



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPONENTES
VOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE
Vismia japurensis EN CEPAS ATCC DE REFERENCIA
INTERNACIONAL**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al Título de Licenciado en
Bioanálisis

Autora:

Wendy Aleska Mora
Pereira
C.I: V-23.646.948

Tutora:

Dr. Prof. Alexis Buitrago

Cotutor:

PhD. Prof. Janne Rojas

Mérida, Julio de 2024

Dedicatoria

A Dios, porque me ha dado la oportunidad de vivir y me ha mostrado su amor y bondad infinita.

A mis padres, Narcisa Pereira y Alvaro Mora. Por enseñarme que con humildad, sencillez y disciplina puedo alcanzar cualquier meta que me proponga,

A mis hermanos, Albany Mora y Jim Mora. Por los consejos, las sonrisas, el cariño y el amor brindados en el transcurso de toda la carrera y más.

A mis abuelitos Clemencia y Elio. Por motivarme con las palabras “haga fuerza” Aunque no están aquí físicamente hoy en día los recuerdo siempre

A Lucas Frontado por el apoyo incondicional brindado a lo largo de mi carrera, por creer en mí, alentarme a seguir adelante en los momentos más difíciles.

Wendy Aleska Mora Pereira

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios, por haberme permitido lograr uno de mis objetivos, aunque ha sido un largo camino con obstáculos logré entender que sus tiempos y voluntades son perfectos.

A mis padres, Narcisa Pereira y Alvaro Mora, porque sin ellos nada de esto sería posible, por su apoyo incondicional, su amor, por confiar en mí siempre.

A los hermanos indígenas de la etnia Wottojja en especial a Juan López y su familia. Por su valiosa colaboración y aporte de sus conocimientos ancestrales.

A mi tutor el Dr. Alexis Buitrago, por asumir la responsabilidad de tenerme como su tesista, por la paciencia y dedicación durante la realización de este trabajo.

A mi cotutora la Dra. Janne Rojas por aceptar la cotutoría y aportar su valiosa colaboración y conocimiento durante la realización de esta investigación.

Al jurado evaluador, el Dr. Julio Rojas, por el apoyo y aporte de su conocimiento, experiencia y su tiempo en el proceso de evaluación.

Al farmacéutico Carlos Contreras por su apoyo y acompañamiento. Gracias por ser parte del logro de este trabajo de grado

A mis profesores Carmen Lozano, Rima Bahsas, Sarai Dugarte, Alexander Moreno, Evelyn Alviarez, María Carolina Moreno, Greana Aguilera, María Alejandra López, Romina Torres, Freddy Dugarte y Carmen Julia Chávez por estar siempre presentes, por el cariño y por las palabras de apoyo y aliento.

A mis amigas, Jennifer García, Gabriela Valero, Gabriela Villegas, y mi amigo Wilmer Contreras. Compañeros de sueños, tramos, alegrías, contar con ustedes ha sido una bendición.

A el señor Guillermo rey y su esposa Yacneli por abrirme las puertas de su casa, por el cariño y el apoyo brindado a lo largo de la carrera.

A mis compañeros Karol Paredes, Oscar Rincón, Yesica Caracas, Daniel Pérez, Thaina García, Estefany Ortega, Leonymar Errante, Jorge Terán, Angelica contreras, Karla Márquez, Dennise Pereira, Josselis Sanchez, Ángel Rosales, Jessika Muñoz, Isley Guillen. Por el apoyo y por tener ese valor de compañerismo que destacan con todos.

A mis compañeros de promoción, por compartir conmigo esta travesía académica, su colaboración y entusiasmo contribuyeron al logro de esta meta.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por la oportunidad de llevar a cabo este grandioso proyecto de investigación.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a sus profesores que forjaron en mi ética y valores esenciales para el ejercicio de mi carrera.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por darme la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa casa de estudios.

Fueron muchas las personas con las que conté en el transcurso de mi paso por la Universidad y con las que estoy inmensamente agradecida, porque nada sería posible sin su intervención en mi vida.

¡Gracias por todo!

Wendy Aleska Mora Pereira

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xixiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación e Importancia de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	7
Alcances de la investigación.....	7
Limitaciones de la investigación.....	8
CAPÍTULO II	9
MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes históricos.....	11
Aproximación teórica sobre metabolitos secundarios presentes en las plantas.....	12
Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana relacionada con los metabolitos secundarios.....	13
Bases teóricas.....	14
Características botánicas de la familia Hypericaceae.....	14
Distribución Geográfica de la Familia Hypericaceae.....	14
Aspectos botánicos del género <i>Vismia</i>	15
Distribución geográfica de género <i>Vismia</i>	15
Compuestos químicos presentes en el género <i>Vismia</i>	15
Usos etnobotánicos y actividad farmacológica del género <i>Vismia</i>	15

Aspectos Botánicos de <i>Vismia japurensis</i>	16
Taxonomía de <i>Vismia japurensis</i>	17
Compuestos químicos presentes en <i>Vismia japurensis</i>	17
Usos etnobotánicos y actividad farmacológica de <i>Vismia japurensis</i>	18
Definición operacional de términos	18
Productos naturales.....	18
Alcaloides	19
Saponinas.....	19
Quinonas	20
Terpenos.....	21
Flavonoides	21
Cumarinas	22
Técnicas de extracción de aceites esenciales	23
Enfleurage	23
Extracción con solventes.....	23
Extracción por prensado.....	24
Extracción con fluidos supercríticos	25
Extracción por arrastre con vapor.....	25
Hidrodestilación.....	26
Aceites esenciales.....	26
Compuestos de los aceites esenciales.....	27
Monoterpenos.....	30
Sesquiterpenos.....	30
Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	30
Técnicas Cromatografías.....	31
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	32
Características generales de las bacterias	32
Bacterias.....	33
Bacterias Gram positivas.....	33
Bacterias Gram negativas	34
<i>Staphylococcus aureus</i>	35

<i>Enterococcus faecalis</i>	36
<i>Escherichia coli</i>	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	38
Tinción de Gram	38
Tinción de Ziehl-Neelsen	39
Antibióticos	39
Clasificación de agentes antibacterianos.....	40
Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular	40
Antibióticos que dañan la membrana citoplasmática.....	41
Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.....	41
Antibióticos que inhiben la función ribosomal	41
Antibióticos inhibidores de β -lactamasas.....	42
Actividad antibacteriana.....	42
Resistencia bacteriana	42
Resistencia natural	42
Resistencia adquirida	43
Resistencia cromosómica	43
Métodos de análisis de la actividad antimicrobiana	43
Método de Kirby-Bauer.....	44
Método de difusión en medio líquido	44
Método dilución en medio sólido	44
Método de E-test	45
Método de citofluorometría de flujo	45
La concentración inhibitoria mínima (CIM)	46
Operacionalización de las variables.....	46
CAPÍTULO III	49
MARCO METODOLÓGICO	49
Tipo de Investigación	49
Diseño de Investigación.....	49
Población y Muestra	49

Unidad de investigación.....	49
Selección del tamaño de la muestra.....	50
Sistema de variables	50
Instrumento de Recolección de Datos	50
Procedimientos de la Investigación.....	51
Recolección y preparación del material vegetal	51
Extracción de aceites esenciales por el método hidrodestilación	51
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	52
Métodos de difusión en agar con discos de papel (Kirby-Bauer).....	52
Diseño de Análisis.....	54
CAPÍTULO IV	55
RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
Resultados	55
Composición Química del aceite esencial de <i>Vismia japurensis</i>	55
Actividad antibacteriana del aceite de <i>Vismia japurensis</i>	60
Discusión	62
CAPÍTULO V	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
Conclusiones	67
Recomendaciones	68
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de la especie <i>Vismia japurensis</i>	17
Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: Componentes volátiles en el aceite esencial de las hojas de <i>Vismia japurensis</i>	48
Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente: actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Vismia japurensis</i>	48
Tabla 4. Composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Vismia japurensis</i>	56
Tabla 5. Marcadores quimiotaxonómicos en otras especies de <i>Vismia</i>	58
Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Vismia japurensis</i> ..	60

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Vismia japurensis</i> (Tomado y modificado de Da silva., 2019).	16
Figura 2. Alcaloide (Tomado y modificado de Canales y cols, 2011).....	19
Figura 3. Estructura química de la Saponina (Tomado y modificado de Marcano y Hasewaga, 2002).	20
Figura 4. Estructura química de quinona, naftoquinona y antraquinona (Tomado y modificado de Sánchez, 2020).	20
Figura 5. Estructura química de un terpeno (Tomado y modificado de Sánchez, 2020).....	21
Figura 6. Estructura química de un flavonoide (Tomado y modificado de Marcano y Hasewaga, 2002).	22
Figura 7. Estructura química de cumarina (Tomado y modificado de Sánchez, 2020).....	22
Figura 8. Ruta de biosíntesis del ácido mevalónico (Marcano y Hasegawa, 2002).....	29
Figura 9. Membrana celular de una bacteria Gram positiva (Tomado y modificado por Montoya 2008).....	34
Figura 10. Membrana celular de una bacteria Gram negativa (Tomado y modifocado de Romero 2007).....	35
Figura 11. <i>Staphylococcus aureus</i> (Tomado y modificado de Tortora, 2007).	36
Figura 12. <i>Enterococcus faecalis</i> (Tomado y modificado de Ruiz y Guillén., 2005).....	36
Figura 13. <i>Escherichia coli</i> (Tomado y modificado de Tortora y cols., 2007).37	
Figura 14. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Tomado y modificado de Tortora y cols., 2007).....	38
Figura 15. <i>Pseudomona aeruginosa</i> (Tomado y modificado de Brooks y cols., 2001).....	38
Figura 16. Tinción de Gram (Tomado y modificado de Fuller., 2007).	39
Figura 17. Compuestos mayoritarios presentes en la especie <i>Vismia japurensis</i>	57

Figura 18. Compuestos químicos considerados marcadores quimiotaxonómicos para el género <i>Vismia</i>	59
Figura 19. Compuestos químicos considerados poco común para el género <i>Vismia</i>	59

www.bdigital.ula.ve



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Vismia japurensis* EN CEPAS ATCC DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Autora:

Wendy Aleska Mora Pereira
C.I: V-23.646.948

Tutora:

Dr. Prof. Alexis Buitrago

Cotutor:

PhD. Prof. Janne Rojas

RESUMEN

Vismia japurensis (Hypericaceae), comúnmente conocida como lacre es un árbol de hasta 12 m, distribuidos en regiones tropicales y subtropicales de América. En Venezuela crece en todo el país y es utilizada en la medicina tradicional para tratamientos de diversas enfermedades. El presente estudio tiene como objetivo determinar la actividad de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de hojas de *V. japurensis* y comprobar el efecto inhibitorio frente a cepas ATCC de referencia internacional. El tipo de investigación fue analítico. El diseño de investigación fue contemporáneo y transeccional. El aceite se obtuvo por hidrodestilación y se identificaron los componentes químicos por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se lograron identificar al menos 30 compuestos, entre los cuales destacan los sesquiterpenos cíclicos (80%), sesquiterpenos oxigenados (16,6%), sesquiterpenos alifáticos (3,3%). De igual manera, se establecieron como componentes mayoritarios el *cis*-cariofileno (28,22%), β -humuleno (10,01%), *trans*-cariofileno (7,68%), germacreno-*D* (7,28%), y β -selineno (5,05%), así mismo, se encontró en bajas proporciones β -bourboneno (0,39%), *trans*-muurolo-3,5-dieno (4,10%) y γ -gurjuneno (2,48%); especies químicas poco comunes para la especie. Por otra parte, el ensayo para la actividad antibacteriana reveló su efecto contra las bacterias grampositivas *S. aureus* y *E. faecalis* a las CIM de 460 y 820 μ L/mL respectivamente

Palabras claves: *Vismia japurensis*, aceite esencial, actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas y su tratamiento han sido siempre fenómenos inseparables en la vida del hombre, por ello en la historia de la humanidad y sus civilizaciones es conocida la manera como se buscaba e indagaba la posibilidad de encontrar nuevas formas de tratamientos (Sakai., 2022).

De tal manera, el ser humano a lo largo de la historia ha interactuado con la naturaleza en búsqueda de su propio bienestar. Las plantas han sido una parte vital para el alcance de este, pues se les ha dado uso para la cura de enfermedades. Si bien el origen de la fitoterapia (uso medicinal de las plantas) constituye en la actualidad un desafío en la medicina y también se ofrece como una alternativa. El uso de plantas medicinales viene siendo aplicado con la medicina natural tradicional desde tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX. Es por ello, que en la actualidad se viene explorando y valorando el uso de productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes con diferentes actividades biológicas (Peña., 2022).

El deseo permanente de los investigadores por conseguir medicamentos de origen natural, así como el reiterado uso y aprobación de la medicina folclórica tradicional, llevó a una serie de científicos a desarrollar detallados y minuciosos experimentos destinados a conocer plantas con actividades farmacológicas.

En ese sentido, el ensayo para los extractos, aceites y compuestos puros en el género *Vismia* ha proporcionado suficiente evidencia sobre sus propiedades como antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios, insecticidas y antivirales entre otros, los cuales merecen especial atención y profundización para el desarrollo de nuevos tratamientos. Los metabolitos secundarios como antraquinonas, terpenoides, benzofenonas, xantonas, lignanos, cumarinas y

componentes volátiles han sido aislados e identificados en las diferentes especies del género (Vizcaya y cols., 2012).

El género *Vismia* posee aproximadamente 35 especies, las cuales han sido fuentes de interés para un pequeño grupo de investigadores en Latinoamérica. Entre las cuales se puede mencionar a la especie *Vismia japurensis*, un árbol que mide de 9 a 11 m, el cual se encuentra distribuido principalmente en toda la Amazonía brasileña, así como en Colombia, Ecuador y Venezuela. De gran interés en la medicina tradicional para combatir reumatismo, dermatosis impigens (Tinea corpórea), heridas y picaduras de insectos (Gomes y cols., 2011).

Las características las xantonas, que pueden usarse como marcadores quimiotaxonómico. Esta clase química también puede contener hidróxilos fenólicos, lo que permite la estabilización de los radicales libres presentes en las células que le confiere una alta capacidad antioxidante (Gomes y cols., 2011).

Por lo tanto, la presente investigación estudiará los componentes volátiles del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*. Los mismos, se presentan como una mezcla de diferentes especies químicas aromáticas encontradas en los canales secretores de las plantas. Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación con corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos (Villarreal y cols., 2022). Con la solución oleosa obtenida se determinará la sensibilidad contra el crecimiento de ciertas cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional.

La presente investigación se encuentra estructurada por el: **Capítulo I.** Problema: Planteamiento, Formulación del problema, Justificación de la investigación, Objetivos; Limitaciones. **Capítulo II.** Marco Teórico: Trabajos Previos y Bases Teóricas, Definición operacional de términos, Variables e Hipótesis de la investigación; **Capítulo III.** Marco Metodológico: Tipo y Diseño,

Población y Muestra, Técnicas, Instrumentos y Procedimiento de recolección de datos, Análisis de datos. **Capítulo IV.** Resultados y Discusiones y **Capítulo V.** Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En las últimas décadas se ha observado el uso indiscriminado de los antibióticos, lo que ha provocado la aparición de bacterias multirresistentes en los ambientes hospitalarios y en la comunidad, trayendo como consecuencia que cada día sea difícil conseguir un tratamiento eficaz en la actualidad, lo que conlleva a que incrementen los costos médicos, ocasionando que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad. (Rocha y cols., 2015).

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido al uso inadecuado de los antibióticos propone en su plan de acción contra la resistencia: mejorar la sensibilización y los conocimientos en materia de resistencia a los antimicrobianos, reforzar la vigilancia y la investigación, reducir la incidencia de las infecciones, optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos, asegurar que se realicen inversiones sostenibles en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2020). Además, estimular el estudio y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (Camacho., 2023).

En ese sentido, una de las alternativas es la utilización de los extractos vegetales debido sus principios activos, los cuales son empleados en la vida diaria para el tratamiento de diferentes patologías, así como también, una alternativa para la elaboración de nuevos medicamentos. Alrededor del 80% de los habitantes de la tierra dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria en salud (Bermúdez y cols., 2005).

La actividad antibacteriana de los extractos vegetales, revelan su potencial como una fuente de agentes antimicrobianos utilizados en la medicina tradicional, de igual manera son implementados en algunos países como una alternativa a la utilización de antibióticos permitiendo de esta manera el avance en el uso empírico de las especies vegetales como una base científica demostrando así su utilidad en las pruebas antibacterianas, siendo el uso de las plantas una buena opción frente al descubrimiento de nuevas alternativas de combatir bacterias. (Bermúdez y cols., 2005).

Por su parte, las plantas del género *Vismia*, son conocidas como excelentes fuentes de metabolitos secundarios del tipo aromáticos oxigenados, tales como: antranas, xantonas, antraquinonas, flavonoides, terpenos, entre otros, considerados para el género como marcadores quimiotaxonómicos. En la medicina tradicional se utiliza el exudado de color naranja para el tratamiento de diferentes enfermedades cutáneas como la sífilis o el herpes, así como también en infusiones para combatir problemas gastrointestinales y control de los problemas circulatorios (Buitrago y cols., 2020, Salas, 2006).

Los aceites esenciales son representados por una gran cantidad de compuestos volátiles del tipo terpenos que tienen la particularidad de ser solubles en solventes no polares. De igual manera, presentan una elevada miscibilidad en etanol que favorece su utilización para la elaboración de fragancias. (Rojas y cols., 2010).

En la actualidad se considera a la resistencia antibacteriana una problemática de interés en temas de salud pública a nivel mundial, lo que conlleva a la búsqueda de nuevas especies bioactivas, por lo cual se plantea el estudio de una especie perteneciente a la flora de la amazonía venezolana con potencial para el tratamiento de ciertas patologías infecciosas.

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio se formula la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la actividad antibacteriana de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las hojas de

Vismia japurensis contra cepas ATCC de referencia internacional que se estudió en el Laboratorio B de Productos Naturales “Antonio Morales” perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en el Estado Mérida, entre julio de 2023 y julio de 2024?

Justificación e Importancia de la Investigación

Cada día se hace más difícil el tratamiento antimicrobiano por la capacidad de dichos microorganismos de crear resistencia, tal fenómeno ha sido considerado emergente en todo el mundo, especialmente por infecciones nosocomiales, mostrando cifras anuales en aumento del manejo de pacientes (OMS, 2020). Dado que en la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional, conllevando a la búsqueda múltiples investigaciones de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, y así evaluar estos compuestos logrando establecer su actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (Alzamora y cols., 2001). El uso de plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas y vegetales que pueden considerarse para la elaboración de los fármacos, la investigación en este sentido brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural siendo las plantas medicinales. En este sentido se ha señalado que el género *Vismia* posee gran actividad medicinal, de tal manera el estudiar de manera particular la especie *Vismia japurensis* como producto de gran potencial biológico (Vizcaya y cols., 2012; Rojas y cols., 2010).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Estudiar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis* en cepas de referencia internacional en el Laboratorio B de Productos Naturales “Antonio Morales”, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde julio 2023 hasta julio 2024.

Objetivos Específicos

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

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la investigación

Los alcances hacen referencia a la profundidad del estudio, es decir, al grado de elaboración. A su vez, tienen correspondencia con el logro de la investigación. La investigación permitió determinar algunos de los componentes que se encuentran en el aceite esencial obtenido a partir de las hojas de la especie *Vismia japurensis*, así como también se analizó su actividad antibacteriana, todo esto mediante el aprovechamiento de los compuestos naturales provenientes de las plantas de la Amazonía venezolana. Se espera que la investigación pueda complementar el trabajo de

otros investigadores, captar el interés de los lectores y la meta principal de toda investigación que es generar y compartir nuevos conocimientos dentro de la comunidad científica. El alcance de esta investigación estuvo relacionado con los efectos producidos por los componentes volátiles del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis* sobre el crecimiento en ciertas cepas ATCC de referencia internacional.

Limitaciones de la investigación

En cuanto a las limitaciones de la investigación, es importante considerar los aspectos al presupuesto disponible para realizar la investigación, siendo uno de ellos el traslado para la obtención de la muestra en el estado Amazonas. A su vez existen limitaciones al acceso de trabajos previos, artículos actualizados de revistas especializadas con información de la especie en estudio, adicional a esto los cortes prolongados de electricidad y fallas en el servicio de internet que se presentan diariamente en el país, sin dejar atrás la crisis económica provocando así altos costos de reactivos y otros materiales de laboratorio necesarios para llevar a cabo la fase experimental de la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Buitrago y cols., (2023), realizaron una investigación la cual fue determinar la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de los frutos de *V. baccifera* y *V. macrophylla* recolectados en los Andes venezolanos, se recolectaron especies de *Vismia* en diferentes localidades de los estados Mérida y Táchira, Venezuela. Los aceites esenciales se obtuvieron mediante hidrodestilación y la composición química se realizó mediante técnicas de GC y GC/MS. El análisis antimicrobiano se llevó a cabo mediante ensayos de difusión en disco. Los análisis por GC y GC/MS mostraron que estas especies están compuestas principalmente de sesquiterpenos, siendo α -curcumeno, β -curcumeno, germacreno *D*, γ -bisaboleno y β -cariofileno entre los componentes principales. La actividad antimicrobiana también se realizó en los aceites investigados a través de difusión de agar en disco, Todas las muestras analizadas mostraron inhibición del crecimiento contra *S. aureus* con valores de CIM entre 80 a 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$. *E. faecalis* también fue inhibida por VBJ (60 $\mu\text{L}/\text{mL}$); VBH (80 $\mu\text{l}/\text{ml}$); VBM (200 $\mu\text{l}/\text{ml}$); VM (250 $\mu\text{L}/\text{mL}$). VM, VBM y VBV mostraron una actividad moderada contra *E. coli* con valores de CIM entre 520 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 980 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *K. pneumoniae* fue inhibida por VBH, VBV y VBJ con valores de MIC de 550 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 580 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 980 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Los aceites de las muestras VBM, VBV y VBH también mostraron actividad contra las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* con valores de CIM entre 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 700 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Además, los aceites de *V. baccifera* demostraron ser

activos contra *C. albicans* y *C. krusei* con valores de CIM entre 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 950 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Buitrago y cols., (2020), realizaron el siguiente estudio titulado Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana de fracciones de diferentes polaridades obtenidas de *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch y *Vismia macrophylla* Kunth.I. Estudio permitió en primer lugar identificar, el tamizaje fitoquímico en los extractos metanólicos de *Vismia baccifera* (VB) y *Vismia macrophylla* (VM), en el cual se observaron la presencia de metabolitos secundarios del tipo antraquinona, xantona, antrona, glicósidos, flavonoides, terpenos y esteroides, así como comprobar la ausencia de alcaloides, mucílagos y saponinas. Evaluaron la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con discos de papel. Los resultados les permitieron establecer que las soluciones de mediana a alta polaridad fueron activas solo contra las bacterias grampositivas. Para la muestra de **VM** las fracciones en agua (Ag), diclorometano (DCI), metanol (Met) y acetato de etilo (AcE) inhibieron el desarrollo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), con rangos de concentración inhibitoria mínima (**CIM**) de 200 a 350 $\mu\text{L}/\text{mL}$, la fracción de Met y Ag inhibió *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) con valores de **CIM** de 512 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Con respecto a la especie **VB** solo la muestra en Met fue activa contra *S. aureus* (**CIM**: 320 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y *E. faecalis* (**CIM**: 350 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Por otra parte, Pedroza. (2019), realizó un estudio teniendo como objetivo el estudio químico y biológico de tres especies *V. japurensis*, *V. cauliflora* y *V. sandwithii*. Al analizar el perfil químico de las tres especies de *Vismia*, fue posible verificar la presencia de antraquinonas, triterpenos y flavonoides. Con relación a actividad antioxidante para los extractos los resultados fueron de mediana capacidad secuestrante en comparación con el estándar de ácido ascórbico.

Para la actividad antibacteriana, los extractos se consideraron activos contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis* a la CMI de 500 µg/mL. De igual manera, evaluaron la acción del triterpeno Friedelina contra la bacteria *Citrobacter freundii* (CIM: 125 µg/mL); siendo estos los primeros informes de actividades biológicas para la especie *V. japurensis*.

Antecedentes históricos

Desde tiempos antiguos, los recursos vegetales han sido aprovechados por el hombre para uso alimenticio o medicinal. Esto es gracias a la cantidad de metabolitos secundarios que poseen las plantas y sus frutos, los cuales han constituido un punto de partida para el descubrimiento de nuevas sustancias bioactivas lo que ha permitido tener opciones interesantes para darle solución a la problemática de la resistencia a antibióticos y la necesidad de desarrollar nuevos fármacos debido a escases de los medicamentos que sean eficaces y efectivos. (Beltrán y cols.,).

El género *Vismia* fue descrito por primera vez por Domenico Vandelli y fue titulado en una obra llamada "Florae Lusitanicae et Brasiliensis Specimen 1788". Es de amplia distribución, árbol de 4 a 12 metros de altura es característico de las fronteras de la selva. La savia que se desprende de las especies de *Vismia* y su uso por parte de las tribus del Amazonas y en diferentes zonas geográficas, impulsó los primeros estudios a comienzos de la década de los sesenta. Los mismos la utilizaban como un tratamiento eficaz para la protección de mordeduras de serpiente, enfermedades de la piel además de ser una pintura decorativa utilizada en el cuerpo para el desarrollo de sus tradiciones (Ewan., 1962).

La familia Hypericaceae pertenece al orden Malpighiales, estuvo incluida durante mucho tiempo en la familia Clusiaceae, también conocida como Guttiferae. Fue segregada de Clusiaceae, recientemente basada en datos de estudios de carácter molecular, filogenético y morfológico, siendo luego reconocida como una familia independiente (Stevens., 2019).

En el estudio de esta actividad antimicrobiana en las plantas ha cobrado gran relevancia la implementación del método de Kirby-Bauer como prueba de susceptibilidad, puesto que este método de difusión con discos es sencillo, de bajo costo y aunque es un método cualitativo, brinda resultados confiables, lo cual hace a este método útil, no solo para los laboratorios de microbiología de instituciones altamente especializadas, sino también para laboratorios menos especializados (Pérez y cols, 2006).

Aproximación teórica sobre metabolitos secundarios presentes en las plantas

Los metabolitos secundarios son moléculas biosintetizadas por las plantas y juegan un papel de protección y supervivencia. Así mismo, los metabolitos secundarios son de gran importancia para la salud humana ya que son compuestos con propiedades bioactivas. La amplia variabilidad estructural de estos compuestos ha atraído la curiosidad de químicos y las actividades biológicas que poseen estos productos naturales han inspirado a la industria farmacéutica para buscar nuevas formas farmacéuticas (Marcano y Hasegawa., 2002).

Son moléculas relativamente pequeñas presentes en el reino vegetal. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores,

antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas (Martínez y cols., 2000).

Se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glucósidos, alcaloides. En las cuales los terpenoides poseen propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, entre otros. En cuanto a los compuestos fenólicos tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad cardiovascular, el cáncer, la úlcera duodenal y gástrica, procesos patológicos de carácter inflamatorio, fragilidad vascular, infecciones entre otros. Mientras que los glicosidos cumplen funciones de defensas, y por último los alcaloides a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos (Martínez y cols., 2000).

Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana relacionada con los metabolitos secundarios

La actividad antibacteriana se refiere a la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias que causan infecciones. Los antibióticos se pueden dividir en los grupos bacteriostáticos y bactericidas, según los microorganismos sobre los que actúan y el grado de su acción. Por tanto, si se quiere tratar una infección, se llama acción antibacteriana, y si se quiere prevenir una infección, se llama profilaxis antibacteriana. Esto se aplica dependiendo del caso individual y la apariencia individual (Sánchez y cols., 2020).

De igual forma, se asocian a metabolitos secundarios que forman parte importante de este proceso al observar la identificación de diversos grupos funcionales presentes en extractos y/o aceites esenciales. Estos grupos funcionales varían dependiendo de su origen y proximidad al momento de inhibición del crecimiento bacteriano. Compuestos vegetales existentes y sus efectos satisfactorios sobre diversas bacterias. Por lo tanto, estas

implementaciones o ensayos proporcionarán datos más confiables respecto a su implementación (Cosme., 2008).

Bases teóricas

Características botánicas de la familia Hypericaceae

Esta familia comprende árboles, arbustos con tallos glabras o con pelos simples, estrellados, dendríticos o lepidotos. El desprendimiento de cualquier parte de la planta produce una savia de color anaranjada. Sin estípulas, hojas simples y opuestas, dísticas o decusadas, glabras, o con pelos estrellados, dendríticos o lepidotos, a menudo con puntos glandulares rojos o negros y bordes enteros. Inflorescencias en panículas terminales (Martins y cols., 2018).

Flores bisexuales actinomorfas, sépalos libres o unidos, imbricados, enteros o con el margen irregularmente dividido y a menudo con puntos o líneas glandulares. Pétalos, libres, imbricados, enteros o con el margen irregularmente dividido. Estambres cuando son muchos usualmente se encuentran agrupados en fascículos. Ovario súpero, estilos, libres o unidos, estigma capitado o a veces bífido. Frutos en cápsulas, bayas o rara vez drupas, con restos del cáliz en la base. Semillas Muchas veces aladas (Martins y cols., 2018).

La familia Hypericaceae pertenece al orden Malpigiales, la misma reúne al menos 11 géneros y cerca de 560 especies distribuidas a nivel mundial; las cuales se extienden desde las regiones templadas hasta los trópicos (Lima., 2020).

Distribución Geográfica de la Familia Hypericaceae

La familia Hypericaceae tiene una distribución cosmopolita y se extiende desde las regiones templadas hasta los trópicos, representado por 11

géneros (*Ascyrum*, *Cratoxylum*, *Eliea*, *Harungana*, *Hypericum*, *Lianthus*, *Psorospermum*, *Santomasia*, *Thornea*, *Triadenum* y *Vismia*) y aproximadamente 1356 especies. Los mismos se distribuyen en tres tribus: *Vismieae* Choisy, *Hypericeae* Choisy y *Cratoxyleae* Bentham (Stevens., 2007).

Aspectos botánicos del género Vismia

Pertenece a la familia Hypericaceae, se encuentra representada por tres géneros: *Vismia*, *Harungana* y *Psorospermum*, las cuales crecen en regiones tropicales y subtropicales (Vizcaya y cols., 2012). Las plantas del género *Vismia*, están representadas por árboles bajos con copas poblada o arbustos altos, presentan hojas opuestas, anchas, parecidas a los álamos, y flores blancas, verdes, amarillentas o parduscas que nacen en panículas más o menos apiñadas (Lima y cols., 2022).

Distribución geográfica de género Vismia

Existen cerca de setenta especies de *Vismia*, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en América Central y del Sur; Centro y Oeste de África y muy pocas especies en Asia. (Vizcaya y cols., 2012).

Compuestos químicos presentes en el género Vismia.

En las diferentes especies del género *Vismia* se han aislado e identificado mayoritariamente compuestos aromáticos oxigenados, tales como: antraquinonas xantonas, flavonoides, terpenoides, benzofenonas, lignanos, cumarinas, así como también compuestos volátiles del tipo monoterpenos, sesquiterpenos cíclicos y acíclicos con algunas funciones oxigenadas (Vizcaya y cols, 2012).

Usos etnobotánicos y actividad farmacológica del género Vismia

Las plantas del género *Vismia* han reportado la presencia de compuestos bioactivos con actividades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias,

insecticidas y antivirales entre otros; siendo de interés para el desarrollo de nuevos fármacos con utilidad para el tratamiento de ciertas patologías (Vizcaya y cols., 2012).

Aspectos Botánicos de Vismia japurensis

Vismia japurensis (Hypericaceae) es una especie de planta arbustiva, conocida popularmente en la Amazonía como lacre, picharrinha o purga de vento ampliamente distribuida en los estados Amazonas, Apure, Bolívar y Sucre. Se considera un árbol pionero generalmente se presenta en vegetación secundaria, mide entre 3 y 10 m de altura y tiene látex de color naranja (Da silva, 2019; Buitrago, 2018). Como se presenta en la Figura 1, presenta hojas con puntos glandulares negruzcos, Flores homostilas o heterostilas contiene cinco sépalos dorsalmente, excepto en los angostos márgenes internos glandulares; cinco pétalos, vellosos en el interior, con glándulas anaranjadas a negras; estambres en cinco fascículos antipétalos cada uno de 10–50 estambres; cinco fascículos estaminodiales; cinco ovarios locular con placentación axial, cinco estilos, libres. Fruto una baya lisa, glabra, frecuentemente punteado-glandular; semillas numerosas, cilíndricas (Vizcaya y cols., 2012).



Figura 1. *Vismia japurensis* (Tomado y modificado de Da silva., 2019).

Taxonomía de Vismia japurensis

Es una familia altamente distribuida y aceptada por la APG II, una breve descripción de las características taxonómicas se describe en la Tabla 3. Ampliamente distribuida en algunos países de América del Sur, como Brasil, Colombia, Ecuador y Venezuela. (Da silva., 2019).

Tabla 1 Taxonomía de la especie *Vismia japurensis*.

Clase	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia	Hypericaceae
Subfamilia	Hypericoideae
Género:	<i>Vismia</i>
Especie	<i>japurensis</i> Reichardt

Compuestos químicos presentes en Vismia japurensis

Los estudios fitoquímicos de *V. japurensis* extracto metanólico de las hojas presenta antraquinonas vismiaquinona y vismiaquinona B, los triterpenos Friedelina y Friedelan-3- β -ol y el esteroide sitosterol (Miraglia y cols, 1981). Por otra parte un estudio con el extracto cloroformico de las bayas de la especie, se pudo observar la presencia de α -selineno, β -selineno, vismiaquinona, triglicéridos, vismiona A, acetilvismiona B, γ -hidroxiantrona y *trans*- γ -hidroxiferruginina A; (Pinheiro., 1984).

Da silva en el 2019 determinó en la especie *V. japurensis* la presencia de antraquinonas, triterpenos y flavonoides. A partir del estudio fitoquímico de extractos de hexano de las hojas de *V. japurensis*, se aislaron dos triterpenos (friedelina y Friedelan-3-ol) y tres antraquinonas. (madagascina, fisciona y vismiaquinona A)

Usos etnobotánicos y actividad farmacológica de Vismia japurensis

Respecto a las actividades realizadas con extractos de las hojas de *Vismia japurensis* Da silva en el 2019 observó: actividad antioxidante, actividad antipalúdica, También los extractos de hexano mostraron toxicidad a la concentración de 1000 g/mL, con 100% de mortalidad de larvas. Para la actividad de anti angiogénico. Con respecto a la actividad antibacteriana sirvió contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis* (Da silva., 2019).

Definición operacional de términos

Productos naturales

El mundo vegetal muestra un abanico de moléculas, donde el hombre ha hecho y hace una provechosa utilización de las mismas. La maquinaria química de un vegetal es tan ingeniosa que asombra al estudiar en su profundidad la estructura, función, metabolismo y regulación de cada molécula identificada, así como los innumerables procesos en que participan a nivel celular (Bandoni y cols., 2006).

Los compuestos derivados del metabolismo secundario se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos de ellos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Bruneton., 2001).

Gran diversidad de metabolitos secundarios ha sido y son utilizados por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, agrícola, cosmética, alimenticia, entre otras. En muchos casos los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos

de semisíntesis. La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos (Bandoni y cols., 2006), entre los metabolitos secundarios están los siguientes:

Alcaloides

Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias Fanerógamas, en menor proporción en Criptógamas (licopodios), microorganismos (ergot) y animales (Figura 2). Su actividad fisiológica principalmente a nivel de sistema nervioso, fue el motor de las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos se han manifestado como altamente tóxicos y otros en dosis apropiadas son drogas comúnmente usadas en medicina (Marcano y Hasewaga, 2002).

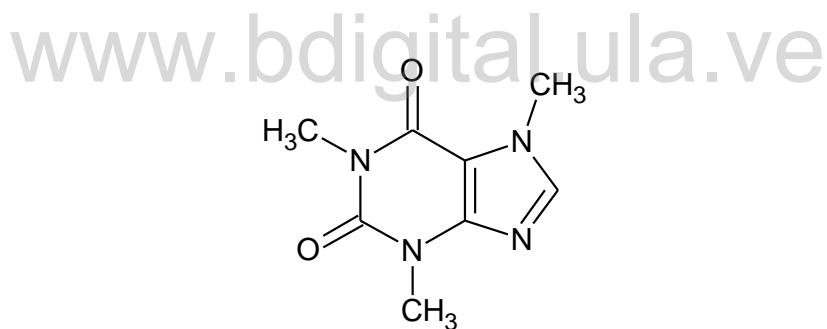


Figura 2. Alcaloide (Tomado y modificado de Canales y cols, 2011).

Saponinas

Se llaman saponinas (Figura 3) a un grupo de sustancias glicosídicas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Por hidrólisis (ácida, microbiológica o enzimática) de una saponina se obtienen carbohidratos y una aglicona “sapógenina”. Estos compuestos se aíslan de diferentes fuentes vegetales; por ser solubles en agua pueden extraerse fácilmente en frío o en caliente con agua o con alcoholes de bajo peso molecular (Marcano y Hasewaga, 2002). Las saponinas ofrecen una alta

actividad superficial debido a la combinación estructurada de un grupo polar (azúcar) y uno no polar (esteroide o triterpeno), propiedad que permite su uso como un detergente natural, agente estabilizante y emulsificador en productos de limpieza y cosméticos (Ávalos y Pérez, 2009).

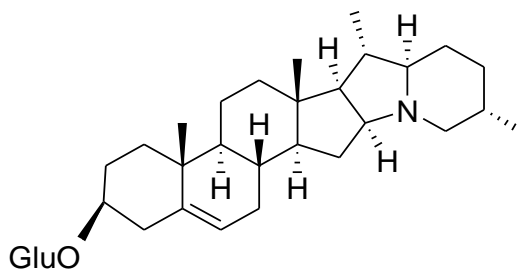


Figura 3. Estructura química de la Saponina (Tomado y modificado de Marcano y Hasewaga, 2002).

Quinonas

Son dicetonas cíclicas insaturadas que por su reducción se convierten en polifenoles, son comunes en plantas, en vegetales, hongos y bacterias. Derivan su nombre de la *p*-benzoquinona como producto de oxidación del ácido químico. Se clasifican en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y fenantraquinonas (Figura 4), dependiendo de los anillos aromáticos que posean (Sánchez, 2020).

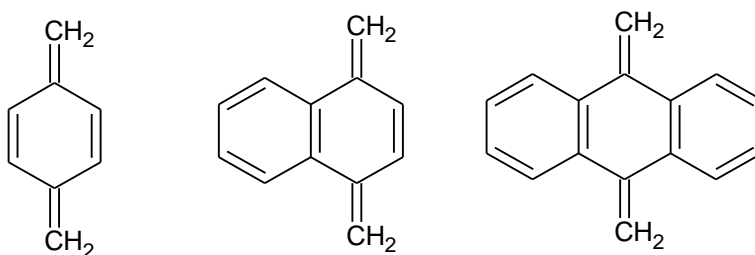


Figura 4. Estructura química de quinona, naftoquinona y antraquinona (Tomado y modificado de Sánchez, 2020).

Terpenos

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isoprenos (Figura 5). Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplasmico; mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plásmidos. Muchos terpenoides son interesantes desde el punto de vista comercial debido a su uso como aromas y fragancias, así como en la industria cosmética y alimenticia por su importancia en la calidad de los productos agrícolas. Adicionalmente, poseen importancia medicinal por sus propiedades anticancerígenas antiulcerosas, animalarica y antimicrobianas (Ávalos y Pérez., 2009).

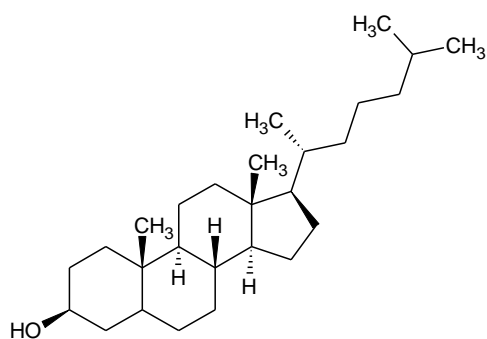


Figura 5. Estructura química de un terpeno (Tomado y modificado de Sánchez, 2020).

Flavonoides

Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Figura 6), estos se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales las antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e

isoflavonas (Ávalos y Pérez., 2009). Los flavonoides sin ser metabolitos primarios se encuentran casi en cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares, mientras que, en los vegetales inferiores, algas, hongos y bacterias, los compuestos fenólicos principales son quinonas y xantonas y a estos deben su color. La función de los flavonoides en las plantas son varias puesto que se consideran antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobiales y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, entre otros (Marcano y Hasewaga., 2002).

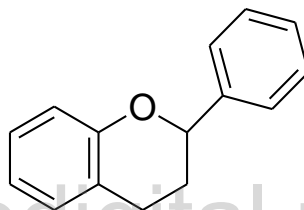


Figura 6. Estructura química de un flavonoide (Tomado y modificado de Marcano y Hasewaga, 2002).

Cumarinas

Son una familia de fitoquímicos que biosintetizan en las plantas por la ruta fenilpropanoide. Estos compuestos son derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, la esculetina y la escopoletina. Las cumarinas son sólidos cristalizables, se puede ver en su estructura química (Figura 7) un anillo bencénico unido a una piran-2-ona (Sánchez., 2020).

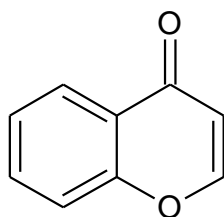


Figura 7. Estructura química de cumarina (Tomado y modificado de Sánchez, 2020).

Técnicas de extracción de aceites esenciales

Existen diversos procedimientos para extraer los aceites esenciales, los cuales se mencionan a continuación:

Enfleurage

Éste es el método por el cual las esencias de la flor, que son más delicadas y difíciles de obtener son extraídas. Las flores o los pétalos se machacan entre las bandejas enmarcadas, de cristal de madera manchadas con una grasa animal hasta se satura con su perfume. Para esto se utilizan grasas naturales con puntos de ablandamiento alrededor de 40°C, normalmente manteca de cerdo RBD (Refinada, Blanqueada, Desodorizada). Se extiende en bandejas ó “chasis” en profundidad no mayor a 0,5 cm y sobre ella se colocan los pétalos de flores ó el material vegetal, desde donde se van a extraer los principios odoríficos, el contacto puede durar de 3 a 5 días. Luego el material vegetal es removido y reemplazado por material fresco, esta operación se repite buscando la saturación de la grasa. Posteriormente la grasa impregnada del principio activo, “le pomade”, se lava con alcohol libre de congéneres (alcohol de perfumería), relación 1/1 dos veces consecutivas. El alcohol se filtra y se destila a vacío (21 mmHg / 30°C) hasta recuperar un 80% del volumen de alcohol, como mínimo, en el fondo queda un residuo llamado “absolute” (Cases y Hernández., 2007).

Extracción con solventes

El material previamente debe de ser molido, macerado, picado, para permitir una mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. El proceso ha de buscar que el sólido y/o líquido, estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura ambiente. El proceso puede ejecutarse por batch (por lotes o cochadas) o en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo

soxhlet). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. El solvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, ha de disponerse de una unidad de enfriamiento, para la menor pérdida del solvente. El material residual en la marmita de destilación. En caso de emplear glicoles, aceites vegetales, aceites minerales, como solventes extractores, los componentes odoríficos son imposibles de recuperar desde allí y el producto se comercializa como un todo, conocido como “extractos” (Morillo y cols., 2010).

Extracción por prensado

El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch o en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta o de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa. Para los cítricos antiguamente se empleó el método manual de la esponja, especialmente en Italia, que consiste en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja hasta que se empapa de aceite, se exprime entonces la esponja y se libera el aceite esencial. Otros métodos corresponden a raspado, como el del estilete o “ecuelle”, donde la fruta se pone a girar en un torno y con un estilete se raspa la corteza únicamente; permanentemente cae un rocío de agua que arrastra los detritos y el aceite es liberado. Otro proceso emplea una máquina de abrasión similar a una peladora de papas, la “pellatrice” y también hace uso del rocío de agua. En estos procesos la mezcla detritos-agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos y el aceite esencial recuperado se coloca en una nevera a 3°C durante 4 horas, para solidificar gomas y ceras que se localizan en la superficie. El aceite esencial se guarda en recipientes oscuros a 12 °C. Los aceites obtenidos por prensado

y/o raspado, se les comercializa como “expresión en frío” y cumplen las funciones de odorizantes (smell oils) y saborizantes (taste oils) (Morillo y cols., 2010).

Extracción con fluidos supercríticos

EL punto crítico corresponde a las condiciones de temperatura y presión, para un gas por encima de las cuales la sustancia ya no puede ser “licuada” por incremento de presión. Adicionalmente las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido. La sustancia más empleada es el CO₂, que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. En la parte final del proceso hay una remoción total del solvente y se realiza a una temperatura baja, se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños “a cocido”. El CO₂ no es tóxico, ni explosivo, ni incendiario, es bacteriostático y es clasificado por la FDA como GRAS (Generally Recognized As Safe). La temperatura y presión críticas para el CO₂ son P_c 73 bar y T_c 31°C (Cases y Hernández., 2007).

Extracción por arrastre con vapor

Por efecto de la temperatura del vapor (100°C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial, este debe de ser insoluble en agua, ya que después del condensador, en el separador (Florentino) debe de formarse dos fases: una de aceite esencial y otra de agua. Si el aceite esencial presenta componentes solubles en agua estos quedarán en la fase acuosa (Cerpa., 2000).

Hidrodestilación

La hidrodestilación es un proceso conocido y difundido mundialmente para obtener el aceite esencial de una planta aromática. Sin embargo, existen escasos estudios sistemáticos para conocer los fenómenos controlantes del proceso y permitan entenderlo física o químicamente, con los propósitos de: controlarlo, simularlo y optimizarlo eficientemente. Estos sistemas son muy utilizados en el campo, son fáciles de instalar, se pueden llevar de un sitio a otro, “trashumantes”, son baratos, seguros, fáciles de operar y presentan un consumo energético bajo (Cerpa., 2000).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. En general son los responsables del olor de las plantas. Existen aceites que se usa en medicina y otras sustancias aromáticas empleadas en farmacia y perfumería conocidas como esencias (Martínez A., 1996).

Pueden estar en diferentes órganos: raíz, rizoma, leño, hoja, fruto, sumidades floridas. La composición varía con el lugar de origen. También varía con el hábitat en que se desarrolle, el momento de la recolección, el método de extracción, entre otros. Entre las principales propiedades terapéuticas debidas a la presencia de aceites esenciales, cabe destacar la antiséptica (durante muchísimos años estas especies vegetales se han empleado como especias, no solo para dar sabor sino también para conservar los alimentos); antiespasmódica; expectorante; carminativa y eupéptica; entre otros. Se debe tener en cuenta que algunos aceites esenciales, sobre todo a dosis elevadas, son tóxicos, principalmente a nivel del sistema nervioso central (Van., 2003).

Compuestos de los aceites esenciales

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados. Ej: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico y se les cataloga como terpenos: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y carotenos (C40). Es posible encontrar en los aceites, derivados del fenil propano y compuestos formados por la degradación de ácidos grasos (Marcano y Hasegawa 1991).

Se conoce que la ruta de ácido mevalónico que se presenta en la Figura 8, es el precursor de los terpenos; éste se forma por la condensación de los tioésteres del ácido acético por medio de la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa (HMG-CoA sintetasa); el producto será la formación del acetoacetato, que a través de una reacción química de condensación aldólica de éste con una molécula de acetilcoenzima A catalizada por la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que efectúa la reducción NADPH dependiente de la (HMG-CoA reductasa) a ácido 3R-mevalónico (MVA). De manera más simple se puede decir que el ácido mevalónico se origina por deshidratación y descarboxilación simultánea que es ayudada por la fosforilación del OH en el C-3 de la molécula. En esta etapa se produce isopentenilpirofosfato (IPP), el cual se equilibra con dimetilalilpirofosfato (DMAPP) por pérdida de hidrógeno y ganancia del grupo metilo. Ambos compuestos conformarán los terpenoides al sucumbir a varias condensaciones sucesivas. Así, por ejemplo, para que se originen los monoterpenos debe ocurrir la condensación de DMAPP e IPP: de la última unidad la pérdida del H sobre el C-2 origina la unión trans (geranilpirofosfato (GPP)). A su vez el GPP se condensa con una unidad de IPP formando de esta manera el farnesilpirofosfato (FPP), precursor de los sesquiterpenos. Para

biosintetizar diterpenos debe ocurrir una reacción de condensación de este modo se formará el precursor de los diterpenos que es el geranylgeranylpirofosfato (GGPP). La formación de los triterpenos, esteroides y carotenos provienen del escualeno y del fitoeno. La formación del ácido mevalónico (MVA) es partir de la acetil-CoA y la acetoacetil-CoA, donde se forma al final el dimetil alil pirofosfato (DMAPP) y isopentenil pirofosfato (IPP); representa esquemáticamente la vía del mevalonato y el origen de los diferentes terpenos, (Marcano y Hasegawa.,1991).

www.bdigital.ula.ve

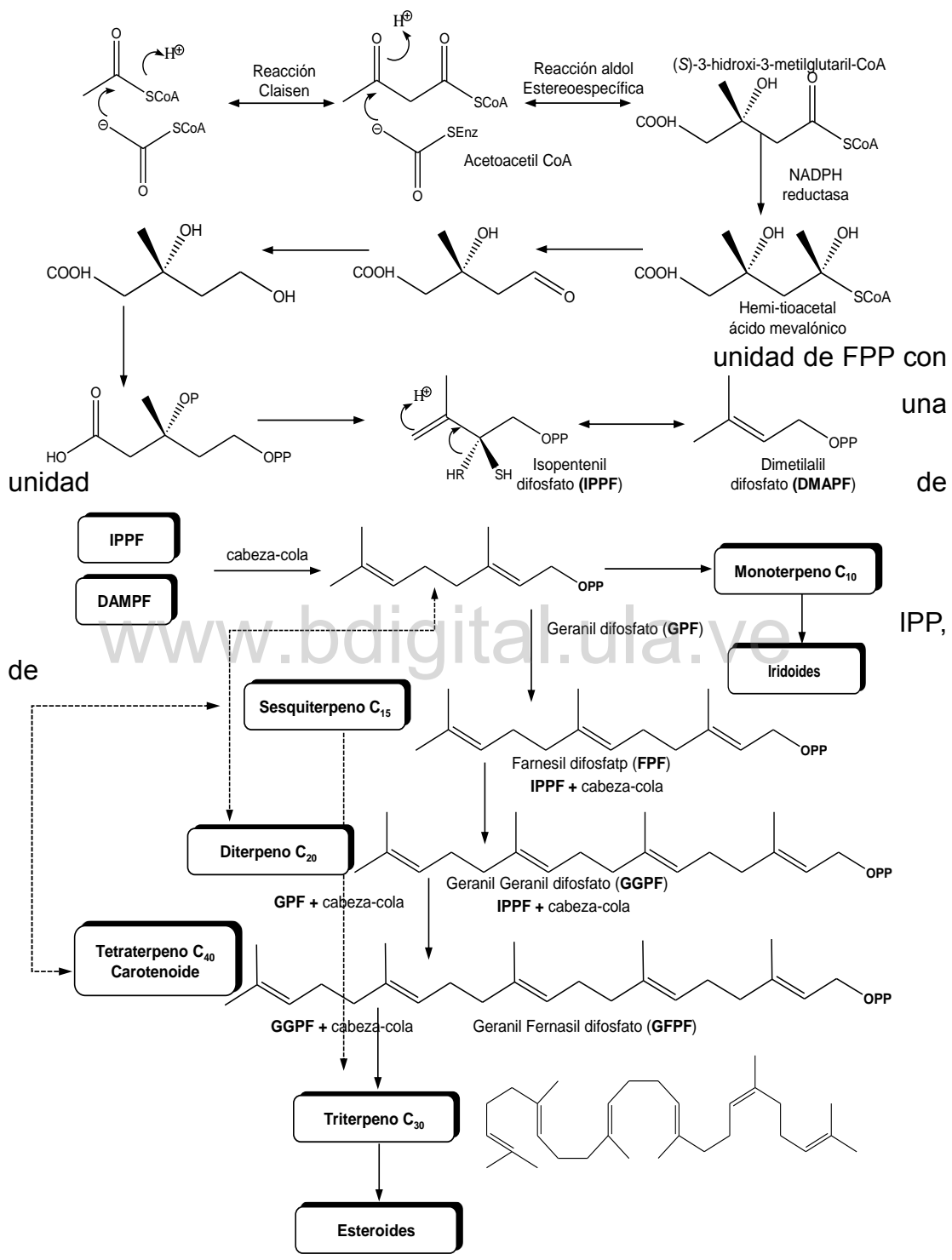


Figura 8. Ruta de biosíntesis del ácido mevalónico (Marcano y Hasegawa, 2002)

Monoterpenos

Son biogénicamente derivados de dos unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos, plantas, microorganismos e insectos; algunos tienen funciones específicas en el individuo, otros presentan actividades biológicas de distinta naturaleza (Marcano y Hasegawa., 1991).

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

Sesquiterpenos

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

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos. Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades

biológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación y establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida, por medio de extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas, para ello se han empleado las técnicas *In Vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas. El uso de plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas, vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en diferentes países, a partir de su empleo en medicina tradicional, la investigación en este sentido brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural, las plantas medicinales (Kumar y cols., 1998).

Técnicas Cromatografías

Son técnicas que se basan en la separación de sustancias que se encuentran presente en una mezcla compleja, entre dos fases inmiscibles, una móvil y otra estacionaria. Las moléculas pertenecientes al soluto de la mezcla son retenidas por la fase estacionaria y arrastradas por la fase móvil, de modo que, si los componentes de la mezcla presentan afinidades diferentes por algunas de las fases, sus velocidades medias de avance a lo largo del sistema serán diferentes (Skoog., 2008).

La cromatografía es una técnica muy versátil, que permite la separación tanto de mezcla como la purificación de los productos, la determinación del grado de pureza de un compuesto, el seguimiento de reacciones o la detección y caracterización de compuestos. Su principal ventaja frente a otros métodos de separación y purificación es que las técnicas cromatográficas se pueden clasificar atendiendo varios criterios: naturaleza de las fases (las cuales son sólido, líquido, gas), relación de polaridad de las fases (fase normal, fase inversa), mecanismo de separación (adsorción, exclusión, intercambio iónico,

reparto, afinidad), disposición de las fases (en columna en plano) y forma del desarrollo del proceso (frontal, de desplazamiento, de elución) (Dean y cols., 1990; Palomino. , 2001).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La técnica de cromatografía de gases puede ser acoplada con la espectrometría de masas para obtener el espectro de masa de cada componente, el peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con espectros de masas de muchos componentes y recientemente se han logrado desarrollar columnas cromatográficas quirales para la separación de componentes ópticamente activos. Con la espectrometría de masas no solo es factible determinar los picos de una especie, sino también identificar los diversos componentes sin resolver. En la combinación cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, el efluente de la columna se introduce directamente en la cámara de ionización de dicho espectrómetro de forma que se elimina la mayor parte del gas portador. En la cámara de ionización, se ionizan todas las moléculas y los iones se separan de acuerdo con su cociente masa/carga, que se utiliza para identificar el compuesto (Segovia y Suárez., 2010).

Características generales de las bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares de varios micrómetros de tamaño, tienen una membrana plasmática formada por lípidos y proteínas que rodea y protege la célula, y una pared celular, una barrera física y mecánica que le confiere forma a la bacteria. Muchas bacterias son propias del cuerpo humano, se denominan parte de la microflora habitable del cuerpo y actúan como barrera protectora contra diversos patógenos (Arcano., 2008).

Según su forma se pueden distinguir distintos tipos de bacterias (cocos, bacilos, vibrios o vibriones, espirillas, espiroquetas). Según la tinción de Gram, las bacterias se pueden clasificar en bacterias Gram positivas y Gram

negativas. Las bacterias Gram negativas tienen endotoxinas en sus paredes celulares que pueden tener efectos tóxicos en el organismo. Las bacterias, principalmente las Gram positivas, por otro lado, producen y liberan exotoxinas asociadas con infecciones, como la toxina botulínica y la tetanospasmina. (Acuña., 2018).

Bacterias

Las bacterias junto con los protozoos, los hongos y las algas, pertenecen a la categoría de los microorganismos, que son formas de vida microscópica. La bacteria es indispensable para la vida en la Tierra y existe en los más diversos ambientes. Es el organismo que se encuentra en mayor abundancia en nuestro planeta. Hay bacterias que conviven dentro de otros organismos en relaciones simbióticas llamadas endosimbiontes, el ejemplo más común es la flora bacteriana hoy día llamado microbiota habitual, del tracto digestivo que ayuda a procesar nutrientes. Presentan las siguientes características: son procariontes por lo que no tiene núcleo y están formados por un único cromosoma, tienen un ADN en el citoplasma (Barrios., 1988).

Se reproducen mediante fisión binaria o división celular, el ADN se divide y luego también su citoplasma para crear dos células hijas. Posee una pared celular compuesta de peptidoglicano muy resistente por ser de cadena recta y no ramificada, tienen diferentes métodos de metabolismos y de hábitats, algunos tienen cilios o flagelos y pertenecen al reino monera. Según su forma, las bacterias son generalmente clasificadas en: bacilos (bastón), espirilos (espirales) o cocos (esféricos) (Fuller., 2007).

Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas (Figura 9), son bacterias que se vuelven azul oscuro o violeta cuando se tiñen con tinción de Gram. Esta propiedad química está estrechamente relacionada con la estructura de la envoltura celular y, por

tanto, refleja la forma natural en que se organizan las bacterias. Estos son los principales grupos de bacterias, y el nombre Posibacteria también se utiliza cuando se trata como un taxón de 39, siendo el resto bacterias Gram negativas (Montoya., 2008).

Su composición de pared celular es 90% de peptidoglicano. Este es el componente principal que se puede distinguir de las paredes de las células Gram negativas, ya que proporciona el espesor de la pared celular tras la tinción. La tinción de Gram garantiza un color violeta cristal en el interior de las células. Además de peptidoglicano, está compuesto por ácidos teicoicos, que están presentes en pequeñas cantidades y se almacenan como polisacáridos ácidos en la pared bacteriana (Montoya, 2008).

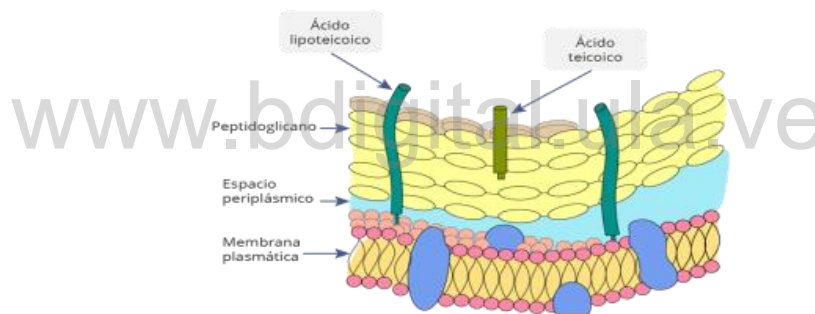


Figura 9. Membrana celular de una bacteria Gram positiva (Tomado y modificado por Montoya 2008)

Bacterias Gram negativas

La tinción de Gram da como resultado un color rosa pálido en lugar de azul oscuro o violeta. Esta propiedad está estrechamente relacionada con la estructura bidérmica proporcionada por la envoltura celular. Esto se debe a que la envoltura celular tiene doble membrana celular, una externa y otra citoplasmática, lo que refleja el método natural de organización bacteriana (Romero., 2007).

La composición de la pared celular de estas bacterias consiste en una membrana citoplasmática (membrana interna), una delgada pared celular de peptidoglicano que rodea la pared celular anterior y una membrana externa que cubre la pared celular de estas bacterias. Entre las membranas citoplasmáticas interna y externa se encuentra el espacio periplásmico (Figura 10), que está lleno de una sustancia llamada periplasma. El periplasma contiene importantes enzimas que alimentan a estas bacterias (Romero., 2007).

La membrana externa contiene una variedad de proteínas. Esto incluye canales de porinas o proteínas que permiten el paso de determinadas sustancias. También existe una estructura llamada lipopolisacárido (LPS), que consta de tres regiones: polisacárido O (antígeno), estructura central de polisacárido (KDO) y lípido A (endotoxina). Los lipopolisacáridos contienen toxinas termoestables que se liberan cuando las bacterias se descomponen y resisten la esterilización en autoclave (Romero., 2007).

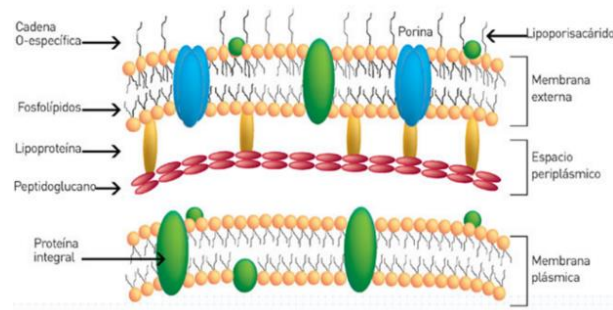


Figura 10. Membrana celular de una bacteria Gram negativa (Tomado y modificado de Romero 2007)

Staphylococcus aureus

Es una bacteria Gram positiva (Figura 11) residente en la piel transmitida a la herida quirúrgica está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas

cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula son anaerobias facultativas (Fuller., 2007). (Tortora y cols, 2007).



Figura 11. *Staphylococcus aureus* (Tomado y modificado de Tortora, 2007).

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis, (Figura 12) microbiológicamente se clasifica como coco grampositivo, no fermentador de endoesporas, presenta una disposición típica en pares o cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, quimiórganotrofos, con metabolismo fermentativo y catalasa negativo. Estos microbios se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal como comensales y también pueden estar presente en el tracto genitourinario y en la saliva, también ha demostrado adquirir a una amplia gama de antibióticos (Ruiz y Guillén., 2005).



Figura 12. *Enterococcus faecalis* (Tomado y modificado de Ruiz y Guillén., 2005).

Escherichia coli

Es un bacilo que mide de 1-3 μm de largo por 0,5 μm de ancho, se presenta sólo en pares, en cortas cadenas o formando grupos (Figura 13). Es móvil, no forma esporas y por lo general es no capsulado. Forma parte de la flora residente del tubo digestivo de las personas sanas, donde no causan daño. Sin embargo, pueden producir infecciones localizadas y supurativas graves., *E. coli* es la causa más frecuente de infecciones urinarias. Una vez en el torrente circulatorio puede producir la siembra en otros órganos y causar una destrucción grave de los tejidos (Koneman, 2008; Tortora y cols., 2007).



Figura 13. *Escherichia coli* (Tomado y modificado de Tortora y cols., 2007).

Klebsiella pneumoniae

Son bacilos no flagelados, por lo tanto, son inmóviles (Figura 14). Se encuentra frecuentemente en el suelo o el agua, es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*. Son bacterias Gram Negativas, implicadas principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de heridas quirúrgicas. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema. También suele encontrarse en las infecciones de la toracotomía para realización de by pass o revascularización coronaria (Ruiz y Guillén., 2005).

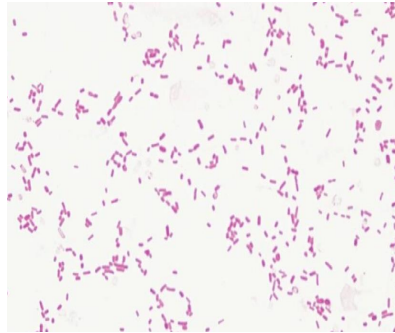


Figura 14. *Klebsiella pneumoniae* (Tomado y modificado de Tortora y cols., 2007).

Pseudomona aeroginosa

Son bacilos Gram negativos móviles, miden casi $0,6 \times 2\mu$ y (Figura 15) muestran una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas. Además, son aerobios obligados que se multiplican fácilmente en muchos tipos de cultivos, algunas producen hemolisis, forman colonias redondas y lisas con un color verdoso fluorescente. Esta bacteria tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos de los hospitales. Puede infectar el tracto urinario, las quemaduras y las heridas, así como causar sepsis, abscesos y meningitis (Brooks y cols, 2011)

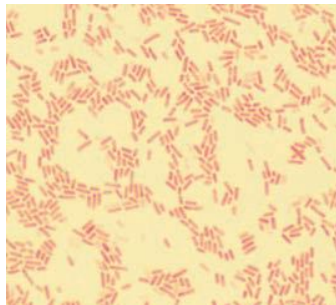


Figura 15. *Pseudomona aeroginosa* (Tomado y modificado de Brooks y cols., 2001).

Tinción de Gram

El procedimiento de la tinción de Gram requiere dos colorantes: cristal violeta o violeta de genciana como colorante principal y safranina como colorante de contraste (Figura 16). Las bacterias vistas con el microscopio las bacterias Gram positivas aparecen de color violeta y las Gram negativas de

rosa. La naturaleza de la membrana de la célula bacteriana determina la clasificación según la coloración de Gram y su respuesta a antibióticos específicos. Los antibióticos se describen como eficaces contra microorganismos Gram negativos, Gram positivos o contra ambos tipos de bacterias. La coloración de Gram revela las formas de las bacterias individuales y ayuda a su identificación (Fuller., 2007).

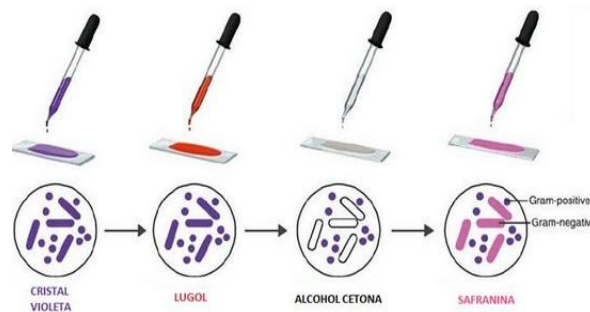


Figura 16. Tinción de Gram (Tomado y modificado de Fuller., 2007).

Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen es una técnica comúnmente utilizada en el diagnóstico de rutina de la tuberculosis. Se trata de una técnica rápida, sencilla y económica que se puede realizar en cualquier laboratorio clínico. Esta tinción se puede utilizar para diferenciar las bacterias en dos grupos: las que son resistentes a la tinción ácido-alcohol y las que no. La sensibilidad de esta tinción para identificar bacterias acidorresistentes es del 74% (López y cols., 2014).

Antibióticos

Los antibióticos están ampliamente considerados como uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes en la historia de la medicina. Hoy en día, muy pocas personas pueden vivir sin tomar antibióticos (Belloso., 2009).

Estos representan un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinéticos y farmacodinámicos, tienen efectos específicos sobre estructuras o funciones específicas de los microorganismos y tienen una alta eficacia biológica en bajas concentraciones. Sin embargo, la toxicidad es selectiva y la toxicidad para las células del organismo es mínimo. El objetivo de la terapia con antibióticos es controlar y reducir la cantidad de microorganismos viables para que el sistema inmunológico pueda eliminarlos todos. Según la interacción entre bacterias y antibióticos, estos medicamentos se pueden dividir en las siguientes categorías: a) Bactericida: Su efecto es letal y provoca la lisis de las bacterias. b) Bacteriostático: Una vez alcanza su concentración en suero o tejidos, impide el desarrollo y reproducción de bacterias sin destruir las células. De hecho, cuando se suspenden los antibióticos, los microorganismos pueden volver a crecer (Belloso., 2009).

Clasificación de agentes antibacterianos

Estos se pueden clasificar según cómo afectan las diferentes funciones de las bacterias. En primer lugar, la acción de los desinfectantes inhibe la propagación de los microorganismos que provocan el proceso infeccioso. Por un lado, los microorganismos permanecen vivos y pueden reactivarse y proliferar si se interrumpe el tratamiento, pero también sirven para inhibir el crecimiento bacteriano (Paredes y Roca, 2004).

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Estos antibióticos actúan en diferentes pasos de la biosíntesis del peptidoglicano, un componente esencial de las paredes celulares bacterianas. Se considera una capa importante que asegura la supervivencia de las bacterias y causa daños debido a una disminución en la fuerza de las bacterias. Por tanto, se consideran fungicidas (Rocha y cols., 2015).

Antibióticos que dañan la membrana citoplasmática

Pueden producirse daños debido a cambios en los componentes aniónicos y catiónicos de la membrana celular. Los fármacos catiónicos y aniónicos pueden alterar el tejido de la membrana. Los antibióticos que son eficaces en este caso incluyen la polimixina B® y la colistina® (polimixina E), que inhiben el crecimiento de bacterias gramnegativas y tienen lípidos cargados negativamente en sus superficies. Son responsables de alterar la permeabilidad de la membrana y permitir que los cationes salgan de la célula. (Rocha cols., 2015).

Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

Muchos agentes antimicrobianos pueden inhibir la síntesis de nucleótidos, causar interconversión de nucleótidos o interferir con la replicación y transcripción del ADN. Debido a la falta de síntesis de ácidos nucleicos, el organismo es incapaz de replicar bacterias (Rocha y cols., 2015).

Antibióticos que inhiben la función ribosomal

Las subunidades 30S y 50S que forman el ribosoma bacteriano 70S forman el sitio de acción de los agentes antimicrobianos y contienen proteínas específicas a las que se unen los fármacos. De esta manera, los aminoglucósidos, azúcares complejos derivados de varias especies de *Streptomyces*, alteran la función ribosómica bacteriana, principalmente la subunidad 30S. Las tetraciclinas® también intervienen en la subunidad ribosómica 30S, inhibiendo la unión del aminoacil ARN a los ribosomas. Esta función es parcial pero no completa y ejerce un efecto bacteriostático (Rocha et al., 2015).

Antibióticos inhibidores de β -lactamasas

La resistencia que presentan determinadas bacterias a los antibióticos con anillo β -lactámico (penicilinas y cefalosporinas) se denomina β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), la β -lactamasa se trata de una enzima producida por algunas especies bacterianas, ya que las β -lactamasas participan en la degradación bacteriana. Los compuestos son el principal culpable. Por lo tanto, se ha descubierto que los antibióticos que inhiben la β -lactamasa son el ácido clavulánico®, tazobactam® y sulbactam® (Rocha y cols., 2015).

Actividad antibacteriana

Se refiere a unas sustancias que presentan propiedades capaces de inhibir el crecimiento antibacteriano. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así, como en su mecanismo de acción y espectro (Ramírez y Marín, 2009).

Resistencia bacteriana

El uso de medicamentos como los antibióticos para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas es de gran utilidad en la actualidad. Sin embargo, la resistencia a estos medicamentos se desarrolla cuando las bacterias comienzan a presentar mutaciones en respuesta al uso indiscriminado de estos medicamentos. Por tanto, es importante saber que la resistencia sólo se da en bacterias y no en humanos ni animales. Estas bacterias son las responsables de provocar estas infecciones, lo que las hace más difíciles de tratar con antibióticos. (OMS., 2020).

Resistencia natural

Esta es una propiedad única de las bacterias, y su aparición queda ilustrada por el aislamiento de bacterias resistentes a los antibióticos, con una antigüedad estimada de 2000 años, descubiertas en las profundidades de los

glaciares del Ártico canadiense. Existían antes del uso de antibióticos. Además, los microorganismos que producen los antibióticos son naturalmente resistentes. En el caso de la resistencia natural, todas las bacterias de una misma especie son resistentes a alguna familia de antibióticos, lo que les otorga una ventaja competitiva sobre otras cepas y sobreviven al uso de ese antibiótico (Fernández y cols., 2003).

Resistencia adquirida

La aparición de resistencia en las bacterias se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de los cromosomas) y la transferencia de material genético extracromosómico de otras bacterias (Fernández cols., 2003).

Resistencia cromosómica

Es causada por mutaciones espontáneas que resultan en cambios genéticos estables. Inicialmente, aparecen pocas bacterias resistentes, pero a medida que el antibiótico selecciona los microorganismos, las células resistentes evolucionan y se convierten en cultivos puros resistentes a los antibióticos. Las mutaciones espontáneas pueden acelerarse por la acción de agentes físicos o químicos, como en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* sobre los aminoglucósidos (Sánchez y cols., 2016).

Métodos de análisis de la actividad antimicrobiana

En la actualidad existen diferentes métodos para evaluar la susceptibilidad de los microorganismos ante agentes antimicrobianos. Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana se encuentran: métodos de dilución, difusión en disco y difusión del pozo en el agar, en el presente estudio se utilizó el método de Kirby-Bauer, mediante los se determina en forma cualitativa el efecto antimicrobiano de los extractos de la planta sobre los microorganismos de interés (Sánchez y cols., 2016).

Método de Kirby-Bauer

Es el método más utilizado para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos. Esta técnica solo aporta información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico específico. Las pruebas de sensibilidad están indicadas para apoyar a la terapia antimicrobiana en procesos infecciosos causados por bacterias, donde la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir de forma confiable su sensibilidad. El método Kirby-Bauer consiste en depositar en la superficie del agar previamente inoculado con el microorganismo discos impregnados con concentración conocida de diferentes antibióticos. Una vez que el disco de antibiótico entra en contacto con la superficie del agar, este difunde gradualmente formando un gradiente de concentración. La incubación debe hacerse durante 24-28 horas, una vez incubado, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente y deben ser comparados con los diámetros de zonas establecidas en las tablas de interpretación internacional (GLSI). (Montero y cols., 2018; Ramírez y Castaño., 2009).

Método de difusión en medio líquido

El método se basa en una suspensión de bacterias con concentración predeterminada y apropiada frente a varias concentraciones de un mismo agente antimicrobiano (mediante diluciones seriadas dobles), se hace el estudio en un medio líquido. Así mismo se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 mL (macro dilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de micro titulación (micro dilución) (Castro., 2013).

Método dilución en medio sólido

Técnica que implica la incorporación de concentración de diluciones variadas de agentes microbianos, en un medio solidificado con agar, utilizando

generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados obtenidos de estos ensayos se consideran fiables para la determinación del valor de la concentración inhibitoria mínima (**CIM**) para una determinada combinación bacterio/antimicrobiano en una prueba concreta (Castro., 2013).

Método de E-test

Este método emplea una tira con una matriz plástica que tiene una concentración decreciente de un antibiótico determinado. El medio que se usa es agar sangre con sangre de caballo al 5% y con una base de Müller-Hinton o puede utilizarse agar HTM o agar chocolate suplementado. Aquí, se determina solamente la **CIM** y ésta se encuentra en la interfase de la elipse, La lectura debe ser muy cuidadosa y puede hacerse con la ayuda de una lupa. Se recomienda que, si la interfase cae entre dos puntos, se escoja la concentración más alta y también es muy importante la observación de pequeñas colonias presentes en las zonas de bajo crecimiento, lo que puede indicar resistencia o bajos niveles de ésta (Herrera., 1999).

Método de citofluorometría de flujo

Es una técnica avanzada, automatizada, objetiva y altamente sensible, muy utilizada para el estudio del inmunofenotipo de las células normales y anormales. Permitiendo realizar análisis multiparamétricos del componente celular en suspensión de una manera individual, a través de sus características físico-químicas, permite analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto periodo, así mismo posee una sensibilidad superior a 1×10^{-4} , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10000 células normales. En este sentido la técnica brinda beneficios como la detención temprana de enfermedades infecciosas emergentes, la obtención del

microorganismo de interés, el estudio de susceptibilidad a medicamentos, disminución de tiempo de procedimientos (Agudo., 2007)

La concentración inhibitoria mínima (CIM)

En microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.

Las **CIM** pueden ser determinadas mediante métodos de microdilución en caldo, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI (Clinical and Laboratory Institute Standards), BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Existen otro método basado en la difusión en agar: las tiras de Etest, consiste en unas tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antimicrobiano difunde en el medio, y tras la incubación, se determina la **CIM** en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento (Andrews., 2001).

En medicina, la **CIM** no sólo se usa para determinar la concentración de antimicrobiano que recibirá el paciente sino también el tipo de antimicrobianos a utilizar, lo que a su vez reduce la oportunidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos (Andrews., 2001).

Operacionalización de las variables

La operacionalización de variables consiste en un conjunto de técnicas y métodos que permiten medir la variable en una investigación, es un proceso de separación y análisis de la variable en sus componentes que permiten

medirla. Variable independiente: aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*. Variable dependiente: actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis* (Tablas 2 y 3).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: Componentes volátiles en el aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual
Componentes volátiles del aceite esencial de las hojas <i>Vismia japurensis</i>	Independiente y discreta	Productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal. no grasos, volátiles y ligeros, generalmente son mezclas complejas de constituyentes muy variables (Van, 2003).
4.Definición operacional	5.Dimensiones	6.Indicador
Se determinará mediante la técnica de Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). (Segovia y Suárez, 2010)	Monoterpenos y sesquiterpenos alifáticos, cíclicos y oxigenados presentes o ausentes en el aceite esencial de la especie <i>Vismia japurensis</i>	Comparación de los índices de Kovat's y la base de datos NIST

Fuente: Mora y Buitrago (2024).

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente: actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual
Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de <i>Vismia japurensis</i>	Dependiente	Se refiere a unas sustancias cuyas propiedades son capaces de eliminar e inhibir el crecimiento antibacteriano sin incurrir en el daño del organismo que las porta (Ramírez y Castaño2009).
4.Definición operacional	5.Dimensiones	6.Indicador
Método de difusión en disco (Kirby-Bauer). (Velazco y cols 2007)	Cepas Gram positivas : - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Cepas Gram Negativas: - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	Diámetro de los halos de inhibición. De acuerdo a: 0 - 5 mm 6 – 10mm 11 – 20mm

Fuente: Mora y Buitrago (2024).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2012) refirió que existen diferentes tipos de investigación: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Específicamente, la investigación es de tipo analítica ya que requiere analizar los diferentes compuestos presentes en el aceite y la posible actividad antibacteriana.

Diseño de Investigación

El diseño de investigación se define con base en el procedimiento, el cual se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber (Hurtado, 2012). Por lo tanto, la investigación fue de diseño experimental, donde intervino la variable independiente sobre los procesos de causa-efecto y los modificó de manera intencional y planificada para ver los efectos, pero además hace un control estricto de variables extrañas para descartar que los cambios hayan sido originados por otros factores distintos a las variables independientes (Hurtado., 2012).

Población y Muestra

Unidad de investigación

La unidad de investigación está representada por la planta *Vismia japurensis* recolectada en la comunidad Alto Carinagua, Puerto Ayacucho

estado Amazonas, se realizó el procesamiento en el laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales”, en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra está representada por las hojas de la planta *Vismia japurensis*. El tipo de muestreo utilizado es no probabilístico, respecto a que la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra. Aquí el procedimiento no es mecánico ni con base en fórmulas de probabilidad, sino que depende del proceso de toma de decisiones de un investigador o de un grupo de investigadores (Hernández, Fernández y Baptista., 2006).

Sistema de variables

Las variables que guardan relación con el objetivo de la investigación son las siguientes; variable dependiente: actividad antibacteriana del aceite de las hojas de *Vismia japurensis*. Variable independiente: los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*.

Instrumento de Recolección de Datos

Según Palella y Martins (2017), un instrumento permite recolectar los datos relacionados con los objetivos y los indicadores obtenidos de la operacionalización de las variables. En este trabajo de investigación se empleó la observación estructurada; como técnica, la cual consiste en visualizar la presencia o ausencia de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis* por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Además de describir, la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos en estudio mediante la medición de los halos de inhibición frente a los componentes volátiles presentes en el aceite esencial obtenidos de las hojas de *Vismia japurensis*.

Procedimientos de la Investigación

Recolección y preparación del material vegetal

Las hojas de *Vismia japurensis* fueron colectadas en la comunidad indígena Alto Carinagua, Municipio Atures, Estado Amazonas, ubicado a 110 m s. n. m. (5,665652 N-67,547585W), por la autora de la investigación, se obtuvo un total 1 kg en un ambiente controlado y con las normas de seguridad que permitieron que la especie se mantuviera fresca para el análisis. Se realizó la correspondiente identificación y clasificación botánica por el Dr. Pablo Meléndez, posteriormente se depositó en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela, se dejó una muestra testigo bajo el código por definir.

Con respecto a la selección, división y preparación del material vegetal, se sometió a una eliminación de impurezas y partes en descomposición, para ser destinada a la obtención del aceite esencial por hidrodestilación en el Laboratorio B de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de Dr. Alexis Buitrago.

Extracción de aceites esenciales por el método hidrodestilación

El material vegetal fresco se cortó en pequeños trozos y luego se licuó, para romper los reservorios donde se encuentra concentrado el aceite. Así como también, con el propósito de incrementar la superficie de contacto con el agua, lo que permitió que se reflejará un mayor rendimiento en la extracción. En el método de extracción por hidrodestilación con arrastre de vapor de agua, el material a extraer estuvo completamente sumergido en agua y se calentó hasta ebullición utilizando una manta de calentamiento durante un tiempo de 3 horas. Las moléculas volátiles son arrastradas por el agua en fase de vapor

y se condensan al contacto con el refrigerante, para luego ser depositado en una trampa tipo Clevenger.

El aceite obtenido fué recolectado con ayuda de una pipeta Pasteur, colocado en un envase de color ámbar, además, se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua que pudiesen alterar su composición química por hidrólisis o polimerizaciones. El aceite se guardó bajo refrigeración a 4 °C.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Una vez obtenido el aceite esencial, se procedió a la separación e identificación de los componentes volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, procedimiento que fué realizado en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, bajo la supervisión del Dr. Edison Osorio.

Métodos de difusión en agar con discos de papel (Kirby-Bauer)

Para el ensayo por el método de difusión en agar según Kirby-Bauer se utilizaron bacterias de referencia internacional, tales como: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). El método empleado permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias patógenas frente a una sustancia de origen vegetal; utilizando el protocolo experimental que se presenta a continuación:

Preparación de las placas de Petri: Para las bacterias se depositó aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri, una vez solidificada la placa, se le realizó el control de esterilidad y se conservó a 4°C.

Adecuación de los discos: Los discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro correspondientes a los ensayos con aceites, se impregnaron con 20 μ L de la solución a probar, estos discos organizados en placas de Petri se esterilizaron bajo luz UV durante 90 minutos previo al ensayo.

Preparación de los inóculos: Los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85% p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton[®], hasta lograr una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL).

Inoculación: una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar con un hisopo estéril mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de petri. Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con el aceite, además, se colocaron discos de papel de filtro impregnados con los distintos controles negativos (solventes), así como también, los fármacos de referencia para cada microorganismo, como controles positivos.

Incubación: Los cultivos y controles, positivos (antibióticos), negativos (solventes) se incubaron a 37 °C durante 48 h.

Lectura de los ensayos: Se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 48 h. El diámetro de la zona de inhibición fue expresado en milímetros (mm).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): Solo se determinó la **CIM** contra los microorganismos que mostraron susceptibilidad a los aceites. Para la determinación la **CIM** se prepararon diluciones en el solvente apropiado a diferentes rangos de concentración, luego se impregnaron los discos de papel de filtro con 20 μ L de cada solución, La **CIM**

se refiere como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano que presenta el aceite.

Diseño de Análisis

Hernández, Fernández y Baptista (2010), refirieron que existen dos tipos de enfoques de investigación: cualitativo y cuantitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. Por lo tanto, esta investigación tuvo un enfoque cualitativo ya que se analizaron numéricamente los datos recolectados de la unidad de estudio con el fin de medir la actividad antibacteriana. Además, un enfoque cuantitativo puesto que se evaluaron los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados.

Composición Química del aceite esencial de *Vismia japurensis*.

El aceite esencial obtenido para un kg de las hojas de *Vismia japurensis* (**Vj**) obtenido mediante la técnica de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua fue de 0,1 mL, representando un 0,1% m/v de rendimiento, el mismo se almacenó bajo refrigeración hasta el día del análisis por CG-EM.

Mediante el análisis químico realizado por CG-EM se lograron identificar 30 compuestos en la muestra oleosa, los cuales fueron identificados por comparación entre los IK y los datos espectrales de masas obtenidos en las bases de datos WILEY275.L, NIST05.L y HPCH2205. L.

La Tabla 4 muestra la diversidad de componentes volátiles aislados, en donde, el 80% son sesquiterpenos (mono, di, tri) cíclicos y un 16,6% son sesquiterpenos oxigenados (mono, di, tri) cíclicos, así mismo, se encontró un 3,3% de sesquiterpenos alifáticos.

De igual manera, para el aceite de **Vj** se identificaron como compuestos volátiles mayoritarios el *cis*-cariofileno (28,22%), β -humuleno (10,01%), *trans*-cariofileno (7,68%), germacreno-*D* (7,28%), y β -selineno (5,05%). Las estructuras químicas de esta especie se encuentran representadas en la Figura 17.

Tabla 4. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*

Compuestos	%A	IK
<i>trans</i> -anetol	1,97	1295
δ -elemeno	1,43	1344
α -copaeno	0,33	1372
β- elemeno.	4,78	1387
β -bouboneno	0,39	1390
<i>trans</i>-cariofileno	7,68	1413
<i>cis</i>-cariofileno	28,22	1417
β -copaeno	2,56	1420
α -bergamoteno	1,99	1422
β -cubebeno	0,44	1430
β -humuleno	10,01	1436
α -guaieno	2,57	1438
6,9-guaiadieno	3,38	1442
β -farneseno	1,85	1450
α -humuleno	0,66	1451
<i>cis</i> -muurolo-3,5-dieno	1,34	1465
<i>trans</i> -1,4-cadinadieno	0,70	1469
γ -muurolo	0,97	1477
germacreno- <i>D</i>	7,28	1483
β-selineno	5,05	1487
γ -gurjuneno	2,48	1475
<i>cis</i> - β -guaieno	1,03	1492
<i>trans</i>-muurolo-3,5-dieno	4,10	1495
β -bisaboleno	1,69	1505
α -bisaboleno	1,86	1506
γ -bisaboleno	0,53	1529
(-)-espatulenol	1,08	1577
Oxido de cariofileno	1,57	1588
Guaiol	0,55	1602
epi- α -cadinol	0,47	1630
α -muurolol	1,04	1631

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

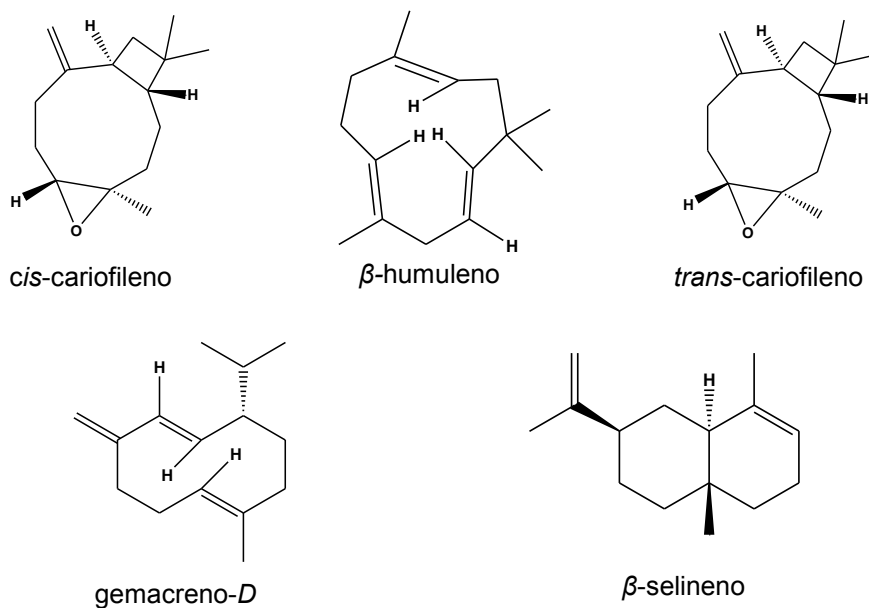


Figura 17. Compuestos mayoritarios presentes en la especie *Vismia japurensis*

En la Tabla 5, se hace un resumen de algunos estudios que señalan para las especies *V. baccifera*, *V. macrophylla*, *V. guianensis*, *V. japurensis* y *V. cayennensis* la presencia de al menos seis compuestos considerados como marcadores quimiotaxonómicos. Estas estructuras terpénicas aisladas e identificadas de los aceites obtenidos de las diferentes partes de la planta y que son provenientes de la ruta del ácido mevalónico se encuentran presentadas en la Figura 34, siendo las mismas: α -humuleno, α -selineno, gemacreno *D*, α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno y *trans*-cariofileno (Buitrago y cols., 2023; Barbosa y cols., 2021; Buitrago., 2018; Rojas y cols., 2011).

Tabla 5. Marcadores quimiotaxonómicos en otras especies de *Vismia*

Trabajos de investigación	Compuestos	Autores
Composición química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de frutos de <i>Vismia baccifera</i> y <i>Vismia macrophylla</i> recolectados en diferentes ubicaciones de los Andes venezolanos.	α -humuleno, α -selineno, germacreno <i>D</i> , α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno y <i>trans</i> -cariofileno	(Buitrago y cols., 2023)
Composición química y actividades biológicas de los aceites esenciales de hojas frescas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy y <i>Vismia cayennensis</i> (Jacq.) Pers.	<i>trans</i> -carifileno, α -copaeno, α -selineno, germacreno <i>D</i>	(Barbosa y cols., 2021)
Composición de aceites esenciales y actividad citotóxica en dos especies de plantas del género <i>Vismia</i> (Hypericaceae) de los Andes venezolanos	α -humuleno, germacreno- <i>D</i> , <i>trans</i> -cariofileno, α -selineno, α -cubebeno, α -copaeno	(Rojas y cols., 2020)
Composición química, actividades antibacterianas y antioxidantes del aceite esencial de frutos de <i>Vismia guianensis</i> .	β -cariofileno, α -copaeno, α -cubebeno, β -elemeno, α -selineno, α -humuleno	(Silvestre y cols., 2012)
Composición de aceites esenciales y actividad antibacteriana de frutos de <i>Vismia baccifera</i> recolectados en Mérida, Venezuela	<i>trans</i> -cariofileno, α -copaeno, β -elemeno, α -selineno, germacreno <i>D</i> , α -humuleno	(Rojas y cols., 2011)

(Mora y Buitrago 2024)

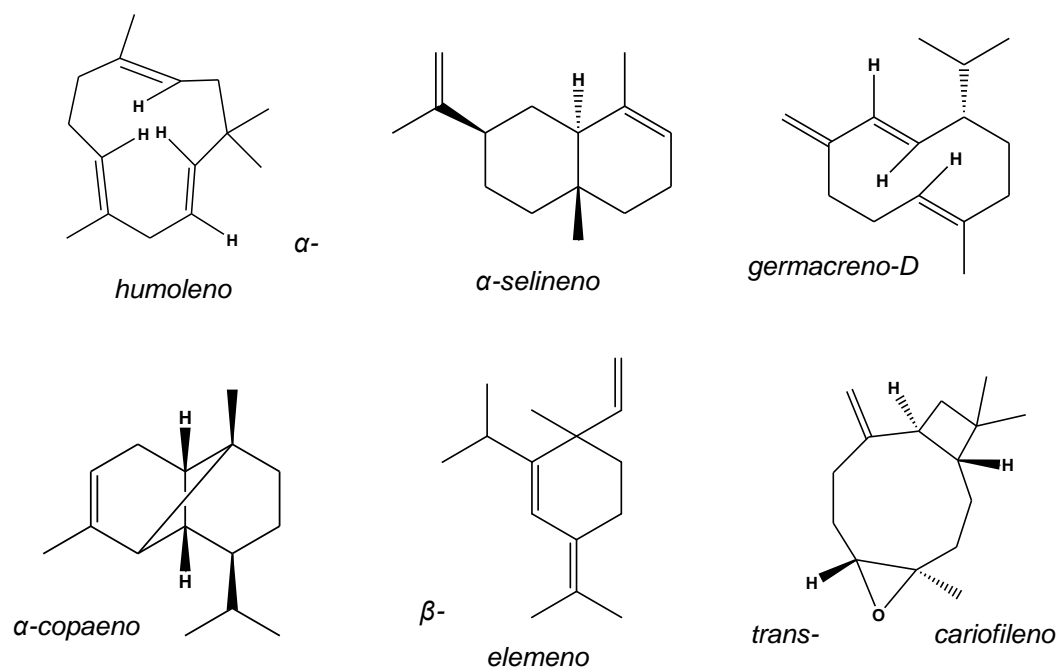


Figura 18. Compuestos químicos considerados marcadores quimiotaxonómicos para el género *Vismia*

Con relación a esta investigación, la Figura 19 muestra otros compuestos químicos aislados e identificados poco comunes para el género, los cuales se encontraron en pequeñas proporciones, a saber: β -bourboneno (0,39%), *trans*-muurola-3,5-dieno (4,10%) y γ -gurjuneno, los cuales refieren en la literatura poseer propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes entre otros (Moreno y cols., 2018, Gil y cols., 2016).

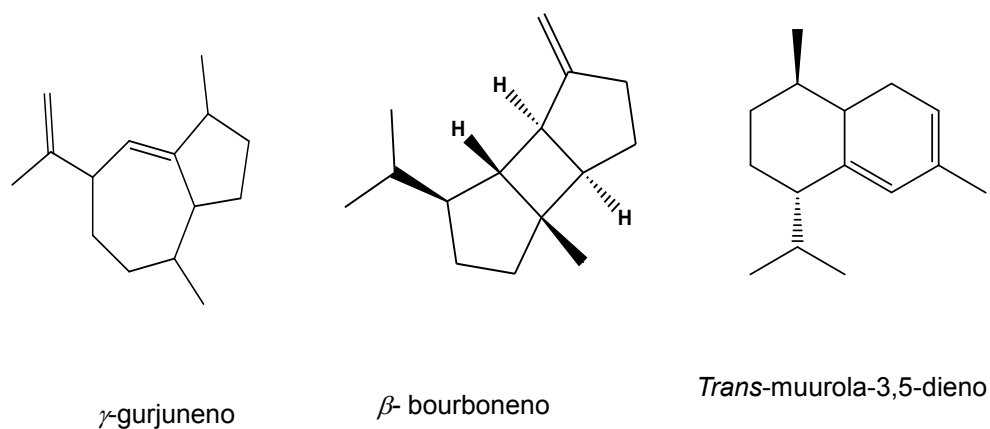


Figura 19. Compuestos químicos considerados poco común para el género *Vismia*

Actividad antibacteriana del aceite de *Vismia japurensis*.

El aceite obtenido de **Vj** se ensayó utilizando el método modificado de difusión en agar con disco de papel descrito por Velasco y cols., (2007); con las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**), *Enterococcus faecalis* (**ATCC 19433**), *Pseudomonas aeruginosa* (**ATCC 27853**), *Escherichia coli* (**ATCC 25922**) y *Klebsiella pneumoniae* (**ATCC 25955**). Así mismo, se determinó la **CIM** para el aceite activo contra las cepas ensayadas.

Los resultados del estudio de la actividad antibacteriana que se presentan en la Tabla 6, indican un efecto en el crecimiento bacteriano solo contra las bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con halos de inhibición de 16 mm y 7 mm respectivamente; caso contrario para todas las bacterias Gram negativas ensayadas. Posteriormente, se realizaron diferentes diluciones para determinar la concentración inhibitoria mínima (**CIM**), estableciéndose para *Staphylococcus aureus* una **CIM** de 460 µg/mL y para *Enterococcus faecalis* una **CIM** de 820 µg/mL.

Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Vismia japurensis*.

Microorganismos	Zona de inhibición (mm)*						CIM (µL/mL)
	Aceite esencial	Compuestos de Referencia					
		SXT	VA	GM	AZT	CEP	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	16	40*					460
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	7		26*				820
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	NA			34*			NE
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA				42*		NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA					38*	NE

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

Es importante mencionar, lo establecido por Kuete., (2010), un sistema que clasifica la actividad antimicrobiana para los extractos y compuestos puros. Donde **CIM** inferiores a 100 µg/mL se consideran con una alta acción contra el crecimiento bacteriano, de igual manera, valores entre 100 µL/mL a 625 µL/mL la acción es moderada. Para el caso de concentraciones superiores a 625 µL/mL se considera un efecto bajo o prácticamente nulo. En base a lo antes expuesto, el aceite de **Vj** posee un bajo efecto inhibitorio contra *E. faecalis* (**CIM**: 820 µg/mL) y moderada acción contra *S. aureus* (**CIM**: 460 µg/mL) (Silva y cols, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Discusión

Composición Química del aceite esencial de *Vismia japurensis*

La variabilidad en la composición de los diferentes compuestos químicos presentes para cada especie del género *Vismia* se relaciona con los distintos factores ambientales, tipo de suelo, cantidad de agua, exposición a la luz, entre otros (factores abióticos), así como también, a la presencia de microorganismos, animales y plantas (factores bióticos). Además, la plasticidad que presentan las plantas para su adaptación y sobrevivencia a estos tipos de cambios en su habitat (Buitrago, 2018, Mishra, 2016, Figueredo y cols 2008).

Cabe destacar que la variabilidad en la composición de los diferentes compuestos químicos presentes para cada especie del género *Vismia* se relaciona con los distintos factores ambientales, tipo de suelo, cantidad de agua, exposición a la luz, entre otros (factores abióticos), así como también, a la presencia de microorganismos, animales y plantas (factores bióticos). Además, la plasticidad que presentan las plantas para su adaptación y sobrevivencia a estos tipos de cambios en su habitat (Buitrago, 2018, Mishra, 2016, Figueredo y cols 2008).

Existen algunos grupos de investigación que se han interesado por estudiar el género *Vismia* para determinar la composición química y establecer su posible efecto bioactivo. En ese sentido, Buitrago y cols. (2023), realizaron el estudio comparativo para los aceites obtenidos por hidrodestilación e identificados por CG-EM, para las hojas de *Vismia baccifera* y *Vismia macrophylla* recolectadas en Mérida y Táchira, estableciendo la presencia para todas las muestras de los compuestos β -elemeno, α -humoleno, α -cubebeno, α -copaeno, encontraron solo para las muestras de *Vismia baccifera* el sesquiterpeno bicíclico β -cariofileno. Por otra parte, para la muestra oleosa recolectada en el estado Táchira observaron la presencia de los

sesquiterpenos cíclicos γ -muuroleno, *trans*-4,5-muuroleno, β -bisaboleno, α -bisaboleno, epi- α -cadinol y epi- α -murulol.

En otra investigación, para el aceite obtenido de las hojas de *Vismia guianensis* y *Vismia cayennensis* extraídas por hidrodestilación, lograron identificar por CG-EM 46 sesquiterpenos, donde los tres compuestos con mayor porcentaje de abundancia para *V. guianensis* fueron *trans*-carifileno (10,40%), α -copaeno (29,45%) y *trans*-nerolidol (24,06%), α -humuleno (2,84%), *Agarospirol* (2,80%). Para la muestra *V. cayennensis* identificaron 61 constituyentes entre los cuales se pueden mencionar el *curzereno* (25,29%), *trans*-cariofileno (25,42%), *intermedeol* (5,25%) y *viridiflorol* (2,44) (Barbosa y cols., 2021).

Por otra parte, Rojas y cols., (2020), estudiaron la actividad citotóxica de los aceites esenciales de las hojas de *Vismia baccifera* Triana & Planch recolectadas en dos localidades del estado Mérida (**VBJ** y **VBV**) y *Vismia macrophylla* Kunth (**VM**) proveniente del estado Táchira. Los mismos fueron obtenidos por hidrodestilación y analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, donde lograron identificar para **VBJ** el β -cariofileno (73,4%), α -humuleno (12,6%) y germacreno-*D* (4,3%). Para el aceite de **VBV** determinaron la presencia de *trans*-cariofileno (42,8%), β -elemeno (12,4%), α -humuleno (7,4%) y eremofileno (9,6%) como componentes principales. Mientras que el aceite **VM** presentó en mayor proporción el γ -bisaboleno (44,4%) y β -bisabolol (14,9%).

Existen algunos grupos de investigación que se han interesado por estudiar el género *Vismia* para determinar la composición química y establecer su posible efecto bioactivo. En ese sentido, Buitrago y cols. (2023), realizaron el estudio comparativo para los aceites obtenidos por hidrodestilación e identificados por CG-EM, para las hojas de *Vismia baccifera* y *Vismia macrophylla* recolectadas en Mérida y Táchira, estableciendo la presencia

para todas las muestras de los compuestos β -elemeno, α -humoleno, α -cubebeno, α -copaeno, encontraron solo para las muestras de *Vismia baccifera* el sesquiterpeno bicíclico β -cariofileno. Por otra parte, para la muestra oleosa recolectada en el estado Táchira observaron la presencia de los sesquiterpenos cíclicos γ -muuroleno, *trans*-4,5-muuroleno, β -bisaboleno, α -bisaboleno, epi- α -cadinol y epi- α -murulol.

En otra investigación, para el aceite obtenido de las hojas de *Vismia guianensis* y *Vismia cayennensis* extraídas por hidrodestilación, lograron identificar por CG-EM 46 sesquiterpenos, donde los tres compuestos con mayor porcentaje de abundancia para *V. guianensis* fueron *trans*-carifileno (10,40%), α -copaeno (29,45%) y *trans*-nerolidol (24,06%), α -humuleno (2,84%), *Agarospirol* (2,80%). Para la muestra *V. cayennensis* identificaron 61 constituyentes entre los cuales se pueden mencionar el *curzereno* (25,29%), *trans*-cariofileno (25,42%), *intermedeol* (5,25%) y *viridiflorol* (2,44) (Barbosa y cols., 2021).

Por otra parte, Rojas y cols., (2020), estudiaron la actividad citotóxica de los aceites esenciales de las hojas de *Vismia baccifera* Triana & Planch recolectadas en dos localidades del estado Mérida (**VB**J y **VB**V) y *Vismia macrophylla* Kunth (**VM**) proveniente del estado Táchira. Los mismos fueron obtenidos por hidrodestilación y analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, donde lograron identificar para **VB**J el β -cariofileno (73,4%), α -humuleno (12,6%) y germacreno-*D* (4,3%). Para el aceite de **VB**V determinaron la presencia de *trans*-cariofileno (42,8%), β -elemeno (12,4%), α -humuleno (7,4%) y eremofileno (9,6%) como componentes principales. Mientras que el aceite **VM** presentó en mayor proporción el γ -bisaboleno (44,4%) y β -bisabolol (14,9%).

Actividad antibacteriana del aceite de *Vismia japurensis*.

Cabe destacar que la acción bacteriostática de los aceites esenciales depende del tipo de compuesto químico y la proporción presente en la muestra. Los mismos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano a través de varios mecanismos, tales como: daño celular en la estructura y función de la membrana, la inducción de coagulación de los componentes citoplasmáticos, la inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, la interferencia de procesos metabólicos esenciales y la interrupción en la comunicación celular normal (Sin y cols., 2021). Dichos mecanismos se deben a la conformación de la pared celular que presentan en las diferentes cepas bacterianas, en ese sentido las bacterias Gram positivas presentan una capa de peptidoglicanos con mayor susceptibilidad a la acción de los compuestos químicos. Efecto opuesto en las bacterias Gram negativas, las cuales presentan una bicapa de lipopolisacáridos que le proporcionan cierta resistencia a la entrada de algunas sustancias químicas (Romero, 2007)

Una cantidad importante de ensayos confirman la acción de los distintos compuestos químicos que se encuentran en las especies del género *Vismia* con acción contra algunas cepas Gram positivas y Gram negativas. Buitrago y cols., (2023), al investigar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de los frutos de *Vismia baccifera* y *Vismia macrophylla* recolectados en diferentes localidades andinas, observaron un comportamiento variable para los aceites ensayados, En ese sentido, encontraron para *S. aureus* valores de **CIM** entre 80 a 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Para *E. faecalis* el aceite **VBJ** valores **CIM** de 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y para **VBH** la **CIM** fue de 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La muestra de **VM** (**CIM**: 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y las muestras **VM**, **VBM** y **VBV** mostraron una actividad baja contra *E coli* con valores de **CIM** entre 520 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 980 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *K. pneumoniae* fue inhibida por **VBH**, **VBV** y **VBJ** con valores de **CIM** entre 550 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 980 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los aceites de las muestras **VBM**, **VBV** y **VBH** también mostraron actividad contra

las bacterias Gram negativas en este caso la *P. aeruginosa* con valores de **CMI** entre 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 700 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Además, los aceites de *V. baccifera* también fueron activos contra *C. albicans* y *C. krusei* con valores de **CMI** entre 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 950 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Por otra parte, el estudio antibacteriano llevado a cabo por Silvestre y cols., (2012), con los frutos de *Vismia guianensis*; reveló su efectividad frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* a la **CIM** de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* y *Vibrio alginolyticus* el valor de **CIM** fue de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Así mismo Rojas y cols., (2011), realizaron estudios de la actividad antibacteriana de los frutos de *Vismia baccifera* recolectados en Mérida, Venezuela. Comprobando que el aceite esencial mostró un amplio espectro antibacteriano contra bacterias Gram positivas *E. faecalis* y *S. aureus* a **CIM** inferiores a 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Un mejor efecto se observó contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* con valores de **CIM** entre 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En otra investigación Buitrago y cols., (2015), estudiaron la acción antibacteriana en los aceites obtenidos de las hojas y frutos de *Vismia macrophylla* recolectados en Táchira-Venezuela. En este estudio, para el aceite de los frutos encontraron para las bacterias Gram positivas *S. aureus* una **CIM** de 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y para *E. faecalis* una **CIM** de 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Con relación al efecto contra *E. coli* la **CIM** fue de 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Por otra parte, el aceite obtenido de las hojas mostró solo actividad contra *S. aureus* (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y *E. faecalis* (500 $\mu\text{L}/\text{mL}$). De igual manera, la muestra oleosa obtenida de las hojas presentó efecto contra las levaduras *C. krusei* y *C. albicans* con **CIM** de 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El aceite obtenido de las hojas de la especie *Vismia japurensis*, obtenido por hidrodestilación con arrastre de vapor de agua, y posteriormente analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) permitió identificar un 80% de sesquiterpenos (mono, di, tri) cíclicos y 16,6% sesquiterpenos oxigenados (mono, di, tri), así mismo, se encontraron en pequeñas proporciones sesquiterpenos alifáticos.

También se determinaron otros compuestos poco comunes para el género, tales como: β -bourboneno, *trans*-muurolo-3,5-dieno y γ -gurjuneno, componentes que la literatura refiere que tienen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otros.

Es importante mencionar, la variedad en la composición química del aceite obtenido de las hojas de la especie de **Vj**, el cual se encuentra íntimamente relacionado a los factores abióticos, bióticos y la plasticidad.

El aceite esencial de las hojas de **Vj** mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), arrojando como resultado una **CIM** de 460 a 820 μ L/mL, respectivamente. Por otra parte, no se observó un efecto en el crecimiento bacteriano de las cepas Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Recomendaciones

1. Recolectar la planta en diferentes localidades del Estado Amazonas para estudiar las variaciones en su composición química y posible efecto antibacteriano
2. Realizar otras actividades biológicas para determinar el potencial del aceite esencial de las hojas de *Vismia japurensis*
3. Continuar con el estudio utilizando el aceite esencial de las hojas de **Vj** contra otras cepas bacterianas de referencia internacional.
4. Realizar otros estudios biológicos con el aceite **Vj** para determinar la acción antioxidante, antiinflamatoria citotóxica, entre otras.
5. Proponer a las autoridades un mayor trabajo interdisciplinario entre las diferentes unidades académicas de la facultad con el propósito que exista mayor accesibilidad a los espacios físicos e instrumentos.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

- Acuña, G. C. (2018). Bacterias ¿Por qué me enferman? (ed) [dhttps://doi.org/10.32457/isbn97895684541802018-ed1](https://doi.org/10.32457/isbn97895684541802018-ed1)
- Abbott D. (1973). *Introducción a la cromatografía* (3ª ed.). Madrid: Alhambra. 121 pág.
- Aguado. (2007). Aplicaciones de la Citometría de Flujo en Microbiología, Veterinaria Y Agricultura. *Revista MVZ Córdoba*, 12 (2), 1077-1095. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682007000200015&lng=en&tlng=es.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (1):5-16.
- Arcano, Daniel. (2008). El lado positivo de las bacterias, *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 39(2), 63-65. http://ve.scielo.org/scielo.php?scrip_artrxt&pid=S0798-04772008000200009&tlng=es.
- Ávalos, A, Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3), 119-145. 2009. <http://hdl.handle.net/20.500.14352/50406>
- Bandoni, T, Holzmann,T , Thiesen,L., Fratoni, E., y Fischer, A.(2006). Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*,91(1) DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.10.005.
- Barbosa. T, da Silva, V., da Silva, B., Lopes, A., Guesdon, I., Maia, P., do Carmo, D. (2021). Chemical composition and biological activities of essential oils from fresh *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy and *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. Leaves. *Research, Society and Development*, 10(8), e37410817440-e37410817440.

- Barrios, A. (1988). Bacteriología y Virología Básicas. Trabajo de ascenso no publicado. Universidad de Los Andes, Mérida.
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital*, 29, 102-11.
- Beltrán, C., Díaz, F. y Gómez, H. (2013). Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 619-631.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M., Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8),453-459. ISSN: 0378-1844. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33910703>
- Buitrago, A., Rojas, J., Velasco, J., Morillo, M., Joly, N., Rojas, L., & Martin, P. (2023). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fruits of *vismia baccifera* and *Vismia macrophylla* collected at different locations in Venezuelan Andes. *European Journal of Medicinal Plants*, 34(12), 45.
- Buitrago, A., Rojas, J., y Velasco, J. (2020). Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana de fracciones de diferentes polaridades obtenidas de *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch y *Vismia macrophylla* Kunth. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 62(1), 15-23. 62. 15-22.
- Buitrago-Díaz, A. A. (2018) Estudio fitoquímico y evaluación de diversas actividades biológicas en las especies *Vismia baccifera* y *Vismia macrophylla* (Doctoral dissertation, Tesis doctoral]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida: SERBIULA).
- Buitrago, A., Rojas, J., Rojas, L., Velasco, J., Morales, A., Peñaloza, Y., & Díaz, C. (2015). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Táchira-Venezuela. *Natural Product Communications*, 10(2), 1934578X1501000244.

- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., y Mietznert, T. (2011). *Microbiología médica*. (25ª Ed). México: Mcgraw-Hill Intenamericana.
- Bruneton J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2ª edición, Zaragoza: Acribia, 2001, 1100 Págs., ISBN: 84-200-0956-3.
- Camacho, S. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual (Bacterial resistance, a current crisis). *Rev Esp Salud Publica*. 20(97): 2-4
- Canales P., Carazo L., y Centeno S. (2011). *Determinación de los metabolitos secundarios de la hoja seca de la especie vegetal Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico* (Tesis doctoral).
- Cases C., y Hernández M. (2007). Memorias de las jornadas técnicas dedicadas a PAM. Brihuega, Guadalajara.
- Castro E. (2013). Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las hojas y flores de *Iso (Dalea mitisii)* (Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Cerpa, M. (2000). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Universidad de Valladolid. Departamento de Ingeniería Química. Tecnología del Medio Ambiente. Tesis de Doctorado
- Cosme, I. (2008). El Uso de las Plantas Medicinales. *Rev Intercultural. Universidad Veracruzana Intercultural*, 3(3): 23-25.
- Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4), 242-245.
- Da silva, L. (2019). Estrutura molecular e actividades biológica de metabolitos secundarios de espécies de *Vismia* Vand (Hypericaceae). Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Estado do Amazonas.
- Dean J., Merritt L., Settle A y Willard H. (1990). *Métodos instrumentales de análisis*. (2ª ed.). México DF: Continental. 1037 pág.

- Ely, C., Boldrini, I., y Bordignon, S. (2013). Novidade taxonômica da família Hypericaceae Para A Flora Do Brasil.
- Ewan J. (1962). The South american species of *Vismia* (Guttiferae). *US Nat Moss Contribution from de National Herbarium* 35: 293 - 361.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L. M., y Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista cubana de medicina militar*, 32(1), 0-0.
- Figueiredo, A.C., Barroso J, G., Pedro I.G y ScheffeR, J. J. C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volátil e componets and essential oils. *Flavour Fragrance Journal*, 23,213-226
- Fuller, J. (2007). Instrumentación quirúrgica. *Teoría, técnicas y procedimientos* (4ª ed.). Edimburgo-Escocia: Editorial médica panamericana.
- Gil, E., Cuca, L. E., y Delgado, W. A. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Ocotea caudata* (Nees) Mez (Lauraceae) from Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 15(4), 258-263.
- Gomes, O., Santos, F., y Nunez, C., (2011). Estudio Químico de *Vismia Japurensis* Reich (clusiaceae) Visando Substâncias Antioxidantes. *XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA–CNPq/FAPEAM*.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.
- Hernández, R., Fernández, C y Baptista, P. (2006). Metodología de la Investigación. *México: Mc Graw Hill Interamericana*.
- Hernández, R., Fernández, C y Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. *México: Mc Graw Hill Interamericana*.
- Hurtado, J. (2012). El Proyecto de Investigación. Séptima Edición.
- Kuete V. (2010). potencial of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta medica*. 76(14):1479-91. doi: 10.1055/s-0030-1250027

- Kumar, A., Sharma, V., Singh, A. (1998). Antibacterial properties of different Eucaliptus oils. *Fitoterapia* 198; 2: 141-4
- Lima, L. M. (2020). Cultura de tecidos vegetais in vitro de *Vismia japurensis* Reichardt (Hypericaceae).
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Marcano, D., Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela. 588 pp. ISBN 980-00-2066-7.
- Martins, M. V., Shimizu, G. H., y Bittrich, V. (2018). Flora da Reserva Ducke, Estado Amazonas, Brasil: Hypericaceae. *Hoehnea*, 45, 361-371.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal Natural Product*, 59(1), 77-79. https://medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50(1), 5-18.
- Mishra, T. (2016). Climate change and production of secondary metabolites in medicinal plants: A review, *international Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 27-30
- Montero-Recalde, M., Vayas, L., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño, P., y Erazo-Gutierrez, V. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1543-1547.
- Montoya, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Colección salud. Universidad de Antioquia.

- Morillo O., Fernandez S., Hernande, H., Castillo G., Marquina G. (2010). Optimizacion de los parámetros de extracción de aceite de palam africana utilizando co2 supercritico. *Bioagro* 22(2):89-94.
- Moreno, É., Leal, S., Stashenko., y García, L. (2018). Induction of programmed cell death in Trypanosoma cruzi by Lippia alba essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). *BMC complementary and alternative medicine*, 18, 1-16.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antibióticos. Notas Descriptivas. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. *Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI)*, 74.
- Palella, S., Martins, F. (2017) Metodología de la investigación cuantitativa 4ta Ediciones de la universidad pedagógica experimental libertador. Caracas Venezuela.
- Paredes, Fernando, y Roca, Juan José. (2004). Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 23(3), 116-124.
- Pedroza, L. (2019). Estrutura Molecular e atividade biológica de metabólitos secundários de espécies de *Vismia* Vand (Hypericaceae).
- Peña, M. (2022). Actividad Biológica Antimicrobiana de Extractos de Plantas Medicinales en Colombia, Departamento del Atlántico. Trabajo de Investigación del Programa Microbiología. Universidad Simón Bolívar. Colombia.
- Pérez, M., Batlle, M., Verdera, J., y Llop, A. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. *Rev Cubana Med Trop*, 58(3).46-63.

- Pinheiro R., Mac-M., Betollo, G., Monache, F. (1984). Prenylated anthranoids from *Vismia* species. *Phytochemistry*, 23(8), 1737-1740.
- Ramírez, L., y Cataño, M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15 (42), 263-268.
- Rojas-Vera, J., Buitrago-Díaz, A., Arvelo, F. A., Sojo, F. J., Suarez, A. I., y Rojas, L. (2020). Essential oil composition and cytotoxic activity in twospecies ofthe plant genus *Vismia* (Hypericaceae) from the Venezuelan Andes. *Revista de Biología Tropical*, 68(3), 884-891.
- Rojas J, Buitrago A, Rojas L, Morales A, Lucena M, Baldovino S. Essential oil composition and antibacterial activity of *Vismia baccifera* fruits collected from Mérida, Venezuela. *Nat Prod Commun*. 6(5): 699-700.
- Rojas, J., Buitrago, A., Rojas, L., y Morales, A. (2010). Essential Oil Composition of *Vismia macrophylla* Leaves (Guttiferae). *Nat Prod Comm* 6 : 85-86
- Rocha, C., Reynolds, N., y Simons, M. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1), 139-145.
- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana. Mexico City: Editorial Médica Panamericana, 285-333.
- Ruiz, V y Guillén, S. (2005). Tratado seimc de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid-España: Editorial médica panamericana.
- Sakai, T., y Morimoto, Morimoto, Y. (2022). The History of infectious Diseases and Medicine. *Pathogens (basel, Switzerland)*, 11(10), 1147. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101147>
- Salas, F. (2006). Composición química, análisis antibacteriano, actividad analgésica y citotoxicidad aguda de las hojas de *Vismia baccifera* var. dealbata. Tesis de grado para optar por el título de Magister. Facultad

de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. Mérida – Venezuela.

- Sánchez, F. (2020). Fitoquímica. México: Editorial FES Zaragoza.
- Sánchez, E., Castillo, S.L. y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C. Rivas, M. Oranday y M, Verde. (Eds.), *Investigación en plantas de importancia médica*. (pp. 77-100). Barcelona- España: OmniaScience.
- Sanchez-Perez, J. A., Béjar Castillo, V., Villanueva Cotrina, F., & Guevara-Granados, J. M. (2020, April). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sensu stricto sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. In *Anales de la Facultad de Medicina* 81(2)180-185. UNMSM. Facultad de Medicina.
- Segovia, I y Suarez, L. (2010). Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho" y determinación de su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica. Tesis de grado Universidad Nacional Mayor de San Marco. Lima Perú.
- Skoog, D. (2008). Principios de Análisis Instrumental (6ª ed.). México DF: Reverte.
- Silva D, Costa P, Ribon A, Purgato G, Gaspar D, Dias M. Plant Extracts Display Sinergism with Different Classes of Antibiotics. *An Acad Bras Cienc*. 13,91(2)_e 20190117. Doi: 10.1590/0001-3765201920180117.
- Silvestre, R., de Moraes M., Lins A., Ralph, M., Lima-Filho, J., Camara, C., y Silva, T. (2012). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. *African Journal of Biotechnology*, 11(41), 9888-9893.
- Sin, C., Britos, M., Chamorro, E., Cáceres, M., Fernández, D., y Ortega, S. (2021). Aceites esenciales con actividad antibacteriana: posible aplicación y administración en odontología. *Odontología Vital*, (35), 32-43.

- Stevens, P. (2007). Clusiaceae-Guttiferae, Hypericaceae. In: K. Kubitzki [ed], The families and genera of vascular plants, vol. IX, *Flowering plants. Eudicots.*, 48-66, 194-201.
- Tortora, G., Carroll, Funke, B. y Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (9ª Ed). Buenos Aires- Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Van A. (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. *Módulo, 2*, 50-55.
- Villarreal S., Villegas M., Rojas L., Cordero Y., Rodríguez M y Castillo D. (2022). Composición química y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) a. gray (Asteraceae) recolectada en el estado Mérida – Venezuela. *Acta Bioclinica*, 12(23): 7-23.
- Vizcaya, M., Morales, A., Rojas, J., Y Nuñez, R. (2012). Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (1),12-34.