

Caracterización química y actividad antimicrobiana de los componentes volátiles de *Eucalyptus* de dos especies de Venezuela

Silvana Villarreal-Rivas^{1a*}, Luis Rojas-Fermin^{1†}, Rocelvic Lárez^{2b}, María Torres^{2c}, Clara Díaz^{3d}, María Lucena de Ustáriz^{4c}, Juan Carmona^{5f}

¹ Laboratorio “A” Productos Naturales, Instituto de Investigaciones, “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela. *Autora de correspondencia.

² Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

³ Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

⁴ Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador.

⁵ Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Correos electrónicos: ^a silvanarmn@yahoo.es, ^b larezrocelvic14@gmail.com, ^c majotoorres01@gmail.com, ^d cadg2011@gmail.com, ^e maru_lu@yahoo.com, ^f jcarmona43@hotmail.com

Recibido: 30 de junio de 2022

Revisado: 31 de junio de 2022

Aceptado: 6 de agosto de 2022

RESUMEN

Objetivo: la presente investigación describe la caracterización química cuali-cuantitativa y la evaluación antimicrobiana de los aceites esenciales (AE) presentes en las hojas de dos especies de *Eucalyptus*, los cuales fueron recolectados en el estado Mérida en la República Bolivariana de Venezuela. **Métodos:** se realizó la extracción de los AE por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger. La composición química fue evaluada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con disco, frente a cepas de referencia internacional *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). **Resultados:** los compuestos mayoritarios para la especie *Eucalyptus globulus* fueron: 1,8-cineol (43,36 %), limoneno (15,86 %), β -pineno

(14,61 %), α -pineno (9,32 %) y para el *Eucalyptus robustus* el α -pineno (37,61 %), *p*-cimeno (11,09 %), α -fellandreno (9,92 %), β -pineno (6,96 %), 1,8-cineol (5,79 %). El AE de *E. globulus* inhibió el desarrollo de *S. aureus* una CIM de 0,5 g/mL, *E. faecalis* 0,25 g/mL, *E. coli* y *K. pneumoniae* de 0,125 g/mL, y para *C. albicans* 100 μ L/mL y *C. krusei* 50 μ L/mL. Por su parte, la especie *E. robustus* presentó inhibición con una CIM de 0,125 g/mL contra: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y para *C. albicans* 50 μ L/mL y *C. krusei* 10 μ L/mL. **Conclusión:** los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. robustus* mostraron actividad antimicrobiana significativa.

Palabras clave: Myrtaceace, *E. globulus*, *E. robustus*, aceite esencial, actividad antimicrobiana.

SUMMARY

Chemical characterization and antimicrobial activity of the volatile components of *Eucalyptus* of two species from Venezuela

Objective: this research describes the qualitative-quantitative chemical characterization and antimicrobial evaluation of essential oils (EO) present in the leaves of two species of *Eucalyptus*, which were collected in the state of Mérida in the Bolivarian Republic of Venezuela. **Methods:** the essential oils were extracted by the hydrodistillation method using the Clevenger trap. The chemical composition was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The antimicrobial activity was determined by the agar disk diffusion method, against international reference strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) and *Candida krusei* (ATCC 6258). **Results:** the main compounds for the species *Eucalyptus globulus* were: 1,8-cineol (43.36%), limonene (15.86%), β -pinene (14.61%), α -pinene (9.32%) and for *Eucalyptus robustus* α -pinene (37.61%), *p*-cymene (11.09%), α -fellandrene (9.92%), β -pinene (6.96%), 1,8 -cineol (5.79%). The EO of *E. globulus* inhibited the development of *S. aureus* an MIC of 0.5 g/mL, *E. faecalis* 0.25 g/mL, *E. coli* and *K. pneumoniae* of 0.125 g/mL, and for *C. albicans* 100 μ L/mL and *C. krusei* 50 μ L/mL. For its part, the species *E. robustus* presented inhibition with a MIC of 0.125 g/mL against: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and for *C. albicans* 50 μ L/mL and *C. krusei* 10 μ L/mL. **Conclusion:** the essential oils of *E. globulus* and *E. robustus* showed significant antimicrobial activity.

Keywords: Myrtaceace, *E. globulus*, *E. robustus*, essential oils, antimicrobial activity.

RESUMO

Caracterización química e atividade antimicrobiana dos componentes voláteis de *Eucalyptus* de duas espécies da Venezuela

Objetivo: esta pesquisa descreve a caracterização química qualitativa-quantitativa e avaliação antimicrobiana de óleos essenciais (EA) presentes nas folhas de duas espécies de eucalipto, que foram coletadas no estado de Mérida na República Bolivariana da Venezuela. **Métodos:** a extração dos OEs foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando a armadilha de Clevenger. A composição química foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em disco de ágar contra as cepas de referência internacional *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) e *Candida krusei* (ATCC 6258). **Resultados:** os principais compostos para a espécie *Eucalyptus globulus* foram: 1,8-cineol (43,36%), limoneno (15,86%), β -pineno (14,61%), α -pineno (9,32%) e para *Eucalyptus robustus* α -pineno (37,61%), *p*-cimeno (11,09%), α -felandreno (9,92%), β -pineno (6,96%), 1,8-cineol (5,79%). O OE de *E. globulus* inibiu o desenvolvimento de *S. aureus* uma CIM de 0,5 g/mL, *E. faecalis* 0,25 g/mL, *E. coli* e *K. pneumoniae* de 0,125 g/mL, e para *C. albicans* 100 μ L/mL e *C. krusei* 50 μ L/mL. Por sua vez, a espécie *E. robustus* apresentou inibição com CIM de 0,125 g/mL contra: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e para *C. albicans* 50 μ L/mL e *C. krusei* 10 μ L/mL. **Conclusão:** os óleos essenciais de *E. globulus* e *E. robustus* apresentaram atividade antimicrobiana significativa.

Palavras-Chave: Myrtaceace, *E. globulus*, *E. robustus*, óleo essencial, atividade antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

La familia Myrtaceae se compone de aproximadamente de 130 géneros y unas 5000 especies, los cuales son árboles y arbustos tropicales, siendo los principales centros de distribución las zonas tropicales de América y Asia, junto con Australia. Uno de los géneros más conocidos es el *Eucalyptus* L'Hér., el cual es muy abundante con cerca de 700 especies, casi todas nativas de Australia, muchas de ellas ricas en aceite esencial con alto contenido de eucaliptol (líquido miscible con alcohol), el cual se utiliza en la medicina popular como analgésico, antiinflamatorio y antipirético [1, 2].

Entre las especies del género *Eucalyptus* L'Hér., se encuentra *E. globulus* Labill., siendo una especie arbórea originaria del suroeste de Australia y Tasmania, su rápido crecimiento le ha dado lugar al aprovechamiento industrial [3]; y el *E. robustus* Sm., la cual es una especie que se adapta a una extensa variedad de climas y ha sido introducida en muchos climas tropicales, subtropicales y templados cálidos, incluyendo Venezuela [4]. Estas dos especies se les atribuyen diversas propiedades, entre las cuales destaca: efectos antirreumático, antiséptico, analgésico, antidiarreico, antifúngico y antibacteriano [5, 6].

Las dos especies de *Eucalyptus*, están fundamentalmente constituidas por el denominado aceite de eucalipto, el cual se caracteriza por ser volátil, destilado a partir de las hojas frescas, es un líquido incoloro o ligeramente amarillento que tiene propiedades aromáticas muy características. El componente principal del aceite de eucalipto es el eucaliptol (1,8-cineol), así mismo está constituido por pequeñas cantidades de aldehídos volátiles, terpenos, sesquiterpenos, aldehídos aromáticos, alcoholes y fenoles [7-10].

Por su parte, el eucaliptol tiene propiedades antisépticas particularmente de las vías respiratorias y urinarias, antipirético, balsámico y estimulante [11]. Es importante destacar, que los aceites esenciales cumplen una labor fundamental en las plantas, estos compuestos han sido creados en el laboratorio químico de la naturaleza para proteger y prolongar la vida de las plantas, ya que a menudo constituyen un medio de defensa frente a depredadores, actuando como repelentes de insectos, bacterias, hongos y animales herbívoros, previniendo así la destrucción de las flores y hojas; otras veces, las esencias de las flores y del polen actúan como hormonas de polinización, atrayendo a las abejas y a otros insectos, con lo cual ayudan en la fertilización cruzada de ciertas plantas [12].

Por lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se plateó un estudio comparativo de los componentes volátiles de las especies *E. robustus* Sm., y *E. globulus* Labill., pertenecientes a la familia botánica Myrtaceae en Mérida-Venezuela, asimismo se determinó la actividad antimicrobiana de dichas especies frente a microorganismos patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia vegetal e identificación botánica

Las hojas de las especies *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm., (Myrtaceae) fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Luis Ruiz Terán”, Universidad de Los Andes, Mérida – Venezuela. La muestra estuvo integrada por la recolección de un (1) kilo de hojas frescas de las especies vegetales para la extracción de los aceites esenciales y los ensayos de actividad antimicrobiana. La determinación botánica la realizó el Ing. Juan Carmona y un voucher de cada mues-

tra fue depositado bajo el número 01, en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

Extracción de los aceites esenciales

Para la extracción de los aceites esenciales de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm., las hojas frescas (1,0 Kg) se separaron del resto del material vegetal y se licuaron con agua, con la finalidad de romper las células que contienen el aceite aromático. Las preparaciones se sometieron a ebullición mediante el método de hidrodestilación, utilizando la trampa de Clevenger. El proceso se realizó durante 3 horas, hasta obtener un aceite esencial de color característico de cada especie vegetal. Los aceites obtenidos se trasladaron a un envase ámbar y se les adicionó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminarle la humedad. Fueron guardados a baja temperatura de 4-6 °C, tomando la precaución de protegerlos de la luz y de la presencia de oxígeno, debido a que estos factores alteran la composición de las esencias oxidando los dobles enlaces y cambiando la configuración de algunos componentes [13].

Determinación de compuestos químicos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Las esencias obtenidas fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 6898, con columna de fenil-metil-polixilosano de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro (HP-5 MS) y equipado con un detector de masa marca Hewlett-Packard modelo 5973. La identificación de los componentes se realizó usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición [14]. Para el análisis se preparó una solución de 20 μL de cada aceite en 1 mL de éter dietílico. De cada muestra se inyectó 1,0 mL, para su análisis el tiempo fue de 50 min y se utilizó helio como gas portador, ajustado a una velocidad lineal de 0,8 mL/min. El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: iniciándose en 60 °C durante cero (0) minutos, luego se incrementó a razón de 4 °C/min hasta 260 °C. El inyector se mantuvo a 200 °C. La relación de reparto fue de 1:100.

Cálculo de los Índices de Kováts

El cálculo de los índices de Kováts se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosysten. Se compararon los tiempos de retención de los componentes de cada aceite esencial con una serie de *n*-parafinas ($\text{C}_7\text{-C}_{22}$) [15]. Los valores obtenidos se compararon con los valores publicados en la literatura [16, 17].

Determinación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó la técnica de difusión en agar con discos, llamada también método de Kirby-Bauer, empleando bacterias y levaduras de

referencia internacional: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) y *Candida krusei* (ATCC 6258) de acuerdo a la siguiente metodología:

Preparación de las placas: Para las bacterias se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri [18] y para las levaduras 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) [19]. Luego las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Preparación de los discos: Se emplearon discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm diámetro, los cuales se organizaron en una placa de Petri y se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda la noche previa al ensayo. Posteriormente fueron impregnados con 10 µL de cada aceite por separado y de igual modo se impregnaron discos con el solvente utilizado (dimetil-sulfóxido DMSO puro al 99,9%), como control negativo.

Preparación del inóculo microbiano: Cada inóculo bacteriano se preparó en solución salina fisiológica (SSF) estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, y las levaduras en agar Sabouraud dextrosa con antibiótico control para cada cepa, hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de McFarland N° 1 (3×10^8 UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias).

Inoculación: En el caso de las cepas bacterianas, una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar con un aplicador estéril. Para las levaduras una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se suspendió 1 mL del mismo en 20 mL de agar Müeller-Hinton modificado, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de petri una vez solidificado el agar y seco el inóculo. Se colocaron los discos de papel de filtro, previamente impregnados con los aceites y con el control negativo sobre la superficie del agar inoculado. Asimismo, el disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo según el microorganismo [20].

Incubación: Después de haber colocado los discos en las placas con agar Müeller-Hinton éstas se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos (Pre-incubación); luego se incubó a 37 °C por 24 horas en posición invertida, en atmósfera aeróbica.

Lectura de los ensayos: Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas. La medición de los diámetros de inhibición alrededor de los discos impregnados con los aceites, son producto de la acción antimicrobiana y se expresaron en milímetros

para luego realizar su comparación con las tablas de referencia permitiendo calificar a la cepa como resistente, intermedia o susceptible a los aceites empleados. Se ha reportado que cepas Gram positivas susceptibles a aceites esenciales de especies del género *Eucalyptus* L'Hér., el diámetro del halo de inhibición oscila entre 15 y 85 mm y de las bacterias Gram negativas de $26,0 \pm 0,00$ mm [21, 22].

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible [18]. Este método consiste en enfrentar a las cepas de referencia a diferentes concentraciones de las muestras [23]. La cual se realizó preparando diluciones de los aceites esenciales con DMSO, y se impregnaron discos con 10 μ L de cada dilución, para luego ser evaluados por el método de difusión en agar con discos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de los aceites esenciales de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm.

En la extracción del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* Labill., se obtuvo 2 mL de aceite a partir de 148,44 g de hojas (rendimiento 1,35 %). En cuanto a la identificación de los compuestos volátiles, el cromatograma reportó 14 compuestos, los cuales representan el 99,99 % del total del aceite extraído. Siendo los mayoritarios: 1,8-cineol (43,36 %), el limoneno (15,86 %), el β -pineno (14,61 %), y el α -pineno (9,32 %) (Tabla 1). Con respecto al aceite esencial del *Eucalyptus robustus* Sm., se obtuvo 3,5 mL de aceite a partir de 414,60 g de las hojas (rendimiento 0,84 %). En cuanto a la identificación de los compuestos volátiles, el cromatograma reportó 20 compuestos, los cuales representan el 98,76 % del total del aceite extraído. Siendo los mayoritarios: α -pineno (37,61 %), *p*-cimeno (11,09 %), α -fellandreno (9,92 %), β -pineno (6,96 %), α -terpineol (6,21 %), y al igual que el *E. globulus* Labill., presentó el limoneno (6,08 %), y el 1,8-cineol (5,79 %), aunque en menor proporción (Tabla 2).

Tabla 1. Componentes del aceite esencial de las hojas de *E. globulus* Labill.

| Picos | Componentes | TR (min) | Área (%) | IKcal | IKtab |
|-------|------------------|----------|----------|-------|-------|
| 1 | α -pineno | 5,43 | 9,32 | 931 | 932 |
| 2 | Canfeno | 5,78 | 0,71 | 944 | 946 |
| 3 | β -pineno | 6,45 | 14,61 | 967 | 974 |
| 4 | β -mirceno | 6,72 | 0,77 | 975 | 988 |

(Continúa)

| Picos | Componentes | TR (min) | Área (%) | IKcal | IKtab |
|-------|---------------------|----------|----------|-------|-------|
| 5 | Limoneno | 7,80 | 15,86 | 1010 | 1024 |
| 6 | 1,8-cineol | 7,92 | 43,36 | 1016 | 1026 |
| 7 | Terpinoleno | 9,52 | 0,90 | 1082 | 1086 |
| 8 | Endofenchol | 10,31 | 0,67 | 1111 | 1114 |
| 9 | Borneol | 11,98 | 0,87 | 1166 | 1165 |
| 10 | 4-terpineol | 12,34 | 1,31 | 1176 | 1185 |
| 11 | α -terpineol | 12,77 | 4,90 | 1189 | 1186 |
| 12 | Aromadendreno | 20,72 | 1,95 | 1444 | 1439 |
| 13 | Espatulenol | 25,06 | 3,68 | 1582 | 1579 |
| 14 | Viridiflorol | 25,28 | 1,08 | 1588 | 1592 |

TR: Tiempo de Retención, IKcal: Índice de Kováts calculado, IKtab: Índice de Kovats referencial.

Los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico coincide con el reportado por González-Guñez *et al.* [24] en la publicación titulada: Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (Myrtaceae) para el control de *Sitophilus zeamais* motschulsky, donde se evidencia el efecto repelente del aceite esencial de dichas especies, y en el análisis fitoquímicos indicaron que los mayores constituyentes del aceite esencial de ambas especies son 1,8-cineol (eucaliptol) (55,49 % en *E. globulus* y 59,85 % en *E. nitens*) y α -pineno (18,18 % en *E. globulus* y 18,36 % en *E. nitens*). No existe una correlación entre la concentración de 1,8 cineol y α -pineno y el efecto repelente, lo que indica que estos compuestos no actúan de forma aislada sino que en conjunto con otros presentes en el aceite esencial, como citronelal, citronelol, citronelil de etilo, *p*-cimeno, eucamalol, limoneno, linalool, α -pineno, γ -terpineno, α -terpineol, alloocimeno y aromadendreno, de los cuales la mayoría se encuentran presentes en la muestras estudiadas.

Tabla 2. Componentes del aceite esencial de las hojas de *E. robustus* Sm.

| Picos | Componentes | TR (min) | Área (%) | IKcal | IKtab |
|-------|-----------------------|----------|----------|-------|-------|
| 1 | α -pineno | 5,45 | 37,61 | 932 | 932 |
| 2 | β -pineno | 6,45 | 6,96 | 966 | 974 |
| 3 | β -mirceno | 6,73 | 0,99 | 975 | 988 |
| 4 | α -fellandreno | 7,12 | 9,92 | 987 | 1002 |
| 5 | <i>p</i> -cimeno | 7,67 | 11,09 | 1004 | 1020 |
| 6 | Limoneno | 7,78 | 6,08 | 1009 | 1024 |

(Continúa)

Tabla 2. (Continúa)

| Picos | Componentes | TR (min) | Área (%) | IKcal | IKtab |
|-------|---------------------|----------|----------|-------|-------|
| 7 | 1,8-cineol | 7,88 | 5,79 | 1014 | 1026 |
| 8 | α -terpineno | 8,63 | 1,26 | 1047 | 1054 |
| 9 | Terpinoleno | 9,53 | 1,28 | 1083 | 1086 |
| 10 | Endofenchol | 10,31 | 0,65 | 1111 | 1114 |
| 11 | Borneol | 11,98 | 0,80 | 1166 | 1165 |
| 12 | Terpinen-4-ol | 12,34 | 2,17 | 1176 | 1174 |
| 13 | α -terpineol | 12,77 | 6,21 | 1189 | 1186 |
| 14 | Piperitona | 14,85 | 1,01 | 1258 | 1249 |
| 15 | Aromadendreno | 20,72 | 0,84 | 1444 | 1439 |
| 16 | Biciclogermacreno | 22,47 | 0,68 | 1503 | 1500 |
| 17 | Espathulenol | 24,86 | 0,70 | 1576 | 1579 |
| 18 | γ -gurjuneno | 25,05 | 3,34 | 1582 | 1475 |
| 19 | Viridiflorol | 25,27 | 0,78 | 1588 | 1592 |
| 20 | α -eudesmol | 27,00 | 0,60 | 1653 | 1630 |

TR: Tiempo de Retención, IKcal: Índice de Kováts calculado, IKtab: Índice de Kovats referencial.

Asimismo, los datos obtenidos no guardan mucha diferencia con los reportados por Yáñez *et al.* [25] a los aceites esenciales de las hojas de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, de Colombia, que fueron obtenidos por hidrodestilación y analizados por la técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (GCAR) se identificaron doce componentes mayoritarios: 1,8-cineol o eucaliptol (77-82 %), α -pineno, limoneno, α -terpineno, α -copaeno, guaiol, α -felandreno, β -terpinen-4-ol, linalol, α -terpineol, mirceno y β -selineno.

Además, la presente investigación se correlaciona con los resultados aportado por Jinbiao *et al.* [26], donde el número de componentes identificados y principales en aceites esenciales de diferentes especies de eucaliptos presentan el 1,8-cineol. Los principales componentes son monoterpenos (1,8-cineol, *p*-cimeno, citronelal, citronelol, limoneno, α -fellandreno, β -fellandreno, α -pineno, β -pineno, terpinoleno, α -terpineol, y α -tujeno) y sesquiterpenos (β -cariofileno, β -eudesmol, globulol, espatulenol y viridiflorol). El perfil químico y los componentes principales de los aceites de hojas de eucalipto varían significativamente entre las especies. Esta diferencia se ha observado incluso entre los árboles de la misma especie en diferentes períodos, sitios, método y tiempo de extracción.

Finalmente, se ha reportado que los metabolitos secundarios volátiles identificados en los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, empleando las diferentes técni-

cas de extracción, cambiaron ligeramente en sus respectivas concentraciones. La variabilidad en los porcentajes de los componentes químicos, pudo estar influenciado por diversos factores, tales como, la técnica de extracción (arrastre con vapor o hidrodestilación asistida por microondas), el tratamiento de la hoja (fresca o seca), las condiciones del suelo y la edad de la planta, así como por cambios de tipo genético [27].

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm.

Los resultados obtenidos de la actividad de los aceites esenciales de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm., fueron reportados en la Tabla 3, donde se observa resultados positivos significativos frente a todas las cepas ensayadas como: bacterias Gram positivas *S. aureus* (ATCC 25922) con halos de 26 y 23 mm (*E. globulus* y *E. robustus*), y *E. faecalis* (ATCC 19433) con 25 y 18 mm de diámetro respectivamente. Bacterias Gram negativas *E. coli* (ATCC 25922) (21 y 20 mm *E. globulus* y *E. robustus*) y *K. pneumoniae* (ATCC 23357) (15 y 19 mm *E. globulus* y *E. robustus*). Asimismo, las levaduras como *C. albicans* (CDC B-385) y *C. krusei* (ATCC 6258) con 8, 8 y 7, 8 mm (*E. globulus* y *E. robustus*) respectivamente.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm.

| Microorganismos | Zona de Inhibición (mm)* | | | | | | | |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Aceite <i>E. globulus</i> | Aceite <i>E. robustus</i> | Control Positivo | | | | | |
| | | | ERT | AMK | AMP | AMK | FLU | VON |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 | 26* | 23* | 27* | | | | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 | 25* | 18* | | 26* | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 21* | 20* | | | 23* | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 | 15* | 19* | | | | 21* | | |
| <i>Candida albicans</i> CDC B-385 | 8* | 8* | | | | | 10* | |
| <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 | 7* | 8* | | | | | | 14* |

Controles positivos: ERT: Eritromicina® (10mg), AMK: Amikacina® (30 mg), AMP: Ampicilina® (10 mg), Fluconazol® (300 mg) VOR: Voriconazol® (400 mg); control negativo: Dimetil sulfóxido. *Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm, media tomada de dos ensayos consecutivos.

Asimismo, se muestra la concentración inhibitoria mínima (CIM), para ello se prepararon distintas diluciones con un rango de concentración desde 1-0,06 g/mL para el

ensayo antibacteriano y con respecto a las levaduras el rango de concentración fueron desde 500-10 mg/mL. Con respecto a la especie *E. globulus* Labill., presentó contra *S. aureus* una CIM de 0,5 g/mL, para *E. faecalis* 0,25 g/mL, para *E. coli* y *K. pneumoniae* fue de 0,125 g/mL, y para las levaduras *C. albicans* 100 µL/mL y *C. krusei* 50 µL/mL (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración Inhibitoria Mínima de la especie *E. globulus* Labill.

| Microorganismos | Zona de Inhibición (mm)* | | | | | | | | |
|--|--|----------|-----|-----------|-----|------------|----|-----------|----|
| | Aceite <i>E. globulus</i> 0,5 g/ 500 mL DMSO | | | | | | | | |
| | 1 g/mL | 0,5 g/mL | | 0,25 g/mL | | 0,125 g/mL | | 0,06 g/mL | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 | 8* | 6* | | NA | | NA | | NA | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 | 10* | 6* | | 5* | | NA | | NA | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 13* | 10* | | 8* | | 5* | | NA | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 | 7* | 7* | | 6* | | 5* | | NA | |
| | µL/mL | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 50 | 20 | 10 |
| <i>Candida albicans</i> CDC B-385 | | 9* | 8* | 8* | 7* | 6* | NA | NA | NA |
| <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 | | 14* | 12* | 11* | 11* | 8* | 7* | NA | NA |

NA: no activo.

Por su parte, la especie *E. robustus* Sm., presentó contra *S. aureus* una CIM de 0,125 g/mL, para las bacterias Gram positivas y Gram negativas y para las levaduras *C. albicans* 50 µL/mL y *C. krusei* 10 µL/mL (Tabla 5). Estos resultados son comparables a los reportados en la literatura, donde el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) presenta propiedades antibacterianas para bacterias Gram negativas *E. coli* y Gram positivas *S. aureus* [28]. De igual forma se ha reportado que las especies en estudio poseen actividad antibacteriana, antifungal, entre otras actividades biológicas [26].

Recientemente, se ha reportado la eficacia antibacteriana del aceite esencial de *E. globulus* para usarlo con fines industriales, ya que tiene actividad frente a bacterias Gram positivas y algunas levaduras [21], razón de ser compuesto en un gran porcentaje por eucalipto que se presume es el responsable de esta actividad [29, 30]. En resumen, los AE presentan su acción antibacteriana de acuerdo a diversos mecanismos que son dependientes del tipo de microorganismo. Estos mecanismos están principalmente asociados a los cambios en los canales de iones como el sodio, potasio y calcio, que

Tabla 5. Concentración Inhibitoria Mínima de la especie *E. robustus* Sm.

| Microorganismos | Zona de Inhibición (mm)* | | | | | | | | |
|--|--|----------|-----|-----------|-----|------------|----|-----------|----|
| | Aceite <i>E. robustus</i> 0,5 g/ 500 mL DMSO | | | | | | | | |
| | 1 g/mL | 0,5 g/mL | | 0,25 g/mL | | 0,125 g/mL | | 0,06 g/mL | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 | 19* | 15* | | 11* | | 10* | | NA | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 | 8* | 8* | | 7* | | 6* | | NA | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 12* | 10* | | 8* | | 6* | | NA | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 | 10* | 8* | | 8* | | 7* | | NA | |
| | μL/mL | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 50 | 20 | 10 |
| <i>Candida albicans</i> CDC B-385 | | 9* | 8* | 7* | 7* | 7* | 7* | NA | NA |
| <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 | | 14* | 13* | 11* | 11* | 10* | 8* | 7* | 7* |

NA: no activo.

aumentan la permeabilidad de la membrana bacteriana y propician su ruptura, con la consecuente liberación de sus constituyentes intracelulares [31].

Por lo tanto, la actividad bactericida y antifúngica de especies de *Eucalyptus* spp., está estrechamente relacionada con los fenoles y monoterpenos que poseen, debido a que son capaces de tener una interacción directa con el citoplasma del patógeno o bien, gracias a su hidrofobicidad, pueden incorporarse a los lípidos de la membrana celular bacteriana, en donde ocurre una fuga de iones y otros compuestos del microorganismo [32].

CONCLUSIONES

A partir de este estudio, se puede concluir que el AE obtenido de las hojas de *E. globulus* Labill., los componentes químicos mayoritarios encontrados por análisis fitoquímico, fueron: 1,8-cineol (43,36 %), limoneno (15,86 %), β -pineno (14,61 %), y α -pineno (9,32 %). Por su parte el AE de las hojas de *E. robustus* Sm., fueron: α -pineno (37,61 %), *p*-cimeno (11,09 %), α -fellandreno (9,92 %), β -pineno (6,96 %), α -terpenol (6,21%), limoneno (6,08 %), y 1,8- cineol (5,79 %). Tanto los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. robustus* mostraron actividad contra las bacterias de cepas ATCC: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Finalmente, todas las diluciones ensayadas en los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. robustus* mostraron actividad contra cepas CDC 385 de *Candida albicans*, obteniéndose para las mismas una CIM de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con un halo de inhibición de 6 mm de diámetro y 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con un halo de inhibición de 7 mm de diámetro respectivamente. Y contra cepas ATCC 6258 de *Candida Krusei* obteniéndose para *E. globulus* una CIM de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con halo de inhibición de 7 mm, y para *E. robustus* una CIM de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con halo de inhibición de 6 mm de diámetro. Estos resultados son interpretados como actividad significativa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Universidad de Los Andes) y en especial al Dr. Luis Rojas (QEPD) por el análisis de los resultados cromatográficos gases-masa.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. J. Silva, W. Abebe, S. Sousa, V. Duarte, M. Machado, F. Matos, Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*, *Journal of Ethnopharmacology*, **89**(2), 277 (2003).
2. D. Granados-Sánchez, G.F. López-Ríos, Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*, *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, **13**(2), 143-156 (2007).
3. S.S.S Gomes, A.H.C. Bittencourt, Estudo e avaliação da ação antibacteriana de *Eucalyptus globulus* L. e *Allium sativum* L. sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, *SAPIENS-Revista de divulgação Científica*, **1**(2), 19 (2019).
4. E.L. Barnard, Occurrence, impact, and fungicidal control of girdling stem cankers caused by *Cylindrocladium scoparium* on eucalyptus seedlings in a south Florida nursery (*Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus robustus*, benomyl, *Chlorothalonia*, copper hydroxide), *Plant Disease*, **68**(6), 471-473 (1984).

5. D.A. Amaya, *Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Eucalyptus globulus "eucalipto", sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923 comparado con oxacilina*, tesis de grado, Universidad César Vallejo, Perú, 2018.
6. M.B. Vignola, M. Serra, A.E. Andreatta, Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos, *Revista Tecnología y Ciencia*, **18**(37), 92-100 (2020).
7. V.R. Preedy, *Essential oils in food preservation, flavor and safety*, Elsevier, 2016.
8. C.I. Viturro, Volatile components of *Eucalyptus globulus* Labill. Ssp., bicostata from Jujuy, Argentina, *Journal of Essential Oil Research*, **15**, 206-208 (2003).
9. N.A. Trivedi, S.C. Hotchandani, A study of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus*, *Indian Journal of Pharmacology*, **32**, 93-95 (2004).
10. B. Damjanović-Vratnica, T. Tatjana-Dakov, D. Suković, J. Damjanović, Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill, *Food Science*, **29**(3), 277-284 (2011).
11. Q.M. Guo, X.W. Yang. Cypellocarpin C and other compounds from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill, *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**(6), 543-545 (2006).
12. F.E. Argote-Vega, Z.J. Suarez-Montenegro, M.E. Tobar-Delgado, J.A. Pérez-Álvarez, A.M. Hurtado-Benavides, J. Delgado-Ospina, Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, **15**(2), 52-60 (2017).
13. G.R. Takeoka, M. Guentert, S.L. Smith, W. Jennings, Changes in aroma concentrates during storage, en: *Biogenesis of aromas*, T.H. Parliament, R. Croteau (editors), Washington D. C., 1986, p. 65.
14. P. Sandra, C. Bicchi, *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, Heidelberg: Huethig, 1987.
15. E. Kováts, Retentinsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone, *Helvetica Chimica Acta*, **XLI**, 1915 (1958).
16. R. Adams, *Identificación de compuestos de aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas*, 4ª edición, Illinois, 2007, 1-804 p.

17. N.W. Davies, Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases, *Journal of Chromatography*, **503**, 1-24 (1990).
18. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed., CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2018, pp. 1-15.
19. NCCLS, *Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline*, NCCLS document EP5-A2, 2nd ed., Wayne, Pennsylvania, 2004.
20. J. Velasco, J. Rojas, P. Salazar, M. Rodríguez, T. Díaz, A. Morales, M. Rondón, Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin, *Natural Product Communication*, **2**(1), 85-88 (2007).
21. M. Boukhatem, A. Boumaiza, H. Nada, M. Rajabi, S. Mousa, *Eucalyptus globulus* essential oil as a natural food preservative: Antioxidant, antibacterial and antifungal properties in vitro and in a real food matrix (Orangina fruit juice), *Applied Science*, **10**(16) 5581 (2020).
22. H. Tolba, H. Moghrani, A. Aboun, R. Maachi, Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antimicrobial activity, *Nature & Technology Journal, Vol. B: Agronomic and Biological Sciences*, **18**, 19-27 (2018).
23. L. Araujo-Baptista¹, K. Vimos-Sisa, R. Cruz-Tenempaguay, F. Falconí-Ontaneda, L. Rojas-Fermín, A. González-Romero, Componentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) que crece en Ecuador, *Acta Biológica Colombiana*, **25**(1), 22-28 (2020).
24. R. González-Guñez, G. Silva-Aguayo, A. Urbina-Parra, M. Gerding- González, Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (Myrtaceae) para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Chilean Journal of Agriculture and Animal Science, ex Agro-Ciencia*, **32**(3), 110-116 (2016).
25. R.X. Yáñez, M.O. Cuadro, Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia), *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, **10**(1), 52-61 (2012).

26. Z. Jinbiao, A. Min, W. Hanwen, S. Rex, L. Deirdre, Chemistry and bioactivity of *Eucalyptus* essential oils, *Allelopathy Journal*, **25**(2), 313-330 (2010).
27. H. Ghelichnia, Essential oil composition of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger at different growing altitudes in Mazandaran, Iran, *Cercetari Agronomice în Moldova*, **51**(2), 75- 83 (2018).
28. N. Morocho, *Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus spp.) sobre cepas certificadas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus*, tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, 2018.
29. C.M. Zamora-Ramírez, C.J. Toro-Huamanchumo, Actividad antibiótica del *Eucalyptus globulus* frente a bacterias Gram positivas: un artículo de revisión, *Revista Médica Vallejana*, **10**(2) 93-104 (2021).
30. M.G. Hualca, I.S. Meregildo, *Actividad antibacteriana del aceite esencial de Eucalyptus globulus (eucalipto) sobre Staphylococcus aureus*, tesis de grado, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Roosevelt, Huancayo-Perú, 2021.
31. M. Sánchez, J. Araujo, Actividad antibacteriana de un gel experimental de *Eucalyptus globulus* Labill frente a *Porphyromonas gingivalis*, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, **40**(2) e1104 (2021).
32. M. Montero-Recalde, M.J. Morocho-Núñez, D. Avilés-Esquivel, Á. Carrasco-Cando, R. Erazo-Gutiérrez, Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, **30**(2) 932-938 (2019).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

S. Villarreal-Rivas, L. Rojas-Fermin, R. Lárez, M. Torres, C. Díaz, M. Lucena de Ustáriz, J. Carmona, Caracterización química y actividad antimicrobiana de los componentes volátiles de *Eucalyptus* de dos especies de Venezuela. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(1), 91-106 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109361>