

CIENCIA 23(1), 14 - 22, 2015
Maracaibo, Venezuela

Composición química y evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch. contra cepas bacterianas de referencia internacional

Fanny González^{1*}, Francy Hernández-Molina¹, Luis Rojas-Fermin², María Araque¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología,
Laboratorio de Microbiología Molecular. ²Instituto de Investigaciones.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, 5101 Mérida, Venezuela.

Recibido: 20-06-14 Aceptado: 29-01-15

Resumen

Las plantas medicinales se consideran fuentes naturales para la síntesis de nuevos agentes que pueden actuar como alternativas a los antibióticos en el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias resistentes. En este estudio se determinó la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de las flores y las hojas de *M. quadrangularis*. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación y la caracterización química se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La evaluación de la actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar perforado. Más de cuarenta componentes fueron identificados constituyendo un 85,93% y 94,66% del aceite de la hoja y la flor, respectivamente, siendo los más abundantes los monoterpenos tales como limoneno, sabineno, α -pineno y α -tujeno y los sesquiterpenos como trans-cariofileno, mirceno y germacreno-D. Los aceites esenciales mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre las bacterias gramnegativas, especialmente en cepas de *Escherichia coli*. De acuerdo con nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre la caracterización química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. quadrangularis*.

Palabras clave: *Montanoa quadrangularis*; composición química; actividad antibacteriana; aceite esencial.

Chemical composition and *in vitro* evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch. against international reference bacterial strains

Abstract

Medicinal plants are considered new resources for producing agents that act as alternatives to antibiotics in the treatment of diseases caused by antibiotic-resistant bacteria. In this study, the chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of the flowers and

* Autor para la correspondencia: fannyg@ula.ve

leaves of *M. quadrangularis* were determined. The essential oils were obtained by hydrodistillation and chemical characterization was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The evaluation of antibacterial activity was carried out by the diffusion method in agar wells. More than forty components, representing 85,93% and 94,66% of the oil from leaves and flowers, respectively, were identified; monoterpenes, such as limonene, sabinene, α -pinene and α -thujene and sesquiterpenes, such as trans-caryophyllene, myrcene and germacrene-D were the most abundant constituents. The essential oils showed a significant inhibitory effect against Gram-negative bacteria, especially *Escherichia coli*. To our knowledge, this is the first report of the chemical characterization and antibacterial activity of the essential oil of *M. quadrangularis*.

Keywords: *Montanoa quadrangularis*; chemical composition; antibacterial activity; essential oil.

Introducción

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbi-mortalidad en todo el mundo. En la actualidad, muchas de estas infecciones especialmente las reemergentes, son causadas por patógenos resistentes a los agentes antimicrobianos de uso convencional. En consecuencia, las terapias anti-infecciosas efectivas y disponibles comercialmente se han reducido y el costo de los cuidados en salud se ha incrementado sustancialmente (1).

La búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos con estructura y mecanismos de acción diferentes a los antibióticos de uso común, podría ser la vía para enfrentar el fenómeno de la resistencia bacteriana (2). En este sentido, los productos naturales en especial los aceites esenciales provenientes de plantas superiores, constituyen una fuente no tradicional importante para la investigación y desarrollo de nuevas drogas con actividad antimicrobiana (3).

Los aceites esenciales son en su mayoría sustancias terpénicas y compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, que se almacenan en tejidos secretores de los órganos vegetales aromáticos (4). Numerosos estudios destacan la utilidad de estos aceites en la fabricación de perfumes, cosméticos y saborizantes en la industria farmacéutica. Además, la notable actividad antibacteriana

de diversos aceites esenciales provenientes de plantas superiores ha sido reportada extensamente (5).

El género *Montanoa* pertenece a la familia *Asteraceae* y comprende 75 especies, en su mayoría distribuidas ampliamente en Latinoamérica (6). En Venezuela se han identificado solo tres especies: *M. angulata* Badillo, *M. fragans* Badillo y *M. quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch. Esta última también es conocida como: *M. tamayonis* Ariste, *M. exelsa* Ernst. y *M. moritziana* Sch. Bip. ex Kuntze (7). Si bien a este género se le atribuyen principalmente beneficios en la salud femenina por sus propiedades regulatorias de la menstruación y estimulador de las contracciones uterinas (oxitócico) (6,8), otros efectos biológicos como la actividad antibacteriana se desconocen.

Estudios fitoquímicos realizados en extractos obtenidos de flores y hojas de algunas especies de *Montanoa*, han determinado la presencia de una variedad de monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos. Por el contrario, la composición química del aceite esencial de estas especies ha sido escasamente investigada, así como sus propiedades biológicas (9). Por tal motivo, en este estudio se realizó la caracterización química del aceite esencial proveniente de *M. quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch. y se determinó la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Materiales y métodos

Material vegetal: La recolección del material vegetal se realizó entre los meses de noviembre a marzo de 2006, en la carretera vía El Morro, Municipio Libertador del estado Mérida, Venezuela, a 1.800 m. s.n.m., durante el período de floración y en la estación seca. La identificación de la planta fue llevada a cabo por el Ing. Juan Carmona y un registro de la muestra fue depositado bajo el N° MERF-01 en el Herbario "Luís Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, Venezuela.

Obtención del aceite esencial: Inicialmente las partes aéreas de muestras frescas de *M. quadrangularis* fueron cortadas en pequeñas porciones (2,68 K de hojas y 2,24 K de flores), este material fue sometido a hidrodestilación empleando la Trampa de Clevenger para obtener los aceites esenciales. Una vez extraídos los aceites, estos fueron resguardados de la luz en envases tipo ámbar y conservados a 4 °C. **Análisis de la composición química:** Los componentes de los aceites esenciales se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP) modelo 6890, acoplado a un detector de masa HP MSD modelo 5973, equipado con una columna capilar de metil-5% fenil silicona (HP-5) de 30 m de largo x 0,25 mm de diámetro. El volumen de inyección fue de 1 µL de una dilución de la muestra en éter dietílico (20 µL en 1 mL). Se utilizó una temperatura inicial de 60 °C, que se incrementó progresivamente 4 °C por minuto hasta alcanzar 260 °C. La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos computarizada Wiley MS Data Library 6th edición. Los índices de Kovat's (IK) fueron calculados en relación a una serie de *n*-alcanos (de C9 a C23) utilizados como estándares internos. Los IK obtenidos se compararon con los reportados en la literatura.

Una vez caracterizado el aceite esencial obtenido tanto de las hojas como de la flor

se procedió a realizar diluciones seriadas de cada uno (100; 50; 25; 12; 6; 3; 1,5 y 1%) utilizando como diluyente etanol grado analítico, marca: Fisher Scientific.

Evaluación de la actividad antibacteriana: La actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. quadrangularis* fue determinada mediante la técnica de difusión en agar perforado (10,11). Para estos ensayos se utilizaron cepas bacterianas de referencia internacional (ATCC, del inglés *American Type Culture Collection*), 2 grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) y 3 gramnegativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Como controles positivos para la inhibición del crecimiento bacteriano se utilizó la vancomicina (4 µg/mL) y ciprofloxacina (2 µg/mL) para las bacterias grampositivas y gramnegativas, respectivamente. El etanol fue utilizado como control negativo.

La preparación de los inóculos microbianos se realizó a partir de cepas puras mantenidas en agar Tripticasa de Soja (TSA, marca: BD BBL, Francia), tomando muestras de varias colonias y resuspendiéndolas en una solución de cloruro de sodio al 0,85% estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0.5 de McFarland (10⁶⁻⁸ UFC/mL).

La preparación de las placas se realizó de acuerdo a lo descrito por Araque y col. (2007) (11). Brevemente esto consistió en emplear placas de petri (8 cms de diámetro) con 25 mL de agar Mueller Hinton (MH) sin solidificar; a cada placa se le colocó una plantilla perforadora de metal estéril a modo de tapa, la cual una vez solidificado el agar y retirada la plantilla, esta produjo 5 pozos equidistantes de 4 mm de diámetro.

Después de preparados los inóculos bacterianos y empleando hisopos estériles se procedió a inocular en tres o cuatro direcciones toda la superficie de las placas con agar Mueller Hinton, girando sucesivamente dicha placa en ángulos de 90° (2 placas por

bacteria). Posteriormente, en cada pozo se colocó 20 μL de cada una de las diluciones del aceite, así como los controles respectivos. Finalmente, los pozos fueron sellados con agar MH sin solidificar. Todas las placas fueron colocadas a 4 °C durante 12 horas para facilitar la difusión del aceite, luego se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente fueron incubadas a 36 °C durante 24 h. La lectura se realizó mediante la medición con un vernier de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Los ensayos se realizaron por triplicado en eventos separados y los valores promedios son señalados en los resultados.

Resultados y discusión

El rendimiento porcentual del aceite obtenido con base en el peso en gramos de la muestra y a la cantidad extraída fue muy similar tanto para la hoja como para la flor (0,15% y 0,16%, respectivamente).

Los resultados de la caracterización química del aceite esencial se muestran en la tabla 1. La identificación y distribución de los distintos compuestos del aceite esencial de la hoja y la flor, representaron un 85,93% y 94,66% respectivamente, de la composición total de estos aceites, los cuales se lograron diferenciar en más de 40 componentes. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de la flor fueron: limoneno (18,83%), sabineno (11,63%), α -pineno (9,90%) y α -tujeno (9,27%) y los de la hoja estuvieron representados por: limoneno (18,01%), *trans*-cariofileno (16,07%), germacreno-D (7,63%) y mirceno (6,37%) constituyendo aproximadamente el 50% del total de los componentes identificados.

Son escasos los estudios realizados en relación a la composición química del aceite esencial del género *Montanoa*. Sin embargo, los resultados obtenidos son similares a los reportados por Robles y su equipo (2006) (6), quienes mediante microextracción en fase sólida (SPME) y GC-MS, analizaron el aceite esencial de las partes aéreas de *M. tomento-*

sa, una especie vegetal recolectada en México, en la cual encontraron que monoterpenos como: sabineno, α -pineno, α -tujeno y limoneno constituyeron el 70,5% del total de los compuestos identificados; algunos sesquiterpenos como germacreno-D y cariofileno también fueron reconocidos pero en menor concentración. Por otra parte, Pérez-Amador y col. (2006) (9) analizaron por GC aproximadamente el 30% del aceite esencial de las partes aéreas de *M. grandiflora*, logrando reconocer no más de 22 compuestos donde los de mayor proporción fueron β -felandreno, limoneno y α -pineno. Contrariamente, estudios realizados con extractos obtenidos de *M. quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch han identificado taninos, esteroides y alcaloides como compuestos mayoritarios (12). Es probable, que las diferencias en los resultados obtenidos en este estudio y los registrados en la literatura radique en el tipo de sustancia analizada (extracto o aceite esencial), la metodología empleada para la obtención y análisis químico de la misma, además de las diferencias inherentes que pudieran existir en cuanto a la diversidad de las especies estudiadas, así como las condiciones geográficas y climáticas donde se encontraba la planta, entre otras variables.

Numerosas investigaciones han demostrado efectos biológicos de plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae*, así como, del género *Montanoa* Cerv., destacando su actividad antimicótica, oxitócica y citotóxica, que han resultado importantes para la medicina, la farmacología y la toxicología (6,8). Zapata y colaboradores (2010) (13), demostraron actividad antimicótica al evaluar 15 aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia *Asteraceae* recolectadas en Colombia. Por otra parte, se ha descrito que existe una estrecha relación entre la actividad antibacteriana y la naturaleza de los principales constituyentes de un aceite esencial (14). De hecho, estudios *in vitro* han revelado que compuestos monoterpénicos (limoneno, sabineno, α -pineno y α -tujeno) y fenólicos (carvacol y timol) como los descritos en este estudio tienen acción antibacteriana (15).

Tabla 1
Composición química del aceite esencial provenientes de la flor y hoja
de *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch en columna capilar HP-5.

Componentes	Flor (%)	Hoja (%)	Ik*
<i>trans</i> -2-hexenal	-	0,09	
<i>cis</i> -3-hexenol	-	0,17	
1-hexanol	0,04	0,06	
santolina trieno	8,01	-	907
α -tujeno	9,27	5,42	924
α -pineno	9,90	1,84	930
camfeno	0,07	-	943
sabineno	11,63	6,24	965
β -pineno	5,76	2,20	968
mirceno	6,83	6,37	979
α -felandreno	0,09	-	994
α -terpineno	0,82	0,26	1006
p-cimeno	0,16	0,09	1015
limoneno	18,83	18,01	1020
1,8-cineol	1,48	2,07	1023
<i>cis</i> - β -ocimeno	0,07	-	1027
<i>trans</i> - β -ocimeno	0,17	0,17	1039
γ -terpineno	1,65	0,47	1052
<i>trans</i> -sabineno hidrato	-	0,12	1062
α -terpinoleno	0,41	0,13	1086
linalool	0,13	0,22	1099
nonanal	0,17	0,58	1103
<i>cis</i> -p-menth-2-en-1-ol	-	0,07	1121
terpineno-4-ol	3,23	1,01	1178
α -terpineol	0,25	-	1191
<i>cis</i> -piperitol	0,08	-	1209
timol	1,20	0,06	1301
carvacrol	0,92	0,06	1309
eugenol	-	0,08	1361
isoledeno	-	0,12	1370
α -copaeno	0,22	0,95	1378
<i>trans</i> -metil cinnamato	-	0,32	1384
β -bourboneno	-	0,14	1386
β -cubebeno	0,14	0,15	1388

Tabla 1 (Continuación)

Componentes	Flor (%)	Hoja (%)	Ik*
β -elemeno	0,33	0,44	1393
metil-eugenol	0,06	-	1404
α -gurjuneno	0,24	0,78	1410
trans-cariofileno	3,24	16,07	1421
α -bergamoteno	0,12	0,07	1437
α -humuleno	0,41	0,95	1456
trans- β -farneseno	0,13	0,10	1458
allo-aromadendreno	-	0,33	1463
γ muuroleno	-	0,16	1476
β -selineno	0,21	-	1478
germacreno-D	4,55	7,63	1484
(+)- β -selineno	-	2,20	1490
ledeno	1,94	-	1491
α -muuroleno	0,10	0,36	1503
germacreno A	-	0,50	1509
β -bisaboleno	0,08	0,18	1511
cubebol	-	2,70	1517
δ -cadineno	1,13	2,51	1526
cadina-1,4-dieno	-	0,11	1530
germacreno B	-	0,32	1553
cariofileno oxido	0,20	1,56	1585
carotol	0,39	0,31	1598
cadinol	-	0,62	1638
torreyol	-	0,12	1641
tricosano	-	0,44	2300
% Total	94,66	85,93	
Número de compuestos	41	50	

*Ik: Índice de Kovats calculado en relación a n-alcenos (C_9 - C_{23}).

En la tabla 2, se señalan los resultados de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las partes aéreas de *M. quadrangularis* en cepas de referencia internacional. Independientemente del origen de extracción del aceite (hoja o flor) de *M. quadrangularis*, estos demostraron tener actividad de tipo grupo-específico, es decir

el poder inhibitorio de los aceites se observó exclusivamente sobre las bacterias gramnegativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) y una nula actividad fue observada en los organismos grampositivos ensayados (*S. aureus* y *E. faecalis*). Es de resaltar la actividad del aceite obtenido de la flor, donde el efecto inhibitorio fue a concentraciones me-

Tabla 2
Actividad antibacteriana del aceite esencial proveniente de hojas y flor de *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch

Concentración del aceite esencial (%)	Diámetro promedio (mm) de la zona de inhibición ^a													
	<i>S. aureus</i> ATCC25923		<i>E. faecalis</i> ATCC19433		<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> ATCC23357		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853					
	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor				
100	0	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	7,6	0	
50	0	0	0	0	0	0	10,3	0	0	0	0	0	0	
25	0	0	0	0	0	0	13,0	0	0	0	0	0	9,0	
12	0	0	0	0	0	0	11,3	0	0	0	0	0	9,0	
6	0	0	0	0	0	0	12,0	0	0	0	0	0	9,3	
3	0	0	0	0	0	0	9,3	0	0	0	8,3	0	0	
1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,6	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,0	0	0	
Control positivo														
Vancomicina (4 µg/mL)	14,0	14,3	21,6	21,3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ciprofloxacina (2 µg/mL)	NA	NA	NA	NA	33,4	33,6	15,3	37,3	34,0	37,0	37,0	34,0	37,0	37,0
Control negativo														
Etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^aValores que corresponden a tres ensayos independientes. NA: no aplicable.

nores a 50% en las bacterias gramnegativas. En el caso del aceite sin diluir proveniente de la hoja solo afectó el crecimiento de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Es probable que las diferencias observadas en la distribución de los componentes de cada aceite influyan en la difusión de estos en el medio de cultivo sólido, de manera que la determinación de la concentración inhibitoria mínima en caldo pudiera valorar mejor el efecto inhibitorio de los aceites analizados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten afirmar que el aceite esencial de las partes aéreas de *M. quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch, presenta principios activos que tienen efectos inhibitorios sobre microorganismos gramnegativos. Este hallazgo supone que componentes presentes en el aceite esencial de *M. quadrangularis* podrían ser una fuente natural de agentes antibacterianos con interés clínico.

De acuerdo a nuestro conocimiento, y luego de una exhaustiva revisión de la bibliografía, hasta el momento no se ha reportado la actividad antibacteriana del aceite esencial de este género, ni la composición química de la especie en estudio; por lo que el presente trabajo representa el primer registro de la caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch frente a cepas bacterianas de referencia internacional.

Conclusiones

El análisis de la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *M. quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch permitió diferenciar más de 40 componentes, predominando compuestos monoterpénicos (limoneno, sabineno, α -pineno, α -tujeno y mircenol) y sesquiterpénicos (trans-cariofileno, mircenol y germacreno-D).

Los aceites esenciales analizados mostraron actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas de referencia internacional.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) proyecto N° FA-373-06-03F y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), Venezuela (Proyecto N° 2012002321. Contrato N° 201201213).

Referencias bibliográficas

1. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Fecha de consulta: 24/03/2014.
2. RAID A., YAZEED A., AYESHA M., RABBANI S., JANARDHAN K., GUPTA V. **Saudi J Biol Sci** 21:147-151.2014.
3. MARQUES A., LIMA C., ALVIANO D., ALVIANO C., ESTEVES R., KAPLAN M. **Emir J Food Agric** 25(10):798-808.2013.
4. BRUNETON J. Fitoquímica-Plantas Medicinales Farmacognosia. 2^{da} ed. Zaragoza (Esp): Edit. acribia, s.a. 477-506.2001.
5. AYMAN A., MAZEN S. **IJBMS** 39(1).2014.
6. ROBLES R., MOLINA J., LOZOYA E., LÓPEZ M. **Flavour Frag J** 21:225-27.2006.
7. ERNSTIA. Revista del Herbario Victor Manuel Vadillo [Publicaciones Periódicas] Facultad de Agronomía Universidad Central de Venezuela 11(3,4):188-90.2001.
8. CARRO M., CERVANTES E., CERVANTES M., RODRÍGUEZ G. **Pharmacol Biochem Behav** 78(1):29-34.2004.
9. PEREZ A., MUÑOZ M., NOYOLA A., GARCIA F. **Rev Int Botan Exp** 75:145-150.2006.
10. ACOSTA M., GONZÁLEZ M., ARAQUE M., VELAZCO E., KHOURI N., ROJAS L., et al. **Rev Fac Farm** 45(1):19-24.2003.
11. ARAQUE M., ROJAS L., USUBILLAGA A. **Ciencia** 15(3):366-370.2007.

12. GUTIÉRREZ F., ISAZA G., MARULANDA T. **Rev Univ Caldas** 14(1):83-91.1994.
13. ZAPATA B., DURAN C., STASHENKO E., BETANCUR L., MESA A. **Rev Iberoam Micol.** 27(02):101-103.2010.
14. KALEMBA D., KUNICKA A. **Curr Med Chem** 10(10):813-29.2003.
15. RAMIREZ L., ISAZA J., VELOZA E., MARIN D. **Ciencia** 17(4):313-321.2009.