

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *EPELETIA SCHULTZII* WEDD (ASTERACEAE) RECOLECTADA EN EL ESTADO TRUJILLO – VENEZUELA

CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *EPELETIA SCHULTZII* WEDD (ASTERACEAE) FROM STATE TRUJILLO – VENEZUELA

Libia Alarcón*, Alexis Peña, Judith Velasco, Alfredo Usubillaga, Billmary-Z Contreras-Moreno, Luis Rojas Fermin, Deisy Ramírez, Aparicio Rosa
Universidad de Los Andes - Venezuela

Resumen

El aceite esencial de las hojas frescas de *Espeletia schultzii* Wedd (Asteraceae), obtenido por hidrodestilación fue rico en monoterpenos hidrocarbonados. El análisis de sus componentes volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-EM) permitió la identificación de 13 componentes, que constituyeron el 100 % del aceite esencial de los cuales los mayoritarios fueron α -pineno (49,72 %), β -pineno (16,02 %) y β -mirceeno (14,42 %). La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó empleando los métodos de difusión en agar con discos y Microdilución en caldo contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella Typhi* (CDC 57), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y la actividad antifúngica contra *Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). Este aceite mostró solo actividad antibacteriana, con variación en los resultados de acuerdo al método utilizado, por el método de difusión en agar con discos inhibió el desarrollo de las bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) con halos de inhibición entre 7 y 9 mm de diámetro y valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) que oscilaron entre 280 y 580 $\mu\text{g/mL}$, empleando el método de Microdilución en caldo, inhibió el desarrollo de todos los microorganismos ensayados a concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados revelaron que la sensibilidad del método juega un papel preponderante en la evaluación de este aceite como antibacteriano, siendo más sensible el método de Microdilución en caldo. Este es el primer reporte de la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las hojas de esta especie.

Palabras clave: *Espeletia schultzii* Wedd, actividad antimicrobial, aceite esencial, α -pineno, β -pineno.

Abstrac

The essential oil of fresh leaves *Espeletia schultzii* Wedd (Asteraceae) obtained by hydrodistillation was rich in hydrocarbon monoterpenes. The analysis of its volatile components by chromatography gas-mass spectrometry (GC-MS) allowed the identification of 13 components, which constituted 100% of essential oil of which the majority were α -pinene (50.11%), β -pinene (16.28%) and β -myrcene (14.71%). The antibacterial activity of the essential oil was assessed using methods agar diffusion and broth microdilution discs against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (CDC 57), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and antifungal activity against *Candida albicans* (CDC-B385) and *Candida krusei* (ATCC 6258). This oil showed only activity antibacterial, with variation in the results according to the method used by the diffusion method agar disk inhibited by Gram positive bacteria (*S. aureus* and *E. faecalis*) with inhibition halos of 7 to 9 mm in diameter and minimum inhibitory concentration values (MIC) ranging between 280 and 580 mg / mL , using the broth microdilution method, inhibited the development of all microorganisms tested at concentrations of 10 to 100 $\mu\text{g / mL}$. These results revealed that the sensitivity of the method plays an important role in the evaluation of this oil as an antibacterial, It is more sensitive the broth microdilution method. This is the first report of the activity antibacterial essential oil obtained from the leaves of this species.

Keywords: *Espeletia schultzii* Wedd, antibacterial activity, essential oil, α -pinene, β -pinene.

Recibido: 21/10/2015 - **Aprobado:** 08/03/2016

*Farmacéutico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA) con estudios de Maestría en Química Aplicada Mención Química Orgánica. Profesora Agregado de la Universidad de los Andes. Núcleo Universitario Rafael Rangel (NURR-ULA). Coordinadora de la Carrera de Farmacia NURR-ULA. (sigue en la pág. 76)

Introducción

La familia Asteraceae Bercht y Presl (1820) corresponde al orden Asterales y subclase Asteridae, comprende más de 1700 géneros y unas 30.000 especies que equivalen aproximadamente al 10% de la flora global (Katinas y col., 2007). Debido a su adaptación a diferentes ambientes, es posible ubicarla en todos los continentes a excepción de la Antártida y del interior de Groenlandia (Del Vitto y Petenatti, 2009), es abundante en zonas tropicales, subtropicales y templadas frías, no obstante muchos géneros son propios de las altas montañas (Ricardi, 1992).

En Venezuela, se han identificado 204 géneros y 784 especies de esta familia, de los cuales 12 géneros, 189 especies, 2 subespecies y 5 variedades son endémicos (Hokche y col., 2008). Estas plantas se encuentran distribuidas desde el nivel del mar hasta los sitios más elevados de los páramos andinos, y han sido agrupadas en tres regiones: la Costa y los Llanos, los Andes y la Cordillera Costera, y la región Guayanesa. La primera región es pobre en endemismo y diversidad, sin embargo, las dos últimas presentan las áreas de mayor concentración y alto grado de endemismo (Lasser, 1964).

El género *Espeletia* fue descubierto por Mutis en los páramos colombianos (el frailejón) y dedicado al virrey Ezpeleta en honor a su apellido. Este género abarcaba todas las especies conocidas como frailejones hasta su revisión taxonómica por Cuatrecasas (1976), la cual condujo a su división en ocho géneros *Carramboia*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Libanothamus*, *Ruilopezia*, *Tamania* y *Paramiflos* (Cuatrecasas, 1976; Cuatrecasas, 1995; Torrenegra y Téllez, 1994; Visbal y col., 2004). Además de ser el género más extendido y dominante en

todo el ecosistema andino venezolano, el cual se distribuye entre los 2700 y los 4200 m de altitud (Vareschi, 1970). Actualmente se conocen alrededor de 74 especies de *Espeletia* (1987) y endémicas en Venezuela se reconocen al menos 17 especies (Aparicio y col., 2002). Sin embargo, es bastante difícil establecer un número definido debido a la capacidad de hibridación que poseen estas plantas (Ibañez y Usubillaga, 2008).

Los frailejones tienen actividad terapéutica aplicados directamente (López-Palacios, 1984), en infusiones o mezclados con otros ingredientes (García-Barriga, 1975; Otaiza, 1999), se ha usado para solventar problemas respiratorios, bronquitis, gripe, tos, asma y problemas digestivos (Giraldo, Baquero, Bermúdez & Oliveira-Miranda, 2009). Son plantas pubescentes y resinosas, con aceites esenciales ricos en hidrocarburos monoterpénicos (Usubillaga y col., 2001). El estudio fitoquímico del género *Espeletia* se ha centrado en ambos tipos de análisis: de sus componentes volátiles y de su resina. Dependiendo de la especie estudiada, el porcentaje de aceite esencial se encuentra entre 0,1 y 1 % de la masa del material vegetal fresco (Khoury y col., 2000.; Usubillaga y col., 2001; Ibañez y Usubillaga 2006a,b, 2008).

Espeletia schultzei Wedd, es una planta resinosa de los frailejones que caracterizan la vegetación de superpáramo en el Parque Nacional Sierra Nevada del Estado Mérida en Venezuela, crece por encima de 2800 m (Monasterio, 1980) hasta 4.150 m (Berg, 1998), 4.200 m (Rada y col., 1989). Forma parte de las 180 especies de la subtribu *Espeletiinae* que se conocen comúnmente como Frailejón (Cuatrecasas, 1987), y ha sido ampliamente estudiada debido a sus hojas, las cuales colocadas directamente en el cuerpo y en la frente se usan para tratar dolores reumáticos y dolores de cabeza;

mientras que las resinas se emplean para tratar enfermedades respiratorias (López-Palacios, 1984), en el mercado nacional se comercializan jarabes de miel y extractos de hojas de frailejón.

El aceite esencial de todas las especies de *Espeletia* hasta ahora estudiadas muestran un alto contenido de hidrocarburos monoterpénicos, encontrándose en la mayoría de los casos con un porcentaje que oscila alrededor del 80 %, por otra parte dentro de sus componentes mayoritarios el α -pineno se ha identificado en todas las especies, aunque no siempre como componente mayoritario (Usbillaga y col., 2001). En relación a la actividad antibacteriana De Los Ríos y col. (1999), en un estudio realizado con las flores de *E. schultzi* Wedd colectada en el Páramo de Piedras Blancas, en el Edo. Mérida, Venezuela, reportaron actividad del extracto acetato de etilo contra *Bacillus cereus* y del extracto acuoso contra *S. aureus*.

En tal sentido, para contribuir con el estudio del frailejón, en el presente trabajo se determinó la composición química del aceite esencial de las hojas de *E. schultzi* Wedd y la actividad antimicrobiana se evaluó por dos métodos: el de difusión en agar con discos y el de Microdilución en caldo contra microorganismos de referencia internacional.

Materiales y métodos

Recolección de material vegetal

Las partes aéreas frescas de *E. schultzi* Wedd, fueron recolectadas entre los meses de Mayo-Noviembre de 2010, en el Páramo de Ortíz del estado Trujillo (L.N: 9°15'24.2"; L.O: 70°24'36.6"), a 2.677 m.s.n.m. La identificación botánica fue realizada por el Ing. Forestal Juan Carmona, adscrito al Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los

Andes (ULA), Venezuela. Los ejemplares colectados en campo están resguardados en el Herbario antes mencionado (código AP03).

Extracción de los aceites esenciales

Las hojas frescas de *E. schultzi* Wedd finamente cortadas y trituradas se sometieron a hidrodestilación empleando una trampa de Clevenger, con una relación 1:3 (planta fresca: agua destilada), durante 3 horas. El aceite esencial obtenido fue secado con sulfato de sodio anhidro y almacenado al resguardo de la luz a una temperatura de 4-6 °C, hasta su utilización.

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

El estudio por CG-EM del aceite esencial de *E. schultzi* Wedd, se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard Modelo GC System HP6890 y Mass Selective detector 5973 serie II, equipado con columna capilar HP-5 MS (30 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno y un espesor de pared de 0,25 μ m). La temperatura inicial fue de 60°C hasta alcanzar 260 °C a razón de 4°C/min. La temperatura del puerto de inyección fue de 230 °C y la del cuadrupolo 150 °C. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 0,9 mL/min ajustado a una velocidad lineal de 34 m/s. La energía de la fuente de ionización fue de 70 eV con un rango de barrido de 40-500 amu a 3,9 scans/s. Se inyectó 1,0 μ L del aceite diluido al 2% en n-heptano con una relación de split de 1:100 éter - dietílico. El tiempo de la corrida fue de 50 min. La identificación de los componentes del aceite se realizó por comparación de sus espectros de masas con los reportados en la base de datos del equipo Wiley MS library data 6^{ta} Edición y los índices de Kóvats (IK) reportados en la literatura (Adams, 2007).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Microorganismos. Se determinó la actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras de referencia internacional (Tabla 2).

Determinación de la actividad antibacteriana

➤ **Método de difusión en agar con discos.** La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar con discos, de acuerdo a la metodología descrita por Velasco y col. (2007), colocando adicionalmente en los ensayos antibacterianos un disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo (Tabla 2). La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó con todos los microorganismos ensayados que dieron inhibición bacteriana. Se utilizaron diluciones de aceite dentro de un intervalo de concentración de 10-300 $\mu\text{g/mL}$. La CIM se define como la concentración más baja que inhibió el crecimiento bacteriano visible (CLSI, 2012); también se incluyó un control negativo usando un disco de papel de filtro saturado con dimetilsulfóxido (DMSO) para comprobar la posible actividad de este solvente en contra de los microorganismos ensayados. Los experimentos se realizaron por duplicado.

➤ **Método de Microdilución en caldo.** La actividad antimicrobiana además se determinó por el método de Microdilución en caldo descrito por INEI-ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán 2001, con algunas modificaciones. El ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo MH a 37 °C. El inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al Patrón de Turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} ufc/mL). Para esta prueba se emplearon microplacas de 96 pozos, estériles de fondo redondo, cada orificio contenía:

90 μL de caldo Müeller-Hinton (MH), se agregaron 5 μL del inóculo en cada pozo, para una concentración final bacteriana de aproximadamente 5×10^5 ufc/mL, se adicionó 5 μL del aceite esencial, para un volumen final por pozo de 1 mL. En cada prueba se incluyó un pozo de control de crecimiento (MH + inóculo - sin antibiótico), un control negativo (caldo MH sin inocular), un control negativo (caldo MH + inóculo + DMSO) y un control positivo con ciprofloxacina (256 $\mu\text{g/mL}$) para *P. aeruginosa* y kanamicina (256 $\mu\text{g/mL}$) para el resto de las bacterias. Las microplacas inoculadas se incubaron durante 20 h 37 °C, posteriormente se sembraron 2 μL de cada pozo en agar Müeller-Hinton, el cual se incubó durante 24 horas a 37 °C. Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: en el agar MH donde se observó desarrollo bacteriano se consideró negativo, y en aquel medio que no se observó crecimiento como positivo. En el último caso, se procedió a determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), mediante diluciones del aceite esencial con DMSO en un rango de concentración de 10-200 $\mu\text{g/mL}$, repitiéndose los pasos anteriores. La CIM se definió como la concentración más baja del aceite esencial capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (CLSI 2012). Los ensayos microbiológicos se realizaron por duplicado.

Determinación de la actividad antimicótica

➤ **Método de difusión en agar con discos.** La actividad antimicótica por el método de difusión en agar con discos se evaluó con la metodología descrita por el CLSI 2012. La prueba se realizó en capsulas de Petri, los inóculos se prepararon minutos antes de la prueba en solución salina estéril (0,85% p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada una de las levaduras (conservadas previamente en agar Sabouraud dextrosa con

cloranfenicol), hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 (1×10^6 -8 UFC/mL), una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se tomaron 20 mL de agar *Miüller-Hinton* (BBL™®), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,5 µg/mL) y se mezclaron con 1 mL del inóculo (Lozina, 2005), posteriormente las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Los discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm de diámetro se esterizaron bajo luz ultravioleta (LUV) durante 24 horas previas al ensayo y luego se impregnaron con 10 µL del aceite puro. Posteriormente se colocaron en la superficie del agar ya inoculado, también se colocaron discos de papel de filtro impregnados con DMSO como control negativo y los discos del antimicótico de referencia para cada microorganismo como controles positivos (Peman y col., 2006). El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C. Se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h. El diámetro de la zona de inhibición, producto de la acción antimicótica del aceite, fue expresado en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando existía crecimiento microbiano alrededor del disco al igual que los controles negativos. La CIM solo se determinó contra los microorganismos que mostraron susceptibilidad al aceite. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados y discusión

Durante el proceso de hidrodestilación de las partes aéreas frescas, se obtuvo un aceite esencial de aspecto incoloro, olor característico y con un rendimiento de 0,29 % (v/p). El análisis de la composición química del aceite obtenido, se realizó a través de CG-EM, por comparación de los espectros de masas con los de la base de datos de la librería Wiley del sistema CG-

EM y mediante determinación de los Índices de Kóvats, lográndose así la identificación de 21 componentes que constituyen el 100 % del aceite esencial. Sus componentes volátiles mayoritarios fueron α -pineno (49,72 %), β -pineno (16,02 %) y β -mirceno (14,42 %) (Tabla 1). Estos resultados se correlacionan con la composición química señalada en la literatura de todas las especies del género *Espeletia* (Ibañez y Usubillaga 2006a), con predominio de los monoterpenos hidrocarbonados.

La composición química del aceite esencial de *E. schultzii* descrita en este estudio es similar a la reportada por Ibañez y Usubillaga (2006a), que muestran un análisis del aceite esencial de *E. schultzii* colectada en diferentes localidades del Estado Mérida-Venezuela, encontrando predominio de los monoterpenos hidrocarbonados α -pineno (alrededor de un 20 %) y β -mirceno (alrededor de un 20 %) para las especies colectadas en el Páramo de los Osos y Páramo de la Culata, sin embargo, muestra diferencias con la presencia mayoritaria del α -felandreno (40-50 %) para la misma especie colectada en el Pico Águila.

Las diferencias en el rendimiento y la composición química de los aceites esenciales en una planta pueden deberse a las condiciones del suelo, factores climáticos, estado de madurez, época de la recolección y ubicación geográfica. (Upadhyay, 2010; Regnault-Roger, 1997). Otros autores adjudican esta variabilidad acotando que los aceites esenciales están constituidos por productos del metabolismo secundario, cuya naturaleza, distribución en la planta y concentración no es consecuencia únicamente de factores genéticos, sino de un amplio conjunto de factores ecológicos, tales como: altitud, tipo de suelo, humedad, entre otros (Llorens y col., 2008; Yañez y col., 2011). De los resultados obtenidos y en contraste con

el estudio realizado por Ibañez y Usubillaga (2006a), se puede establecer que la altitud y condiciones particulares de cada páramo influyen sobre la química de *E. schultzii* Wedd.

La evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *E. schultzii* Wedd realizada en la presente investigación, mostró actividad solo contra bacterias. Cuando se empleó el método de difusión en agar con discos se observó inhibición del desarrollo de *S. aureus* y *E. faecalis*. Este resultado se correlaciona con la actividad reportada por De Los Ríos y col. (1999), en un estudio realizado con las flores de esta especie colectada en el Páramo de Piedras Blancas, en el Edo. Mérida, Venezuela, quienes señalan actividad del extracto acetato de etilo contra *Bacillus cereus* y del extracto acuoso contra *S. aureus*. Por otra parte, Peña y col. (2012), evaluaron esta actividad biológica en el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la especie *Espeletia nana* y encontraron inhibición del desarrollo de las bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*). Sin embargo, los resultados de la actividad antibacteriana utilizando el método de Microdilución en caldo revelaron actividad contra todas las bacterias ensayadas, Gram positivas y Gram negativas (enterobacterias y el bacilo gram negativo no fermentador de la glucosa). Este es el primer estudio sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *E. schultzii* Wedd.

La actividad antibacteriana de *E. schultzii* Wedd podría estar relacionada con la presencia de los componentes mayoritarios α -pineno y β -pineno, basado en reportes que señalan que el α -pineno, β -pineno y el limoneno tienen fuerte actividad antibacteriana (Magiatis y col., 1999; Filipowicz y col., 2003). Se presume que estos terpenos muestran su efecto tóxico a

través de la destrucción de la integridad de la membrana (Andrews y col., 1980; Uribe y Peña, 1985; Knoblock y col., 1988) y como consecuencia inhibición de la respiración e inhibición del transporte de iones.

Al comparar los métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana, el método de Microdilución en caldo resultó más sensible, al arrojar valores más bajos de CIM contra *S. aureus* y *E. faecalis* que el método de difusión en agar con discos. Además, solo por este método se observó actividad del aceite esencial de *E. schultzii* contra las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *S. Typhi*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) con valores de CIM que oscilaron entre 10 y 80 $\mu\text{g/mL}$. Esta diferencia en la sensibilidad de los métodos, podría estar relacionada con factores de difusión en el medio, gobernados por la naturaleza química del aceite que influye directamente sobre su solubilidad.

La actividad antibacteriana observada en este estudio permite sugerir que el aceite esencial de *E. schultzii* puede ser usado en preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades nosocomiales ocasionadas por estos microorganismos (Geffers y Gastmeier 2011, Jaggi y col. 2012, Caini y col. 2013).

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de *Espeletia schultzei* colectado en el estado Trujillo-Venezuela.

Pico	Componentes	TR	% AR	IR	IM
1	α -Pineneno	5,27	49,72	935	CG-EM, IR
2	Sabineno	6,13	0,65	966	CG-EM, IR
3	β -Pineneno	6,23	16,02	969	CG-EM, IR
4	β -Miraceno	6,53	14,42	979	CG-EM, IR
5	Limoneno	7,54	0,80	1009	CG-EM, IR
6	1,8-cineol	7,75	0,78	1018	CG-EM, IR
7	(z)- β -Ocimeno	8,05	2,26	1032	CG-EM, IR
8	(E)- β -Ocimeno	9,73	0,13	1050	CG-EM, IR
9	<i>trans</i> -Verbenol	11,07	0,11	1147	CG-EM, IR
10	α -Terpineol	12,53	0,11	1192	CG-EM, IR
11	Mirtenol	12,72	0,10	1197	CG-EM, IR
12	Cipereno	19,24	0,21	1403	CG-EM, IR
13	β -Cariofileno	19,86	2,85	1423	CG-EM, IR
14	α - <i>trans</i> -Bergamoteno	20,33	0,24	1440	CG-EM, IR
15	α -Humuleno	20,90	0,17	1460	CG-EM, IR
16	γ -Curcumeno	21,67	0,13	1486	CG-EM, IR
17	γ -Himachaleno	21,82	4,07	1491	CG-EM, IR
18	α -Zengibereno	22,16	1,58	1503	CG-EM, IR
19	Biciclogermacreno	22,22	3,76	1505	CG-EM, IR
20	δ -Cadineno	23,01	0,12	1530	CG-EM, IR
21	Espatuleno	24,61	1,22	1578	CG-EM, IR

TR: tiempo de retención en minutos; % AR: área relativa; IR: índice de retención; IM: identificación por masas; CG-EM: compuestos identificados de la base de datos Wiley Mass Spectra Library (6ª edición) y el libro Adams.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espeletia schultzei* colectado en el estado Trujillo-Venezuela.

Microorganismos	Método de análisis				
	Difusión en agar con discos			Microdilución en caldo	
	Zona de inhibición (mm)*		CIM $\mu\text{g/mL}$	AE CIM $\mu\text{g/mL}$	
	AE	Control positivo			
Bacterias					
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	9*	OX	19*	280	≤ 10
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	7*	VA	21*	580	≤ 100
<i>Salmonella</i> Typhi (CDC 57)	NA	CIP	29*	NP	≤ 10
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	NA	S	15*	NP	80
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA	AZT	30*	NP	≤ 10
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA	CEF	26*	NP	≤ 10
Hongos					
<i>Candida albicans</i> (CDC-B385)	NA	FLU	50*	NP	NP
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	NA	VOR	22*	NP	NP

AE: Aceite esencial; OX: Oxaciclina® 1 μg , BBL; VA: Vancomicina® 30 μg , BBL; CIP: Ciprofloxacina® 5 μg , BBL; S: Streptomycin® 30 μg , BBL; AZT: Aztreonam® 30 μg , BBL; CEF: Ceftoperazona® 75 μg , BBL; FLU: Fluconazol® (100 μg); VOR: Voriconazol® (400 $\mu\text{g/mL}$ voriconazol); *zona de inhibición expresada en mm con discos de 6 mm de diámetro; CIM: Concentración inhibitoria mínima (Rango de concentración 10-300 $\mu\text{g/mL}$); NA: No activo, NP: No probado.

Conclusiones

El estudio fitoquímico (componentes volátiles) del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *E. schultzii* Wedd mostró la presencia mayoritaria de monoterpenos hidrogenados siendo los principales componentes α -pineno (49,72 %), β -pineno (16,02 %) y β -mirceno (14,42 %). Encontrando algunas diferencias en cuanto a sus metabolitos mayoritarios con los reportados en la literatura para la misma especie pero de diferente localidad, de esta manera se confirma que la altitud y condiciones ambientales juegan un rol importante para la biosíntesis de los metabolitos secundarios.

El aceite esencial de *E. schultzii* Wedd fue activo contra todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas ensayadas, con variación en los valores de la CIM según el método utilizado, siendo más sensible el método de Microdilución en caldo al compararlo con el método de difusión en agar con discos.

Con base a la literatura revisada, este es el primer reporte sobre actividad antibacteriana del aceite esencial de *E. schultzii* Wedd.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Artes de la Universidad de Los Andes CDCHTA-ULA (Proyecto NURR-C-573-13-08-B), al Programa de apoyo a grupos de investigación del CDCHTA (ADG: Grupo Bacteriología Clínica) y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología FONACIT (Proyecto 2013002081).

Autores: (vine de la pág. 69)

Alexis Eduardo Peña Rangel: Farmacéutico y Licenciado en Química CUM LAUDE egresado de la Universidad de Los Andes (ULA) con estudios de Doctorado en Química Aplicada Mención Química Orgánica. Profesor Agregado de la Universidad de los Andes. Núcleo Universitario Rafael Rangel (NURR-ULA).

Alfredo Usubillaga: Ing. Químico, SUMMA CUM LAUDE. Master of Science University of Illinois, Urbana, Ph. D. University of Illinois, Urbana. Profesor Titular de la Universidad de los Andes y director del Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA.

Aparicio Rosa: Farmacéutico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA) con estudios de Maestría en Química de Medicamentos, Doctorado en Química Aplicada, Mención Química Orgánica.

Billmary-Z Contreras-Moreno: Ingeniero Químico, egresada de la Universidad de Los Andes (ULA) con estudios de Doctorado en Química de Medicamentos. Becaria de la Cohorte 2016-2018 del Programa de Formación de Generación de Relevo del Vicerrectorado académico-ULA en el Dpto. de Cálculo de la Escuela Básica de la Facultad de Ingeniería (ULA).

Deisy Ramírez: Ingeniero Químico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA) con estudios de Maestría en Ingeniería de Procesos de la Universidad de Carabobo. Profesora Agregado de la Universidad de los Andes. Núcleo Universitario Rafael Rangel (NURR-ULA).

Judith Velasco: Licenciada en Bioanálisis egresada de la Universidad de Los Andes (ULA), con estudios de Especialidad en Microbiología Clínica y Doctorado en Ciencias Médicas Fundamentales. Profesora Titular de la Universidad de Los Andes.

Luis Rojas: Farmacéutico egresado de la Universidad de Los Andes (ULA) con Maestría en Química de Medicamentos y Doctorado en Química Orgánica de la Universidad de Bordeaux-Francia. Profesor Titular de la Universidad de los Andes y director del Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA.

Referencias bibliográficas:

- Adams R. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (No. Ed.4). Carol Stream, Illinois (USA): Allured Publ. Corp. 469 p.
- Andrews, R. E., Parks, L. W., & Spence, K. D. 1980. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 40 (2): 301-304.
- Aparicio R, Romero M, Khouri N, Rojas L, Usubillaga A. 2002. Volatile constituents from the leaves of three *Coespeletia* species from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*. 14 (1): 37-39.
- Berg A. 1998. Plant communities and life forms of the superparamo of the "Sierra Nevada de Merida" National Park, Venezuela. *Phytocoenologia*. 28 (2): 157-203.
- Caini S, Hajdu A, Kurcz A, BöröczK. 2013. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005-2010. *Eurosurveillance*. 18 (2). Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20352>
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard-Eleventh Edition. Document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cuatrecasas J. 1995. A new genus of the Compositae: *Paramiflos* (Espeletiinae) from Colombia. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 108: 748-750.
- Cuatrecasas J. 1976. A new subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. *Phytol*. 35 (1): 43-61.
- Cuatrecasas J. 1987. Clave diagnóstica de las especies de *Ruilopezia* (Espeletiinae, Heliantheae, Compositae). *Anales Jardín Botánico de Madrid*. 44 (2): 401-419.
- Del Vitto L y Petenatti E. 2009. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte sinópsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*. 18 (2): 87-115.
- De Los Rios, C., Hidalgo, B.D., Contreras, Q., Crescente, O., Caserta, A. 1999. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de las inflorescencias de *Espeletia schultzei* (Asteraceae). *Ciencia*. 7, 72-77.
- Filipowicz N, Kamiński M, Kurlenda J, Asztemborska M, Ochocka J. 2003. Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research*. 17 (3): 227-231.
- García-Barriga H. Flora Medicinal de Colombia. 1975. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Botánica Médica. Vol.3, 345 p.
- Geffers C, Gastmeier P. 2011. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *DtschArzteblInt*. 108 (6):87-93.
- Giraldo, D., Baquero, E., Bermúdez, A., & Oliveira-Miranda, M. A. 2009. [www. redalyc. org](http://www.redalyc.org). *Acta Botanica Venezuelica*. 32 (2), 267-301.
- Hokche O, Berry P, Huber O. 2008. Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela. Caracas Venezuela: Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser.
- Ibáñez J, Usubillaga A. 2006b. Analysis of the essential oil of two different altitudinal populations of *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. Ex Wedd) Cuatrec. *Flavour and Fragrance Journal*. 21 (5): 760-763.

- Ibañez J, Usubillaga A. 2008. Estudio de la composición del aceite esencial de un frailejón híbrido entre *Espeletia schultzi* y *Coespeletia moritziana* (Espeletiinae). Revista de la Facultad de Farmacia. 50 (1): 16-19.
- Ibañez J, Usubillaga A. 2006a. The essential oil of *Espeletia schultzi* of different altitudinal populations. Flavour and Fragrance Journal. 21 (2): 286-289.
- Jaggi N, Sissodia P, Sharma L. 2012. Control of multidrug resistant bacteria in a tertiary care hospital in India. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 1:23. Disponible en: <http://www.aricjournal.com/content/1/1/23>
- Katinas L, Gutierrez D, Grossi M, Crisci J. 2007. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 42 (1-2): 113-129.
- Khoury N, Usubillaga A, Rojas L y Galarraga F. 2000. Essential oil of *Espeletia weddellii* (Sch. Bip. Ex Wedd.) Flavour and Fragrance Journal. 15 (4): 263-265.
- Knoblock K, Pauli A, Iberl B, Weis N, Weigand H. 1988. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research. 1 (3): 119-128.
- Lasser T. 1964. Flora de Venezuela: Compositae. Caracas Venezuela: Instituto Botánico Dirección de Recursos Naturales Renovables. Ministerio de Agricultura y Cría. Vol X. Primera. Parte 244: 475-478.
- Llorens J, Castell V, Ramírez R. 2008. Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales. Xiloca. 36:61-84.
- López-Palacios S. 1984. Usos Médicos de Plantas Comunes. Mérida, Venezuela: Talleres Gráficos Universitarios, 241 p.
- Lozina L, Boehringer S, Acosta O. 2005. Extrapolación en una Forma Posológica de valores obtenidos in Vitro sobre actividad antifúngica del propóleo. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen V-018.
- Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis A, Chinou I, Mitaku S. 1999. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacialentiscus* var. chia, Planta Medica. 65 (08): 749-752.
- Malbrán C. 2001. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires-Argentina: INEI-ANLIS.
- Monasterio M. 1980. Los páramos andinos como región natural: Características biogeográficas generales y afinidades con otras regiones andinas. Estudios ecológicos en los Páramos Andinos. Mérida, Venezuela: Talleres gráficos de la Universidad de Los Andes, 15-27 p.
- Otaiza R. 1999. Breve Diccionario de Plantas Medicinales. Caracas, Venezuela: Los Libros de El Nacional. Colección Quirón. Vol. 19, 247 p.
- Pemán J, Cantón E, Calabuig E, Bosch M, Valentín A, Viudes A, Gobernado M. 2006. Actividad in vitro del voriconazol frente a levaduras y algas con los nuevos puntos de corte del patrón de resistencia. Revista Española de *Quimioterapia*. 19 (1): 21-33.
- Peña Alexis, Rojas Luis, Aparicio Rosa, Alarcón Libia, Baptista José Gregorio, Judith Velasco, Carmona Juan y Usubillaga Alfredo. 2012. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of

- Espeletia nana*. Natural Product Communications. 7 (5): 661 – 662.
- Rada F, Azócar A, González J, Briceño B. 1989. Leaf gas Exchange in *Espeletia schultzei* Wedd, a giant caulescent rosette species, along an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes. Acta Oecológica. 9 (1): 73-79.
- Regnault-Roger C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integrated Pest Management Reviews. 2 (1): 25-34.
- Ricardi M. 1992. Familias de dicotiledóneas venezolanas II. Subclases Rosidae y Asteridae: Evolución, filogenia y géneros. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Torrenegra R, Téllez A. 1994. Química de especies del género *Espeletia*. *Espeletia killipii*, *Espeletia tunjana*. Revista Colombiana de Química. 23: 29-35.
- Upadhyay R. 2010. Essential oils: antimicrobial, antihelminthic, antiviral, anticancer and anti-insect properties. *Journal of Applied Biosciences*. 36 (1): 1-22.
- Uribe S, Ramirez T, Peña A. 1985. Effects of β -Pinene on yeast membrane functions. *Journal of bacteriology*. 16 (3), 1195-1200.
- Usubillaga A, Khouri N, Rojas L, Morillo M. 2001. Essential oil of the leaves from *Espeletia batata* Cuatrec. *Journal of Essential Oil Research*. 13 (6): 450-451.
- Vareschi V. Flora de los páramos de Venezuela. 1970. Mérida-Venezuela: Ediciones del Rectorado. Universidad de Los Andes.
- Velasco J, Rojas J, Salazar P, Rodríguez M, Díaz T, Morales A, Rondón M. 2007. Antibacterial activity of the essential oil of *lippiaoreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*. 2 (1):85-88.
- Visbal T, Martín P, Mora A, Delgado G, Usubillaga A. 2004. Carbohydrate esters of kaurenic acid. *Revista latinoamericana de química*. 32: 67-75.
- Yáñez X, Parada D, Lugo L. 2011. Variabilidad del rendimiento del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* nativo de Norte de Santander (Colombia) de acuerdo con el tratamiento de la hoja. *Bistua*. 9 (1):48-54.