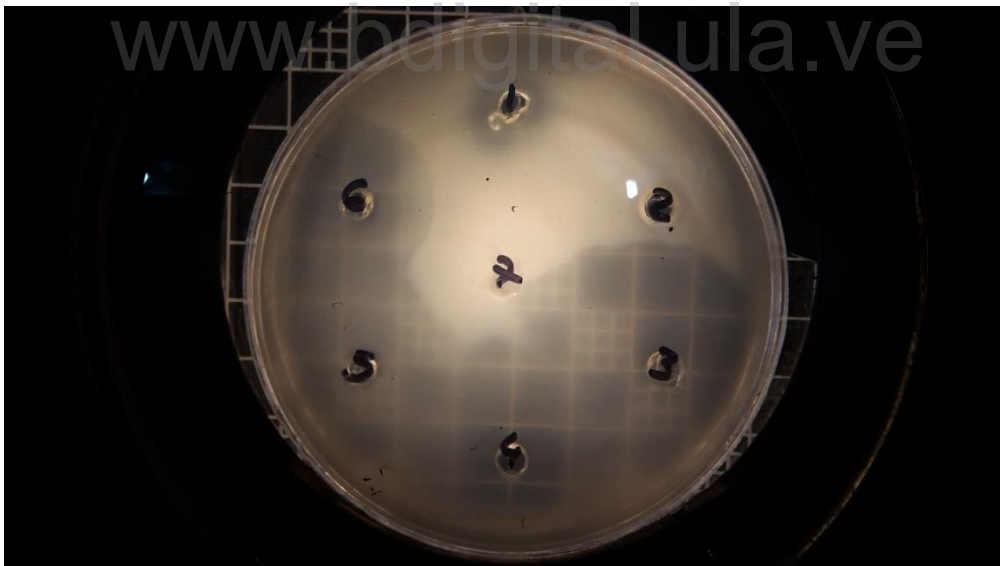


Figura 16. *E. faecalis*

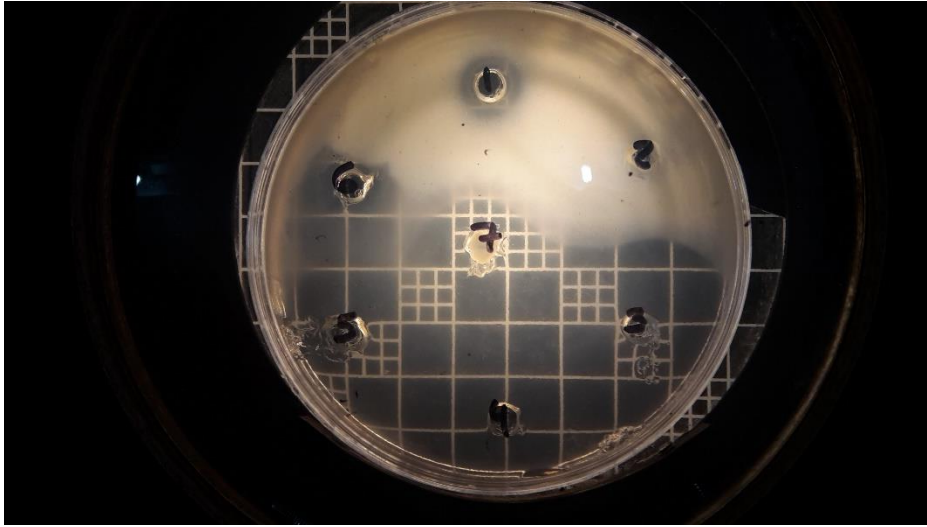


Figura 17. *P. aeruginosa*

www.bdigital.ula.ve