



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS
DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y
MEDICAMENTOS ORGÁNICOS**



Composición Química y Actividad Microbiológica/Larvicida del Aceite Esencial de *Verbesina negrensis* (Steeyermark)

(Trabajo de Grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis)

Prof. Mora Flor
Tutor

Rojas A, Yesenia
Tesista

Mérida, Mayo de 2014

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xii
INTRODUCCIÓN	13
CAPITULO I. EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema	15
Objetivos de la investigación	15
Objetivos generales	15
Objetivos específicos	16
Justificación	16
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	
Antecedentes históricos	17
Antecedentes de la investigación	19
Estudio fitoquímico del género <i>Verbesina</i>	19
Bases teóricas	22
<i>Familia Asteraceae (Compositae)</i>	22
Clasificación botánica de la familia Asteraceae	22
Descripción botánica de la familia Asteraceae	22
Distribución geográfica de la familia Asteraceae	23
Composición química de las Asteraceae	23
Actividades biológicas de los géneros más estudiados de la familia Asteraceae	23
<i>Género Verbesina</i>	24
Descripción botánica del género <i>Verbesina</i>	24
Distribución geográfica del género <i>Verbesina</i>	25
Usos medicinales de algunas especies de plantas pertenecientes al género <i>Verbesina</i>	25
<i>Verbesina negrensis</i>	25
Descripción botánica de la especie <i>Verbesina negrensis</i>	25
Distribución geográfica de la especie <i>Verbesina negrensis</i>	26
<i>Aceites esenciales</i>	26
Actividad farmacológica de los aceites esenciales	27

Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales	27
Biogénesis de los aceites esenciales	27
Composición química de los aceites esenciales	28
Terpenos	28
Biosíntesis de los terpenos	29
Localización y función de los aceites esenciales	30
Análisis y control de calidad de los aceites esenciales	31
Aceites esenciales - actividad antibacteriana	32
Aceites esenciales - actividad larvícida	32
Relación hombre-germen	32
Resistencia bacteriana	32
Resistencia larvícida	33
Proceso de obtención de los aceites esenciales	35
Métodos utilizados para la separación de los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales	35
Cromatografía	35
Cromatografía de gases	35
Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM)	36
Hipótesis	37
CAPÍTULO III. MARCO METODOLOGICO	
Tipo de investigación	38
Metodología y Plan de Trabajo	38
Metodología	38
Recolección e identificación de la especie vegetal	39
Extracción del aceite esencial	40
Separación e identificación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial	40
Cromatografía de gases (Índices de Kóvats)	40
Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	41
Evaluación de la actividad antibacteriana	41
Microorganismos de ensayo	41
Preparación de los inóculos bacterianos	41
Preparación de las placas	42
Inoculación de las placas	42
Colocación de los discos impregnados con el aceite esencial de <i>Verbesina negrensis</i>	42

Preincubación e incubación	42
Lectura de las placas	42
Medición de la toxicidad en las larvas	43
Plan de Trabajo	44
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Parte química	45
Parte biológica	49
Actividad antibacteriana	49
Actividad larvicida	50
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones	51
Recomendaciones	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias, pertenecen a varias especies de plantas, proporcionan sabor y olor a innumerables alimentos, aunque también son usados en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética. La familia Asteraceae es rica en aceites esenciales, a ella pertenece el género *Verbesina negrensis*, la cual es una especie endémica de Venezuela. Del género *Verbesina*, solo se ha reportado el estudio del aceite esencial de *Verbesina turbacensis*, así como también, el estudio de *Verbesina diversifolia*. La hidrodestilación por arrastre con vapor de agua, es un método que se utiliza para la extracción de los aceites esenciales, de las hojas frescas de *Verbesina negrensis* se produjo un rendimiento de 0,08% del aceite esencial. El análisis químico del mismo se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cual permitió identificar 27 componentes que constituyen el 96,6% del aceite. Los compuestos más abundantes fueron el α -pineno (43,1%), α -humuleno (13,8%) y el *Cis*-muurola-3,5-dieno (8,1%). La actividad antibacteriana del aceite esencial realizada por el método de difusión en agar con discos frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostro una moderada actividad contra las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, con valores de CIM de 350 μ g/mL-500 μ g/mL. El aceite resulto no ser activo contra larvas del III instar de *Aedes aegypti*.

Palabras clave: Productos naturales, aceite esencial, Asteraceae, *Verbesina negrensis*, antimicrobiano.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios todopoderoso quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se me presentaban, enseñándome a enfrentar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

A mi madre por su apoyo incondicional, que con sus esfuerzos, palabras y acciones llenaron cada día de enardecimiento y de fuerza mis caminos.

A mi hermana por estar siempre presente, acompañándome para seguir adelante. A mis dos sobrinos por su amor y cariño.

A la ilustre Universidad de los Andes. A la profesora Flor Mora, a la profesora María Gualtieri y a la profesora Tulia Díaz.

A todas aquellas persona que de un modo u otro han permitido el desarrollo de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** primeramente a María Santísima y al Santo Cristo de la Grita, por permitirme vivir y darme las fuerzas necesarias para alcanzar una meta más en mi vida.

A mi madre **CARMEN ALARCÓN**, por su apoyo y consejo incondicional en todo momento, gracias por apoyarme con los recursos necesarios para estudiar, me has dado lo que soy como persona, a pesar de las dificultades; mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y mi coraje para conseguir mis objetivos y por estar siempre presente en cada meta de mi vida; por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba y hoy por hoy hago lo que puedo para poder compensar de alguna u otra manera todo lo que me ha dado. Gracias por todo su amor, su paciencia y su amistad. Para ti siempre mi corazón y agradecimiento. TE AMO!!

A mi hermana **Yare**, por ser parte importante de mi vida, por estar siempre conmigo y brindarme su amor, apoyo y confianza para poder culminar con éxito esta investigación. Te quiero!!

A mis dos sobrinos **Alexis** y **Jampier**, mis dos retoños por brindarme tanto amor y cariño. Ustedes son mi motivación, inspiración y felicidad diaria. Cuantos los amo!!!

A **Jesús Leonardo**, por su amor, paciencia y comprensión, por su apoyo incondicional, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Gracias por estar siempre a mi lado!

A la ilustre Universidad de los Andes, por abrirme las puertas para formarme como profesional.

A la Profesora **Flor Mora**, por su tutoría, apoyo, dedicación, paciencia y optimismo para la realización de este trabajo de investigación.

A las Profesoras **María Gualtieri** y **Tulia Díaz**, les agradezco su confianza, apoyo y dedicación.

Al Ingeniero Forestal **Juan Carmona**, por la ayuda en la identificación taxonómica de la especie vegetal en estudio.

A mis primos **Daniela, Carlos Eduardo, Alexis, Analí, José H y Ana Karina**, por confiar y creer en mí y sobre todo brindarme su amistad, su apoyo.

A mi padrastro **Darío** y mi cuñado **William**, por su amistad, confianza y apoyo incondicional.

A mis amigos (**John, Karianny, Erickson, Leonella, Rima, Richar, Marianny Betzenia**) y todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al C.D.C.H.T.A, por el financiamiento otorgado para la elaboración de esta tesis, proyecto código **FA-483-10-08-EE**.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos más difíciles. A todos espero no defraudarlos y contar siempre con este apoyo, sincero, valioso e incondicional.

www.bdigital.ula.ve **A todos MIL GRACIAS**

ÍNDICE DE TABLA

	Pág.
Tabla 1. Algunas especies estudiadas del género <i>Verbesina</i>	21
Tabla 2. Algunos aceites esenciales que han sido ampliamente utilizados comercial e industrialmente en todo el mundo	26
Tabla 3. Parámetros analíticos utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales	31
Tabla 4. Plan de trabajo	44
Tabla 5. Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Verbesina negrensis</i>	47
Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Verbesina negrensis</i> contra cepas de Referencia Internacional	50

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Agentes hipotensores aislados de <i>Verbesina caracasana</i>	19
Figura 2. Componentes mayoritarios del aceite esencial del género <i>Verbesina</i>	20
Figura 3. Detalles de las hojas del género <i>Verbesina</i>	24
Figura 4. Detalles de las hojas de la especie <i>Verbesina negrensis</i>	25
Figura 5. Molécula de isopreno	29
Figura 6. Mosquito y larva <i>Aedes aegypti</i>	34
Figura 7. Aparato de Clevenger	40
Figura 8. Cromatógrama del aceite esencial de <i>Verbesina negrensis</i>	46
Figura 9. Compuestos químicos presentes en el aceite esencial de <i>Verbesina negrensis</i>	48

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Biosíntesis de terpenos	Pág. 30
Esquema 2.	Diseño de investigación	39

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido siempre una fuente indispensable para la obtención de productos beneficiosos en la historia de la humanidad (Bandoni *et al.*, 2009). El estudio de la amplia flora venezolana, se inicia en forma práctica y empírica durante la época precolombina; los indígenas ya conocían muchos de los secretos de nuestras plantas autóctonas, utilizándolas como plantas medicinales y comestibles. Venezuela al igual que otros países del ecuador presentan una alta biodiversidad de especies vegetales ricas en productos naturales con gran utilidad (Efange, 2002). Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivadas de sus actividades metabólicas enfocadas a sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros (Gracia *et al.*, 2010). Los productos naturales obtenidos a partir de las plantas se han utilizado como agentes medicinales desde hace muchos años, entre estos encontramos los aceites esenciales (AEs), a los cuales se les atribuyen diversas actividades biológicas como antiespasmódica, antihelmíntica, antiinflamatoria, antiséptica y antimicrobiana; así, como también han sido probados por sus propiedades bactericidas, aplicaciones viricidas, fungicidas, insecticidas, medicamentos y cosméticos, en productos farmacéuticos, sanitarios, industrias agrícola y alimentaria (Acosta *et al.*, 2003; Bakkali *et al.*, 2008; Nerio *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2004). Los AEs son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de plantas aromáticas (Stashenko *et al.*, 1998). El estudio de estos compuestos ha conducido a innumerables avances en la farmacología y la medicina (Castañeda *et al.*, 2007). Esta es una de las ventaja que tienen los AEs ya que no representan un peligro para la salud del hombre y el medio ambiente (Martínez *et al.*, 2003).

Diversos estudios han mostrado el efecto antibacteriano e insecticida de los aceites esenciales (Cano *et al.*, 2008). Así como también se ha reportado la acción larvicida de especies de plantas contra insectos vectores de los géneros *Culex*, *Anopheles*, y de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Hoy por hoy, el dengue, se ha convertido en nuestro país en un problema serio de salud pública con el que a diario se cobran muchas víctimas en los países del mundo. El agente responsable de este virus es el zancudo *A. aegypti*, el cual pertenece a la familia Culicidae (Leyva *et al.*, 2009).

En conformidad a lo antes expuesto, se propone buscar una alternativa haciendo uso de la riqueza de la flora Venezolana, utilizando especialmente una especie vegetal endémica; *Verbesina negrensis*, con el fin de obtener aceite esencial, determinar su actividad microbiológica contraen bacterias Grampositivas y Gramnegativas y evaluar la actividad larvicida en *A. aegypti*. El aceite esencial se

obtuvo por hidrodestilación y su análisis químico se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La salud según la Organización Mundial de la Salud, es el estado completo de bienestar físico, psíquico y social, no la mera ausencia de enfermedades. Las enfermedades infecciosas se ubican entre las más peligrosas para el ser humano. El uso indiscriminado de antibióticos ha contribuido de una manera decisiva a la aparición de la resistencia bacteriana a nivel mundial. Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, causando infecciones por bacterias multirresistentes que producen una amplia morbilidad y mortalidad en el mundo. lo cual crea resistencia bacteriana a los antibióticos que constituye un grave problema de salud en la actualidad, (Riverón *et al.*, 2003). Desde otro punto de vista, alrededor del 40% de la población mundial vive en zonas tropicales donde existe un gran riesgo de transmisión de enfermedades entre ellas el dengue. El dengue es endémico en al menos cien países en Asia, el Pacífico, las Américas, África y el Caribe. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 50 y 100 millones de infecciones se producen anualmente, incluidos 500.000 casos de dengue hemorrágico y 22.000 muertes, principalmente entre los niños. No hay todavía ninguna vacuna para prevenir la infección con el virus del dengue y las medidas más eficaces que actualmente se están tomando, es la eliminación de los criaderos y protección de las picaduras de mosquitos de *Aedes aegypti* (Briegel, 2003).

De manera que, ¿Será posible la búsqueda de alternativas de origen vegetal de bajo costo y reducidos efectos colaterales para el tratamiento de estas enfermedades que tanto aquejan la salud humana?

Objetivos de la Investigación

Objetivos Generales

- Determinar la composición química del aceite esencial de *Verbesina negrensis*.

- Determinar la actividad antibacteriana sobre cepas Grampositivas y Gramnegativas.
- Determinar la actividad larvica en *Aedes aegypti*.

Objetivos Específicos

- Identificar botánicamente la especie vegetal colectada en el campo.
- Determinar la composición química del aceite esencial de *Verbesina negrensis* aplicando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas.
- Determinar la actividad antibacteriana sobre cepas de referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), empleando el método de difusión en agar con disco.
- Determinar la actividad larvica en *Aedes aegypti* usando el método estandarizado por la Organización Mundial de la Salud.

Justificación

La presente tesis busca reforzar tratamientos alternativos que están enfocados en la extracción y caracterización de aceites esenciales con potencial actividad biológica. Venezuela es reconocida como una de las zonas de mayor diversidad de plantas, llegando a ser ubicada en el puesto 7 a nivel mundial, no se conoce el número exacto de especies existentes en el país; sin embargo en los años 80, el investigador Julián Steyermark sostenía que nuestra diversidad vegetal oscilaba entre 20 y 30 mil especies de plantas. De las cuales un porcentaje muy pequeño corresponde a plantas, a las cuales se les ha realizado análisis y explotación en el territorio nacional. Los aceites esenciales de la gran mayoría de nuestras especies vegetales no han sido estudiados ni identificados en cuanto a composición, propiedades físicas y biológicas. Por lo tanto, es necesario diversificar y ampliar el espectro de acción de las plantas aromáticas, con el fin de obtener mayor diversidad de aceites esenciales obtenidos de plantas que hacen parte de nuestro entorno pero que de un modo u otro han pasado desapercibidos, como es el caso de la especie objeto de este estudio: *Verbesina negrensis*, especie perteneciente a la familia Asteraceae, rica en aceites esenciales, y de cuyo aceite esencial no se han reportado estudios fitoquímicos, de manera que este trabajo soporta el uso etnomedicinal de esta especie endémica de nuestra región andina.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes Históricos

El término de aceites esenciales, fue utilizado por primera vez en el siglo XVI, por Paracelso (famoso Médico y Farmacéutico) quien utilizó aceites esenciales como medicamentos y los consideró como la quinta esencia o elemento inmaterial presente en todo ser. Esta propuesta ya había sido señalada por Aristóteles dos mil años antes y que junto a la tierra, el aire, el fuego y el agua constituyen los elementos fundamentales que conforman todo ser vivo o inanimado, según la teoría Aristotélica. Entre los siglos XVI y XVII, se comenzó a utilizar por primera vez en las farmacias de todo el mundo la mayor parte de los aceites esenciales que se encuentran disponibles en la actualidad. Con el ingreso de la medicina moderna, la utilización de vacunas y antibióticos sustituyó en gran parte el uso de los antiguos remedios basados en los aceites esenciales, aunque desde el siglo XIX su demanda creció hasta ser necesaria la industrialización de la producción debido a su empleo masivo en perfumes y sabores para la alimentación, así como también por sus propiedades bactericida, insecticida y antiparasitaria, entre otras (Ortuño, 2006).

El ser humano es hospedador de una gran variedad de bacterias, protozoos y virus; en el caso de las bacterias, Christhian Gram en 1884, descubrió una tinción diferencial de gran valor, que luego recibió el nombre de tinción de Gram, y que ha permitido la clasificación de las mismas en: Las bacterias Grampositivas, son las que resisten la decoloración y permanecen teñidas de un color azul oscuro; las bacterias Gramnegativas son rápidamente decolorada. Ciertos miembros de la flora microbiana normal pueden convertirse en invasores y producir enfermedades cuando los mecanismos de defensa del hospedador están suprimidos. Así mismo hay bacterias patógenas, aproximadamente unas doscientas especies que afectan el ser humano; es decir, causantes de enfermedades. El efecto patógeno varía mucho en función de las especies y depende tanto de la virulencia de la especie en particular como de las condiciones del organismo huésped. Los grupos de bacterias se encuentran distribuidos en el organismo de acuerdo al hábitat y nutrientes que existen, razón por la cual no son iguales en las distintas partes del organismo. Hay bacterias que producen siempre infección, otras que son oportunistas y otras comensales, que se

instalan ocupando el espacio y condiciones, de manera que un patógeno no se puede instalar. Las bacterias patógenas son exigentes en sus requerimientos. Entre las bacterias más patógenas, están las causantes del cólera (*Vibrio cholerae*), del tétanos (*Clostridium tetani*), de la gangrena gaseosa (*Clostridium perfringens*), de la lepra (*Mycobacterium leprae*), de la peste (*Yersinia pestis*), de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), de la sífilis (*Treponema pallidum*), de la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi*), de la fiebre ondulante o brucelosis (*Brucella* spp), entre otras. Hasta el descubrimiento de los virus, las bacterias fueron consideradas los agentes patógenos de todas las enfermedades infecciosas (Stanier *et al.*, 1992).

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de muerte en el mundo, tanto en adultos como en niños; con respecto al virus del dengue, este es un problema creciente para la salud pública. Entre 1779 y 1780 se describió en Asia, África y América del Norte una epidemia, debida a una enfermedad con manifestaciones parecidas al dengue; sin embargo, cuadros clínicos semejantes a los de dengue se encuentran reportados en la Enciclopedia China de la Dinastía Chin (265-420 A. E. C). Los antiguos chinos ya suponían que la enfermedad estaba relacionada con insectos voladores asociados al agua (Gubler, 1998). El término «dengue» se originó en América entre 1827 y 1828, a raíz de una epidemia en el Caribe que cursaba con fiebre, artralgias y exantema. Los esclavos provenientes de África identificaron a esta entidad patológica como dinga o dyenga, homónimo del Swahili Ki denga pepo, que significa ataque repentino (calambre o estremecimiento) provocado por un «espíritu malo» (Gubler, 1998; Halstead, 1980). Hay reportes clínicos de dengue entre 1779 y 1780, aunque las primeras epidemias compatibles con dengue clásico en Latinoamérica y el Caribe se dieron en las Antillas Francesas en 1635 y en Panamá en 1699 (Gubler, 1998, Isturiz *et al.*, 2000). La primera epidemia de dengue clásico, del siglo XX, en América, comprobada por laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela en los años 1963-1964, donde el virus dengue 3 fue el serotipo circulante. Años antes, entre 1953-1954, en situación no epidémica, se había descrito en Trinidad. Entre los años 1968 y 1969 otra epidemia aquejó algunas islas del Caribe, aislándose los serotipos de dengue 2 y 3. En 1977 el serotipo Den-1 fue encajado en América a través de Jamaica, el que se diseminó por la mayoría de las islas del Caribe ocasionando epidemias y también afectó a algunos países centroamericanos (Belice, Honduras, El Salvador, Guatemala, México) y sudamericanos (Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname), abarcando incluso a Texas en EEUU (OPS, 1995). Es decir, el *Aedes aegypti*, el vector del virus dengue, se encuentra en una gran variedad de países tropicales y se calcula que 2,5 billones de personas habitan en áreas donde existe el riesgo de transmisión de la epidemia (Cabezas, 2005).

Antecedentes de la Investigación

Estudios fitoquímicos del género Verbesina

En el estudio fitoquímico del género, se reporta la presencia de una gran variedad de compuestos: acetilénicos, terpenos, cinamatos sesquiterpénicos (Gardner *et al.*, 1961; Box *et al.*, 1977; Bohlmann, 1978**b**; 1979; 1980), derivados de elemanólidos (Guerrero, 1975**a**; 1975**b**; Ortega *et al.*, 1977), y otros compuestos menos abundantes (Tiwari y Rao, 1978; Wagner *et al.*, 1974; Bohlmann y Lonitz, 1978**a**). Delle Monache y colaboradores han realizado estudios biodirigidos de la *V. caracasana*. De la purificación biológica del extracto de la planta se han aislado dos agentes hipotensores: caracasanamida y caracasandiamida (Fig. 1) (Monache, 1992; 1996).

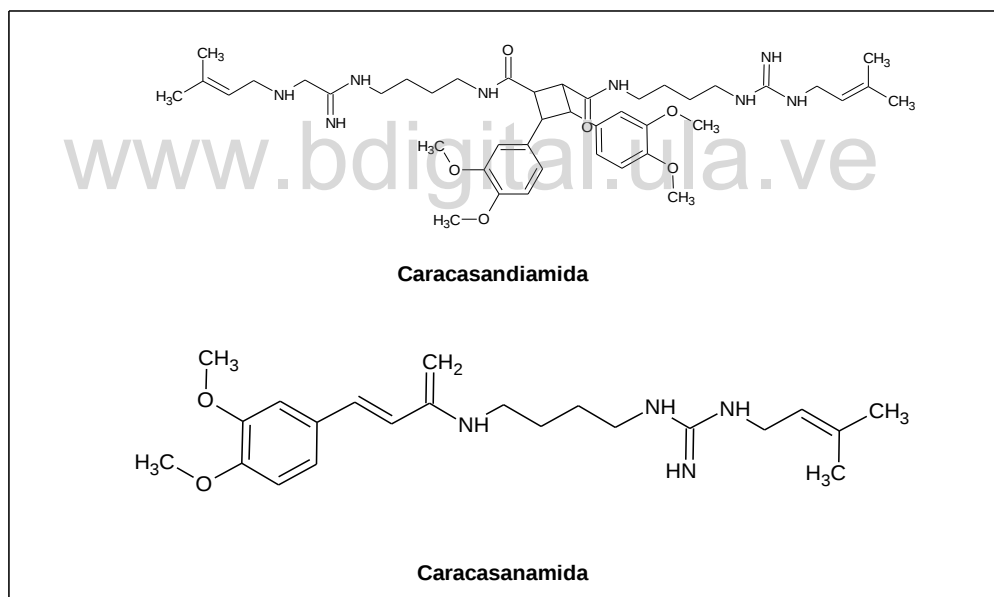


Fig. 1. Agentes hipotensores aislados de *Verbesina caracasana*.

Fuente: Monache, 1992; 1996.

Es importante resaltar que del género *Verbesina*, solo se ha reportado el estudio del aceite esencial de la especie *Verbesina turbacensis* y *Verbesina diversifolia*. Con respecto a el aceites esencial *Verbesina turbacensis*, cuyo análisis químico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa mostró como

componente mayoritario el D-germacreno (56.20%) (Fig. 2). La evaluación de la actividad antibacteriana de este aceite esencial mostró un efecto inhibitorio importante contra patógenos humanos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, excepto para *Pseudomona aeruginosa* (Gualtieri, 2006). De acuerdo con el estudio de *Verbesina diversifolia*, Craveiro *et al.*, y Albuquerque *et al.*, describen la composición química del aceite esencial, ambos grupos recolectaron la planta en el estado Ceara de Brasil. Craveiro *et al.*, reportaron como componente mayoritario γ -muuroleno (30,5%) y γ -elemene (24, 6%) (Fig. 2), (Craveiro *et al.*, 1986), mientras que Albuquerque *et al.*, reportaron biciclogermacreno (20,7-23,2%), β -cariofileno (7,4-14,18%) y D-4-ol-germacreno (10,9-14,1%) como compuestos mayoritarios (Fig. 2) (Albuquerque *et al.*, 2006), ver tabla 1. Recientemente se ha publicado una revisión más exhaustiva del genero *Verbesina*, en la cual señala que los eudesmanos son los metabolitos secundarios más abundantes presentes en este género, así como también, flavonoides alcaloides de guanidina, compuestos acetilénicos y terpenos (Mora *et al.*, 2013).

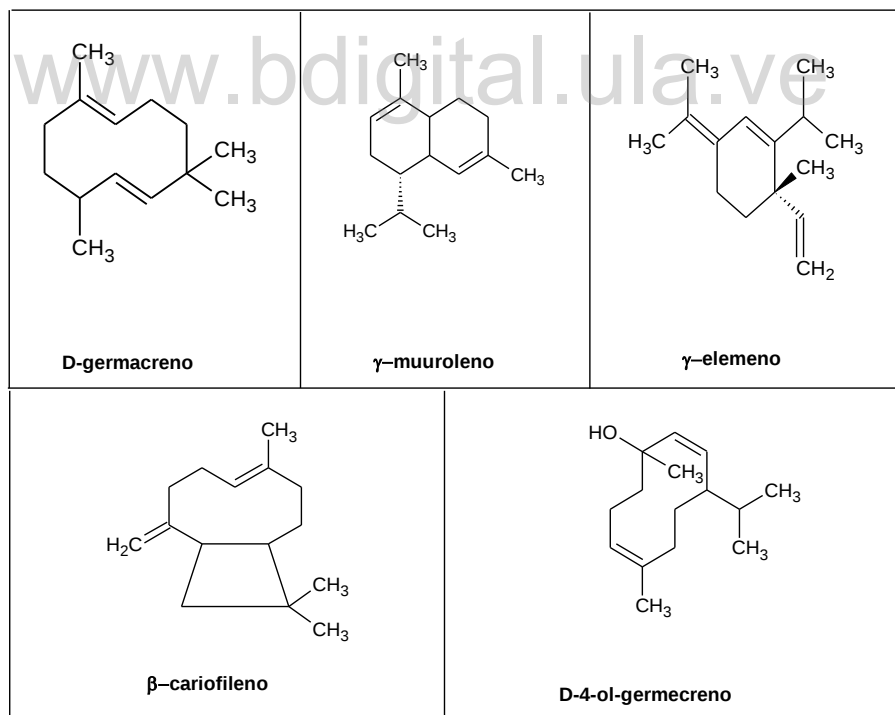


Fig. 2. Compuestos mayoritarios del aceites esencial del genero *Verbesina*.

Fuente: Gualtieri, 2006; Craveiro *et al.*, 1986; Albuquerque *et al.*, 2006.

Tabla 1**Algunas especies estudiadas del género *Verbesina*.**

Especies	Compuestos
<i>V. myricephala</i>	Se aisló un flavonol glicosídico (Wagner, 1974).
<i>V. occidentales</i>	Se encontró Sesquiterpenos derivados del muuroleno (Bohlmann, 1978a).
<i>V. enceloides</i>	Contiene compuestos simples tales como: ésteres aromáticos y alifáticos y terpenos (Bohlmann, 1978a).
<i>V. eudesmane</i>	Contiene compuestos como eudesmano y derivados de germacreno, todos provistos de un cinamato, además se aisló un aldehído bisaboleno y derivados de kaureno (Bohlmann, 1980).
<i>V. sublobata</i>	
<i>V. gigantea</i>	Produjeron principalmente aldehídos aromáticos, ácidos y euparin (Herz, 1981).
<i>V. virginica</i>	
<i>V. myricephala</i>	
<i>V. sordescens</i>	Además de los compuestos acetilénicos, contiene terpenos y sesquiterpenos cinamate (Bohlmann, 1982).
<i>V. caracasana</i>	Se aislaron dos agentes hipotensores: caracasanamida y caracasandiamida (Monache, 1992; 1996).
<i>V. turbacensis</i>	Mostró como compuesto mayoritario el D-germacreno (Gualtieri, 2006).
<i>V. diversifolia</i>	Craveiro <i>et al.</i> , 1986, reportaron el γ -muuroleno y γ -elemene como componentes mayoritarios. Albuquerque <i>et al.</i> , 2006, revelaron como constituyentes principales al bicilogermacreno, β -cariofileno y D-4-ol-germacreno.

Fuente: Wagner, 1974; Bohlmann, 1978a; Bohlmann, 1980; Herz, 1981; Bohlmann, 1982; Monache, 1992; 1996; Gualtieri, 2006; Craveiro *et al.*, 1986; Albuquerque *et al.*, 2006.

Bases teóricas

Familia Asteraceae (Compositae)

La familia Asteraceae antes llamada Compositae o Compuesta, constituye la familia de plantas vasculares con un número aproximado de géneros y especies en el mundo con alrededor de unos 950 géneros y unas 20000 especies (Moreira, 2006; Moreno *et al.*, 2006). En Venezuela, la familia Asteraceae, es la segunda familia con mayor riqueza de especies en la división Magnoliophyta; se reconocen 204 géneros y 784 especies (Yáñez *et al.*, 2011); también es conocida como la familia de las rosa, margaritas y girasoles. Algunos de los géneros de esta familia Asteraceae tenemos: *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Tagetes*, entre otros, los cuales son ornamentales y la mayoría de ellos tienen valores medicinales (Fig. 3). La familia está dividida en 13 tribus: *Heliantheae*, *Astereae*, *Anthemideae*, *Arctotideae*, *Inuleae*, *Senecioneae*, *Calenduleae*, *Eupatorieae*, *Vernoniae*, *Cynareae*, *Mutisieae*, *Liabeae* y *Lactuceae* (Rahman *et al.*, 2008; Steyermark *et al.*, 1997).

Clasificación botánica de la familia Asteraceae

Reino:	Plantae
Sub-reino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae o Compositae
Tribu:	Heliantheae
Subtribu:	Verbesininae
Género:	Verbesina

Fuente: Steyermark *et al.*, 1997; Heywood *et al.*, 1977; Mora *et al.*, 2013.

Descripción botánica de la familia Asteraceae

Asteraceae, es una familia de plantas herbáceas anuales o perennes (Torres *et al.*, 2007), se caracterizan por agrupar las flores en una inflorescencia racimosas en capítulos, con flores individuales rodeadas de una o varias filas de brácteas (involucro) sobre el receptáculo (Torres *et al.*, 2007; Vitto y Petenatti, 2009). Las flores son pequeñas, hermafroditas o en ocasiones, funcionalmente unisexuales o

estériles; de simetría actinomorfa o zigomorfa, pentámeras; gamopétala; cáliz nulo o formado por pelos simples, plumosos o setiformes, por escamas o por pequeña corona membranácea (Torres *et al.*, 2007); en su mayoría son hierbas anuales o vivaces, aunque también podemos encontrar arbustos y árboles (Lasser, 1964).

Distribución geográfica de la familia Asteraceae

Las especies venezolanas se encuentran distribuidas en todo el país, siendo abundantes tanto en la región Andino-Cordillera Costera y en Región Guayanesa (Lasser, 1964; Yáñez *et al.*, 2011); crecen en lugares con temperaturas bajas, por esta razón son pocas las especies en la región Costera y los Llanos (Yáñez *et al.*, 2011). La mayoría de las especies Venezolanas se encuentran en los páramos, donde no solo son abundantes, sino que presentan un alto endemismo tanto a nivel de géneros como de especies. De las 1400 especies de plantas con flores en los páramos Venezolanos, hay un predominio de Asteraceae con cerca de 340 especies (Vivas y Ubiergo, 2010).

Composición química de las Asteraceae

En general la familia Asteraceae está caracterizada por la presencia de ácidos clorogénicos, isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos) y diversos derivados acetilénicos, mientras que carece de taninos verdaderos y de iridoides (Bohlmann, 1977). La síntesis de glúcidos en ultimo termino conduce a la formación de *fructanos* del tipo *inulina*, acumulados en órganos subterráneos y semillas (Bruneton, 1995); son la principal reserva hidrocarbonada de gran digestibilidad y reemplazan el almidón. La síntesis de *ciclitoles*, también caracterizan a las Asteraceae, especialmente *L-inositol* y su isómero *esciloinositol* (Vitto y Petenatti, 2009). Los aceites esenciales, son ricos en ácidos grasos de cadenas cortas, sobre todo *linoléico* y *esteárico* y en menor cantidad oleico, *linolénico* y *palmítico* (Smith, 1985). Los metabolitos secundarios de las Asteraceas son muy variados. Algunos flavonoides y aceites volátiles (con di- y triterpenos), son comunes en casi todas las especies y 2 grupos de sustancias son “marcadores quimiotaxonomicos” de la familia: las *lactonas sesquiterpénicas* y los *compuestos poliacetilénicos*; de tal manera que estas plantas carecen de alcaloides, excepto los de núcleos pirrolizidínicos (Vitto y Petenatti, 2009).

Actividades biológicas de los géneros más estudiados de la familia Asteraceae

Las Asteraceae incluyen una gran cantidad de especies con aplicaciones o utilidades medicinales, agrícolas, industriales, entre otras. Algunas han sido

domesticadas y cultivadas desde la antigüedad y otras forman parte de enormes extensiones de la vegetación natural, determinando la fisonomía de numerosos paisajes; su uso etnobotánico ha ayudado a sustentar numerosos pueblos; un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas gomas, potenciadores de sabor, aromas, etc (Ávalos y Pérez, 2009; Bruneton, 1995). Hoy día, unos 40 géneros de la familia Asteraceae, son relevantes en alimentación humana y animal, así como también, son considerados fuentes de aceites esenciales, forraje, miel y polen, caucho, madera, leña o celulosa. Otras son importantes malezas y/o plantas tóxicas para el hombre y el ganado, algunas causan alergias y otras resultan ornamentales. La acumulación de ciertos metabolitos primarios y secundarios (flavonoides y aceites esenciales) de las plantas determinan la utilidad y aplicación de las mismas (Vitto y Petenatti, 2009). La familia Asteraceae, es rica en aceites esenciales, un género de esta familia lo constituye *Verbesina*.

Género *Verbesina*

El género específico de la familia Asteraceae a estudiar lo constituye: *Verbesina* (tribu Heliantheae) (Carrillos *et al.*, 2010).

Descripción botánica del género *Verbesina*

Se caracterizan por ser hierbas o arbustos de hojas generalmente alternas o en algunos casos opuestas, cabezuelas pequeñas o medianas, solitarias o corimbosas, flores amarillas con las marginales blancas (Fig. 3) (Lasser, 1964; Mora *et al.*, 2013).



Fig. 3. Detalle de las hojas del género *Verbesina*.

Fuente: <http://luirig.altervista.org/cpm/albums/britton-brown-7/britt-4452-verbesina-occidentalis.jpg>

Distribución geográfica del género *Verbesina*

Es un género principalmente americano comprende alrededor de 150 especies, la mayoría de las cuales están distribuidas en América tropical (Lasser, 1964).

Usos medicinales de algunas especies de plantas pertenecientes al género *Verbesina*

De acuerdo con lo reportado por Mora *et al.*, 2013, varias especies de plantas del género *Verbesina*, se han utilizado para el control de trastornos gastrointestinales (*V. turbacensis*), para fines ceremoniales, aplicación digestiva, urinaria y laxantes (*V. virginica*), y para el tratamiento de los síntomas de las mordeduras de araña y las hemorragias (*V. encelioides*).

Verbesina negrensis

Descripción botánica de la especie *Verbesina negrensis*

Verbesina negrensis, es una planta arbustiva, erecta, ramificada; ramas redondas, glabras. Hojas alternas, pecioladas, lanceoladas hasta angostamente elípticas, acuminadas en el ápice, cuneadas hacia la base, 10-20cm (Fig. 4) (Lasser, 1964).



Fig. 4. Detalle de las hojas de *Verbesina negrensis*.

Fuente: Mora, 2011.

Distribución geográfica de la especie *Verbesina negrensis*

Es una especie endémica de Venezuela, distribuida en la región Andina (Lasser, 1964). Hasta hoy día, no hay reportes que evidencien el estudio del aceite esencial de la especie *V. negrensis*.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs), son líquidos aromáticos obtenidos del metabolismo vegetal de las plantas (Burt, 2004); la mayoría de ellos son volátiles y responsables del olor; también se les puede definir, como productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos. Es característica de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos; así, como también, se conocen algunas de las aplicaciones medicinales de los AEs, como lo son: la actividad antibacteriana, antifúngica, antiséptica y como relajante del sistema nervioso central (Tabla 2) (Moreno *et al.*, 2006).

Tabla 2

Algunos aceites esenciales que han sido ampliamente utilizados comercial e industrialmente en todo el mundo

Especie	Componentes	Aplicación
Hoja de <i>Mentha piperita</i> Menta	Menta, mentona, acetato de metilo, mentofurano.	Carminativo, estomacal, antiespasmódico.
Hoja de <i>Peumus boldus</i> Boldo	Paracimeno, cineol, ascaridol.	Colerético, colagogo, diurético, eupéptico.
Fruto, hoja y raíz de <i>Petroselinum sativum</i> Perejil	Apiol, miristicina	Diurético, emenagogo.
Corteza de <i>Cinnamomum verum</i> Canela	Aldehído cinámico, alcoholes aromáticos, etc	Antiséptico, sedante, antiespasmódico, anestésico local, emenagogo, etc.

Fuente: Kuklinski, 2000.

Actividad farmacológica de los aceites esenciales

Los AEs cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos, protozoarios e insectos; las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su elevado contenido fitoquímico y a su poco o nulo efecto tóxico (Castañeda *et al.*, 2007; García *et al.*, 2010).

Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales

Generalmente son líquidos a temperatura ambiente, aunque algunos solidifican a bajas temperaturas, en su mayoría suelen ser transparentes, incoloros o ligeramente coloreados; algunos pueden ser inflamables, menos densos que el agua (Casamada, 1977). Los AEs tienden a ser insolubles en agua; sin embargo hay ciertas esencias que son parcialmente solubles en agua porque algunos de sus componentes se solubilizan, como en el caso de los fenoles. Además son lipófilos y solubles en alcoholes y disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico); poseen un índice de refracción elevado (Bruneton, 1991). Dentro de las propiedades fisicoquímicas más apreciables de los aceites esenciales se encuentran, la volatilidad, inestabilidad (ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de agentes oxidantes y reductores), medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición. Otra propiedad de los constituyentes de una esencia son sus variabilidades estructurales, lo que permite generar por semisíntesis estructuras novedosas (Bandoni, 2002). Las familias ricas en AEs son Laureaceae, Myrtaceae, Umbelliferae, Pinaceae, Rutaceae, Rosaceae, Labiatae y Compositae (Marcano, 2002; Steyermark *et al.*, 1997)

Biogénesis de los aceites esenciales

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como **metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales**. Estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, los cuales hacen parte del metabolismo primario de la planta (Azcón y Talón, 2000). Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida

en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez, 2009). Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse según la estructura química en tres grupos: terpenos o terpenoides, fenoles y sus derivados, y alcaloides (Azcón y Talón, 2000).

Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de hidrocarburos volátiles con una diversidad de grupos funcionales, especialmente terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), así como también, carbohidratos, alcoholes, éteres, aldehídos y cetonas, los cuales son los responsables de las fragancias y las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales (Bandoni, 2002; Bakkali *et al.*, 2008; Nerio *et al.*, 2010). La composición química de los AEs depende de varios factores como: condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad), método del cultivo (fertilizantes, abonos y pesticidas), época de recolección y parte de la planta, modo de almacenamiento y manejo del material vegetal (fresco, seco, fermentado, tratamiento postcosecha), modo de obtención del aceite esencial (hidrodestilación, arrastre con vapor) y edad de la planta y su estado fenológico (Kuklinski, 2000; Leyva *et al.*, 2009).

Terpenos. Terpenos y terpenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo los aceites esenciales unas de sus fuentes más abundantes (Bruneton, 1991). La unidad básica de los terpenoides es el isopreno (Fig.5), el cual consiste en una cadena de cinco átomos de carbono; las moléculas más pequeñas son los monoterpenos, los sesquiterpenos están constituidos por 15 átomos de carbono; conjuntamente, tenemos moléculas de 20 átomos de carbono, diterpenos, los cuales se encuentran en muy pequeña cantidad en los AEs; y en última estancia tenemos que las moléculas de terpenoides con 30 y 40 átomos de carbono, también existen en las plantas, pero son difícil de encontrar en los Aes, debido a que su peso molecular es demasiado alto para poder evaporarse (Lavabre, 1990).

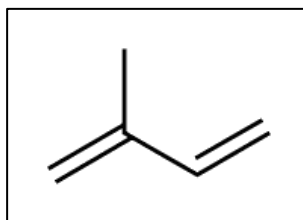
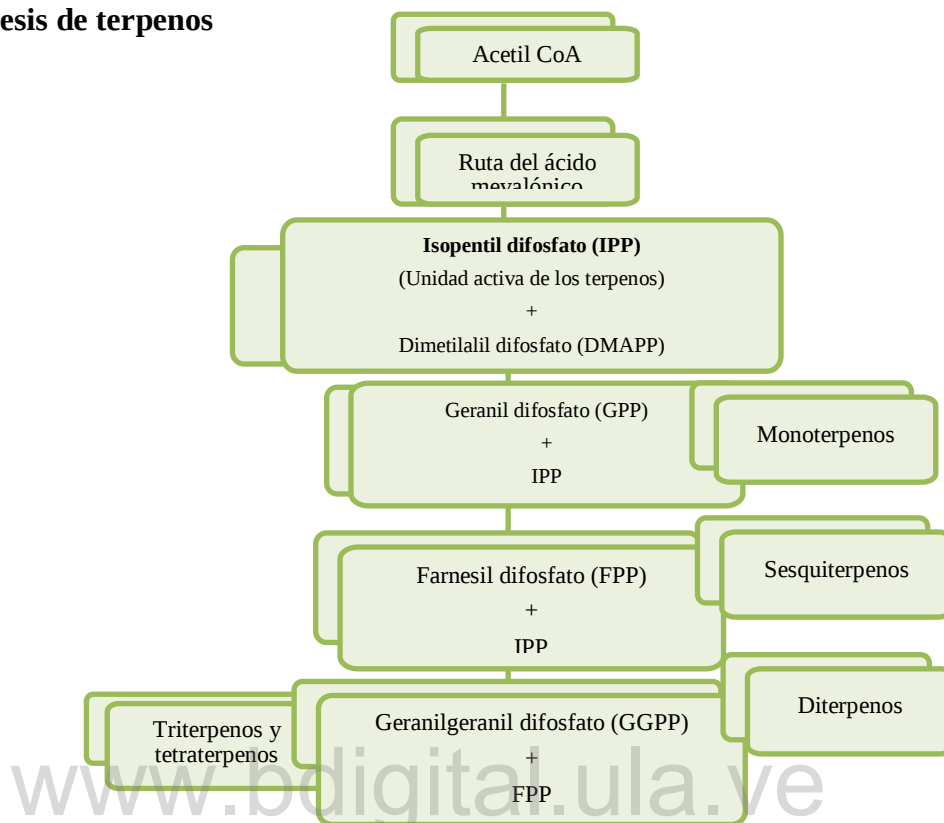


Fig. 5. Molécula de isopreno

Biosíntesis de los terpenos. En la ruta del ácido mevalónico (AMV), se condensan tres moléculas de acetil CoA paso a paso para formar el ácido mevalónico (ver esquema 1). Este intermediario es pirofosforilado, descarboxilado y deshidratado para formar isopentil difosfato (IPP). El IPP, es la unidad activa de cinco carbonos de los terpenos. El isopentil difosfato y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP), son los precursores activos de cinco carbonos en la biosíntesis de los terpenos. En primer lugar, el IPP y DMAPP reaccionan para formar geranil difosfato (GPP), el precursor de 10 carbonos de casi todos los monoterpenos, el GPP puede unirse a otras moléculas de IPP y formar el farnesil difosfato (FPP), compuesto de 15 carbonos, precursor de casi todos los sesquiterpenos; la adición de otra molécula IPP, genera un compuesto de 20 carbonos, el geranilgeranil difosfato (GGPP), precursor de los diterpenos; finalmente el FPP y GGPP pueden dimerizar para formar titerpenos y tetraterpenos respectivamente (Lincoln y Zeiger, 2006).

Esquema 1

Biosíntesis de terpenos



Fuente: Lincoln y Zeiger, 2006.

Localización y funciones de los aceites esenciales

Los AEs se encuentran casi generalmente, en el grupo de las espermatofitas. Además los géneros capaces de elaborar estos principios volátiles, se reagrupan en las familias de las Angiospermas, pertenecientes a los órdenes de las Magnoliales, Laurales, Rutales, Lamiales, Asterales entre otros. Los AEs se pueden encontrar en todos los órganos vegetales: como flores, hojas y menos habitual en la corteza, leños, raíces, rizomas, frutos y en las semillas; aunque en los órganos de una misma especie vegetal podemos encontrar aceite esencial, solo que su composición varía de acuerdo a la localización; cuantitativamente, los contenidos de aceites esenciales son muy bajos, normalmente inferiores al 1% (Bruneton, 1991). En los vegetales los aceites esenciales pueden cumplir diferentes funciones como: actuar en la polinización, con la atracción de ciertos insectos polinizadores y como defensas frente al ataque de parásitos e insectos y a veces suele tener una acción teletóxica sobre las germinaciones; estas acciones se facilitan por la localización periférica de los

elementos secretores; además son de gran utilidad en la industria por sus propiedades medicinales, bactericidas, y aplicaciones viricidas, fungicidas, antiparasitarias, insecticidas, medicamentos y cosméticos, en productos farmacéuticos, sanitarios, cosméticos, industrias agrícolas y alimentaria (Bakkali *et al.*, 2008; Bruneton, 1991; Nerio *et al.*, 2010).

Análisis y control de calidad de los aceites esenciales

El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que posee unas determinadas características analíticas (Bandoni, 2009). Los principales parámetros analíticos empleados para establecer la calidad de un aceite esencial se reportan en la tabla 3.

Tabla 3
Parámetros analíticos utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales

Características organolépticas	Olor Color Apariencia Textura
Determinaciones físicas	Densidad Poder rotatorio Índice de refracción Solubilidad en etanol Punto de congelación Punto de inflamación Rango de destilación
Índices químicos	Acidez Éster Saponificación Fenoles
Características Cromatográficas	Cuantificación de componentes principales Índices de retención Identificación por GC-MS

Fuente: Bandoni, 2002.

Aceites esencial - actividad antibacteriana

Con respecto a la actividad antibacteriana, los AEs probados *in vitro*, han demostrado actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 07:H7, *Shigella disentería*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en niveles de entre 0,2 y 10 mL/μL. Organismos gramnegativos son ligeramente menos susceptibles que las bacterias grampositivas (Burt, 2004). Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los AEs es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides”; así como también, varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los AEs, principalmente los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Es de mencionar también que en la actualidad la resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene el impulso en la búsqueda de nuevos aceites esenciales para combatir las infecciones y superar los problemas de resistencia bacteriana (Shane, 1979; Iikka *et al.*, 1998; Afroditi *et al.*, 1996).

Aceites esenciales – actividad larvícida

La actividad larvícida que poseen los AEs de plantas y sus derivados los hace importantes para ser usados como alternativas en el control de *Aedes aegypti*. En la actualidad, se ha reportado acción larvícida de especies de plantas contra insectos vectores de los géneros *Culex*, *Anopheles*, y de las especies *A. aegypti* y *A. albopictus*; además, existe un número variado de metabolitos secundarios que se encuentran en la composición mayoritaria de las plantas, a los cuales se les adjudican las propiedades insecticidas (D-germacreno) (Leyva *et al.*, 2009). Las propiedades antimicrobianas y larvicidas de los AEs derivados de plantas han sido empíricamente reconocidas durante siglos, pero confirmadas científicamente sólo desde hace pocas décadas (Deans y Ritchie, 1987; Janssen *et al.*, 1987).

Relación hombre – germen

Resistencia bacteriana. La relación hombre-germen se ha visto alterada por dos hechos trascendentales: el descubrimiento y el desarrollo de los antimicrobianos y la creación de resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos (Prieto *et al.*, 1999). Con la aparición de los antimicrobianos, hace más de 60 años, cambió el curso de la historia de las enfermedades infecciosas; sin embargo, a pesar de los éxitos alcanzados por las medidas sanitarias preventivas y por el uso de antimicrobianos, siempre hubo preocupación, debido a que al ingresar un nuevo

antibiótico este iba acompañado de resistencia al mismo (Carmona, 2003); las enfermedades infecciosas, consisten en la penetración, multiplicación e invasión de microorganismos (bacteria, virus, hongos, protozoarios o parásitos multicelulares) en el cuerpo del hombre o de los animales (Cué y Morejón, 1998); las bacterias, son microorganismos unicelulares, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, ríos, lagos, mares, tierra, así como en las hojas y raíces de las plantas y piel y tracto digestivo de los animales (Cué y Morejón, 1998; Prats 2012); los antibióticos, consisten en sustancias químicas que son obtenidos a partir de diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos (Cué y Morejón, 1998). La resistencia bacteriana, es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos; además, existe una resistencia natural o intrínseca en la cual la bacteria carece de diana para un antibiótico y la resistencia adquirida, la cual es realmente la más importante desde el punto de vista médico ya que consiste en la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica (Riverón *et al.*, 2003; Daza 1998). Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos, como son la inactivación de enzimas, donde la bacteria produce enzimas capaces de inactivar los antibióticos; la modificación enzimática, la bacteria sintetiza enzimas que modifican químicamente a estos compuestos y por último eflujo, la bacteria sintetiza proteínas ubicadas a nivel de membrana que captan y lanzan el antibiótico al exterior por medio de unas bombas. Estos mecanismos son los más importantes, porque pueden ser transferidos; la síntesis de enzimas se encuentra codificada en los plásmidos, y este puede ser transferido a otras bacterias, por ejemplo, por conjugación (Daza, 1998).

En general, todos los mecanismos de resistencia pre-existen o se modifican en la naturaleza, ya sea por transferencia de genes de resistencia o por mutaciones (García, 2003). La aparición cada vez más frecuente y diversa de los mecanismos de resistencia a nivel microbiano y sobre todo en aquellas bacterias patógenas e incluso oportunistas, ha traído consecuencias importantes en términos de morbilidad y mortalidad. En Venezuela actualmente se están explorando nuevas fuentes de agentes antibacterianos de origen natural, debido al aumento de la resistencia bacteriana, entre ellos los aceites esenciales derivados de plantas (Yáñez *et al.*, 2011). Innumerables estudios han demostrado la actividad antibacteriana de los aceites esenciales indicando su mayor eficacia sobre organismos grampositivos (Shane, 1979; Iikka *et al.*, 1998).

Resistencia larvicida. La utilización masiva de agroquímicos sintéticos de amplio espectro para el control de plagas y enfermedades ha ocasionado el desarrollo

de resistencia, aparición de nuevas plagas, eliminación de entomofauna benéfica, contaminación ambiental y otros daños accidentales derivados del mal uso y aplicación de los mismos (Ricci *et al.*, 2002); *A. aegypti* (Fig. 6), es una de las principales especies de mosquito en el ecosistema urbano, se encuentra distribuido y adaptado a las regiones tropicales y subtropicales del mundo y tiene gran importancia desde el punto de vista médico-epidemiológico, por ser el vector de los virus del dengue y la fiebre amarilla (Santamarina *et al.*, 2000); el dengue, es la arbovirosis más importante presente en el ser humano tanto en términos de morbilidad como de mortalidad (Gubler *et al.*, 1994). El ataque a las larvas del mosquito *A. aegypti* (Fig. 6) para evitar su maduración a mosquitos adultos y posterior dispersión parece ser una de las formas más efectivas para contrarrestar el mosquito y la enfermedad (Briegel, 2003).

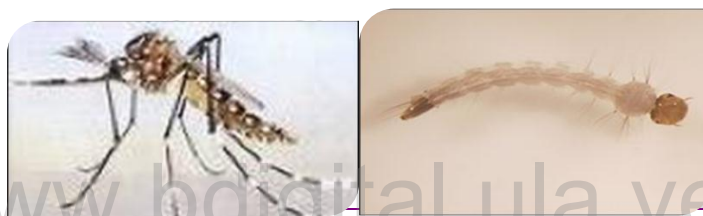


Fig. 6. Mosquito y larva *Aedes aegypti*.

Los larvicidas utilizados en la actualidad incluyen insecticidas de origen bacterianos y organofosforados (siendo el Teméfós el más popularmente usado). Las principales consecuencias toxicas que ha traído el uso de estos químicos representa un riesgo al medio ambiente y la salud humana (Silva, 2004). Aunque se han desarrollado varias vacunas candidatas contra el dengue, aún no se cuenta con una capaz de proteger a la población en riesgo (Kourí, 2006). La acción de los insectos sobre las plantas ha dado lugar a una enorme variedad de metabolitos secundarios con actividad insecticida diversa, producida por las plantas como defensas; las plantas durante su crecimiento y desarrollo generan una gran cantidad de compuestos, que se biosintetizan en las hojas, las flores, los frutos, la raíz entre otras partes de la plantas; la mayoría de estos compuestos no son esenciales para la planta pero actúan como semioquímicos afectando al insecto e influyen sobre la localización del hospedante, su alimentación, su ovoposición, su crecimiento y su desarrollo (Clemente *et al.*, 2007; Villalobos, 1998).

El papel de las plantas como fuente de insecticidas naturales para el control de insectos, tanto de la salud pública como de la agricultura, ha sido reconocido desde tiempos muy remotos, pero a la vez poco explotado (Aguilera *et al.*, 2003). Ha

surgido un aumento de especies de plantas con propiedades larvicidas, entre las cuales se destacan las del género *Annona*, *A. bullata* (Rich), *A. densicoma* (Mart) y *A. muricata* (Mill), que son activas contra *A. aegypti* y los géneros *Culex* y *Anopheles* spp (Sanabria, 2009; Leyva *et al.*, 2009); así como también, es de importancia señalar que en estudios realizados han demostrado que el D-germacreno (57,7%), es el responsable de la toxicidad contra los mosquitos de *A. aegypti* (Ramírez *et al.*, 2011).

Proceso de obtención de los aceites esenciales

Los aceites volátiles se obtienen por diversos procedimientos como lo son destilación con vapor de agua, extracción con solventes orgánicos (éter de petróleo, hexano, propanol), extracción con gases licuados y por expresión de los pericarpios frescos de agrios (Bruneton, 1991).

Métodos utilizados para la separación de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial

Cromatografía. Es un método físico de separación que consiste en una distribución desigual entre dos fases: estacionaria y móvil, de un determinado compuesto, esto permite separar una muestra en sus componentes de acuerdo a sus diferentes distribuciones en un sistema de dos fases dado (Gasco, 1969; Marcano, 2002).

Cromatografía de gases. La cromatografía de gases, es particularmente apropiada para la separación de gases y líquidos volátiles o sólidos en estado gaseoso (Abott, 1970). Se basa en el empleo de una columna cromatográfica, como un simple tubo medio lleno de un producto denominado fase fija y recorrido por un gas portador o vector que representa la fase móvil (Casamada, 1977). La fase estacionaria, puede ser un sólido o un líquido impregnando un soporte inerte, y el fluido o fase móvil, un líquido o un gas (Gasco, 1969). La introducción de la muestra líquida se efectúa por inyección de la misma a la cámara mediante una jeringa especial proporcionada de una aguja hipodérmica, arrastrando desde allí la muestra a la columna. La cámara se mantiene a una temperatura elevada, por lo que la muestra se vaporiza inmediatamente. Los componentes de la muestra se separan a medida que pasan por la columna, emergen de ésta a intervalos y pasan a un detector que manda una señal a un registrador. Finalmente el gas inerte transita 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

trasladar el analito a través de la columna. Esta técnica se utiliza para la separación de sustancias volátiles y termoestables (Storch, 1968; Marcano, 2002).

Un sistema cromatográfico comprende cuatro bloques fundamentales, entre los cuales figuran los siguientes: (1) sistema de aplicación de la muestra (inyector); (2) sistema de separación de la mezcla (columna); (3) sistema de detección de analitos (sustancias) eluidos de la columna (detector) y, finalmente, (4) sistema de datos. Dos papeles de gran importancia de la cromatografía de gases, primero, la cromatografía de gases es una herramienta para efectuar separaciones. En este sentido los métodos de la cromatografía son inmejorables cuando se aplican a muestras orgánicas complejas y a sistemas bioquímicos conformados por especies volátiles o por especies que pueden someterse a un proceso para producir sustancias volátiles. Segundo, es en la determinación de un análisis. En este caso se emplean los tiempos o volúmenes de retención para la identificación cualitativa y las alturas de los picos o sus áreas dan información cuantitativa. Desde el punto de vista cualitativo es una técnica mucho más limitada que la mayoría de los métodos espectroscópicos. Por eso una tendencia importante de combinar las cualidades para la separación que tiene la cromatografía de gases con las mejores propiedades de identificación que poseen instrumentos como los espectrómetros de masas (Skoog *et al.*, 2008).

Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas: CG-EM. La cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-EM) ha demostrado durante los últimos 25 años, que es uno de los métodos más eficaces para el estudio de la composición de los aceites esenciales. La Complementariedad del análisis cromatográfico (screening) con datos espectrales confirmatorios se logra usando la combinación de dos técnicas, CG y EM; en el caso de CG-EM, permite obtener la información “tridimensional”, a saber: (1) los tiempos de retención (t_R), (2) las áreas de picos cromatográficos, que son la base para cuantificar los componentes y (3) los espectros de masas (MS) (Stashenko *et al.*, 2004). La CG-EM, es una técnica adecuada para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La esencia se inyecta directamente al cromatógrafo. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, entran al espectrófotometro de masas, que permite registrar el espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite se identifican con base en patrones de fragmentación, que se observan en sus espectros de masas (Skoog y Leary, 1994).

El cromatógrafo de gases utiliza una columna capilar incluida en un horno termostatzado, esta columna esta revestida en su interior con gel de sílice (u otra fase estacionaria), cuya distinta interacción con las sustancias de la mezcla permite separar los componentes de la misma. Se inyecta una pequeña cantidad de muestra en un

inyector calentado que permita la volatilización de la muestra. Los compuestos volátiles son empujados a lo largo de la columna capilar por una corriente de helio, a medida que la muestra pasa a través de la columna, los componentes más volátiles se mueven más rápidamente a través de la columna que los componentes menos volátiles. Los componentes separados abandonan la columna a tiempos diferentes, pasando mediante un conducto de transferencia a la fuente de iones del espectrómetro de masas, donde las moléculas se ionizan y se fragmentan. La mayoría de los sistemas acoplados, cromatográfico de gases- espectrófotometro de masas, utilizan un cuadrúpedo como sistema de “filtrado” o de discriminación de masas, para separar los iones. A alto vacío, los iones pasan por el espacio entre cuatro barras, las cuales están sometidas a voltajes variables. Los campos eléctricos variables hacen que los iones sigan orbitas complejas y que, en cada instante, solo fragmentos con una masa concreta lleguen al detector. Variando o haciendo un barrido de voltaje, se puede medir un amplio intervalo de masas en menos de un segundo. De esta forma, se pueden realizar muchos espectros de masas, que se almacenan en el computador a medida que los componentes de la muestra pasan desde la columna del cromatógrafo al espectrófotometro de masas. Esta poderosa combinación CG-EM permite que el cromatógrafo de gases separe los componentes de la mezcla y que posteriormente sean identificados por su espectro de masas (Wade, 2004).

www.bdigital.ula.ve

En función a lo antes expuesto, el aceite esencial de *Verbesina negrensis* no ha sido estudiado hasta ahora, es por eso, que el presente trabajo busca determinar la presencia de aceite esencial en esta especie, además determinar su composición química, y a su vez, evaluar la probable actividad antibacteriana o larvicida.

Hipótesis

En función de que las plantas constituyen una fuente abundante de productos naturales activos, de que los aceites esenciales pueden ser usados como larvicidas, bactericidas e insecticidas naturales, y de que esto es de gran importancia para ayudar a la erradicación de enfermedades infecciosas. Es posible que la especie endémica vegetal *V. negrensis* produzca aceite esencial. Es posible que dicho aceite esencial posea actividad antibacteriana o larvicida y que de esas actividades se pueda crear curas alternativas en el combate de enfermedades infecciosas.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Atendiendo la naturaleza del problema, los propósitos que se persiguen y el procedimiento a utilizar para el logro de los mismos, se empleó en el siguiente estudio la metodología de investigación de tipo **exploratoria** apoyada en un **diseño experimental**. La investigación experimental, consiste en someter a experimentación un objeto de estudio (Ávila, 2006). El diseño experimental se desarrolla debido a la necesidad de manipular, observar a través de la realización de las pruebas de laboratorio. En tal sentido, se sometieron varios individuos colectados en campo de la especie *Verbesina negrensis* a hidrodestilación para obtener el aceite esencial. El mismo se evaluó contra diferentes organismos y finalmente se describieron los resultados obtenidos en cada caso.

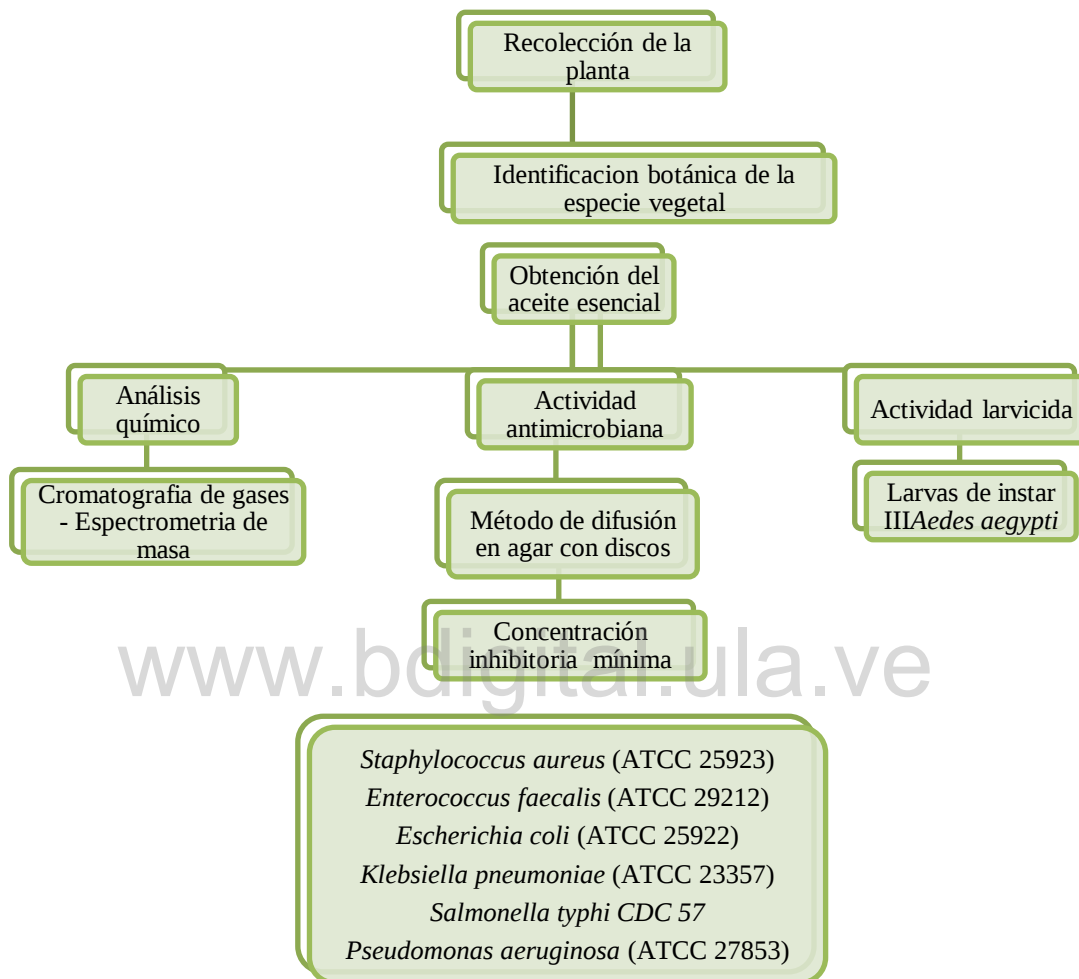
www.bdigital.ula.ve

Metodología y plan de trabajo

Metodología

La metodología en general se desarrolló de acuerdo al diseño de investigación presentado en el esquema 2.

Esquema 2
Diseño de investigación
 (Investigación experimental)



Fuente: Rojas, 2011.

Recolección e identificación de la especie vegetal

La especie *V. negrensis* se recolectó en Pueblo Hondo, Aldea Llanetes, Estado Táchira (Venezuela), junio del 2011. La identificación botánica del material vegetal se llevó a cabo por el ingeniero Juan Carmona Arzola, en el Jardín de Plantas

Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, “Dr. Luis Ruiz Terán”, Universidad de los Andes y depositado bajo el número de voucher FM 047.

Extracción del aceite esencial

Para coleccionar el aceite se utilizó un equipo de hidrodestilación, mediante el método de arrastre con vapor de agua, empleando la trampa de Clevenger (Fig. 7), se sometieron a destilación aproximadamente 1 Kg de hojas frescas del material. Se dejó ebullición a una temperatura de 92° C durante 5–6 horas. El aceite esencial así obtenido, se guardó a baja temperatura en frascos protegidos de la luz y de la ausencia de oxígeno (Rojas, 1994).



Fig. 7. Aparato de clevenger

Fuente: Rojas, 2011.

Separación e identificación de los componentes volátiles del aceite esencial

Cromatografía de gases (Índices de Kovats). los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases marca Perkin-Elmer, modelo Autosystem equipado con columnas de metilpolixiloxano (HP-1) y fenilpolixiloxano (AT-S), de 60 m × 0,25 mm de diámetro y columna capilar de sílice fundida con un espesor de 0.25 mm. La temperatura inicial de la estufa fue de 60 °C; el horno se calentó 4 °C/min hasta 260 °C manteniendo esta temperatura durante 20 minutos. Las temperaturas del inyector y el detector fueron 200 °C y 250 °C, respectivamente. El gas portador fue helio a 1.0 mL/min. La cantidad de 1 µL de la muestra se colocó en un inyector automático

Hewlett-Packard (ALS) con un reparto de 50:1. Los índices de retención fueron calculados en ambas columnas. El método de normalización de áreas de los picos se usó para calcular el porcentaje de composición del aceite esencial.

Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas. El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM), se realizó en un equipo marca Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida de 30 m de largo x 0,25 mm (HP-5MS) y un detector de masas Hewlett Packard MSD 5973. La energía de ionización fue de 70 eV; rango de escaneo, 40:500 amu; 3.9 scans/s. La muestra se diluyó con éter dietílico (20 µL en 1 mL) y 1 µL, fue inyectado en un inyector automático Hewlett-Packard (ALS) con un reparto de 50:1. La identificación de los compuestos del aceite esencial se realizó de acuerdo a sus índices de retención y por comparación de sus espectros de masa usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición (Davies, 1990; Figueiredo *et al.*, 2008).

Evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó de acuerdo al método de difusión en agar con discos descrita por Velasco, 2007 y Acosta *et al.*, 2003.

Microorganismos de ensayo. La actividad antibacteriana fue evaluada en el Laboratorio Clínico de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya” del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, bajo la supervisión de la Lcda. Tulia Díaz. Para la realización de este ensayo se utilizaron cepas de referencia, las cuales fueron aportada por el laboratorio antes mencionado, estas cepas son: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Salmonella typhi* CDC 57 y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Preparación de los inóculos bacterianos. Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de cepas purificadas en medios básicos con un tiempo de incubación no mayor de 24 horas; de estas se tomó una pequeña cantidad de colonias con la ayuda de un asa en aro, para luego ser resuspendidas en una solución salina fisiológica estéril al 0,8% de cloruro de sodio (NaCl) hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0,5 de Mc Farland (10^{6-8} UFC/mL).

Preparación de las placas. Como medio de cultivo fue utilizado el agar Müller Hinton; la preparación del agar, se desarrolló siguiendo las instrucciones de la casa comercial, bajo la supervisión de la Lcda. Tulia Díaz; la cantidad de agar se preparó en base a 30 mL para cada placa de Petri utilizada, luego fue esterilizado en autoclave, envasado y se dejó a temperatura ambiente hasta solidificarse.

Inoculación de las placas. Después de preparados los inóculos y con la ayuda de hisopos estériles, se procedió a inocular en forma de césped las bacterias en las placas de Petri previamente preparadas.

Colocación de los discos impregnados con el aceite esencial de *Verbersina negrensis*. Una vez inoculadas las placas, se colocó sobre la superficie del agar en forma equidistante discos impregnados con el aceite esencial, los controles negativos (DMSO) y controles positivos (antibióticos).

Con el aceite: se impregnaron discos de papel filtro de 5mm de diámetro previamente estéril (colocados bajo campana de luz ultravioleta) con 10 µl del aceite esencial de *Verbesina negrensis*.

Controles: como control negativo se utilizó Dimetil Sulfoxido (DMSO) y el control positivo estuvo representado por discos de antibióticos consultados en *CLSI 2009*, entre los cuales tenemos: Eritromicina® (15 µg), Vancomicina® (30 µg), Ampicilina/Sulbactam® (10 µg/10 µg), Aztreonam® (30 µg), Ciprofloxacina® (30 µg), Ceftazidina® (30 µg).

Preincubación e incubación. Después de colocar los discos en las placas de agar Müller Hinton, se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para facilitar la difusión del aceite a través del agar. Al cabo de este tiempo, finalmente las placas fueron llevadas a la estufa a 37 °C durante 24 horas.

Lectura de las placas. Pasado el tiempo de incubación (24 horas), se procedió a realizar la lectura de las placas. La inhibición del crecimiento se midió en milímetros (mm). Considerando como resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) aquellas donde se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnado con el aceite esencial de *Verbesina*

negrensis. El caso contrario, se consideró negativo o resistente (sin actividad antibacteriana). La CIM se determinó por dilución del aceite con dimetilsulfóxido (DMSO), pipeteando 10µL de cada dilución en un disco de papel filtro, con un rango de 10-500µg/mL, definida como la concentración más baja capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (CLSI, 2009). Además se anexo en los ensayos un disco de papel filtro saturado con DMSO, para probar la posible actividad de este disolvente en contra de las bacterias ensayadas, este se utilizó como control negativo. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Medición de la toxicidad en las larvas

Las pruebas de susceptibilidad larval se realizaron siguiendo el método estandarizado por la Organización Mundial de la Salud (1981), usando larvas del instar III del mosquito *Aedes aegypti*. El aceite esencial de *Verbesina negrensis* se disolvió en agua destilada con Dimetilsulfóxido (DMSO), usando la concentración del disolvente determinada en la fase experimental anteriormente descrita para obtener una solución stock de 500 ppm. Esta concentración tope se establece en base a experiencias previas de otros autores en los que se obtuvieron resultados promisorios con concentraciones de aceites esenciales por debajo de valores de 500 ppm (Amer y Mehlhorn, 2006). Por esta razón, se usó la preparación stock de base para obtener soluciones seriadas a las concentraciones de 100, 50, 25, 10, 5 y 1 ppm. Se colocaron 20 larvas de instar III en recipientes que contenían 50 mL de cada solución, realizando 4 réplicas tanto, para cada concentración, así como también, para el control negativo. Se utilizó como control negativo agua destilada con Dimetilsulfóxido (DMSO). Después de las 24 horas se registró el número de larvas muertas. Los valores de CL_{50} (la concentración a la cual el 50% de las larvas mueren), se calcularon por el Análisis Probit, con el apoyo del programa estadístico BioStat 2007 (AnalystSoft Company). Las larvas se consideraron muertas si estaban inmóviles o incapaces de moverse hasta la superficie del agua. Los bioensayos se realizaron a temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizaron larvas de *A. aegypti* obtenidas de una colonia de cría conservada en el Laboratorio de Ecología de Insectos, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

Plan de trabajo

El plan de trabajo se desarrolló de acuerdo a los parámetros y fechas establecidas en la tabla 4.

Tabla 4
Plan de trabajo

Actividades	Junio 2011 Diciembre 2011	Enero 2012 Junio 2012	Junio 2012 Diciembre 2012	Enero 2013 Junio 2013
Recolección e identificación de la especie vegetal (<i>V. negrensis</i>).	X			
Extracción del aceite esencial de <i>V. negrensis</i> .	X			
Separación e identificación de los componentes químicos presentes en el aceite esencial.		X		
Aplicación del bioensayo de la actividad larvicida en <i>A. aegypti</i> .			X	
Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>V. negrensis</i> en cepas Grampositivas y Gramnegativas.			X	
Evaluación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), contra los organismos que mostraron zona de inhibición.			X	
Elaboración de tesis y publicación de resultados.				X

Fuente: Rojas, 2011.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte Química

Se obtuvieron a partir de las hojas frescas de *V. negrensis* 0,8 mL de aceite esencial de color amarillento y un olor característico, dichas hojas fueron colectadas en Pueblo Hondo, Aldea Llanetes, Estado Táchira (Venezuela) en Junio del 2011.

El análisis químico del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrofometría de masas (CG-EM), de acuerdo a sus índices de retención y por comparación de sus espectros de masa con los espectros de masa de la librería Wiley, permitió identificar 27 compuestos de *V. negrensis* (Tabla 5), que representan el 96,6% de la muestra. Se confirmó la identificación mediante el cálculo de los índices de Kovats. El cromatograma obtenido de la separación se muestra en la fig. 8.

Los compuestos identificados están representados principalmente por mono y sesquiterpenos. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 5 y la figura 9, el compuesto mayoritario del aceite esencial de *Verbesina negrensis* es el α -pineno (2) que representa el 43,1% de los componentes del aceite. Cabe señalar que seis compuestos más: α -humuleno 13,8%, *Cis*-muurola-3,5-dieno 8,1%, limoneno 4,6%, biciclogermacreno 4,2%, β -pineno 2,5%, y D-germacreno 2,4%, también se encuentran en cantidad significativa en el aceite, de manera que junto al α -pineno abarcan el 78,7% de la muestra de aceite. Estos resultados son comparables con los reportados por Craveiro *et al.*, y Albuquerque *et al.*, donde describen la composición química del AEs de *V. diversifolia*, ambos grupos recolectaron la planta en el estado Ceara en Brazil. Craveiro y colaboradores reportaron como compuestos significativos al γ -muuroleno (30,5%) y γ -elemeno (24,6%) (Craveiro *et al.*, 1986), mientras que Albuquerque y colaboradores identificaron como componentes mayoritarios al biciclogermacreno (20,7-23,2%), β -cariofileno (7,4-14,8%) y D-4-ol-germacreno (10,9-14,1%) (Albuquerque *et al.*, 2006). Es importante señalar que para los tres AEs, el α y β -pineno son los monoterpenos más observados.

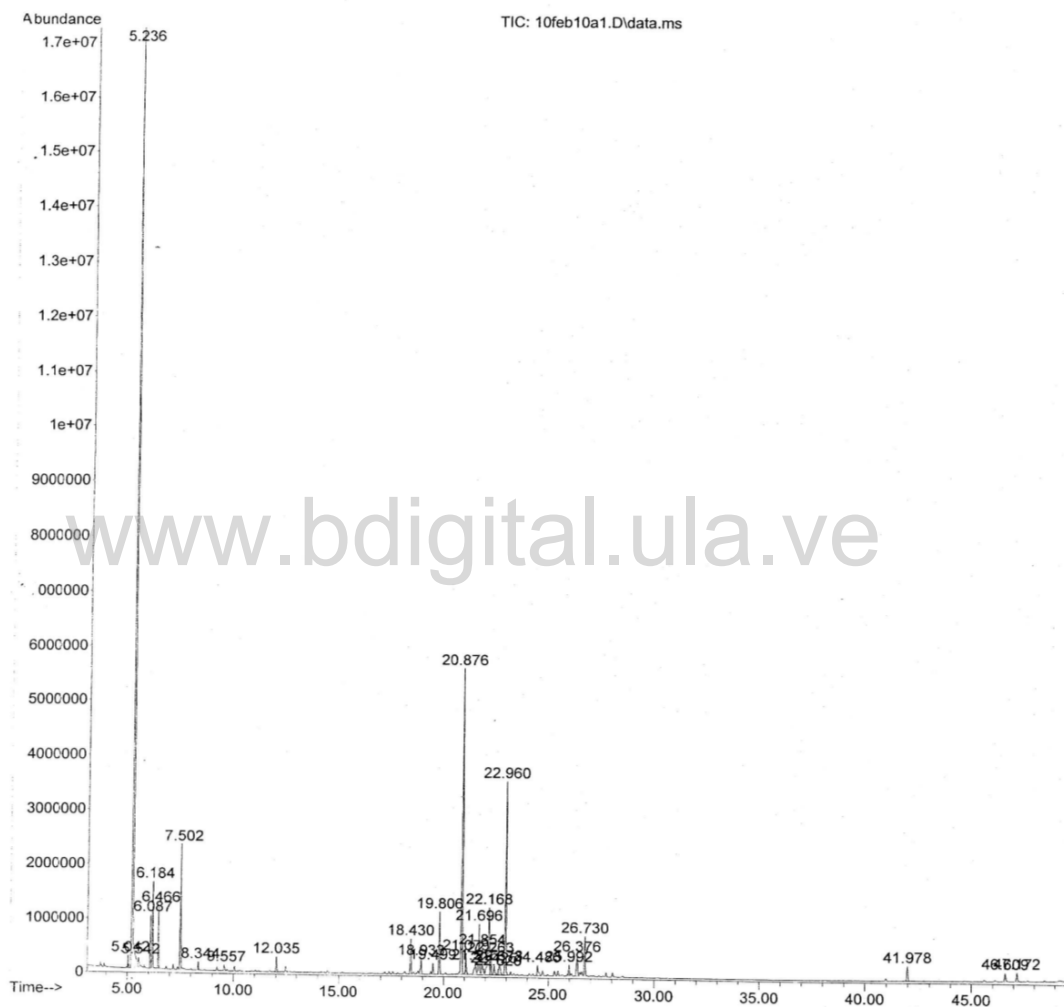
Data Path : C:\msdchem\1\sequence\10feb10aa\
Data File : 10feb10a1.D
Acq On : 10 Feb 2010 10:38
Operator : R. Aparicio
Sample : FMO47
Misc : Muestras Flor Mora
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\HPCH2205.L

Minimum Quality: 80

Unknown Spectrum: Apex minus start of peak

Integration Events: Chemstation Integrator - autoint.e



METESTER.M Thu Feb 11 11:02:36 2010

Page: 1

Fig. 8. Cromatógrama del aceite esencial de *Verbesina negrensis*

Tabla 5.

Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Verbesina negrensis*.

N°	Compuestos	Factor de retención (Min)	de Área %	IK	IK cal
1	Alfa-thujeno	5,04	0,4	931	929
2	α -pineno	5,24	43,1	939	938
3	Gamma-terpineol	5,542	0,5		952
4	Sabineno	6,086	1,5	976	975
5	β -pineno	6,184	2,5	980	978
6	β -mirceno	6,47	1,8	980	989
7	Limoneno	7,50	4,6	1031	1030
8	α -phellandreno	8,35	0,3	1005	1002
9	Linalool	9,56	0,2	1098	1100
10	4-ol-terpinon	12,04	0,6	1164	1184
11	α -copaeno	18,43	1,4	1376	1382
12	β -elemeno	18,93	0,8	1391	1797
13	α -gurjuneno	19,50	0,5	1409	1417
14	β -(E)-farneseno	19,80	2,6	1458	1428
15	α -humuleno	20,88	13,8	1454	1466
16	α -guaieno	21,08	0,9	1439	1473
17	β -patchouleno	21,51	0,9	1380	1488
18	D-germacreno	21,70	2,4	1480	1494
19	β -selineno	21,85	1,2	1485	1499
20	Bicyclogermacreno	22,17	4,2	1494	1510
21	α -muuroleno	22,26	0,8	1499	1513
22	β -chamigreno	22,43	0,5	1475	1518
23	Dauca-5,8-dieno	22,68	0,7		1526
24	Cis-muurola-3,5-dieno	22,96	8,1	1447	1535
25	D-4-ol-germacrenol	24,49	0,6	1574	1582
26	1-epi-cubenol	25,99	0,4	1627	1617
27	Gamma-cadineno	26,38	1,3	1513	1624

Fuente: Rojas, 2011.

1) 	2) 	3) 	4)
5) 	6) 	7) 	8)
9) 	10) 	11) 	12)
13) 	14) 	15) 	16)
17) 	18) 	19) 	20)
21) 	22) 	23) 	24)
25) 	26) 	27) 	

Fig. 9. Compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Verbesina negrensis*

Fuente: Rojas, 2011.

Parte Biológica

Actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial (Tabla 6), realizada por el método de difusión en agar con discos frente a las cepas de referencias como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Salmonella typhi* CDC 57 y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), demostró la efectividad del AEs de *V. negrensis* sobre bacterias grampositivas como *Enterococcus faecalis*, en la cual se observó un halo de inhibición de 8mm y su concentración inhibitoria mínima fue de 350 µg/mL y *Staphylococcus aureus*, con un halo inhibición de 7mm, y una concentración inhibitoria mínima (CIM) y esta fue de 500 µg/mL. Ahora bien, con respecto a la determinación de la concentración inhibitoria mínima se puede decir que los valores de 350 µg/mL y 500 µg/mL representan una actividad moderada del aceite esencial sobre el crecimiento de las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Yáñez et al., 2011, donde el aceite esencial de *Ambrosia peruviana* (otra especie de la familia Asteraceae), resulto ser activo con valores de CIM de 350-500 µg/mL. Así también, varios autores han descrito que el α -pineno es el responsable de la actividad antibacteriana. El pineno tiene la capacidad de destruir la integridad celular, por lo tanto inhibe los procesos de respiración y de transporte de iones (Bakkali et al., 2008; Uribe et al., 1985); de acuerdo a la composición química del AEs de *V. negrensis* este presento como compuesto mayoritario al α -pineno, al cual podría atribuirse principalmente la actividad antibacteriana. El AEs de *V. turbasensis*, otra especie colectada en Venezuela, presento al D-germacreno (56,2%) como componente mayoritario, seguido del β -cariofileno (8,1%), biciclogermacreno (8,1%) y α -pineno (6,1%), Este AEs demostró actividad antibacteriana contra patógenos humanos incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Gualtieri, 2006).

Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Verbesina negrensis* contra cepas de Referencia Internacional.

Microorganismos	Aceite	SAM	ATM	ZONA DE INHIBICION (mm)*			E	CAZ	CIM (µg/mL)
				CIP	VA				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	7*	21*							500
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	8*		35*						300
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	NA				24*				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA						32*		
<i>Salmonella typhi</i> CDC 57	NA							41*	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA							32*	

SAM: Ampicilina Sulbatam. ATM: Aztreonam. CIP: Ciprofloxacina. VA: Vancomicina. E: Eritromicina. CAZ: Ceftazidina. CIM: Concentración inhibitoria mínima. NA: No activo.

Fuente: Rojas, 2011.

Actividad larvicida

Con relación a la actividad larvicida, se observó que el aceite esencial de *V. negrensis* no presenta actividad sobre larvas del tercer instar de *Ae. aegypti*, a una concentración de 500 ppm luego de 24 horas ya que para ese momento ni se registraron larvas muertas, ni se observaron larvas inmóviles o incapaces de moverse hasta la superficie del agua. Es interesante mencionar que aunque el aceite esencial de *V. negrensis* presenta compuestos que aparentemente tiene actividad larvicida como es el caso del D-germacreno, que de acuerdo con Ramírez et al., 2011, se encuentra en una concentración de aproximadamente 58% en el aceite esencial de *Annona cherimola*, y es probable que debido a ello dicho aceite esencial sea activo contra *Ae. Aegypti*. En el caso del aceite esencial de *V. negrensis*, la concentración de este compuesto es muy baja 2,4%, y pudiera ser una de las causas por las cuales este aceite no mostro esta actividad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que el aceite esencial de *V. negrensis* de un color amarillento y olor característico presento 0,08% de rendimiento.
2. El análisis químico del AEs de *V. negrensis*, mostró ser rico en mono y sesquiterpenos, siendo el alfa-pineno su principal constituyente, así como también, el alfa-humuleno, cis-muurola-3,5-dieno y limoneno son mayoritarios en el aceite.
3. El aceite esencial de *V. negrensis* mostro actividad antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*, presentando una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 350 µg/mL, así como también, contra *Staphylococcus aureus*, el cual mostro una CIM de 500 µg/mL.
4. Al aceite esencial de *V. negrensis* no se le detectó actividad larvicida contra larvas del tercer instar del mosquito *Ae. aegypti*, a una concentración de 500 ppm.

Recomendaciones

- En el aceite esencial de *V. negrensis* podrían encontrarse principios activos utilizables como futuras alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones de la piel, osteomielitis, neumonía e infecciones urinarias.
- Realizar un estudio fitoquímico completo de la especie *Verbesina negrensis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abbott D (1970). Introducción a la cromatografía. Segunda edición. **Pág.** 1
2. Acosta M, González M, Araque M, Velasco E, Khouri N y Rojas L (2003). Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacteria multiresistentes de origen nosocomial. Revista de la Facultad de Farmacia. **45** (1), 19-24.
3. Afroditi S, Eleni P, Constantita N, Stella K, Thomas L y Minas A (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. Journal Agricultural and food Chemistry. **44**, 1202-1205.
4. Aguilera L, Navarro A, Tacoronte J, Leyva M y Marquetti M (2003). Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Revista Cubana de Medicina Tropical. **55** (2), 100-104.
5. Albuquerque M, Canuto K, Pessoa O, Nunes E, Nascimento R y Silveira E (2006). Essential oils composition of *Verbesina diversifolia* DC. Flavour Fragrance J. **21**, 634-636.
6. Amer A y Melhorn H (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*. **99**, 466-472.
7. Ávalos A y Pérez E (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. **2** (3), 119-145.
8. Ávila H (2006). Introducción a la metodología de la investigación. Edición Eumedonet, México. **Pág.** 73.
9. Azcón J y Talón M (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. 1ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. **Pág.** 261.
10. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D y Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology. **46**, 446-475.
11. Bandoni A (2002). Los recursos aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. **Pág.** 27, 31, 180, 207-209.
12. Bandoni A (2009). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Planta. **Pág.** 410.
13. Bandoni A, Retta D, Di Leo Lira P y Van C (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. **8** (5), 317-322.

14. Bohlmann F (1977). Summary of the chemistry of the compositae. En: Heywood, Harborne & Tuner (eds). The Biology and Chemistry of the Compositae. **2**, 1097-1104.
15. Bohlmann F y Lonitz M (1978a). Neue sesquiterpene aus *Verbesina occidentalis*. Phytochemistry. **17**, 453-455.
16. Bohlmann F y Lonitz M (1978b). Neue eudesman-derivate und andere sesquiterpene aus *Verbesina*-Arten. Chemische Berichte. **111**, 254-263.
17. Bohlmann F y Zdero C (1979). Zur Konfiguration von α -und β -*Verbesinol cumarat*. Phytochemistry. **18**, 1751-1752.
18. Bohlmann F, Grenz M, Gupta R, Dhar A, Ahmed M, King R y Robinson H (1980). Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. Phytochemistry. **19**, 2391-2397.
19. Bohlmann F, Zdero C, Robinson H y King M (1982). Two new eudesmane cinnamates from *Verbesina sordescens*. Phytochemistry. **21** (7), 1663-1664.
20. Box V, Bardouille V y Chan V (1977). Enantio-eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina rupestris*. Phytochemistry. **16**, 987-990.
21. Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology. **94**, 223-253.
22. Briegel H (2003). Physiological bases of mosquito ecology. Journal of Vector Ecology. **28**, 1-11.
23. Bruneton J (1991). Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Editorial acriba, SA; Zaragoza (España), 1ra Edición. **Pág.** 230-244.
24. Bruneton J (1995). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal planta. Lavoisier/Intercept, 2da edición, Paris. **Pág.** 700
25. Cabezas C (2005). Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Publica. **22** (3), 213-214.
26. Cano C, Bonilla P, Roque M y Ruiz J (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) In vitro antifungal activity and metabolites of the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) leaves. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. **25** (3), 298-301.
27. Carmona M (2003). Prevención de la resistencia bacteriana a antimicrobianos. Aspectos farmacológicos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. **23** (1), 5-59.
28. Carrillos P, Rzedowski J y Calderón G (2010). Cuatro nuevas especies de *Verbesina* (Compositae: Heliantheae) del centro de México. Acta Botánica Mexicana. **93**, 127-143.

29. Casamada R (1977). Tratado de farmacognosia. Tercera edición. **Pág.** 467-476.
30. Castañeda M, Muñoz A, Martínez J y Stanshenko E (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica Año XIII*. **33**, 165-166.
31. Clemente S, Mareggiani G, Broussalis A y Ferraro G (2007). Actividad insecticida de 1,8-cineol sobre mosca de los frutos, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). *Dominguezla*. **23** (1), 29-34.
32. CLSI (2009). Performance standars for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standars Institute. *CLSI document M100-S19*, Wayne, PA.
33. Craveiro A, Andrade C, Matos F, Alencar J y Machado F (1986). Essential oils from Brazilian compositae. *Journal Natural Product*. **49**, 360-362.
34. Cué M y Morejón M (1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. antibióticos betalactamicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. **14**(4), 347-361.
35. Davies N (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silica and carbowax 20 M. phases. *Journal of Chromatography*. **503**, 1-24.
36. Daza R (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. **22** (3), 57-67.
37. Deans S y Ritchie G (1987). Antimicrobial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. **5**, 165-180.
38. Efange S (2002). Chapter 5 natural products: A continuing source of inspiration for the medicinal chemistry. *Advances in Phytomedicine*. **1**, 61-69.
39. Figueiredo C, Barroso J, Pedro L y Scheffer J (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **23**, 213-226.
40. García P (2003). Resistencia bacteriana en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. **20** (1), 11-23
41. García C, Martínez A, Ortega J y Castro F (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*. **2**, 86-96
42. Gardner P y Albers C (1961). α - and β -*Verbesinol* sesquiterpene alcohols of the cis-decalin series. *Journal of the American Chemical Society*. **83**, 1512.
43. Gasco S (1969). Teoría y práctica de la cromatografía en fase gaseosa. Editorial ediciones J.E.N; Madrid. **Pág.** 3.

44. Gualteri M, Araque M, Morales A, Rondón M, Rojas J, Araujo L y Villalta C (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Verbesina turbacensis* Kunth, HBK. *Revista Latinoamericana de Química*. **33**, 128-131.
45. Gubler D y Trent D (1994). Emergence of epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious agents and Disease*. **2**, 383-393.
46. Gubler D (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. **11** (3), 480-96.
47. Guerrero C, Martínez M, Díaz E y Romo de vivar A (1975a). Elemenolidas II. Estructura y estereoquímica de la *Verafinina*, una nueva elemenolida aislada de *Verbesina aff. Coabuilensis* Gray. *Revista Latinoamericana de Química*. **6**, 53-56.
48. Guerrero C, Iriarte A, Díaz E, Taboada J, Diddi M y Tellez J (1975b). Determinación de la estructura y estereoquímica de la elemenolida *verafinina C* y aislamiento de la *verafinina B*, dos sustancias citotóxicas aisladas de *Verbesina aff.* *Revista Latinoamericana de Química*. **6**, 119-123.
49. Halstead S (1980). Dengue hemorrhagic fever-a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*. **58**, 1-21.
50. Herz W y Kumar N (1981). Aromatic other constituents of four *Verbesina* species: structure and stereochemistry of Verbesindiol. *Phytochemistry*. **20**, 247-250.
51. Heywood V, Harborne J y Turner B (1977). The biology and chemistry of the compositae. Academic Press, San Francisco (London New). **1**, 2-19.
52. Iikka M, Alakomi H, Kyosti L, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid E, Gorris L y Wright A (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. **46**, 3590-3595.
53. Isturiz R, Gubler D y Brea Del Castillo J (2000). Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infect Dis Clin North Am*. **14** (1), 121-40.
54. Janssen A, Scheffer J y Baerheim A (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Médica*, **53**, 395-398.
55. Kourí G (2006). El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*. **19**, 143-145.
56. Kuklinski C (2000). Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Edición OMEGA. **Pág.** 133-143.

57. Lasser T (1964). Flora de Venezuela. Edición Especial del instituto Botánico. Segunda parte. **Pág.** 602-603.
58. Lavabre M (1995). Aromaterapia. INNER traditions. Lasser Press. Colonia Juárez (México). **Pág.** 30-54.
59. Leyva M, Marguetti M, Tacorante J, Scull R, Timno O, Mesa A y Montada D (2009). Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Revista Biomédica. **20**, 5-13.
60. Lincoln T y Zeiger E (2006). Fisiología vegetal. Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L. **1**, 538.
61. Marcano D y Hasegawua M (2002). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas (Venezuela). Segunda Edición Torino, Venezuela. **Pág.** 60-62, 259-263.
62. Martínez J, Sulbarán de Ferrer B, Ojeda de Rodríguez G, Ferrer A y Nava R (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Revista de la Facultad de Agronomía. **20** (4), 1-32.
63. Monache G, Botta B, Monache F, Espinal R, De Bonnevaux S, De Luca C, Botta M, Corelli F y Carmignani M (1992). Caracasamide, a novel hypotensive agent from *Verbesina caracasana*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **2**, 415-418.
64. Monache G, Botta B, Monache F, Espinal R, De Bonnevaux S, De Luca C, Botta M, Corelli F, Dei D, Gacs-Baitz E y Carmignani M (1996). Caracasandiamide, a truxinic hypotensive agent from *Verbesina caracasana*. Biorganic & Medicinal Chemistry Letters. **6**, 233-238.
65. Mora F, Alpan L, McCracken V y Nieto M (2013). Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. The Natural Products Journal. **3** (2), 140-150.
66. Moreira A (2006). Posición filogenética y distribución de los géneros de Compuestas chilenas, con algunas notas biogeográficas. Revista del Jardín Botánico Chagual. **4**, 12-28.
67. Moreno S, Crescente O, Ortiz S y Quintero M (2006). Composición química y actividad toxica del aceites esencial de *Simsia pubescens* Triana. INTRERCIENCIA. **31** (10), 745-747.
68. Nerio S, Olivero-Verbel J y Stashenko E (2010). Repellent activity of essential oils: A review. Bioresource Technology. **101**, 372-378.
69. Organización Mundial de la salud (1981). Instrucciones para determinar la susceptibilidad o resistencia de los mosquitos adultos a los insecticidas carbamatos, organoclorados y organofosforados. WHO/VBC/81/806.

70. Organización Panamericana de la Salud (1995). Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington DC. **Pág.** 3-22.
71. Ortega A, Martínez M y Romo de vivar A (1977). Las elemanolidas de *Verbesina aff stricta*. Estructura de las Zempoalinas-A y B. Revista Latinoamericana de Química. **8**, 166-168.
72. Ortuño M (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición, AIYANA, España. **Pág.** 8-9.
73. Prats G (2012). Microbiología y parasitología médica. Editorial Médica Panamericana (Madrid). **Pág.** 13.
74. Prieto M, Cuotto M, Moreno M, Rojas L y Usubillaga A (1999). Estudio comparativo de los compuestos volátiles de tres especies de *Eucalyptus* que crecen en el estado Mérida. Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia – Manuscritos.
75. Rahman A, Alan M, Khan S, Ferdous A, Rafiul A y Matiur R. (2008). Taxonomic studies on the family Asteraceae (Compositae) of the rajshahi division. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. **4**(2), 134-140.
76. Ramírez R, Mora F, Ávila J, Rojas L, Usubillaga A, Segnini S y Carmona J (2011). Composición química y actividad larvica del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). Revista de la Facultad de Farmacia. **53** (2), 2-6.
77. Ricci E, Padín S y Kahan A (2002). Efectos repelentes de los aceites esenciales de laurel lemongrass sobre *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae) en repollo. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. **28**, 207-212.
78. Riverón F, Hernández J, Martínez L y Betarte C (2003). Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar. **32** (1), 44-48.
79. Rojas L (1994). Trabajo Especial de Grado ULA. Facultad de Farmacia. Postgrado en Química de Medicamentos.
80. Sanabria L, Segovia EA, González N, Alcaraz P y Vera de Bilbao N (2009). Actividad larvica de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). Departamento de Medicina Tropical. Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay. **7** (2), 26-31.
81. Santamarina A, Pérez R y Honorio S (2000). Susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* al parasitismo por *Romanomermis culicivorax* en condiciones de laboratorio y de campo en Oaxaca, México. Revista Panamericana de Salud Pública. **8** (5), 299-304.

82. Silva H, Silva R, Santos R, Filho E y Elías C (2004). Actividad larvica de taninos aislados de *Mangonea pubescens* St. Hill (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **35**, 1438-1441.
83. Shane G (1979). Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. *Physic Bulletin*. **30**, 262.
84. Skoog D y Leary J (1994). Análisis instrumental. McGraw-Hill. Madrid. **Pág.** 491-527.
85. Skoog D, Holler F y Crouch S (2008). Principios de análisis instrumental. Sexta edición. **Pág.** 788.
86. Smith C (1985). Unusual seed oils and their fatty acids. En: Pryde (ed.), *Fatty acids*. Champaign, Amer. Oil Chemists Soc. **Pág.** 29-47.
87. Stanier R, Ingraham J, Wheelis M y Painter P (1992). Microbiología. Segunda edición. **Pág.** 155-158.
88. Stashenko E, Combariza Y y Puertas A (1998). Aceites esenciales, técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Fitoquímica y Cromatografía. Bucaramanga. Colombia. **Pág.** 30.
89. Steyermark J, Berry P, Bruce K y Yastskievych K (1997). Flora of the Venezuela Guayana. Missouri Botanical Garden. **3**, 181-184.
90. Storch de Gracia J (1968). Fundamentos de la cromatografía de gases. Segunda edición. **Pág.** 6-13.
91. Tiwari H y Rao V (1978). Constituents of *Verbeina encelioides*: isolation of triterpenoids from a *Verbesina* species. *Indian Journal Chemistry*. **16B**, 1133.
92. Torres F, Leyva M, Martínez J y Stashenko E (2007). Estudio de las características del aceite esencial de *Cabreriella oppositicordia* (Asteraceae). *Scientia et Technica*. **33**, 185-186.
93. Uribe S, Ramirez J y Peña A (1985) Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*. **161**, 1195–1200.
94. Velasco J, Rojas J, Salazar P, Rodríguez M, Díaz T, Morales A y Rondón M (2007). Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*. **2** (1), 85-88.
95. Villalobos P (1998). Repelencia, inhibición del crecimiento y toxicidad de extractos vegetales en larvas de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. **24**, 143-154.
96. Vitto L y Petenatti E (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Revista Multequina*. **18 w(2)**, 85-115.

- 97.** Vivas Y y Ubierno P (2010). Asteraceae del Valle Morrenico de Mucubají, estado Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). **27**, 39-60.
- 98.** Wade J (2004). Química Orgánica. 5ta edición. Pearson educación, S.A. **Pág.** 522.
- 99.** Wagner H, Aprameya I, Seligman O y Herz W (1974). Rhamnocitrin-3-glucuronid in *Verbesina myricephala*. Phytochemistry. **13**, 493-494.
- 100.** Yáñez C, Ríos N, Mora F, Rojas L, Díaz T, Velasco J, Ríos N y Meléndez P (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd de los llanos venezolanos. Revista Peruana de Biología. **18** (2), 149-151.
- 101.** Zhu X, Li X y Liu J (2004). Recent pharmacological studies on natural products in China. European Journal of Pharmacology. **500**, 1-3.

www.bdigital.ula.ve