



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



**ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus cinerea* Y  
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciados en  
Bioanálisis

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

**Autoras:**

Luisi Suárez, Elisa R.

Quintero Dávila, María A.

**Tutor:**

Dr. Rojas Fermín, Luis B.

**Cotutor:**

Dr. Ustáriz Fajardo, Francisco J.

Mérida, Julio de 2019

## **Dedicatoria**

A Dios principalmente, a toda mi familia en especial a mi querida madre por ser siempre mi apoyo incondicional, por ustedes he podido lograr las metas que me he propuesto. Gracias, los amo.

Elisa.

A Dios, a mis padres, mis hermanos y a toda mi familia por el apoyo recibido durante todo este tiempo, gracias por creer y confiar siempre en mí, los amo.

Angélica.

A nuestras personas por todo el esfuerzo, empeño, incontables horas de dedicación, voluntad, fuerza, perseverancia y gran valentía al enfrentarnos a todos los tropiezos que se presentaron en el camino, este es un gran logro y nos lo merecemos. Soñamos en grande y lo alcanzamos compañera. ¡Lo logramos!

Elisa y Angélica.

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

## **Agradecimientos**

En primer lugar a Dios todopoderoso por cuidar nuestros pasos y guiarnos por el camino correcto, sin su ayuda nada sería posible.

A nuestros padres por creer y confiar en nosotras, por darnos siempre una palabra de aliento y motivarnos para completar nuestros estudios, con su ánimo y entusiasmo nos han ayudado y apoyado incondicionalmente.

A nuestros hermanos, primos, tíos y amigos que han estado a lo largo de este hermoso transitar y han hecho que estos momentos sean aún más especiales.

A la ilustre Universidad de Los Andes, especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por permitir formarnos en ella, de la cual nos sentimos infinitamente orgullosas por brindarnos la mejor educación de todas.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Usubillaga del Hierro”, especialmente al Laboratorio de Actynomicetos y Laboratorio A Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf”, por abrirnos las puertas y permitir el desarrollo de esta investigación.

A nuestros profesores que han sido nuestros formadores en este largo camino, el cual no ha sido fácil pero aun sabiendo esto colocaron todo su empeño, dedicación y sus valiosos conocimientos. Gracias a sus sabios consejos logramos este objetivo.

A nuestro tutor Luis Rojas, cotutor Francisco Ustáriz, profesora Yndra Cordero y Dr. Rosa Aparicio quienes con su compromiso y dedicación hicieron de esto algo más sencillo. Por ser nuestros padres adoptivos dentro de este proceso de una manera desinteresada, inculcándonos el deseo de aprender y de ser mejores cada día, siendo este el mejor regalo que nos pudieron dar. Gracias por ser sumamente especial con nosotras.

Y a todas las personas que aunque no mencionamos y que de alguna forma u otra hicieron posible el logro de esta meta. Nuestra eterna gratitud por su cooperación.

## Índice de contenido

	pág
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de contenidos	v
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xi
Índice de esquemas	xii
Resumen	xiii
Introducción	1
Capítulo I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del problema	4
Justificación e importancia de la Investigación	6
Objetivos de la investigación	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Alcances y limitaciones de la investigación	8
Capítulo II. MARCO TEORICO	9
Trabajos previos	9
Antecedentes históricos	15
Bases teóricas	16
Descripción botánica de la familia Myrtaceae	16
Descripción botánica y geográfica del género <i>Eucalyptus</i>	17
Descripción botánica de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	18
Composición química de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	18
Generalidades de los aceites esenciales	22
Componentes de los aceites esenciales	22
Componente mayoritario del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> (1,8-cineol)	24
Obtención de los aceites esenciales	25

Métodos de separación e identificación de los componentes de los aceites esenciales	27
Índice de Kováts	28
Importancia de los aceites esenciales	28
Propiedades farmacológicas de los aceites esenciales	29
Propiedades medicinales de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	30
Generalidades de las bacterias	30
Características generales de las bacterias a utilizar en el presente estudio	32
Bacterias Gram-positivas	32
<i>Enterococcus faecalis</i>	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	33
Bacterias Gram-negativas	34
<i>Escherichia coli</i>	34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Generalidades de los antibióticos	37
Clasificación de los antibióticos	38
Consecuencia del uso incorrecto de los antibióticos	40
Resistencia bacteriana	41
Tipos de resistencia bacteriana	41
Actividad antibacteriana	42
Métodos que miden la actividad antibacteriana	42
Definición de términos básicos	44
Concentración inhibitoria mínima	44
Bacterias ATCC ( <i>American Type Culture Collection</i> )	44
Operacionalización de las variables	45
Hipótesis	46
Capítulo III. MARCO METODOLOGICO	47
Tipo de investigación	47

Diseño de investigación	47
Población y muestra	47
Unidad de investigación	47
Selección del tamaño muestral	48
VARIABLES	48
Procedimientos o metodologías de la investigación	49
Recolección de la muestra	49
Obtención del aceite esencial mediante Hidrodestilación simple utilizando trampa de Clevenger	50
Análisis del aceite esencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	51
Cálculo del índice de Kováts	52
Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	53
Bacterias estudiadas	53
Preparación de placas	54
Preparación de pre-inóculos bacterianos	54
Preparación de inóculos bacterianos	54
Inoculación de placas	54
Determinación de la actividad antibacteriana por el método de Difusión en Agar con discos (Kirby-Bauer)	55
Preparación de los discos	55
Colocación de los discos impregnados	56
Pre-incubación e incubación de las placas	56
Lectura de las placas	57
Diseño de análisis	58
Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	59
Obtención del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	59
Composición química del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	60

Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	66
Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	68
Capítulo V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
Conclusiones	74
Recomendaciones	75
Bibliografía	76
Fuentes electrónicas	78

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

## Índice de Figuras

Figura N°	pág
1 Proantocianidinas o taninos condensados	19
2 Taninos hidrolizables o pirogálicos	19
3 Estructura molecular simplificada del isopreno	20
4 2H-1-benzopiran-2-ona (cumarina)	21
5 Terpenos presentes en el aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	23
6 Monoterpenos presentes en el aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	24
7 Estructura química del 1,8-cineol	25
8 Pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	31
9 Bacteria Gram-positiva <i>Enterococcus faecalis</i>	33
10 Bacteria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	34
11 Bacteria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i>	35
12 Bacteria Gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
13 Partes aéreas (hojas) de <i>Eucalyptus cinerea</i>	48
14 Recolección de la muestra de <i>Eucalyptus cinerea</i>	49
15 Pesaje y trituración manual de las partes aéreas (hojas) de <i>Eucalyptus cinerea</i>	50
16 Hidrodestilación simple empleando trampa de Clevenger	51
17 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	52
18 Componentes mayoritarios en el aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	60
19 Porcentaje de componentes identificados del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	61
20 Cromatograma del aceite esencial de la especie	62

	<i>Eucalyptus cinerea</i> en columna capilar HP-5	
21	Quimiotipos de los componentes del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> de las investigaciones utilizadas en los trabajos previos	66
22	Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	70
23	Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	71
24	Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	71
25	Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	72
26	Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	72

## Índice de Tablas

Tabla N°	pág
1 Propiedades fisicoquímicas del 1,8-cineol	25
2 Operacionalización de la variable dependiente	45
3 Operacionalización de la variable independiente	45
4 Bacterias estudiadas en la investigación	53
5 Diluciones empleadas para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	55
6 Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana	56
7 Componentes identificados del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i> mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	61
8 Componentes identificados del aceite esencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> , en los trabajos previos utilizados en la investigación	64
9 Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas	67
10 Valores de las diferentes concentraciones estudiadas para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de la especie <i>Eucalyptus cinerea</i>	70
11 Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> , en los trabajos previos utilizados en la investigación	73

## Índice de Esquemas

Esquema N°	pág
1 Diseño experimental del aceite esencial de <i>Eucalyptus cinerea</i>	52
2 Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en Agar con discos (Kirby-Bauer)	57

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



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES “DR. ALFREDO NICOLÁS  
USUBILLAGA DEL HIERRO”

ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus cinerea* Y  
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

**Autores:**

Luisi Suárez, Elisa R.

Quintero Dávila, María A.

**Tutor:** Prof. Dr. Rojas Fermín, Luis B.

**Cotutor:** Prof. Dr. Ustáriz Fajardo, Francisco J.

**RESUMEN**

En este estudio se analizó el aceite esencial de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea* y se determinó su actividad antibacteriana. El aceite esencial de las hojas fue obtenido mediante el proceso de hidrodestilación simple utilizando trampa de Clevenger. Dicho aceite fue separado e identificado en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP MSD 5973; utilizando la base de datos Wiley MS 6ta edición. Se identificaron como componentes mayoritarios 1,8-cineol (80,34 %) y *alfa*-terpenil-acetato (6,21%). La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de Difusión en Agar con discos (Kirby-Bauer) frente a cepas Gram-positivas y Gram-negativas. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con una CIM de 12,5 ppm, mientras que la actividad para *Klebsiella pneumoniae* fue a una CIM de 6,25 ppm.

**Palabras claves:** *Eucalyptus cinerea*, 1,8-cineol, *alfa*-terpenil-acetato, actividad antibacteriana.

## INTRODUCCIÓN

Desde hace milenios el hombre ha vivido y dependido de las plantas para preservar su salud. Los hombres de todas las eras han demostrado gran interés por las plantas medicinales. Existen documentos e inscripciones de Babilonia, Egipto, Grecia y Roma que hacen referencia a las propiedades curativas de las plantas, muchas de las cuales se utilizan en la medicina moderna (Acosta, 1993).

Existe evidencia de que en China aproximadamente entre los años 5000–4000 a. C. se utilizaba una gran cantidad de drogas sobre las que existen escritos que detallan su recolección y preparación. En la Edad Media, la medicina naturalista coexistía con la superstición y la metafísica, las culturas precolombinas de América ofrecieron a Europa un rico legado de medicina tradicional, reportando para el siglo XVIII una lista de medicamentos desarrollados con plantas utilizadas por los indígenas (Acosta, 1993).

En el siglo XIX todos los tratamientos médicos se hacían por medios naturales y los químicos iniciaron el aislamiento y el análisis de algunas de las sustancias que contenían las plantas medicinales, logrando abrir paso a la industria farmacéutica actual (Acosta, 1993).

Los aceites esenciales son líquidos viscosos semivolátiles obtenidos de materia vegetal como hierbas, flores, hojas, semillas, ramas y cortezas, entre otros. Antiguamente los aceites esenciales y sus componentes químicos ganaron un creciente interés debido a su posible uso como agentes antimicrobianos (Reyes, Palou y López; 2014).

Las principales familias de las plantas que sintetizan los componentes de los aceites esenciales son: Myrtaceae, Lauraceae, Rustaceae, Poaceae, Piperaceae, entre otros. Generalmente, la presencia de estructuras

histológicas sobre o en la superficie de las plantas tiene que ver con la producción del aceite esencial (Bruneton, 2001).

Los constituyentes principales de los aceites esenciales pertenecen a dos grupos de origen biogénico; el grupo de los terpenoides y el grupo de compuestos aromáticos provenientes del fenilpropano, proporcionándole diversas propiedades a los aceites esenciales de las plantas (Bruneton, 2001).

La familia Myrtaceae está compuesta por aproximadamente 3800 especies de las cuales casi 700 son del género *Eucalyptus*, se caracterizan por la presencia, en sus tejidos de glándulas secretoras de aceites esenciales. Muy estimadas en perfumería, agroalimentación o química fina; sus aceites esenciales le confieren a menudo propiedades antisépticas utilizadas en la industria del medicamento (Bruneton, 2001)

Actualmente, existen diversos antibióticos que han contribuido con el control de múltiples enfermedades infecciosas. Logrando con esto mejorar la calidad de vida de la población. Sin embargo, la producción de dichos antibióticos ha ido decayendo y se ha evidenciado la combinación del uso excesivo de los antibióticos con su uso incorrecto, esto se debe a la falta de acceso al tratamiento apropiado y su subutilización debido a los bajos recursos para completar los tratamientos, lo cual conlleva a la resistencia bacteriana, la formación de un mecanismo utilizado por la bacteria (OMS, 2001; Sussman, Mattos y Restrepo, 2002; Fernández, López, Ponce y Machado; 2003).

En profundidad; la resistencia bacteriana es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Fernández y cols, 2003).

La innovación y generación de nuevas alternativas enfocadas en las propiedades de las plantas medicinales es necesaria en la actualidad. La finalidad del presente estudio es definir la composición química del aceite esencial extraído de una muestra de las hojas de *Eucalyptus cinerea* para determinar la actividad antibacteriana contra bacterias ATCC Gram-positivas y Gram-negativas.

En esta investigación se trabajará específicamente con dos de las especies de las bacterias ATCC Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Asimismo, se trabajará específicamente con tres de las especies de las bacterias nosocomiales Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

El presente proyecto está sistematizado por capítulos; en el Capítulo I denominado El Problema se realiza el planteamiento del problema, los objetivos, la justificación e importancia de la Investigación, los alcances y limitaciones de la investigación. En el Capítulo II llamado Marco Teórico abarca los Trabajos previos, Antecedentes históricos, Bases teóricas Definición de términos básicos y Operacionalización del evento de estudio e Hipótesis. El Capítulo III denominado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de investigación, el diseño de análisis, Población y Muestra, Instrumento de Recolección de Datos y Procedimientos de la Investigación. En el Capítulo IV se realizan los resultados y discusiones para así concluir con el Capítulo V que abarca las conclusiones y recomendaciones.

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

La familia Myrtaceae abarca numerosas especies y subespecies compuestas generalmente por arbustos o árboles que predominan en los países cálidos. Esta familia se caracteriza por flores regulares con estambres numerosos y su fruto situado debajo de la flor. La naturaleza del fruto es muy variable: puede ser carnoso y formar una baya, o bien seco, generalmente capsular. Comúnmente, las hojas nacen en parejas una en frente a la otra, tienen numerosos y diminutos depósitos de esencias muy aromáticas (Brunenton, 2001).

La familia Myrtaceae se constituye por 3800 especies en la que se incluye el género *Eucalyptus* que, a su vez, abarca aproximadamente 700 especies originarias de Australia y Tasmania. El crecimiento rápido de esta especie, la calidad de su madera, la capacidad para desecar terrenos húmedos y la presencia de aceites esenciales en sus hojas, han llevado a su introducción en climas favorables y en ciertos casos a su comercialización (Font, 1973).

*Eucalyptus cinerea* es una subespecie de Eucalipto que presenta pocas descripciones en la medicina general ya que su uso principal es ornamental. Sin embargo, existen distintas investigaciones que han demostrado que el aceite esencial presente en las hojas de esta planta puede ser utilizado en la industria médica, cosmética y alimenticia. Los aceites esenciales son el resultado de las mezclas de distintos compuestos químicos orgánicos

sintetizados por las plantas. Se trata de sustancias líquidas, aromáticas, insolubles en agua y discretamente solubles en compuestos orgánicos (Mendes, Yae, Seigi, Frensch, Marques y Nakashima; 2011; Contreras, 2010).

Los aceites esenciales de las hojas de *Eucalyptus cinerea* tienen como compuesto químico principal el eucaliptol (1,8-cineol), también están presentes en concentraciones menores el limoneno;  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, y acetato de  $\alpha$ -terpineoles. Las concentraciones de estos compuestos químicos se ven afectadas por diferentes factores como la zona en que la planta ha sido recolectada, el proceso de secado, la temperatura, el clima, el desarrollo de la planta, el acceso al agua, entre otros (Mendes y cols, 2011).

Los diferentes compuestos encontrados en el aceite esencial extraído de las hojas de *Eucalyptus cinerea* tienen funciones antimicrobianas, antisépticas y propiedades expectorantes (Mendes y cols, 2011).

En la última década ha disminuido la producción de nuevos antibióticos de manera sustancial trayendo como consecuencia la resistencia a estos debido a la presencia de nuevos mecanismos defensivos presentes en bacterias, virus, hongos y protozoarios, con la finalidad de evitar la destrucción y muerte por estas sustancias. La resistencia bacteriana se ha presentado como un fenómeno creciente dado por diferentes factores tales como; el uso indiscriminado de la terapia antibacteriana, el empleo de los antibióticos en pacientes inmunosuprimidos, la falta de conocimiento de la población de estudio sobre la sensibilidad de los gérmenes en relación al antibacteriano, y en muchos casos, se evidencia la prescripción libre de medicamentos. Todos estos factores se relacionan con el aspecto social y económico, con el costo elevado de los tratamientos y con la dificultad de acceso a los centros de salud. En consecuencia, esto genera un aumento de la morbilidad y mortalidad en la población (Sussmann y cols, 2002; Fernández y cols, 2003).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto se genera la siguiente interrogante: ¿Cuál será la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de *Eucalyptus cinerea* en bacterias ATCC específicamente las especies *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, la cual será determinada y procesada en el Laboratorio de Actinomicetos y Laboratorio “A” Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf” del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, durante el periodo de febrero de 2018 a febrero de 2019?

### **Justificación e importancia de la investigación**

Desde la antigüedad se ha observado un amplio uso de plantas medicinales por su capacidad curativa ante distintas enfermedades presentes a lo largo de la historia. Actualmente el uso de estas ha tomado gran relevancia debido a su efectividad, bajo costo, accesible manipulación y por su aporte a industrias farmacéuticas ya que sus compuestos activos están presentes en la mayoría de los medicamentos.

Habitualmente la población venezolana hace gran uso de estas plantas mediante infusiones, ungüentos o la inhalación de los vapores desprendidos debido a su hervor, a pesar de la falta de conocimiento de los componentes químicos orgánicos y de la extensa utilidad que estos presentan.

Las bacterias son causantes de diversas enfermedades por lo cual se hace indispensable el uso de antibióticos, en la mayoría de los casos tales usos no son adecuados ya sea por la falta de conocimiento de la persona, el uso indiscriminado del medicamento, la libre prescripción médica, obteniendo como consecuencia la aparición de bacterias resistentes a estos medicamentos.

Por esto es de gran necesidad realizar investigaciones que permitan descubrir nuevas opciones para atacar dicha problemática, lo cual motiva a profundizar en el estudio de plantas como *Eucalyptus cinerea*, analizando los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial extraído de las hojas, para la posterior determinación de la actividad antibacteriana del mismo.

## **Objetivos de la Investigación**

### ***Objetivo general***

Confirmar la actividad antibacteriana y la composición química que presenta el aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea* sobre bacterias ATCC Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*).

### ***Objetivos específicos***

- Obtener el aceite esencial de las hojas frescas de la especie *Eucalyptus cinerea* mediante el método de Hidrodestilación simple con trampa de Clevenger.
- Identificar y cuantificar los componentes químicos del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea* mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* por el método de Difusión en Agar con discos (Kirby-Bauer) sobre bacterias ATCC Gram-positivas y Gram-negativas.

- Determinar la Concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea*, para cada una de las bacterias ATCC en estudio, a través de una serie de diluciones.

### **Alcances y Limitaciones de la investigación**

El alcance principal para el desarrollo de esta investigación es: Confirmar la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea*, con la finalidad de generar nuevos conocimientos que permitan crear posibles antibióticos y así combatir la resistencia bacteriana.

Las limitaciones principales para el desarrollo de esta investigación, pueden ser generadas por el alto costo y difícil adquisición de los reactivos e insumos necesarios para realizar el análisis del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* y determinación de la actividad antibacteriana.

Otro factor importante que puede significar una limitación en el tiempo de investigación pautado, es la posible suspensión de actividades de forma intermitente que impida el acceso al área de trabajo/investigación y los laboratorios que se encuentran en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis en la Universidad de Los Andes que se han asignado/aprobado para llevar a cabo esta investigación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Kahla, Zouari-Bouassida, Rezgui, Trigui y Tounsi (2017) en su investigación Eficacia de *Eucalyptus cinerea* como fuente de compuestos bioactivos para el control biológico curativo de la agalla de la corona causada por la cepa B6 de *Agrobacterium tumefaciens*, realizaron un análisis fitoquímico del aceite esencial de las hojas de la especie *E. cinerea* a su vez determinaron la actividad antibacteriana in vitro del mismo contra *A. tumefaciens*.

Esta investigación tuvo como resultado que el análisis del aceite esencial de la especie *E. cinerea* realizado arrojó la identificación de 32 compuestos que representan el 98,64 % del aceite. Presentó principalmente monoterpenos oxigenados e hidrocarburos monoterpenos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarburos sesquiterpenos.

El aceite esencial presentó como componentes principales el 1,8-cineol (61%) y canfeno (15,13%) y en menor proporción  $\alpha$ -terpineol, globulol,  $\alpha$ -pineno, trans-pinocarveol.

Sebei, Sakouhi, Herchi, Khouja y Boukhchina (2015) en su estudio Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de siete especies de *Eucalyptus* desarrolladas en Túnez (*Eucalyptus lehmannii*, *Eucalyptus leucoxylon*, *Eucalyptus astringens*, *Eucalyptus cinerea*, *Eucalyptus maidenii*, *Eucalyptus sideroxylon*,

*Eucalyptus biscotata*) determinaron la composición química y el rendimiento de los aceites esenciales de las siete especies de *Eucalyptus*. Investigaron también, las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales contra un gran panel de microorganismos, incluidos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6539), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (29212), *Listeria ivanovii* (RBL 30), *Bacillus cereus* (ATCC 11778).

Esta investigación tuvo como resultado que el rendimiento de los aceites esenciales osciló entre el 1,2 % y el 3,0 % (p/p) para las diferentes especies de *Eucalyptus*. El mayor rendimiento se obtuvo de *E. cinerea* y *E. sideroxylon* (3,0 %), seguido de *E. lehmannii* (2,8 %), mientras que *E. astringens*, dio el rendimiento más bajo con el 1,2 %. De acuerdo con estos resultados, confirmaron que no existe una relación entre la región y el rendimiento del aceite esencial de *Eucalyptus*. De hecho, las especies de una misma región muestran diferentes rendimientos (*E. sideroxylon*, *E. astringens* y *E. cinerea*).

Demostraron también, que los rendimientos de los aceites esenciales variaron según las especies y las estaciones en las que se recolectaron sus hojas. Obteniendo altos rendimientos de las hojas recogidas en la temporada de verano, aunque *E. astringens* dio rendimientos bastantes constantes durante el invierno (1,23 % para la primavera y 1,1 % para el invierno).

En cuanto a la composición química de los aceites esenciales extraídos de las especies de *Eucalyptus* de la región de Bizerte, demostraron contener  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, *trans*-pinocarveol. El 1,8-cineol se obtuvo de *E. maidenii* (83,59 %) seguido de *E. cinerea* (79,18 %) y *E. lehmannii* (49,07 %), mientras que *E. astringens* dio la tasa más baja (60,01 %). Aunque todas las especies son de la misma región muestran diferencias en los niveles de algunos compuestos de aceites esenciales.

Los aceites esenciales extraídos de especies de *Eucalyptus* del jardín botánico de la región de Ain Draham (*E. sideroxylon* y *E. biscotata*), tienen el

mismo nivel de 1,8-cineol y las especies del jardín botánico de la región de Korbous (*E. lehmannii*) tienen la tasa más baja de 1,8-cineol (49,07 %) y el nivel más alto de  $\alpha$ -pineno (26,35 %).

Con respecto a la actividad antibacteriana, los resultados revelaron que los aceites esenciales mostraron actividad antibacteriana con una magnitud variable dependiendo del tamaño de los inóculos. El diámetro del halo de inhibición de los aceites esenciales de las especies de Eucalipto varió de 10 a 29 mm. El halo de inhibición más grande se obtuvo para *Bacillus cereus* (*E. astringens*) y la más baja para *Staphylococcus aureus* (*E. cinerea*). Los aceites esenciales de *E. maidenii*, *E. astringens*, *E. cinerea* (de la región de Bizerte), y *E. biscotata* (de la región de Ain Draham), mostraron la mayor actividad antibacteriana contra *Listeria ivanovii* y *Bacillus cereus*.

Soliman, Fathy, Salama y Saber (2014) en su estudio Composición química y bioactividad del aceite volátil de las hojas y tallos de *Eucalyptus cinerea*, definen la composición química del aceite esencial de las hojas y de los tallos de *E. cinerea* para identificar su quimiotipo y determinan la actividad antioxidante *in vivo* y la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales estudiados contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.

Esta investigación tuvo como resultado, que los aceites volátiles obtenidos de las hojas y de los tallos de *E. cinerea*, fueron cualitativamente similares pero difirieron cuantitativamente. Ambos aceites son ricos en compuestos oxigenados (93,00 % y 80,90 % en hojas y tallos respectivamente). El 1,8-cineol fue el principal monoterpeno identificado (84,55 % y 60,15 % en las hojas y en los tallos respectivamente). El  $\alpha$ -terpineol se detectó en el aceite de tallo (8,55 %) en una concentración mayor que la de las hojas (2,14 %).

También encontraron, acetato de terpinilo en el aceite de los tallos en una cantidad relativamente mayor (7,70 %) que la del aceite de las hojas (4,9 %). El globulol fue mayor en el aceite de tallo (1,89 %) que en las hojas (0,22 %). En contraste,  $\alpha$ -citral y  $\beta$ -citral solo se detectaron en el aceite del tallo. Se detectaron otros compuestos oxigenados en cantidades relativamente pequeñas como geranato de metilo (0,25 % y 0,94 %) y terpinen-4-ol (0,79 % y 0,87 %) en los aceites de las hojas y tallos, respectivamente.

El porcentaje de hidrocarburos alcanzó el 6,01% de la composición total en los aceites de los tallos y el 11,22 % de la composición total en los aceites de las hojas. El limoneno se detectó en una cantidad relativamente mayor en el aceite de hojas juveniles que en los tallos (1,50 % y 1,19 %).

Demostraron también, que el aceite de las hojas mostró un mayor efecto antibacteriano contra los organismos analizados que el de los tallos. El aceite volátil de las hojas mostró una actividad pronunciada contra *Streptococcus faecalis*, seguido de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. También mostró una actividad antifúngica moderada contra *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.

En consecuencia, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del aceite de las hojas, el cual registró valores bajos 5,2, 5,6, 4 y 4,8 mL/mL contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. faecalis* y *Candida albicans* respectivamente y un valor moderado (12,8 mL/mL) contra *A. flavus*. Estos resultados evidenciaron que el aceite volátil de las hojas posee un potente antimicrobiano.

Revelaron una actividad antioxidante significativa para ambas muestras; sin embargo, el aceite volátil de las hojas es más poderoso que el de los tallos. Esto se debe posiblemente, a un mayor contenido de 1,8-cineol en el aceite de las hojas.

Elaissi, Rouis, Salem, Mabrouk, Salem, Salah, Aouni, Farhat, Chemli, Harzallah y Larbi (2012) en su estudio Composición química del aceite esencial de 8 especies de *Eucalyptus* y la evaluación de las actividades antibacterial, antifúngica y antiviral, definen la composición química del aceite esencial de hojas recolectadas y trituradas de *Eucalyptus bicostata*, *Eucalyptus cinerea*, *Eucalyptus maidenii*, *Eucalyptus odorata*, *Eucalyptus sideroxylon*, *Eucalyptus astringens*, *Eucalyptus lehmannii*, *Eucalyptus leucoxylon*, revelaron que *E. cinerea* resultó ser la especie más rica en 1,8-cineol (70,4%), mientras que *E. odorata* resultó ser la especie más rica en criptona.

Esta investigación tuvo como resultado que la actividad de los aceites esenciales de los Eucaliptos varió significativamente dentro de las especies y dentro de las cepas, teniendo como resultado que las bacterias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* fuesen las más resistentes a todos los aceites, mientras que las cepas clínicas *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y todas las cepas de hongos ensayados fueron más sensibles a *E. odorata*.

Además, descubrieron que el aceite esencial de *E. odorata* tuvo mayor citotoxicidad, y que los aceites esenciales de *E. maidenii*, *E. sideroxylon* y *E. cinerea* fueron los menos tóxicos. El aceite esencial de *E. bicostata* demostró tener la mejor actividad antiviral.

Mendes, Yae, Seigi, Frensch, Marques y Nakashima (2011) en su estudio Aceites esenciales de las diferentes partes de la planta de *Eucalyptus cinerea*. F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) como fuente de 1,8-cineol y sus bioactividades, definen la composición química de las muestras de aceites esenciales de las partes aéreas como hojas, flores y

frutos de *Eucalyptus cinerea*, a partir de las partes aéreas recolectadas durante las cuatro estaciones del año.

Probaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en estudio, contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*), bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y levaduras (*Candida albicans*).

Esta investigación tuvo como resultado que *Eucalyptus cinerea* es una especie que puede emplearse como una fuente de 1,8-cineol, ya que las partes aéreas de esta planta (hojas, flores y frutos) revelaron ser ricas en este compuesto en todas las estaciones del año, alcanzando un máximo de concentración de 85,3 % en el aceite esencial.

Revelaron también, que las muestras de los aceites esenciales obtenidos tuvieron potencial antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y levaduras, siendo el microorganismo más sensible *Streptococcus pyogenes*, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, mientras que la cepa de *Escherichia coli* fue la más resistente en la selección preliminar utilizando el método de difusión en disco.

Lima (2005) en su estudio Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de Eucalipto trabajados en seco a nivel del laboratorio y a nivel de planta piloto en la extracción de su aceite esencial, realizaron la extracción del aceite esencial de dos especies de eucalipto en seco (*Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cinerea*) analizándolos con el aparato de extracción denominado Neoclevenger utilizando el método de arrastre de vapor directo para determinar la factibilidad de extracción industrial de dicho aceite.

Esta investigación tuvo como resultado que los aceites esenciales obtenidos de cada una de estas especies determinadas tienen diferencias físicas y químicas, pero lo más evidente que se pudo detectar es el porcentaje de rendimiento en relación a la cantidad de aceite esencial obtenido en función de la cantidad de materia prima utilizada, ya que el rendimiento de *Eucalyptus cinerea* es 4,68 veces mayor al rendimiento de *Eucalyptus globulus*.

Peñaloza y Mora (2002) en su investigación Estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de 3 especies del género *Eucalyptus* (*E. globulus*, *E. robusta* y *E. cinerea*) valoraron la actividad antimicrobiana de cuatro de los aceites esenciales del género *Eucalyptus* del Estado Mérida: *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus robusta* y *Eucalyptus cinerea*, sobre 20 cepas de *Staphylococcus aureus* y 20 cepas de *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes de origen nosocomial, empleando el método del agar perforado.

Esta investigación tuvo como resultado que todos los aceites probados demostraron excelente actividad inhibitoria frente a los crecimientos bacterianos de las cepas Gram-positivas (*S. aureus*), donde el aceite esencial proveniente de *E. cinerea* produjo halos de inhibición de mayor tamaño en aproximadamente el 70 % de las cepas de *S. aureus*.

Asimismo, demostraron que sólo los aceites de *E. globulus* y de *E. robusta* tuvieron capacidad inhibitoria sobre los crecimientos bacterianos de las cepas *K. pneumoniae*, en los que el 60 % de estas cepas inhibidas por el aceite provino de la especie *E. globulus*.

### **Antecedentes Históricos**

La utilización de las plantas medicinales se remonta a la edad de piedra. Los hombres de todas las eras han tenido algún conocimiento y mostraron

interés por ellas. Existen documentos e inscripciones de Babilonia, Egipto, India, China, Grecia y Roma que hacen referencias sobre las plantas con propiedades curativas (Acosta, 1993).

Durante el siglo XV el padre de la Medicina Moderna y la Farmacoquímica, Paracelso, enunció su *Teoría de las Signaturas*, expresando que “Dios creó las plantas y también proporcionó la clave, en su apariencia y morfología, para saber cuál es la virtud interna por lo cual podrían aplicarse a determinados males” (Albornoz, 1980).

Los griegos estaban familiarizados con muchas de las drogas que se conocen aun en la actualidad. Trabajos realizados por, Hipócrates, conocido como el padre de la medicina moderna; Aristóteles; Tefrasto, en su tratado *Historia de las plantas*, tuvo gran influencia en el desarrollo de la botánica y la medicina durante 20 siglos y Dioscórides, cuya influencia fue abrumadora hasta el Renacimiento, escribió su tratado de materia médica que contiene 600 especies vegetales y relata todas las sustancias conocidas en su tiempo (Acosta, 1993).

## **Bases Teóricas**

### ***Descripción botánica de la familia Myrtaceae***

La familia Myrtaceae se compone de aproximadamente 3800 especies de las cuales casi 700 son del género *Eucalyptus*, cuyos tejidos se caracterizan por la presencia de glándulas secretoras de aceites esenciales. Los aceites esenciales de la familia Myrtaceae se caracterizan por tener variedad de utilidades en las áreas de perfumería, agroalimentación o química fina, sus aceites esenciales le confieren a menudo propiedades antisépticas utilizadas en la industria del medicamento (Bruneton, 2001).

Esta familia se compone de árboles o arbustos, raramente sub-arbustos, frecuentemente ericoideos. Hojas indivisas, de composición variable, glanduloso-punteadas, sin estipulas o raras veces con estipulas muy pequeñas. Sus flores generalmente son regulares y hermafroditas (Badillo y Schnee, 1972).

Sus sépalos pueden ser libres o unidos en la base, de prefloración abierta, imbricada o cerrada. Los pétalos son de 3 a 6, generalmente libres, imbricados a veces concrescentes en forma de gorro o pétalos ausentes. Los estambres son numerosos. Las anteras son habitualmente versátiles, abriéndose por dos hendiduras longitudinales o por poros terminales. El ovario es principalmente ínfero, de 1-5 óvulos. El fruto en baya o en capsula, raras veces es drupáceo o nuciforme. Las semillas pueden presentarse sin albumen o con escaso albumen. El embrión es recto o curvo (Badillo y Schnee, 1972).

### ***Descripción botánica y geográfica del género Eucalyptus***

El género *Eucalyptus* originario de Australia, se ha introducido en zonas subtropicales debido a la calidad de su madera, su facilidad de crecimiento y secar terrenos. Su tronco, de color gris ceniza, es alto y recto de follaje siempre verde, pudiendo alcanzar de 50 a 100 cm de altura y de 20 a 30 cm de diámetro, sus hojas son bifformes en plantas jóvenes, son de color verde glauco, de limbos ovales u oval-oblongos, opuestos, sésiles y recubiertos de cera. Todas las hojas contienen glándulas ricas en aceite esencial (Bravo, 2006).

El *Eucalyptus* fue descubierto por Labillardiere en Tasmania, en 1792. Durante un tiempo prolongado se le consideró solamente como una curiosidad. Fue en 1854, cuando se comenzó a utilizar la especie con fines sanitarios, entrando en la terapéutica en 1865 (Gómez, 1977).

### ***Descripción botánica de la especie Eucalyptus cinerea***

*Eucalyptus cinerea*, conocido también como Eucalipto Azul o Eucalipto Plateado, es un árbol que llega a medir hasta 10 m de altura, es aromático con fuerte olor a mentol o a limón maduro. Presenta un tallo ramificado casi desde la base y hojas color glaucoplateado, simples opuestas, sésiles, casi redondeadas de forma ovadas u obovadas, ápice agudo cuando la hoja esta joven. Las flores son de color blanco-crema, organizadas en grupo de tres, axilares y su fruto tipo capsula pxicidio, pequeños hasta 6 mm de longitud (Fonnengra y Botero, 2006).

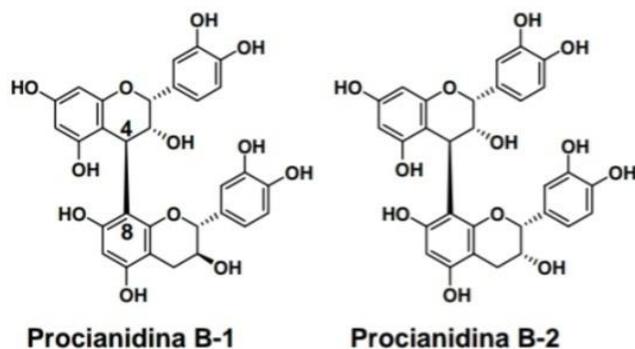
### ***Composición química de la especie Eucalyptus cinerea***

Esta planta contiene agua (5-10 %), minerales (5 %) y numerosos compuestos químicos, como taninos, triterpenos, flavonoides y cumarinas, pero sus componentes principales son los aceites esenciales. El componente mayoritario de dicho aceite es el eucaliptol o 1,8-cineol (70-80 %), que se encuentra acompañado de monoterpenos ( $\alpha$ -pineno), sesquiterpenos (eudesmol), pequeñas cantidades de alcoholes alifáticos, aldehídos y cetonas (Bravo, 2006).

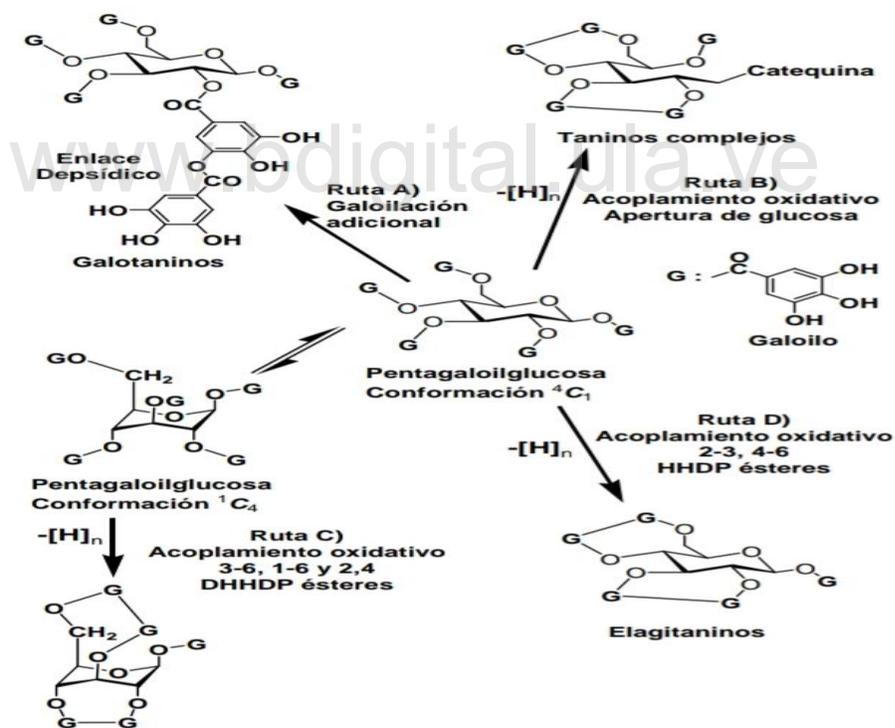
A continuación, se definirán los componentes químicos encontrados en la especie:

**Taninos:** Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en varios sectores del reino de las plantas superiores, también conocidos como polifenoles vegetales, estando presentes en varias familias incluyendo Myrtaceae. Se distinguen por ser solubles en agua, masa molecular entre 500 y 5000, estructura y carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa), complejación intermolecular (astringente) y se divide en dos grupos

estructurales principales: proantocianidinas o taninos condensados y taninos hidrolizables (Isaza, 2007).



**Figura 1.** Proantocianidinas o taninos condensados. **Fuente.** Tomado y modificado de Isaza (2007).



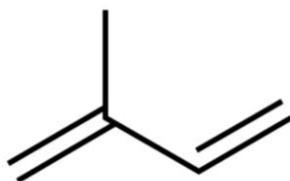
**Figura 2.** Taninos hidrolizables o pirogálicos. **Fuente.** Tomado y modificado de Isaza (2007).

Los taninos, han sido durante años los extraíbles mejor aprovechados de la corteza de los árboles, considerada desperdicio. El tipo y el contenido de

tanino varían por factores diversos como la edad, especie, condiciones del árbol que se trate, pero principalmente se concentran en la corteza. Aunque el uso tradicional de los taninos ha sido en la curtiduría, actualmente se ha desarrollado una gran variedad de usos, como son: la elaboración de productos químicos, como mordiente y fijador en la industria textil, en la fabricación de las tinas, en productos farmacéuticos, como agente clarificador en la elaboración del vino, se emplea además como anti diarreico, cicatrizante y otras aplicaciones en medicina (Pedraza, Ochoa, Flores y Rutiaga, 2006).

**Terpenos:** Son metabolitos secundarios de un gran número de organismos y su actividad alelopática ha hecho que sean una gran fuente de desarrollo de agroquímicos basados en compuestos naturales (García, 2014).

Hablando en un sentido amplio, el término terpeno comprende a todos los compuestos que tienen una relación estructural con la molécula del isopreno: el 2-metil-1,3-butadieno puede considerarse el isopreno como la forma insaturada del isopentano y las estructuras terpénicas, como aquellas constituidas por dos o más unidades isoprénicas ligadas en diversas maneras, con diferentes tipos de cierres de anillos, con diferente grado de insaturaciones y con distintos grupos funcionales (Albornoz, 1980).

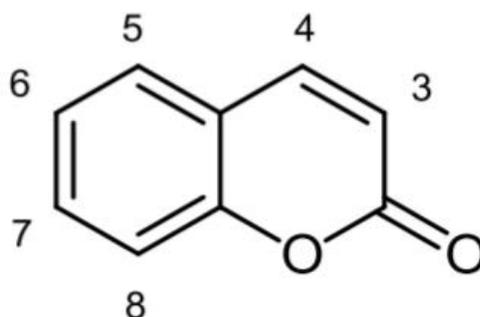


**Figura 3.** Estructura molecular simplificada del isopreno. **Fuente.** Tomada y modificada de Albornoz (1980).

**Triterpenos:** Los triterpenoides están ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal en forma libre o como ésteres y glicósidos. Los triterpenos son los terpenos de 30 carbonos. Son por lo general formados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola (Marcano y Hasegawa, 2002).

**Cumarinas:** Las cumarinas conocidas también como benzopironas, son una familia de compuestos de origen natural y sintético que han suscitado desde mucho tiempo un gran interés debido a sus posibles aplicaciones biológicas. En las plantas se pueden encontrar en general en las raíces, hojas, frutos y flores (Serra, 2012).

Las cumarinas son una gran clase de lactonas constituidas por un anillo de benceno condensado a un anillo  $\alpha$ -pirona y especialmente poseen un sistema  $\pi$ - $\pi$  conjugado rico en electrones, que posee buenas propiedades de transporte de carga. Estas se producen de forma natural en plantas y microorganismos, y se han aislado aproximadamente 1000 derivados de más de 800 especies (Matos, 2013).



**Figura 4.** 2H-1-benzopiran-2-ona (cumarina). **Fuente.** Tomada y modificada de Matos (2013).

### ***Generalidades de los aceites esenciales***

Los aceites esenciales son sustancias líquidas que resultan de la mezcla de una variedad de compuestos químicos orgánicos, que son sintetizados por las plantas. Los compuestos de los aceites esenciales se caracterizan por ser volátiles, poco densos, no grasos, aromáticos, insolubles en agua y no son tóxicos. (Contreras, 2010).

Los géneros que pueden sintetizar los componentes de los aceites esenciales son un número limitado de familias como Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Poacea, Piperaceae, entre otras. Estos aceites esenciales se encuentran en las flores, hojas, cortezas, leños, raíces, rizomas, frutos y semillas; y aunque las plantas provenientes de una misma especie contienen aceite esencial, varían los componentes debido a su localización. (Bruneton, 2001).

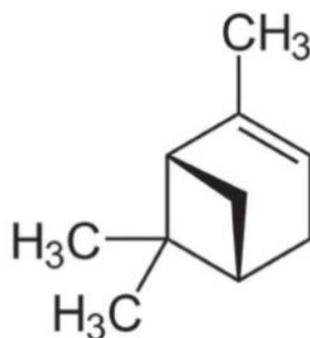
Generalmente la presencia de estructuras histológicas sobre la superficie de las plantas, como las células con aceites esenciales de Lauraceae, glándulas secretoras de Myrtaceae o Rutaceae, pelos secretores de Lamiaceae, tienen que ver con la producción de los aceites esenciales. (Bruneton, 2001).

### ***Componentes de los aceites esenciales***

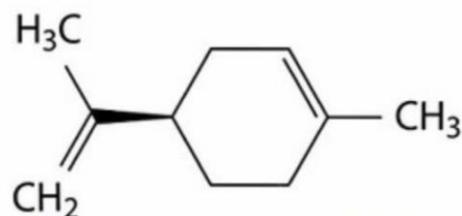
Los constituyentes principales de los aceites esenciales pertenecen a dos grupos de origen biogénicos, el grupo de los terpenoides y el grupo de los compuestos aromáticos que provienen del fenilpropano.

- a) Terpenoides: Aquellos que tengan una masa molecular baja como los monoterpenos y los sesquiterpenos son los que se encuentran en los aceites esenciales.

Alfa-pineno



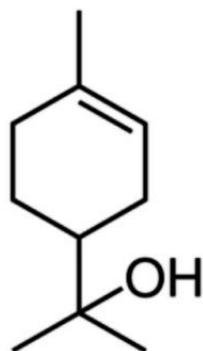
Limoneno



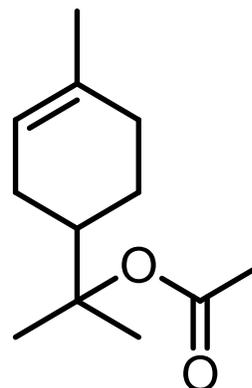
**Figura 5.** Terpenos presentes en el aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*. **Fuente.** Tomado y modificado de Bruneton (2001).

- Monoterpenos: Mayormente se encuentran hidrocarburos, pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. Los monoterpenos están compuestos por numerosas moléculas funcionales:
  - Alcoholes: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.
  - Aldehídos: acíclicos.
  - Cetonas: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.
  - Éteres: dill éter, éteres cíclicos, tetrahidrofuránicos o di y tetrahidropiránicos.
  - Peróxidos.
  - Fenoles.
- Sesquiterpenos: las variaciones estructurales son las mismas que en los monoterpenos, presentando los hidrocarburos, alcoholes y cetonas como los más frecuentes.

*Alfa-terpineol*



*Alfa-terpenil-acetato*



**Figura 6.** Monoterpenos presentes en el aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*. **Fuente.** Tomado y modificado de Bruneton (2001).

- b) Compuestos aromáticos: estos compuestos provenientes del fenilpropano (C3-C6) se encuentran con menor frecuencia al compararlos con los terpenoides. Consta de alil- y propenilfenoles y aldehídos.
- c) Compuestos procedentes de la degradación de ácidos grasos: es el resultado de la transformación de las moléculas no volátiles, contribuyendo a los aromas de los frutos y hojas por lo cual los aceites esenciales la contienen de ser arrastrados por aceites esenciales (Bruneton, 2001).

### ***Componente mayoritario del aceite esencial de la especie***

#### ***Eucalyptus cinerea (1,8-cineol)***

El principal componente de dicho aceite esencial es el 1,8-cineol, un monoterpenoide con estructura de éter bicíclico incoloro e inmiscible en agua. Sin embargo, es soluble en etanol y en cloroformo. Su punto de

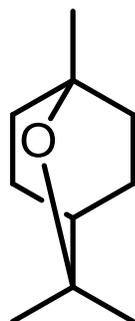
ebullición es de 176,5 °C y su punto de Flash es de 49 °C. En cuanto a sus propiedades organolépticas, tiene un suave olor a alcanfor y es tóxico por ingestión a dosis elevada (García, 2014).

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas del 1,8-cineol.

Formula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
Masa molar	154,249 g/mol
Densidad	0,9225 g/cm <sup>3</sup>
Punto de fusión	1,5 °C
Punto de ebullición	176,5 °C

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

El 1,8-cineol al igual que un gran número de monoterpenoides tiene su efecto fitotóxico derivado de una interacción alelopática negativa, es decir la liberación por parte de un organismo de componentes bioquímicos capaces de influir en el crecimiento o la supervivencia de otros organismos (García, 2014).



**Figura 7.** Estructura química del 1,8-cineol. **Fuente.** Tomado y modificado de García (2014).

### ***Obtención de los aceites esenciales***

Los aceites esenciales se obtienen por los siguientes métodos: hidrodestilación o destilación con agua, destilación con agua-vapor, destilación con arrastre de vapor, extracción con solventes volátiles,

hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, por expresión de los epicarpios de Citrus, método de prensado, método de enflorado o enfleurage y extracción con fluidos súper críticos (Rodríguez, 2012).

- a) Hidrodestilación o Destilación con agua: es un método de extracción que consiste en sumergir el material vegetal en agua, llevar a estado de ebullición el agua, la cual penetra en la planta, disolviendo el aceite esencial presente en las estructuras que lo contienen; los vapores desprendidos se condensan en una superficie fría y el aceite esencial se separa y es recolectado.
- b) Destilación con agua-vapor: es un método en el cual el material vegetal, se coloca sobre una malla que no permite el contacto directo con el agua. El agua es llevada a ebullición, y el vapor generado pasa a través de la planta evitando que el material vegetal se quemé y llevando a cabo la extracción de la esencia.
- c) Destilación por arrastre de vapor: permite obtener aceites esenciales con buenos rendimientos, siendo este método la destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles a través de la vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada componente volátil, por efecto de una corriente directa de vapor de agua.
- d) Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas: consiste en sumergir el material vegetal en agua en un equipo de destilación tipo Clevenger. Se lleva el agua a ebullición, produciendo vapor que penetra el material vegetal permitiendo la evaporación del aceite esencial, posteriormente se condensa y se colecta (Contreras, 2010).
- e) Expresión de los epicarpios de Citrus: consiste en ejercer bajo una corriente de agua sobre la superficie del fruto, se eliminan los desechos sólidos y el aceite esencial es separado de la fase acuosa obtenida por centrifugación.

- f) Método de prensado: el material vegetal es exprimido mecánicamente, para la obtención del aceite, procediendo a recolectarlo y filtrarlo.
- g) Extracción con solventes volátiles: en este método el material vegetal luego de ser secado y molido es puesto en contacto con solventes como cloroformo o alcohol, los cuales solubilizan el aceite esencial, pero a su vez extraen otras sustancias como grasas, obteniéndose una esencia impura.
- h) Método de enflorado o enfleurage: consiste en poner en contacto con una grasa al material vegetal. La esencia se solubiliza en la grasa la cual actúa como vehículo extractor, obteniéndose el aceite esencial y grasa, siendo posteriormente separada por otros medios fisicoquímicos.
- i) Extracción con fluidos súper críticos: el material vegetal es cortado en trozos, licuado o molido, se envuelve en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra, un fluido súper crítico como el CO<sub>2</sub> el cual actúa como solvente extractor y es eliminado por descompresión progresiva, obteniendo una esencia cuyo grado de pureza dependerá de las condiciones de la extracción (Rodríguez, 2012).

### ***Métodos de separación e identificación de los componentes de los aceites esenciales***

Entre los métodos que permiten separar e identificar los componentes presentes en los aceites esenciales se encuentran:

- a) La cromatografía de gases

Es una técnica que permite separar e identificar los componentes de una muestra. Siendo uno de los métodos de análisis más eficaces, debido a que permite la separación de cantidades mínimas (Reyes 2010).

La muestra en la cromatografía de gases se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte y pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La columna se encuentra dentro de un horno a una temperatura dada. Cada soluto presente en la muestra tiene diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo cual permite su separación ya que los componentes fuertemente retenidos por esta fase se movilizan lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente (Gutiérrez y Droguet, 2002).

b) La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas:

Es una técnica de separación de mezclas muy complejas. La espectrometría de masas puede identificar cualquier sustancia pura. La utilización de este método trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan pequeñas cantidades de muestras. La muestra inyectada en el cromatógrafo de gases es separada en la columna cromatográfica obteniendo una elución de los componentes individuales que pasan al espectrómetro de masa donde cada componente se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

### ***Índice de Kováts***

Son índices de retención cromatográficas, que se basan en la medición de tiempos de retención relativos con respecto a los de una serie homóloga de *n*-parafinas, corridas bajo las mismas retenciones cromatográficas experimentales que las de la muestra (Martínez y Stashenko, 2010).

### ***Importancia de los aceites esenciales***

La utilización de medicamentos y la resistencia presentada por algunos microorganismos patógenos, ha llevado a la búsqueda de plantas medicinales y productos derivados como una opción de tratamiento y

prevención de los principales males que aquejan a la población (Gutiérrez, 2010).

En esta búsqueda ha tomado gran relevancia las plantas aromáticas y en especial sus aceites esenciales, los cuales debido a la presencia de principios activos han demostrado tener variedades de aplicaciones, siendo la más relevante su actividad terapéutica (Gutiérrez, 2010).

Los aceites esenciales actualmente son utilizados ampliamente como insumos o materias primas en la industria cosmética, de perfumes, de aseo y limpieza, de plásticos, de pinturas, entre otras, dándole la fragancia a los diferentes productos. En las industrias de alimentos, licores, medicamentos, tabacos y cigarrillos, aportan aromas y sabores, en la industria de biocidas, disolventes y petroquímica, contribuyen con diferentes actividades químicas (Torres, 2011).

### ***Propiedades farmacológicas de los aceites esenciales***

- a) Poder antiséptico: se manifiesta frente a diversas bacterias patógenas, incluso a cepas habitualmente resistentes a los antibióticos. Entre los aceites esenciales antisépticos se encuentran el de la canela, tomillo, clavo, lavanda o eucalipto (Bruneton, 2001).
- b) Propiedades espasmolíticas y sedantes: grandes cantidades de drogas junto a aceites esenciales son eficaces para disminuir o suprimir los espasmos gastrointestinales, como también estimulan en otros casos la secreción gástrica, mejora de insomnios y trastornos psicósomáticos (Bruneton, 2001).
- c) Propiedades irritantes: productos como la esencia de trementina utilizados por vía atópica aumentan la microcirculación, en algunos casos ligera acción anestésica local. Por lo cual actualmente existen pomadas, cremas o geles a base de aceites esenciales. Administrados

por vía interna, los aceites esenciales desencadenan fenómenos de irritación a diferentes niveles (Bruneton, 2001).

### ***Propiedades medicinales de la especie Eucalyptus cinerea***

Las hojas de Eucalipto tienen propiedades expectorantes y antisépticas respiratorias, debido a los aceites esenciales y a su principio activo, eucaliptol. Recientemente, también se le atribuye una acción hipoglucemiante. Se utilizan las hojas en forma de infusión e inhalación para tratar afecciones del aparato respiratorio, esta infusión presenta además, una acción astringente, por la presencia de taninos, sobre todo para la mucosa inflamada (Bravo, 2006).

El aceite esencial se utiliza en forma de inhalaciones y gotas nasales en resfriados, bronquitis y en general en problemas respiratorios, tanto en uso externo e interno, solo o asociado a otros fármacos como antibióticos y analgésicos (Bravo, 2006).

### ***Generalidades de las bacterias***

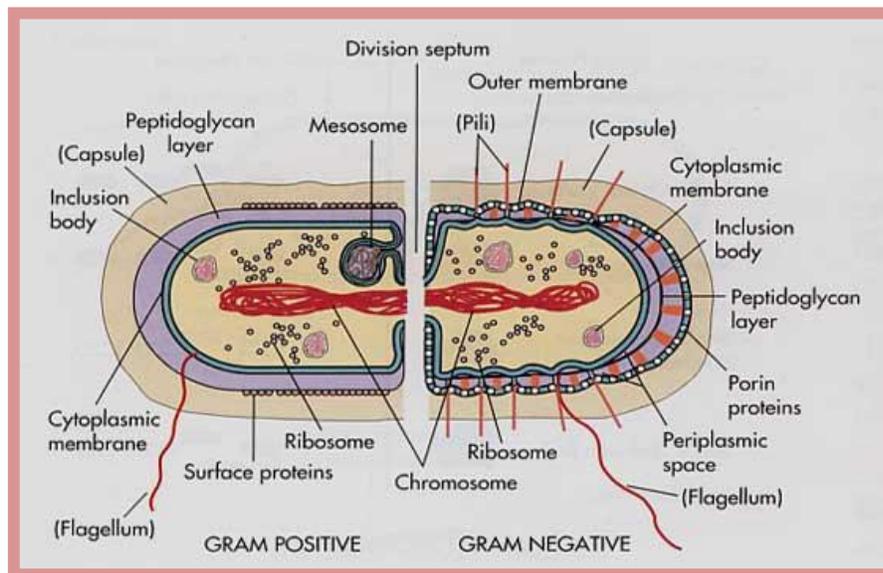
Las bacterias son estructuras unicelulares generalmente menores a 5 mm, que se reproducen por medio de un proceso asexual denominado fisión binaria que se encuentran constituidos por una serie de componentes, los cuales forman el exterior e interior de este microorganismo procarionte (Lucana y Huanca, 2014).

Presentan una especie de envoltura que las rodea exteriormente con una disposición de adentro hacia fuera, comenzando con la membrana citoplasmática, pared celular y una sustancia extracelular llamada glicocalix. A su vez, el interior de la bacteria presenta el citoplasma, los ribosomas y el ADN cromosómico, estructuras que son elementos permanentes e indispensables para la vida de la bacteria (Lucana y Huanca, 2014).

Existen otros componentes llamados elementos facultativos o estructuras variables que difieren en los diferentes microorganismos, ya que pueden o no estar presentes, se encuentran flagelos, fimbrias o pilis que son denominados apéndices de las bacterias, así como la cápsula, las endoesporas y las inclusiones citoplasmáticas (Lucana y Huanca, 2014).

La clasificación bacteriana puede ser favorecida por la aplicación de un procedimiento denominado tinción Gram que utiliza como colorantes principales la violeta genciana y la safranina (Lucana y Huanca, 2014).

Por medio de esta técnica se realiza la división laboratorial de las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo a la capacidad de tinción que presentan, se encuentran bacterias Gram-positivas, poseen múltiples capas de peptidoglucanos que se encuentran formando su pared celular permitiendo de esta manera que al finalizar el procedimiento de tinción se tiñan de color violeta, y las Gram-negativas que solo presentan una capa fina de peptidoglucano, tiñéndose de color rosado (Lucana y Huanca, 2014).



**Figura 8.** Pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

**Fuente.** Tomado y modificado de Murray, P; Rosenthal, K. y Pfaller, M (2009).

## **Características generales de las bacterias a utilizar en el presente estudio**

### **Bacterias Gram-positivas**

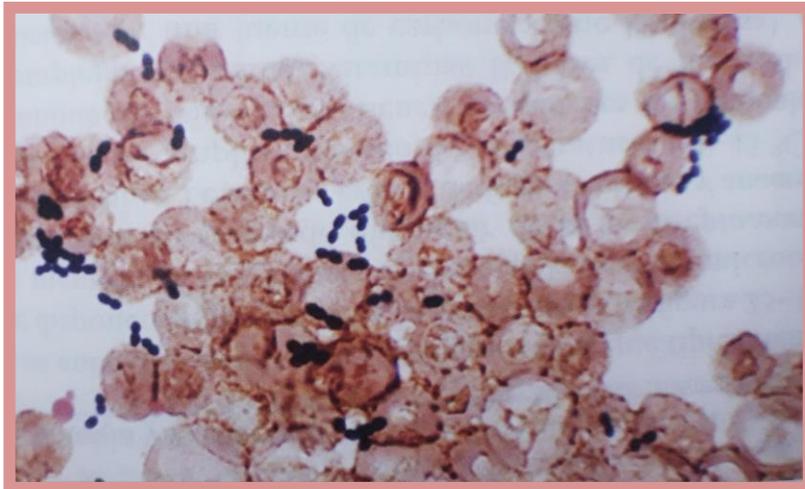
Existe gran variedad de bacterias Gram-positivas, de la cuales solo se trabajaran con dos especies: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

### ***Enterococcus faecalis***

El género *Enterococcus* está compuesto por 33 especies, las más frecuentes son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* pues causan, entre ambos, aproximadamente el 90 % de los aislamientos clínicos (Díaz, Rodríguez y Zhurbenko, 2010).

*Enterococcus faecalis*, son bacterias Gram-positivas, de forma esféricas u ovoides, cocos, no formadores de esporas, se presentan en pares o en cadenas cortas, no motiles, anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismo incluyendo al hombre, aunque pueden encontrarse en el tracto genitourinario y en la saliva (Díaz y cols, 2010).

Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar una gran variedad de enfermedades infecciosas, pueden adaptarse a vivir en los ambientes más hostiles, incluso en presencia de niveles letales de sales biliares y detergentes (Díaz y cols 2010).



**Figura 9.** Bacteria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*. **Fuente.** Tomado y modificado de Murray, P; Rosenthal, K. y Pfaller, M (2009).

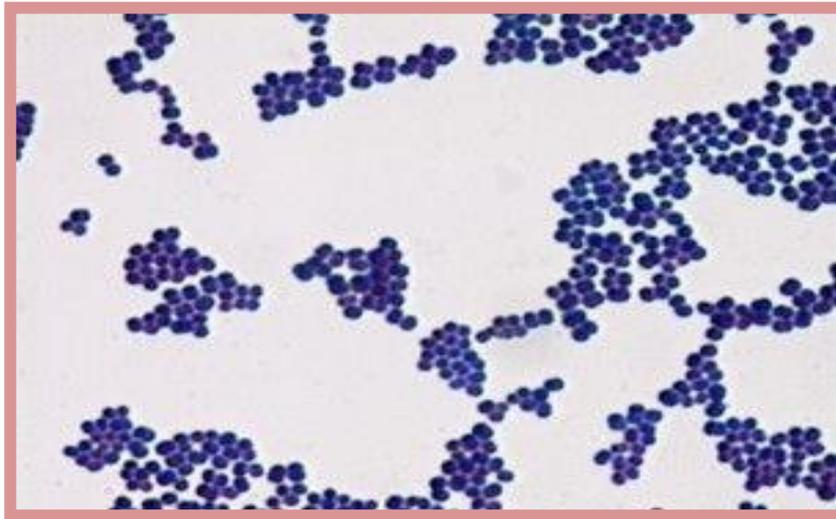
### ***Staphylococcus aureus***

El género *Staphylococcus* perteneciente a la familia Micrococcaceae comprende aproximadamente 32 especies y 15 subespecies; las especies de mayor relevancia médica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aprophyticus*. Son bacterias en forma de grano que se agrupan en racimos, están dentro de los microorganismos Gram-positivos, no forman esporas, pilis ni flagelos, algunas cepas pueden formar cápsulas en condiciones especiales, pueden ser aerobios y anaerobios (Romero, 2007).

Desde el punto de vista de la medicina, *Staphylococcus aureus* es la bacteria más importante del género, que a diferencia de las otras especies, produce coagulasa, mientras que las otras son coagulasas negativas. La coagulasa es una proteína capaz de coagular al plasma citrato u oxalato, con factores presentes en el suero (Romero, 2007).

La importancia de estas bacterias radica en que es un agente que causa numerosas infecciones en el hombre. Pueden producir procesos

inflamatorios supurativos en casi cualquier tejido. Además, son causante de toxinas que provocan cuadros clínicos de muy diversas manifestaciones y desarrollar resistencia a una gran variedad de antimicrobianos (Romero, 2007).



**Figura 10.** Bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. **Fuente.** Tomado y modificado de Murray, P; Rosenthal, K. y Pfaller, M (2009).

### **Bacterias Gram-negativas**

Existe gran variedad de bacterias Gram-negativas, de las cuales solo se trabajaran con tres especies: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

#### ***Escherichia coli***

El género *Escherichia* está formado por las especies: *Escherichia coli* y *Escherichia hermannii*. La *Escherichia coli* es la bacteria que se encuentra frecuentemente en las materias fecales del hombre y de muchas especies animales. Su nicho ecológico natural es en el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en la calidad de sobrio sin causar daño (Romero, 2007).

Muchas cepas de *E. coli* producen sustancias que son útiles al hospedero, como son las colicinas, que tienen efecto inhibitorios sobre otras cepas potencialmente patógenos, por lo que la colonización del intestino es benéfica para el hospedero (Romero, 2007).

*Escherichia coli* es un bacilo Gram-negativo, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forma fimbrias y pilis, muchas cepas producen una microcápsula, y muy pocas elaboran macrocápsulas, y no fabrican esporas. Tienen información genética en los plásmidos, que son responsables de las toxinas y la resistencia a los antimicrobianos (Romero, 2007).



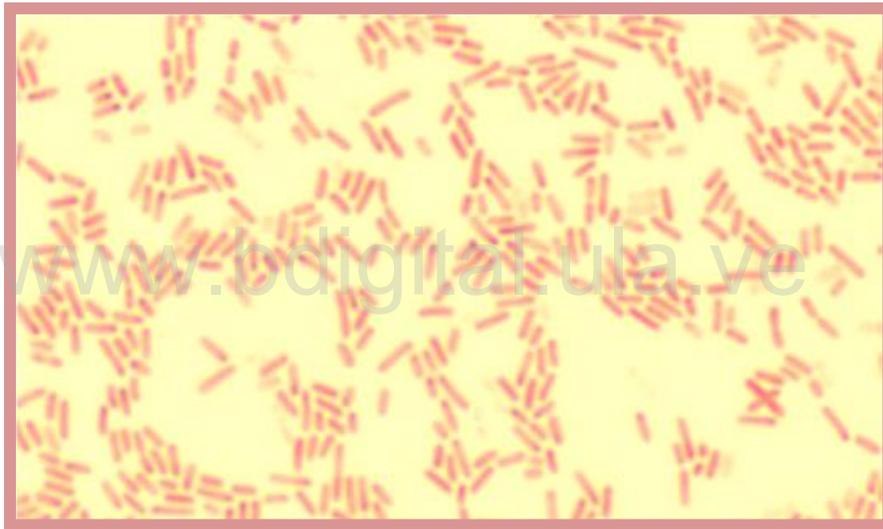
**Figura 11.** Bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. **Fuente.** Tomada y modificada de Brooks, G; Carroll, K; Butel, J; Morse, S. y Mietzner, T (2011).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

El género *Pseudomonas* perteneciente a la familia Pseudomonadaceae, está conformado por una gran variedad de especies que habitan en el suelo y en las aguas estancadas, y forman parte de la flora nativa del intestino de varias especies animales. Son de vida libre y se encuentran en el material orgánico en descomposición, donde tienen importante papel en su

degradación. El patógeno de mayor importancia médica es *Pseudomonas aeruginosa*, que se da en infecciones nosocomiales y en pacientes inmunosuprimidos, presentando una elevada mortalidad (Romero, 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* son bacilos Gram-negativos, aerobios facultativos, móviles con un flagelo polar o un mechón formado por dos o tres flagelos. Posee fimbrias y pilis. En algunos casos forman una delgada microcápsula compuesta por polisacáridos, no forman esporas, y como característica relevante, no fermentan los azúcares (Romero, 2007).



**Figura 12.** Bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. **Fuente.**

Tomada y modificada de Brooks, G; Carroll, K; Butel, J; Morse, S. y Mietzner, T (2011).

### ***Klebsiella pneumoniae***

El género *Klebsiella* pertenece a la familia Enterobacterias, las especies más frecuentes que producen enfermedades en el hombre son *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytocalas*, las cuales colonizan el tracto gastrointestinal y son responsables de infecciones en vías urinarias, respiratoria y síndrome de sepsis. La mayoría de estas infecciones son

nosocomiales y generalmente se observan en pacientes debilitados con enfermedades crónicas (Galí, 2010).

*Klebsiella pneumoniae* está compuesta por bacilos no flagelados, inmóviles, poseen una gran cápsula, solo tienen antígenos O y K. Los factores de patogenicidad son la cápsula, que es un factor antifagocitario y la endotoxina de la pared, que es un lipopolisacárido (Romero, 2007).

### **Generalidades de los antibióticos**

Los antibióticos son un gran grupo de sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos, tales como bacterias, hongos y actinomicetos, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y originan su destrucción (Sánchez, 2004).

En la actualidad, el uso del término antibiótico se ha ampliado, para incluir compuestos sintéticos como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antimicrobiana. Nuevos antibióticos se han empleado y producido debido al incremento de infecciones por bacterias Gram-positivas, aumento de la resistencia bacteriana, cambios en la patogenicidad de algunos microorganismos, comodidad de la posología, mejor tolerancia y menos efectos secundarios (Sánchez, 2004).

Desde su aparición, los antibióticos han sido una importante arma para el tratamiento de muchas dolencias infecciosas, algunas de las cuales causaban y causan gran mortalidad, su uso permitió disminuir en forma importante y notable la morbilidad y mortalidad de algunos de estos males, por ello se pensó en forma equivocada que muchas de estas dolencias iban a desaparecer (Margiña, 2006).

## ***Clasificación de los antibióticos***

Actualmente se dispone de una amplia gama de agentes antimicrobianos sistémicos, se clasifican en los siguientes grupos:

1. Según la acción del antibiótico sobre la bacteria:
  - a) Bacteriostáticos: inhiben la multiplicación bacteriana.
    - Anfenicoles.
    - Lincosaminas.
    - Macrólidos.
    - Sulfamidas.
    - Tetraciclinas.
  - b) Bactericidas: poseen propiedad de destruir la bacteria.
    - Betalactámicos.
    - Aminoglucósidos.
    - Glicopéptidos.
    - Quinolonas.
    - Rifampicinas.
2. Según el mecanismo de acción sobre la bacteria:
  - a) Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared afectando la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana:
    - Penicilinas.
    - Monobactámicos.
    - Carbapenem.
    - Cefalosporinas.
    - Vancomicina.
    - Fosfomicina.
    - Bacitracina.
    - Teicoplanina.

- b) Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad:
  - Polimixinas.
  - Colistinas.
  - Anfotericina B.
- c) Antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas a nivel ribosomal:
  - Los que actúan sobre la subunidad 30S: aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas.
  - Los que actúan sobre la subunidad 50S: macrólidos, lincosamidas y anfenicoles.
- d) Antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos:
  - Quinolonas.
  - Rifampicinas.
- e) Antibióticos antimetabólicos: antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis del ácido fólico.
  - Trimetropina.

3. Sulfosamidas.

4. Según su estructura química:

- a) Betalactámicos:
  - Penicilinas.
  - Cefalosporinas.
  - Monobactámicos.
- b) Carbapenemos.
- c) Aminoglucósidos.
- d) Macrólidos.
- e) Tetraciclinas.
- f) Licosaminas.
- g) Quinolonas.

- h) Sulfonamidas.
- i) Rifamicinas.
- j) Cloranfenicoles.
- k) Antibióticos péptidos.
- l) Otros: metronidazol, ácido fosídico y nitrofuranos.

Las penicilinas constituyen un amplio grupo de antibióticos usados en la terapéutica. El mecanismo de acción de las penicilinas es por inhibición de la biosíntesis de mucopéptidos de la pared celular, siendo más efectiva durante la multiplicación activa de la bacteria, teniendo efecto bactericida a dosis adecuadas (Sánchez, 2004).

### ***Consecuencias del uso incorrecto de los antibióticos***

Una mala indicación del antibiótico, o un mal cumplimiento de la prescripción, puede provocar:

- 1) Fracaso terapéutico.
- 2) Desarrollo de resistencia bacteriana.
- 3) Enmascaramiento de procesos infecciosos.
- 4) Cronificación: la falta de erradicación de un número suficiente de bacterias dará lugar a la persistencia de algunas que mantienen su grado de patogenicidad sin ocasionar manifestaciones agudas.
- 5) Recidiva: las cepas supervivientes, sean resistentes o sensibles, inician una nueva proliferación que provocara una recaída o una reinfección.
- 6) Efectos adversos debido a la acción del medicamento. La toxicidad de algunos antibióticos es potencialmente grave y su aparición es inaceptable si el paciente no necesita el fármaco.

El manejo de los antibióticos no debe ser tomado a la ligera, el médico y el personal de salud deben estar en constante actualización, a fin de evitar

problemas de resistencia, reacciones adversas a los medicamentos para permitir un debido control de patologías que afectan al ser humano (Marguiña, 2006).

### ***Resistencia bacteriana***

La resistencia bacteriana es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antibacterianos. Desde el punto de vista clínico, se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando, la concentración de este en el lugar de la infección es al menos cuatro veces superior a la concentración inhibitoria mínima (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

### ***Tipos de resistencia bacteriana***

#### 1) Natural o intrínseca:

Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de antibióticos, los microorganismos que producen antibióticos son por definición resistentes. En la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventaja competitiva con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Fernández y cols, 2003).

#### 2) Adquirida:

La resistencia adquirida en una bacteria se produce a través de mutaciones y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. La resistencia puede ser transmitida de forma vertical, de generación en generación o de forma horizontal a través de plásmidos u otro material genético movable, como intrones y transposones permitiendo la transmisión no solo a otras generaciones, sino también a otras especies de bacterias. De esta forma puede adquirir la resistencia a uno o a

varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con esto (Fernández y cols, 2003).

### ***Actividad antibacteriana***

La capacidad de un agente antibacteriano de inhibir o eliminar un microorganismo infectante es denominada actividad antibacteriana, para que este efecto se cumpla deben seguirse varios pasos importantes. Primero, el agente debe hallarse en forma activa. Segundo, el antibiótico debe poder alcanzar niveles o concentraciones suficientes en el sitio de la infección para que tenga la oportunidad de ejercer su efecto antibacteriano (Forbes, Sahm, y Weissfeld, 2004).

Los pasos restantes de la acción antibacteriana se relacionan con las interacciones directas entre el agente antibacteriano y la célula bacteriana. Los diferentes agentes antibacterianos poseen una especificidad muy precisa en la célula bacteriana, esto es, su mecanismo de acción (Forbes y cols, 2004).

### ***Métodos que miden la actividad antibacteriana***

#### 1. Dilución en caldo:

La prueba por dilución en caldo, consiste en atacar la bacteria de interés con agentes antibacterianos en un medio líquido. Cada agente antibacteriano se prueba en un rango de concentraciones que habitualmente se expresa en microgramos de fármaco activo/mL de caldo. El rango típico de concentraciones probado para cada antibiótico es una serie de diluciones al medio; la menor concentración de antibacteriano que inhibe por completo, el desarrollo bacteriano visible se registra como concentración inhibitoria mínima (CIM) (Fordes y cols, 2004).

La prueba se divide en dos categorías: microdilución y macrodilución, en ambas pruebas el principio es el mismo, la diferencia es el volumen de caldo, en la microdilución utilizamos de 0,05 a 0,1 mL y en la macrodilución los volúmenes de caldo habituales son de 1,0 mL o más (Fordes y cols, 2004).

La mayoría de las bacterias sometidas a pruebas de sensibilidad requieren el uso de varios antibióticos a varias concentraciones diferentes, por lo cual se hace conveniente utilizar la microdilución, ya que utiliza una sola placa de microtitulación, mientras que, la macro dilución requiere el uso de varios tubos de ensayo, haciendo el proceso más engorroso y laborioso, sobretodo porque la mayoría de los laboratorios debe tomar varios aislamientos por días (Fordes y cols, 2004).

## 2. Dilución en agar:

Es un método de prueba convencional donde las concentraciones de antibacterianos y las bacterias a probar se reúnen en un medio sólido. Cada dilución al medio de un agente antibacteriano se incorpora a una placa separada de agar, por lo que, probar una serie de seis diluciones de un fármaco requiere el uso de seis placas, más una placa de control de desarrollo positivo sin antibiótico. Con este método se prueban uno o más aislamientos bacterianos por placa (Fordes y cols, 2004).

Después del inoculado las placas se examinan en busca de desarrollo y la CMI es la concentración más baja de un agente antibacteriano presente en el agar que inhibe por completo el desarrollo (Fordes y cols, 2004).

## 3. Difusión con discos:

Antes de la aparición de los métodos de microdilución se necesitaba de un método práctico y conveniente para tratar cepas bacterianas. Debido a dicha necesidad Bauer, Kirby, Sherris y Turck, en 1966 desarrollaron la prueba de difusión en disco, basada en el uso de pequeños discos de papel

de filtro impregnados de antibióticos con la CMI para muchas cepas bacterianas que se colocan en las placas que contienen el aislamiento bacteriano (Fordes y cols, 2004).

El agente actúa difundiendo y establece un gradiente de concentración alrededor del disco de papel donde la concentración más alta es la más cercana al disco. El halo que se forma alrededor del disco se mide en milímetros estos varían de tamaño y se correlacionan con la CMI obtenidas por dilución en caldo o en agar realizándose un análisis de regresión, donde se plasma en una gráfica el tamaño del halo en milímetros contra la CMI. A medida que aumenta las cepas bacterianas resistentes el tamaño correspondiente a los halos disminuyen (Fordes y cols, 2004).

### **Definición de Términos Básicos**

#### ***Concentración Inhibitoria Mínima***

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en  $\mu\text{g/dL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C. Esta se ha establecido como “gold Standard” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Horna, Silva, Vicente, y Tamariz, 2005).

#### ***Bacterias ATCC (American Type Culture Collection)***

Microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología. Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes. Existen tres tipos de cepas ATCC: cepas de referencia, cepas de reserva y cepas de trabajo (Montoya, 2011).

## Operacionalización de las Variables

A continuación, se establece la operacionalización de la variable dependiente (**tabla 2**) e independiente (**tabla 3**):

**Tabla 2.** Operacionalización de la variable dependiente.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> .	Dependiente Discreta Cuantitativa.	Es la capacidad de un agente antibacteriano de inhibir o eliminar un microorganismo infectante (Forbes, y cols, 2004).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Método de Kirby-Bauer. Técnica de difusión en disco.	Resistente. Sensible. Frente a las cepas de: <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> .	Presencia de halo de inhibición (mm).

Fuente. Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

**Tabla 3.** Operacionalización de la variable independiente.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Composición química del aceite esencial de las partes aéreas (hojas) de <i>Eucalyptus cinerea</i> .	Independiente.	Son sustancias líquidas resultado de la mezcla de variedad de compuestos químicos orgánicos sintetizados por las plantas (Contreras, 2010).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Hidrodestilación simple utilizando trampa de Cleverger. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas.	Cantidad. Presencia. De las moléculas químicas de los componentes orgánicos.	Determinación del nombre de los compuestos químicos orgánicos del aceite esencial, el tiempo de retención, el porcentaje, índice de Kovats calculado y tabulado.

Fuente. Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

## Hipótesis

Estudios anteriores han demostrado que la familia Myrtaceae tiene actividad antibacteriana sobre diversos microorganismos, por esto es de pensar que el aceite esencial de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea* recolectada en la Escuela Bolivariana “Juan Ruiz Fajardo” ubicada en la Parroquia Domingo Peña, Municipio Libertador del Estado Mérida-Venezuela, presente actividad frente a las cepas ATCC *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

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

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo de Investigación**

Es una investigación de tipo confirmatoria, ya que el propósito de la misma es verificar la hipótesis derivada de la investigación. Se pretende indagar la posible relación entre los eventos de estudio a través de las variables.

#### **Diseño de Investigación**

Es una investigación que presenta un diseño mixto: es tanto una investigación de campo como de laboratorio, ya que el material vegetal para la obtención del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*, fue recolectado en la Parroquia Domingo Peña del Estado Mérida-Venezuela y se procesó en el Laboratorio A Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf” del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Respecto al cuándo y a la amplitud, es contemporánea, longitudinal y bivariable respectivamente.

#### **Población y Muestra**

##### ***Unidad de investigación***

La unidad de investigación de este estudio estuvo representada por las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea* procedente de la

Escuela Bolivariana “Juan Ruiz Fajardo” en la Parroquia Domingo Peña del Estado Mérida.



**Figura 13.** Partes aéreas (hojas) de *Eucalyptus cinerea*. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### ***Selección del tamaño muestral***

La muestra de este estudio fue seleccionada a conveniencia según la capacidad de almacenaje, pre-tratamientos y conservación del material foliar del Laboratorio A Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf” y Laboratorio de Actynomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA).

### **Variables**

- Variable independiente: Composición química del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea*.

- Variable dependiente: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

## Procedimientos o Metodologías de la investigación

### **Recolección de la Muestra**

Las muestras de la planta *Eucalyptus cinerea*, fueron recolectadas el día 3 de Febrero de 2018, en la Escuela Bolivariana “Juan Ruiz Fajardo” ubicada en la Parroquia Domingo Peña, Municipio Libertador del Estado Mérida-Venezuela, tomándose aproximadamente 200 gramos de la misma, posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente, en un contenedor plástico para su próximo pre-tratamiento y obtención del aceite esencial en el Laboratorio A Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf” del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio y el TSU Emilio Salazar. El material botánico fue identificado por el Ingeniero Forestal Juan Carmona adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (ULA).



**Figura 14.** Recolección de la muestra de *Eucalyptus cinerea*. **Fuente.**

Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### ***Obtención del aceite esencial mediante Hidrodestilación simple utilizando trampa de Clevenger***

Para obtener el aceite esencial de la planta en estudio, se recolectaron las hojas del material vegetal fresco, se pesaron 43,80 g y se trituraron manualmente para liberar el aceite dentro de las hojas.

Una vez preparado el material vegetal, se colocó en un balón de extracción de 5 litros de capacidad, ocupando 43,80 g de hojas y 2 litros de agua. Luego se realizó el proceso de Hidrodestilación simple empleando la trampa de Clevenger. La temperatura se mantuvo a 80 °C durante 2 h. Al culminar el proceso de extracción, se obtuvo 2,5 mL de aceite esencial el cual presentó un color amarillo tenue, olor característico y aspecto claro, se almacenó a 4 °C en un envase estéril, hermético, de color ambar debidamente rotulado, resguardándolo de la luz y el oxígeno.



**Figura 15.** Pesaje y trituración manual de las partes aéreas (hojas) de *Eucalyptus cinerea*. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).



**Figura 16.** Hidrodestilación simple empleando trampa de Clevenger. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### ***Análisis del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas***

Los componentes del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* se separaron e identificaron por cromatografía de gases, utilizando un equipo Marca Hewlett Packard 6890 equipado con columna de fenil-metilpolixilosano (HP-5) de 30 m de largo y 0.25 mm de diámetro, con un espesor de pared de 0.25 mm acoplada a espectrometría de masas con detector marca Hewlett Packard MSD 5973.

Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Temperatura inicial del análisis cromatográfico fue de 60 °C, con un gradiente de temperatura de 4 °C/min, temperatura del inyector 250 °C y una temperatura final de 260 °C. Una vez obtenido el cromatograma de los mismos se procedió a la identificación de sus componentes por comparación con los espectros de masas existentes en la base de datos Wiley MS 6ta edición.



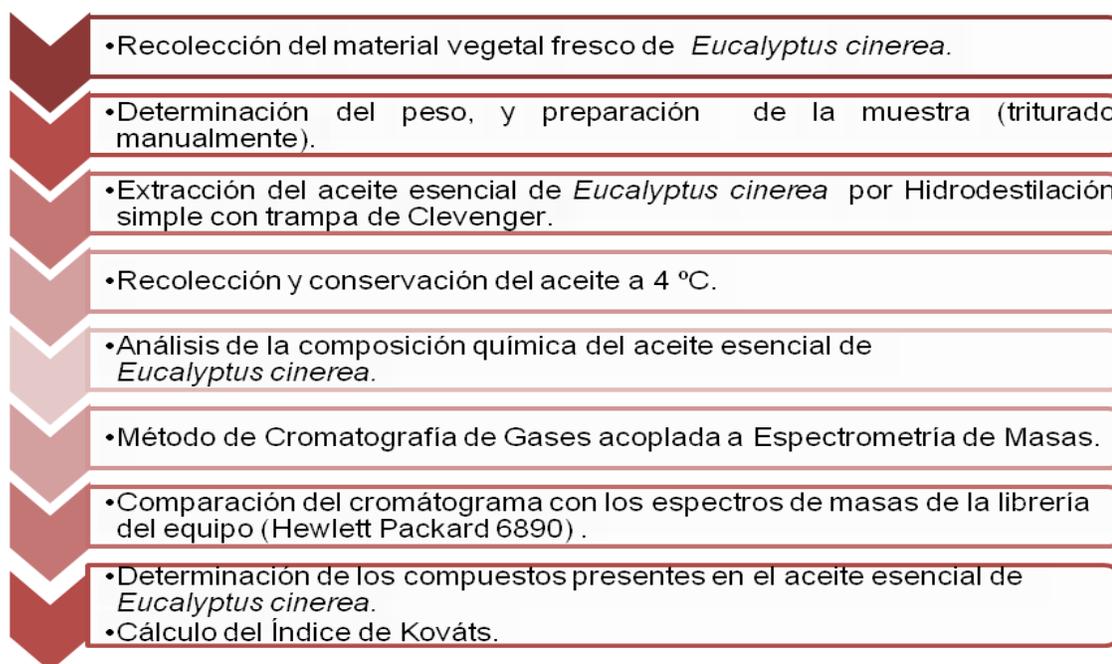
**Figura 17.** Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### **Calculo del índice de Kováts**

Para el cálculo de los índices de Kováts se compararon los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial con patrones de una serie de *n*-parafinas (C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>).

**Esquema 1.** Diseño experimental del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea*.



**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### ***Determinación de la Actividad Antibacteriana del aceite esencial de la especie Eucalyptus cinerea***

La actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar con discos descrito por Fordes y cols (2004). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

#### **Bacterias estudiadas**

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias Gram-positivas y tres pertenecientes a las bacteria Gram-negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (**tabla 4**).

**Tabla 4.** Bacterias estudiadas en la investigación.

<b>Bacterias Gram-positivas</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<b>Bacterias Gram-negativas</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### **Preparación de placas**

En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose aproximadamente 20 mL de Agar Müeller Hinton (MERCK) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

### **Preparación de pre-inóculos bacterianos**

Se empleó un medio de cultivo Müeller Hinton para la determinación de la actividad antibacteriana, las cepas en estudio fueron repicadas alrededor de 16-18 h.

Posteriormente, fueron utilizadas para preparar el pre-inóculo, incubándose a 37 °C en un periodo de 16-18 h, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva del crecimiento bacteriano.

### **Preparación de los inóculos bacterianos**

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.85 % 5 mL en tubos 13x100 previamente estéril, hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán ( $10^{6-8}$  UFC/mL).

### **Inoculación de las placas**

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con los inóculos bacterianos (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

## ***Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en Agar con Discos (Kirby Bauer)***

### **Preparación de los discos**

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL del aceite esencial a una concentración comprendida 100 ppm a 6,25 ppm (**tabla 5**). También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (**tabla 6**) y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO) para verificar que es el aceite esencial el que provoca los halos de inhibición y no el solvente.

**Tabla 5.** Diluciones empleadas para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*.

<b>Aceite esencial</b>	
<b>Solución madre (ppm)</b>	
	AP
	10.000
Diluciones (ppm)	100
	50
	25
	12,5
	6,25

**ppm:** Partes por millón. **AP:** Aceite puro.

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

**Tabla 6.** Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.

Bacterias	Antibióticos comerciales		
	E (15 µg) 32 mm	AMP (10 µg) 32 mm	PIP (100 µg) 27 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	NP	NP
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	NP	P	NP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NP	NP	P
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	NP	NP	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NP	NP	P

**E:** Eritromicina ®. **AMP:** Ampicilina ®. **PIP:** Piperacilina ®. **P:** Provado.

**NP:** No provado.

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### Colocación de los discos impregnados

En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de cada una de las diluciones del aceite esencial (**tabla 5**) y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo (**tabla 6**) correspondiente a cada cepa estudio y el control negativo usando pinza metálica previamente esterilizada.

### Pre-incubación e incubación de las placas

Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inóculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con el aceite esencial en sus diferentes

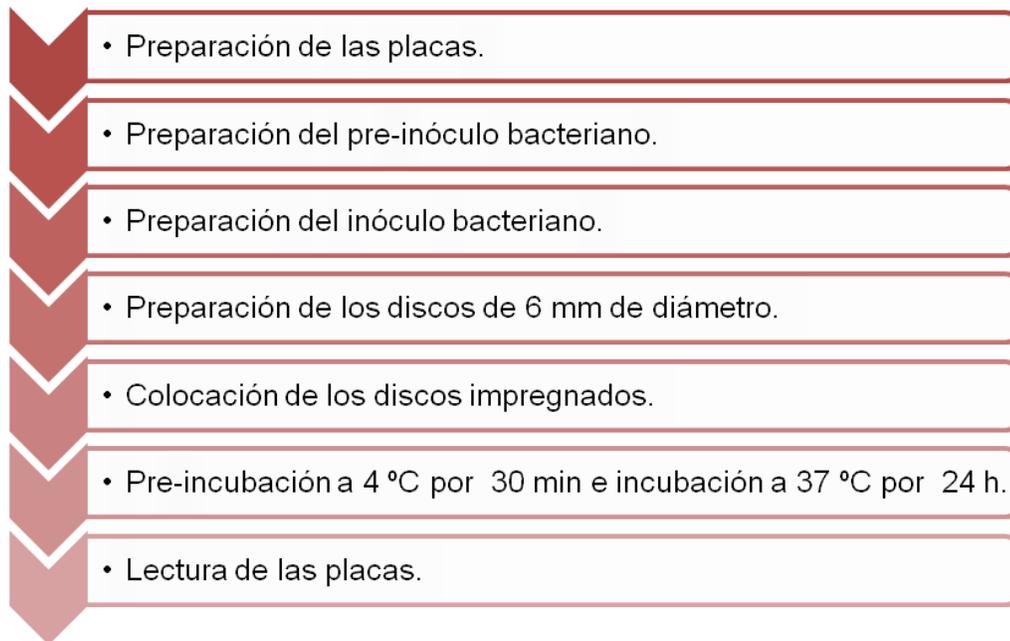
diluciones difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

### Lectura de las placas

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

El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* se expresó en milímetros (mm).

**Esquema 2.** Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad antibacteriana por el Método de Difusión en Agar con discos (Kirby-Bauer).



**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

## **Diseño de análisis**

En esta investigación los datos fueron analizados a través de un proceso cualitativo y cuantitativo, específicamente fueron analizados, según el diseño univariante, dicotónico, multifactorial, bicategorico y multicategorico (Hurtado, 2010).

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

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### ***Obtención del aceite esencial de la especie Eucalyptus cinerea***

Del proceso de extracción del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea*, se obtuvo un volumen de 2,5 mL el cual presentó un rendimiento de 5,70 %. Del mismo, se observaron las siguientes características fisicoquímicas: color amarillo tenue, olor característico (mentol fuerte) y aspecto claro.

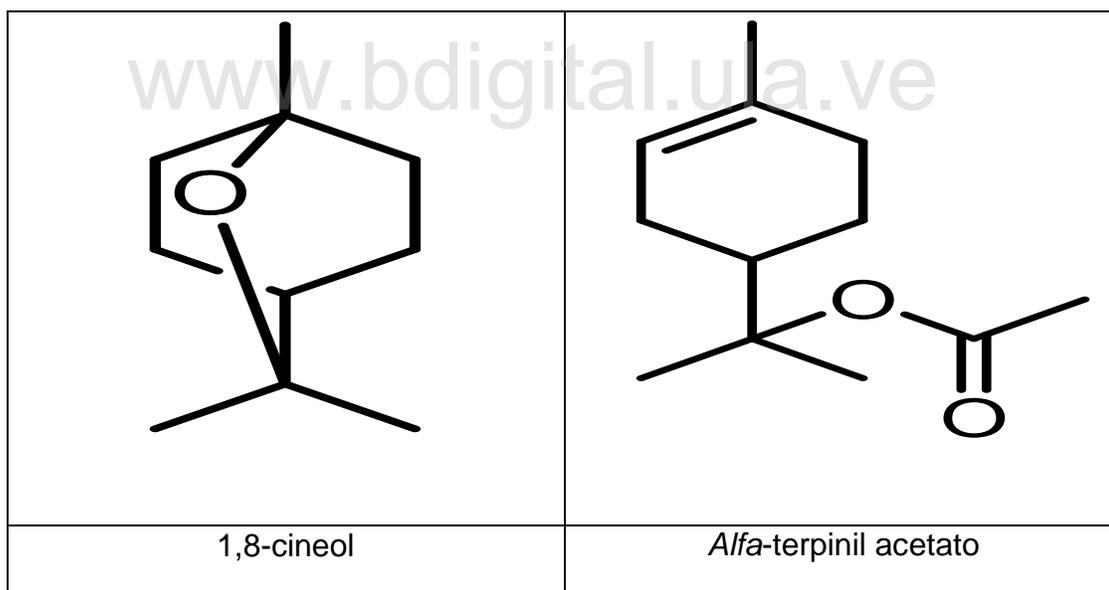
Estos resultados son congruentes con el estudio realizado por Lima (2005), donde el rendimiento de *Eucalyptus cinerea* fue de 4,68 %, presentando este 1 % menos que el obtenido en esta investigación. Debido a esto se da por sentado que la especie *Eucalyptus cinerea* expuesta a una extracción con Hidrodestilación simple tiene un alto rendimiento.

Así mismo, Sebei, Sakouhi, Herchi, Khouja y Boukhchina (2015) en su investigación, reportaron un rendimiento de 3,0 % siendo 2,7 % menos al obtenido en esta investigación. De las investigaciones consultadas, solo estos dos autores reportaron rendimiento del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*.

Aunque el aceite esencial en las distintas investigaciones pertenece a la misma especie, se puede observar una variación en el rendimiento. Esto se debe al clima según la ubicación geográfica donde ha sido recolectada la planta de *Eucalyptus cinerea*. (Sebei y cols, 2015).

**Composición química del aceite esencial de la especie  
*Eucalyptus cinerea***

En relación al análisis de la composición química del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Eucalyptus cinerea* los cuales fueron separados e identificados en un cromatógrafo de gases de marca Hewlett Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP MSD 5973. La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos Wiley MS 6ta edición y el cálculo de los índices de Kováts lo cual permitió identificar 5 compuestos (**tabla 7**). Siendo los mayoritarios para el aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*: *alfa*-pineno (5,50 %), limoneno (3,85 %), 1,8-cineol (80,34 %), *alfa*-terpineol (4,11 %) y *alfa*-terpinil-acetato (6,21 %).



**Figura 18.** Componentes mayoritarios en el aceite esencial estudiado de la especie *Eucalyptus cinerea*.

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

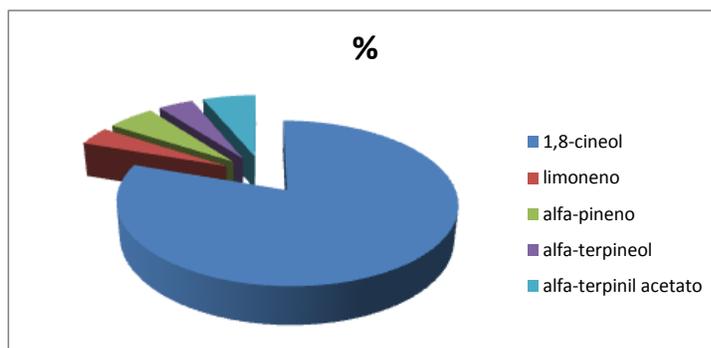
**Tabla 7.** Componentes identificados del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Nº	T.R	% de área	Compuesto	IKcal	IKtab
1	5,11	5,50 %	<i>alfa</i> -pineno	928	932
2	7,38	3,85 %	limoneno	1004	1024
3	7,51	80,34 %	1,8-cineol	1008	1026
4	12,24	4,11 %	<i>alfa</i> -terpineol	1183	1186
5	17,31	6,21 %	<i>alfa</i> -terpinil acetato	1345	1346

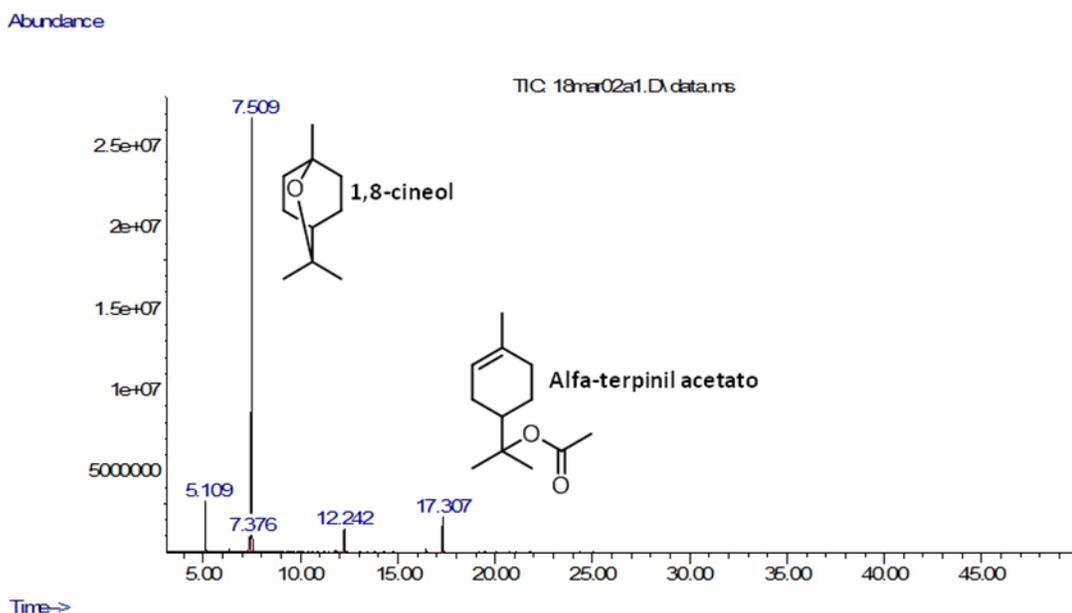
**TR:** Tiempo de retención de los componentes. **IKcal:** Índice de Kováts calculado.

**IKtab:** Índice de Kováts tabulado.

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).



**Figura 19.** Porcentaje de componentes identificados del aceite esencial la especie *Eucalyptus cinerea*. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).



**Figura 20.** Cromatograma del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* en columna capilar HP-5. **Fuente.** Elaboración propia.

Luisi y Quintero (2019).

www.bdigital.ula.ve

Para efectos de la discusión dividiremos las investigaciones en 5 quimiotipos (**figura 21**):

El quimiotipo 1: el componente mayoritario es 1,8-cineol (64-79 %), seguido de  $\alpha$ -pineno (5,3-9,7 %) y limoneno (4,3-7,7 %). En este, se ubican las investigaciones hechas por Peñaloza y Mora (2002) y Lima (2005).

El quimiotipo 2: el componente mayoritario es 1,8-cineol (79-85 %), seguido de  $\alpha$ -pineno (2,9-4,1 %) y  $\alpha$ -terpineol (2,1-2,2 %). En este, se ubican las investigaciones hechas por Soliman y cols (2014) y Sebei (2015).

El quimiotipo 3: el componente mayoritario es 1,8-cineol (70-84 %), seguido  $\alpha$ -terpineol (10,3-11,7 %) y  $\alpha$ -pineno (4,5-5 %). En este, se ubican las investigaciones hechas por Mendes y cols (2011) y Elaissi y cols (2012).

El quimiotipo 4: el componente mayoritario es 1,8-cineol (61 %), seguido de camphene (15,13 %) y  $\alpha$ -terpineol (4,77 %). En este se ubica la investigación realizada por Kahla y cols (2017).

El quimiotipo 5: el componente mayoritario es 1,8-cineol (80,34 %), seguido de  $\alpha$ -terpenil-acetato (6,21 %) y  $\alpha$ -pineno (5,50 %). Es este se ubica la investigación propia realizada por Luisi y Quintero (2019).

Los resultados arrojados en esta investigación, son acordes a los trabajos previos reportados (**tabla 8**). Al observar dicha tabla encontraremos que el componente mayoritario presente en los aceites esenciales de la especie *Eucalyptus cinerea* es 1,8-cineol; variando en porcentaje según el clima del origen geográfico (Sebei cols, 2015), pero aun así manteniéndose en un rango de 64 a 84 %.

Por otro lado, componentes como  $\alpha$ -pineno, limoneno y  $\alpha$ -terpineol encontrados en la investigación, están presentes en dichos trabajos previos, confirmando que la composición química del aceite fue identificado de manera minuciosa. Sin embargo, componentes como el  $\gamma$ -terpineol, globulol y *p*-cimeno que están presentes en solo algunos trabajos previos, no se identificaron en esta investigación.

Al hacer una comparación con los quimiotipos de las investigaciones ya realizadas por otros autores (**figura 21**), observamos que en la investigación se mantiene un porcentaje acorde del 1,8-cineol, pero que varían los otros compuestos. Dicho esto, la investigación podría ubicarse en el quimiotipo 3, ya que el porcentaje de 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno son similares. Pero con una variable que es el  $\alpha$ -terpenil-acetato que solo fue encontrado en el quimiotipo 1, específicamente en la investigación de Peñaloza y Mora (2002), por lo tanto se ubica en un quinto quimiotipo ya que su tercer componente varía en gran cantidad. Confirmando que la variabilidad de los componentes que se pueden encontrar en el aceite esencial de la especie

*Eucalyptus cinerea*, efectivamente se asocia al área geográfica donde fue recolectada la planta.

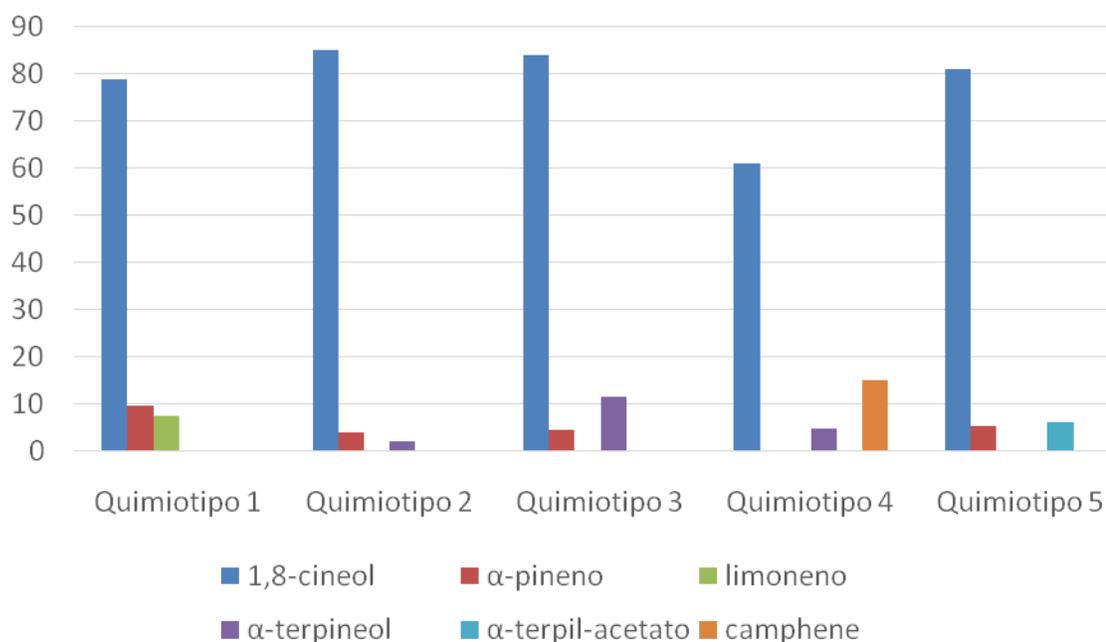
Las concentraciones de estos compuestos químicos se pudieron ver afectadas por diferentes factores, mencionados por Mendes y cols (2011), como la zona en que la planta fue recolectada, el proceso de secado, la temperatura, el clima, el desarrollo de la planta, el acceso al agua y otros factores que pudieron pasar desapercibidos.

**Tabla 8.** Componentes identificados del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*, en los trabajos previos utilizados en la investigación.

Fuente	Localidad	Componentes (%)								
		1,8 - cineol	$\alpha$ -pino	Limoneno	$\gamma$ -terpineol	$\alpha$ -terpineol	Globulol	P-cimeno	$\alpha$ -terpenil-acetato	Camphe
Peñaloza y Mora. (2002).	Venezuela (Mérida)	78,8	5,3	4,3	-	5	-	0,5	3,9	-
Lima. (2005).	Guatemala	64,15	9,67	7,68	-	-	-	-	-	-
Mendes, Ye, Seigi, Frensch, Marques y Nakashima. (2011).	Brasil	84,60	4,97	3,32	0,91	11,72	-	0,39	-	-

Elaissi, Rouis, Salem, Mabrouk, Salem, Salah, Aouni, Farhat, Chemli, Harzallah y Larbi. (2012).	Túnez	70,4	4,5	3,7	0,1	10,3	0,6	1,2	-	-
Soliman, Fathy, Salama y Saber. (2014).	Egipto	84,55	2,90	1,50	0,89	2,14	0,47	0,20	-	-
Sebei, Sakouhi, Herchi, Khouja y Boukhchi n. (2015).	Túnez	79,18	4,08	-	-	2,20	-	-	-	-
Kahla, Zouari-Bouassida, Rezgui, Trigui y Tounsi. (2017).	Túnez	61	3,45	-	0,04	4,77	4,06	-	-	15,13
Luisi y Quintero (2019).	Venezuela (Mérida)	80,34	5,50	3,85	-	4,11	-	-	6,21	-

-: No encontrado. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).



**Figura 21.** Quimiotipos de los componentes del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* de las investigaciones utilizadas en los trabajos previos.

**Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### ***Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie Eucalyptus cinerea***

Para el estudio microbiológico de la actividad antibacteriana de las cepas ATCC ensayadas, se tomó en cuenta para la elección de los grupos controles positivos, las recomendaciones que establece el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos sus siglas en inglés CLSI 2017, la cual determina qué tipo de antibiótico debe usarse con cada especie de las cepas bacterianas, seleccionando así las dos cepas ATCC Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* el antibiótico ampicilina de 10 µg de tipo β-lactámico donde el halo de inhibición para este control

es de  $\geq 17$  mm, para *Staphylococcus aureus* el control positivo fue eritromicina de 15  $\mu\text{g}$  antibiótico de tipo macrólido donde el halo de inhibición para este control es  $\geq 23$  mm.

Para las cepas ATCC Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, el control positivo fue piperacilina de 100  $\mu\text{g}$  de tipo  $\beta$ -lactámico donde el halo de inhibición para estas especies debe ser según el control  $\geq 21$  mm.

Con respecto a las mediciones y observaciones realizadas en el laboratorio a los halos de inhibición de los controles positivos para las especies Gram-positivas de las cepas ATCC, las lecturas de estos fueron las siguientes: para *Staphylococcus aureus* la lectura fue de 26 mm y para *Enterococcus faecalis* la lectura fue de 10 mm. Mientras que para las especies Gram-negativas de las cepas ATCC *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* la lectura fue de 18 mm y para *Escherichia coli* la lectura fue de 20 mm (**tabla 9**).

**Tabla 9.** Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.

Cepas bacterianas ATCC	Halos de inhibición en mm					
	E (15 $\mu\text{g}$ )		AMP (10 $\mu\text{g}$ )		PIP (100 $\mu\text{g}$ )	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$\geq 23$	26	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	$\geq 17$	10	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	$\geq 21$	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	$\geq 21$	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	$\geq 21$	18

**E:** Eritromicina. **APM:** Ampicilina. **PIP:** Piperacilina. **mm:** Milímetros. **CLSI:** Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos. **CE:** Cepas ensayadas. Lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

### ***Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea****

Para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* se realizaron una serie de diluciones a partir de una solución madre (10.000 ppm) de 100 ppm hasta 6,25 ppm con la finalidad de conocer cuál es la menor concentración del aceite esencial que posee actividad antibacteriana, el solvente utilizado para estas diluciones fue el dimetil sulfóxido (DMSO).

En relación a la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*, inhibió el desarrollo de las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (**figura 22**) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (**figura 23**) con halos de inhibición de 7 mm y valor de concentración mínima inhibitoria de 12,5 ppm para ambas especies (**tabla 10**). Así mismo, inhibió el desarrollo de las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 (**figura 24**), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (**figura 25**) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 (**figura 26**) con halos de inhibición de 7 mm para las tres especies, con una concentración mínima inhibitoria de 6,25 ppm para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y de 12,5 ppm para *Klebsiella pneumoniae* (el rango de concentración del aceite fue de 100-6,25 ppm) (**tabla 10**).

Se consideró que si el aceite esencial mostraba una CIM inferior a 12,5 ppm, la actividad antibacteriana era buena; de 12,5 a 25 ppm la actividad antibacteriana era moderada; de 50 a 100 ppm la actividad antibacteriana era débil y por último si sobrepasaba los 100 ppm se consideraba nula. Este criterio fue tomado del trabajo realizado por Holetz, F; Pessini, G; Sanches, N; Garcia,; Nakamura, C y Dias, B (2002).

Por lo tanto el aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* presenta actividad antibacteriana moderada en las cepas ATCC Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la cepa Gram-negativa: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357. Mientras que para las dos cepas Gram-negativas restantes: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la actividad antibacteriana es buena.

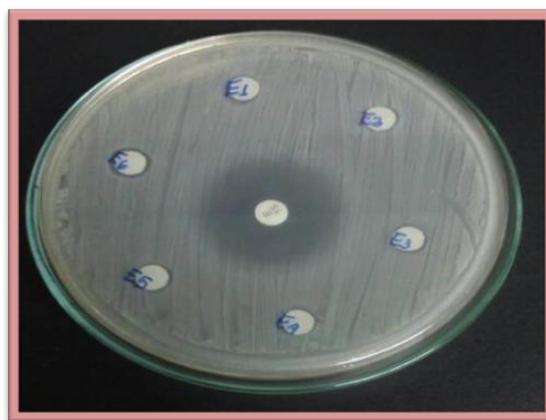
La variabilidad de los halos en las diluciones con respecto a los halos presentes en el aceite puro, pudo variar por la alta polaridad que tiene el papel que se utilizó causando así que los componentes antibacterianos del aceite fuesen retenidos.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* determinada en la investigación, concuerda con la actividad estudiada por otros autores en las diferentes investigaciones utilizadas (**tabla 11**).

**Tabla 10.** Valores de las diferentes concentraciones estudiadas para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*.

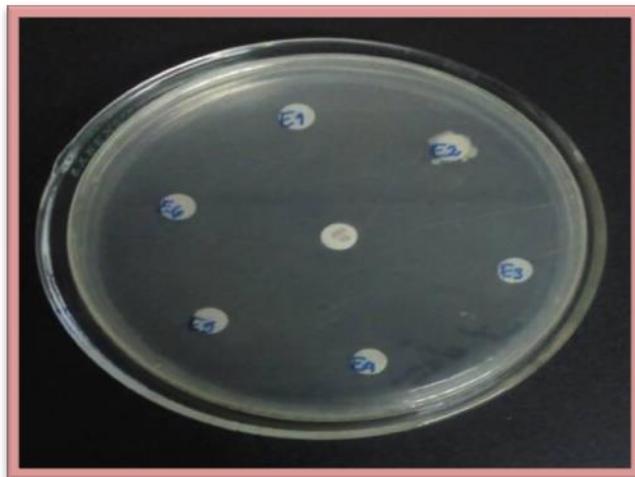
Concentración del aceite esencial (ppm)	Bacterias ATCC				
	S. aureus ATCC 25923	E. faecalis ATCC 29212	E. coli ATCC 25922	P. aeruginosa ATCC 27853	K. pneumoniae ATCC 23357
AP	9 mm	9 mm	15 mm	10 mm	22 mm
100	8 mm	7 mm	8 mm	9 mm	8 mm
50	7 mm	7 mm	8 mm	8 mm	7 mm
25	7 mm	7 mm	8 mm	8 mm	7 mm
12,5	7 mm*	7 mm*	8 mm	8 mm	7 mm*
6,25	0 mm	0 mm	7 mm*	7 mm*	0 mm
C-	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

mm: Milímetros. AP: aceite puro. C-: Control negativo \*: Concentración mínima inhibitoria. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).



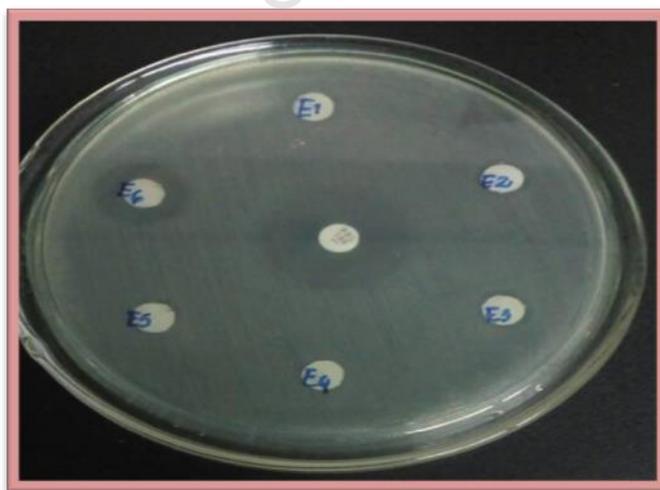
**Figura 22.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Fuente.**

Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

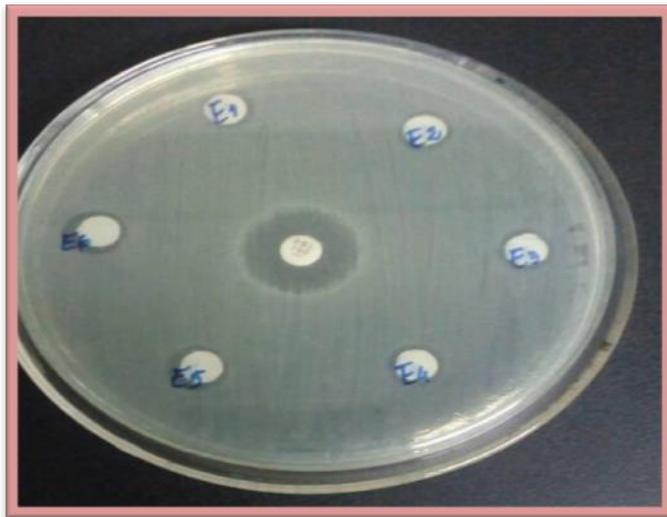


**Figura 23.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

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

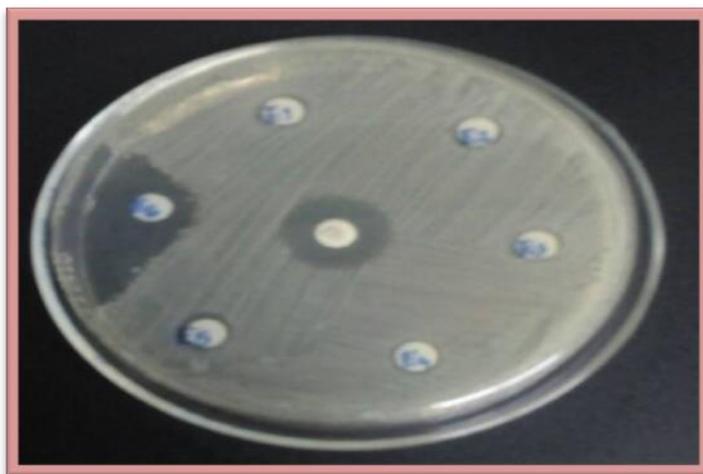


**Figura 24.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* contra *Escherichia coli* ATCC 25922. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).



**Figura 25.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

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



**Figura 26.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

**Tabla 11.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Eucalyptus cinerea* en los trabajos previos utilizados en la investigación.

Autores	Actividad antibacteriana				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Peñaloza y Mora (2002).	S	-	-	-	R
Mendes y cols (2011).	S	-	R	S	-
Elaissi y cols (2012).	S	-	-	R	R
Soliman y cols (2014).	S	-	S	S	-
Sebei y cols (2015).	S	S	S	-	-
Luisi y Quintero (2019).	S	S	S	S	S

S: sensible, R: resistente., - : no estudiado. **Fuente.** Elaboración propia. Luisi y Quintero (2019).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- Del aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* extraído por el método de Hidrodestilación simple empleando trampa de Clevenger, se obtuvo un rendimiento de 5,70 % siendo un buen rendimiento comparado con otras investigaciones.
- De acuerdo al análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas del aceite esencial, se identificaron 5 compuestos: *alfa*-pineno, limoneno, 1,8-cineol, *alfa*-terpineol y *alfa*-terpinil-acetato, siendo los componentes mayoritarios el 1,8-cineol (80,34 %) y el *alfa*-terpinil-acetato (6,21 %).
- El aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea* arrojó una moderada actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y Gram-negativa: *Klebsiella pneumonia* ATCC 23357. Mientras que para las cepas Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 arrojó una buena actividad antibacteriana; lo que contribuye a ampliar la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, que puedan mejorar el proceso de salud enfermedad debido a la multiresistencia de estas bacterias en la sociedad mundial actual.

## Recomendaciones

- Los resultados obtenidos de actividad antibacteriana que presentó el aceite esencial de la especie *Eucalyptus cinerea*, sugiere la posibilidad de realizar futuros estudios encaminados a determinar su actividad sobre un espectro más amplio de bacterias, así como de otros microorganismos (hongos).
- De igual forma resultaría de interés el estudio sinérgico del aceite esencial de esta especie y antibióticos comerciales sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas estudiadas en el presente trabajo así como otros microorganismos (hongos).

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

## Bibliografías

- Albornoz, A. (1980). Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. (1°ed). Caracas, Venezuela: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Acosta, L. (1993). Proporciónese Salud: Cultive Plantas Medicinales. (1° ed). La Habana, Cuba: Científico-Técnica.
- Arias, F. (2004). El Proyecto de la Investigación. (4° ed). Caracas: Episteme.
- Badillo, V. y Schnee, L. (1972). Clave de las familias de las plantas superiores de Venezuela. (5° ed). Maracay, Venezuela: Revista de la Facultad de Agronomía Alcance N° 18.
- Bravo, L. (2006). Farmacognosia (7° ed). Madrid: Elsevier.
- Brooks, G; Carroll, K; Butel, J; Morse, S. y Mietzner, T (2011). Microbiología Médica (25ª ed). México: Lange.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales (2° ed). Zaragoza: Acribia.
- Font, P. (1973). Plantas Medicinales (2° ed). Barcelona: Labor
- Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2004). Diagnóstico Microbiológico. (11° ed). Buenos Aires, Argentina: Médica Paramericana.
- Gómez, M. (1977). Trabajo de Farmacognosia. (1° ed). Barcelona, España: Elsevier.
- Hurtado, J. (2010). Metodología de la Investigación Holística Guía para la comprensión Holística de la Ciencia. (4° ed). Caracas, Venezuela: Sygal

- Marcano, D y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (2º ed). Caracas, Venezuela: Torino.
- Murray, P; Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). Microbiología Médica (6ª ed). España: Elsevier.
- OMS. (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia de antimicrobianos. OMS. Ginebra, Suiza.
- Peñaloza, O. y Mora, R. (2002). Estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de 3 especies del género Eucalyptus (E. globulus, E. robusta y E. cinerea). Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Los Andes.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L. y Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. (1º ed). La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Romero, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. (3º ed). México: Médica Panamericana.

## Fuentes electrónicas

- Adame, R., Castrejón R., Kitzia, B; Ramírez, P. y Leyva, M. (2014). Actividad antimicrobiana del Eucalipto. *Foro de estudios sobre Guerrero*. 1(2),613-616. Disponible en: [http://www.fesgro.mx/journal/articulos/Salud\\_T2\\_5.pdf](http://www.fesgro.mx/journal/articulos/Salud_T2_5.pdf)
- Contreras, V. (2010). Implementación a nivel laboratorio de una unidad de extracción de volátiles por radiación de microondas. Reporte de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de Durango, México. Disponible en: <http://tecno.cruzfierro.com/residencias/05041240-contreras-residencia>
- Díaz, M., Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n2/hie06210.pdf>
- Elaissi, A., Rouis, Z., Salem, N., Mabrouk, S., Salem, Y., Salah, K., Aouni, M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah, F y Larbi, M. (2012) Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. Disponible en: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/14726882-12-81>
- Fernández, F., López, J., Ponce, L. y Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Cubana MedMilít*. 8(1). Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v32n1/mil07103.pdf>
- Fernández, F., Hernández, J., Martínez, L. y Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Cubana MedMilít*, 32(1), 44-8. Disponible en [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32\\_1\\_03/mil07103.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.pdf)

- Fonnengra, R. y Botero, H. (2006). Eucalipto Azul – Eucalipto Plateado – *Eucalyptus cinerea* F. V. Muell. ex Benth. Universidad de Antioquia Disponible en: <http://www.aprendeonline.udea.edu.co/ova/?q=node/701>
- Galí, Z. (2010). *Enterobacterias, Antibióticoterapia*. Revista APUA. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/doc/sitios/apua-cuba/enterobacterias\\_y\\_antibioticoterapia\\_dra\\_zuleica.doc](http://www.sld.cu/galerias/doc/sitios/apua-cuba/enterobacterias_y_antibioticoterapia_dra_zuleica.doc).
- García, P. (2014). Aceites esenciales: Mitos y realidades. Universidad D'Alacant. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/39640>.
- Gutierrez, F (2010). Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso: análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo. Universidad de Chile. Disponible en: <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/105352>
- Gutiérrez, M. y Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas. Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER (U.P.C)*. Disponible en: [http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASE\\_S.pdf?sequence=1](http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASE_S.pdf?sequence=1)
- Horna, G; Silva, M; Vicente, W y Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Med Hered*, 16 (1). Disponible en: [www.scielo.org.pe/scielo.php?Pid=S1018-130X2005000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?Pid=S1018-130X2005000100007&script=sci_arttext)
- Holetz, F; Pessini, G; Sanches, N; Garcia; Nakamura, C y Dias, B. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of Infectious Disiases. *Rev Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de*

- Janeiro*. 97(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/12471432/>
- Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Revista Scientia et Technica*. (33). Disponible en: <http://www.revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/5817>
- Lima, S (2005). Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de Eucalipto trabajados en seco a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto en la extracción de su aceite esencial. Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: [http://www.biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0955\\_Q.pdf](http://www.biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0955_Q.pdf)
- Lucana, M. y Huanca, R. (2014). Estructura Bacteriana. *Actualización Clínica*. Disponible en: [www.revistasbolivarianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49\\_a01.pdf](http://www.revistasbolivarianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a01.pdf)
- Margiña, C., Ugarte, C. y Montiel., M. (2006). Rational and appropriate use of antibiotics. *Acta Médica Peruana*. Disponible en: [www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/004v23n1](http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/004v23n1)
- Martinez, J y Stashenko, E. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas. *Revista Scientia Chromatographica*. 2(1) 29-47. Disponible en: [www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a3.pdf](http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a3.pdf).
- Matos, M. (2013). Cumarinas: versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=48431>.
- Mendes, S., Yae, S., Seigi, F., Frensch, G., Marques, F. y Nakashima, T. (2011). Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea*

- F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. *Pharmaceuticals*, 4(12), 1535-1150. Disponible en <http://www.mdpi.com/1424-8247/4/12/1535>
- Montoya, M. (2011). Las cepas ATCC. Herramienta indispensable en el control de Calidad Interno en Microbiología. *Instituto Colombiano de Medicina Tropical*. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/137115546/Las-Cepas-ATCC>
- Pedraza, F; Ochoa, H; Flores, N y Rutiaga, J. (2006). Extracto tánico de dos cortezas de *Eucalyptus*, de una plantación experimental en Morelia, México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. Disponible en: [http://www.eucalyptus.com.br/icep03/08\\_PedrazaBucio\\_et.all.pdf](http://www.eucalyptus.com.br/icep03/08_PedrazaBucio_et.all.pdf)
- Pérez, L., Zurita, I., Pérez, N., Patino, N. y Calvimonte, O. (2010). Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. *Revista Científica Med.* 13(2) 94-98. Disponible en: [www.scielo.org.bo/pdf/rccm/v13n2/a09.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/rccm/v13n2/a09.pdf)
- Reyes, F., Palou, E. y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68-78. Disponible en <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>
- Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Lanchipa, P. y Zegarra, R. (2004). Antibióticos Sistémicos en Dermatología. Primera parte: Betalactámicos – Carbapenems – Aminoglucósidos – Macrólidos. *Dermatología Peruana*, 14(1). 7-20. Disponible en:

[http://www.sisbib.unmsn.edu.pe/bvrevistas/dermatología/v14\\_n1/Pdf/a02.pdf](http://www.sisbib.unmsn.edu.pe/bvrevistas/dermatología/v14_n1/Pdf/a02.pdf)

Sebei, K; Sakouhi, F; Herchi, W; Khouja, M y Boukchina, S. (2015). Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. *Revista Biological Research* 48 (7). Disponible en: <http://biolres.com/content/48/1/7>

Serra, S (2012). Desarrollo de derivados de 4-hidroxycumarina con diferente actividad farmacológica. Universitá Degli Studi di Cagliari. Disponible en: [https://scholar.google.com/scholar?cluster=7377979119089349158&hl=es&as\\_sdt=0,5&scioldt=0,5#d=gs\\_qabs&u=%23p%3DGU:OKnp\\_BAMJ](https://scholar.google.com/scholar?cluster=7377979119089349158&hl=es&as_sdt=0,5&scioldt=0,5#d=gs_qabs&u=%23p%3DGU:OKnp_BAMJ)

Soliman, F; Fathy, M; Salama, M y Saber, F. (2014). Chemical composition and bioactivity of the volatile oil from leaves and stems of *Eucalyptus cinerea*. *Revista Pharmaceutical Biology*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026361>

Sussmann, O., Mattos, L. y Restrepo, A. (2002). Resistencia bacteriana. *Revista Universitaria Médica*. Hospital universitario San Ignacio. 43(1). Disponible en: [www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?id\\_revista=97&id\\_ejemplar=4486](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?id_revista=97&id_ejemplar=4486)

Torres, L. (2011). Estudio de la Hidrodestilación del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill). N. E. Br., en un destilador a escala piloto. Facultad de Fisicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6820/2/142418.pdf>

Yáñez, X. y Cuadro, O. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus*

y *Eucalyptus camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia).  
*Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 10(1). Disponible en:  
<file:///D:/Downloads/48-134-1-PB.pdf>

www.bdigital.ula.ve