UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE QUÍMICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS
LABORATORIO DE FARMACOTECNIA ANTIMICROBIANA

Unidad de Investigación II para optar al
Título de Químico Farmacéutico

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *HAPLOPAPPUS SP.* (ASTERACEAE) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE INTERÉS CLÍNICO

ARACELI ANDREA MELLA MUÑOZ

Directora: Dra. WALESKA E. VERA QUEZADA

Co-directora: Dra. TANIA F. BAHAMÓNDEZ CAÑAS

AGOSTO, 2022

DEDICATORIA

A mi madre, Flor Muñoz, que con su amor, cariño y paciencia guía mi caminar y por luchar todos los días para ser el mejor ejemplo de humildad y dedicación. A mi hermana y amiga, Melany Mella, por apoyarme en mi formación profesional y acompañarme en todos los momentos especiales de mi vida.

A mi profesora Dra. Waleska Vera, por participar en esta gran etapa de mi vida y brindarme las facilidades para ejecutar esta unidad de investigación. A la Dra. Tania Bahamóndez, por su apoyo y participación en este trabajo.

A mis profesores de mi casa de estudios, por sus enseñanzas compartidas en mi desarrollo profesional.

A mis amigos, Cecilia Pacheco, René Pérez e Isidora Valenzuela, por ofrecerme siempre su apoyo incondicional, cariño, respeto y comprensión que me empuja a seguir adelante en cada etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su paciencia y ayuda que siempre me brindó desinteresadamente en todo momento para lograr mis metas personales y profesionales.

A mi directora de tesis, Dra. Waleska Vera por su apoyo y guía en las improvistas circunstancias del desarrollo de este trabajo. A mi co-directora, Dra. Tania Bahamóndez por sus enseñanzas y participación en todo este proceso.

A la Dra. Jessica Bravo, por su aporte y conocimiento transmitido durante la pasantía desarrollada, ayudando en la elaboración final de la unidad de investigación. A María José Sánchez por su apoyo y ayuda.

Al equipo del Laboratorio de Farmacotecnia Antimicrobiana, por su importante aporte y participación en la ejecución de este proyecto.

RESUMEN

Haplopappus sp. es un arbusto de género americano que crece en las provincias del norte de Chile y regiones próximas a Argentina, conocido popularmente con el nombre de "bailahuén". *Haplopappus sp.* es utilizado por sus propiedades medicinales para afecciones digestivas y de hígado, también como antioxidante, citoprotector e inmunomodulador. Por lo que el objetivo general de esta unidad de investigación fue evaluar la relación entre el quimiotipo y la bioactividad antibacterial del aceite esencial de bailahuén. El aceite esencial se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor y su caracterización se efectuó por análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron 25 metabolitos secundarios, de los cuales el 54% de abundancia relativa corresponde a sesquiterpenos. La evaluación de la actividad antimicrobiana fue realizada utilizando cuatro métodos: difusión en agar, microdilución en placa, conteo de colonias y prevención de la formación de biopelículas en diferentes cepas (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus y L. monocytogenes*). La evaluación de la actividad antimicrobiana refleja un fuerte efecto inhibitorio (>20 mm) sobre las cuatro cepas, una CMI de 8 ,64 y 64 µg/mL en *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus y L. monocytogenes*, respectivamente, indicando que el aceite esencial podría tener selectividad frente a cepas Gram-positivas. Se determinó individualmente la CMI en *S. aureus* resultando en un 2,5%, confirmado por el recuento de células viables y prevención de formación de biopelículas. Estos resultados demuestran que el aceite esencial de *Haplopappus sp*. tiene propiedades antimicrobianas, propiedad proporcionada mayormente por los terpenos presentes en su quimiotipo, por lo que se podría potenciar su uso contra otras cepas bacterianas de interés clínico.

ABSTRACT

Haplopappus sp. is an American shrub genus that grows in northern provinces of Chile and near Argentina, commonly known as “bailahuen”. *Haplopappus sp.* is used for its medicinal properties to treat digestive and liver illness, but also as antioxidant, cytoprotective, and immunomodulatory effects. Therefore, the general aim of this research was to evaluate the relation between the chemotype and the antimicrobial properties of bailahuén essential oil. The essential oil was obtained by steam distillation, characterized by gas chromatography with mass spectroscopy. Twenty-five secondary metabolites were identified, of which 54% of their relative abundance corresponds to sesquiterpenes. The evaluation of antimicrobial activity was evaluated using four methods: agar diffusion, broth microdilution, bacterial colony counting and prevention of biofilm formation in different bacteria strains (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus and L. monocytogenes*). The evaluation of the antimicrobial activity reflects a strong inhibitory effect (>20 mm) on the four bacteria strains, MIC of 8, 64, and 64 µg/mL in *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively, indicating that the essential oil could have selectivity against Gram-positive strains. The MIC was determined individually in *S. aureus* resulting in 2,5%, confirmed by bacterial colony counting and prevention of biofilm formation. These results demonstrate that the essential oil of *Haplopappus sp.* has antimicrobial properties, provided mainly by the terpenes present in the chemotype, so its use against other bacterial strains of clinical interest could be enhanced.

ABREVIACIONES

°C: Grados Celsius

^{1}H NMR: Resonancia magnética nuclear de protón

µg: microgramos

µg/µL: microgramos/microlitros

µL: microlitros

AE: Aceite esencial

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

E. coli: *Escherichia coli*

Espectroscopía IR: Espectroscopía infrarroja

FT-IR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

g: Gramos

GC-MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

h: Horas

IK_{cal}: Índice de Kovats calculado

IK_{lit}: Índice de Kovats reportado en literatura

IKNR: Índice de Kovats no reportado

IKs: Índice de Kovats

Kg: Kilogramos

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

MH: Mueller-Hinton

mL: Mililitro

mm: Milímetros

NI: Compuesto no identificado

nm: Nanómetros

***P. aeruginosa*:** *Pseudomonas aeruginosa*

rpm: Revolución por minuto

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

TIC: Total Ion Current

TLC: Cromatografía de capa fina

T_R: Tiempo de retención

UFC: Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN……..1

1.1 Uso tradicional del género *Haplopappus* .……..……1

1.2 Compuestos de interés en *Haplopappus spp.* ……3

1.3 Aceite esencial de *Haplopappus spp.* ……..……4

2. OBJETIVOS ..…….……..7

2.1 Objetivo general ..……7

2.2 Objetivos específicos ..……..……..7

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA ..……..……8

3.1 Material vegetal ….……..8

3.2 Identificación botánica por histología de *Haplopappus sp*……..……..……8

3.3 Obtención del aceite esencial de *Haplopappus sp*…….……9

3.4 Caracterización física del aceite esencial de *Haplopappus sp*……...…..10

3.4.I. Características organolépticas……..……10

3.4.II. Índice de refracción……...……10

3.5 Caracterización del aceite esencial mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR)…….……11

3.6 Caracterización química del aceite esencial mediante GC-MS……..11

3.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp*…….……12

3.7.A.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo (UDP)…….……12

3.7.A.2 Actividad antimicrobiana en ensayos de difusión en agar (UDP).…….....12

3.7.A.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) (UDP) ..…..13

3.7.B.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo (UV)...……..14

3.7.B.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) del cloranfenicol como control positivo (UV)……14

3.7.B.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (UV)…….…….……15

3.7.B.4 Conteo de colonias viables *S. aureus* (UV)…….……..…..16

3.7.B.5 Prevención de la formación de biopelículas *S. aureus* (UV)……..……17

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….…… 18

4.1 Identificación botánica por histología del bailahuén……..18

4.2 Obtención del aceite esencial de *Haplopappus sp*……...19

4.3 Caracterización física del aceite esencial de *Haplopappus sp*…….……..19

4.3.I. Características organolépticas……...……..19

4.3.II. Índice de refracción…….……..20

4.4 Caracterización del aceite esencial mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR) ……..…….21

4.5 Caracterización química del aceite esencial mediante GC-MS…..……..…22

4.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp*. en ensayos de difusión en agar (UDP)……29

4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Haplopappus sp.* (UDP) …….……..31

4.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Haplopappus sp*. en *S. aureus*. (UV)……..31

4.9 Conteo de colonias viables *S. aureus.* (UV)……..……34

4.10 Prevención de la formación de biopelículas *S. aureus* (UV)……..35

4.11 Relación entre el quimiotipo del aceite esencial de *Haplopappus sp.* y su actividad antimicrobiana……36

5. CONCLUSIÓN…….……37

6. BIBLIOGRAFÍA……38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica *de Haplopappus spp*. en Chile (Elaboración propia)……..2

Figura 2. *Haplopappus spp*.. A: filaria. B: flor tubulosa. C: hoja. D: planta. E: capítulo. F: flor ligulada (Dibujos Tortosa & Bartoli, 2002)……..2

Figura 3. Montaje del equipo de destilación por arrastre de vapor. Imagen adaptada de Castillo et al., (2013)…….…….9

Figura 4. Método de microdilución en caldo de cloranfenicol (Elaboración propia) ...……14

Figura 5. Método de microdilución en caldo del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (Elaboración propia)……..……..15

Figura 6. Identificación botánica de *Haplopappus baylahuen* R. A(4x), B(10X) y C(40X) *Haplopappus sp*. (Bailahuén de herbolaria). D(4x), E(10X) y F(40X) *Haplopappus baylahuen* J. Remy (Bailahuén de referencia Voucher VALPL_PLV:2284)……..17

Figura 7. Espectro infrarrojo del aceite esencial de *Haplopappus sp*……..……..20

Figura 8. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Haplopappus sp*……..……...22

Figura 9. Abundancia relativa (%) del quimiotipo del aceite esencial de *Haplopappus sp*……...27

Figura 10. Metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Haplopappus sp*…….……..27

Figura 11. Ensayo de difusión en agar del aceite esencial de *Haplopappus sp.* en *S. aureus, L. monocytogenes, E. coli* y *P. aeruginosa*……..28

Figura 12. Zona de inhibición (mm) resultante del aceite esencial de *Haplopappus sp*….29

Figura 13. Efecto del cloranfenicol en *S. aureus* por microdilución en caldo.....…….32

Figura 14. Efecto del aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp.* en *S. aureus* por microdilución en caldo. ……..….32

Figura 15. Cuenta total viable (UFC/mL) de *S. aureus* tratado con aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp...*……..…….34

Figura 16. Formación de biopelículas de *S. aureus* frente al aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp*…….……..……35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ficha técnica de *H. baylahuen R*. deshidratado (Australis Herbolaria ©)……...8

Tabla 2. Características organolépticas del aceite esencial de *Haplopappus sp*……..…19

Tabla 3. Índice de refracción del aceite esencial de *Haplopappus sp*…….……19

Tabla 4. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del aceite esencial de *Haplopappus sp*……..20

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Haplopappus sp*…….……..…...23

Tabla 6. Valores de CMI para el aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp*. frente a cepas de *S. aureus, E. coli* y *P. aeruginosa* ….……31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso tradicional del género *Haplopappus.*

En múltiples culturas del mundo es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de la salud, transmitiéndose por generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos para explicar de forma racional el uso terapéutico de una planta, y que permite además su uso continuo hasta el día de hoy (Muñoz M. et al., 2004). La etnomedicina se practica como alternativa de la medicina tradicional desde tiempos antiguos, cobrando mucha relevancia en la actualidad, siendo un conjunto de técnicas y saberes que al ser transmitidos de forma tradicional se utilizan para la prevención y curación de enfermedades, basándose en el conocimiento o tradición popular de una determinada cultura (Salinas et al., 2015).

Tal es el caso de la familia Asteraceae, una de las familias más grandes, que consta de aproximadamente 1100 géneros y 25000 especies (Jansen et al., 1992). Esta familia ha contribuido en un gran número de registros a la farmacopea de diversas culturas, como México, en donde las poblaciones rurales la utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades, siendo los metabolitos secundarios los que otorgan esta característica, tales como sesquiterpenos y en especial las lactonas sesquiterpénicas, las cuales presentan propiedades químicas y biológicas. Sus propiedades biológicas varían desde la actividad antihelmíntica de la santonina (García & Loría, 1974) pasando por la inhibición de tumores cancerosos que posee la vernolepina (Lock de Ugaz, 1989). La actividad que presenta cada lactona sesquiterpénica se debe a las diferencias en el número de alquilaciones, lipofilicidad y geometría molecular de estas moléculas. También muchas especies de la familia Asteraceae son empleadas para aliviar padecimientos de posible origen microbiano (Flores & Rodríguez, 2008; Ruiz-Reyes & Suarez, 2015).

Algunas especies que forman parte de la familia Asteraceae son *Matricaria chamomilla* L. (manzanilla), *Calendula officinalis* L. (caléndula), *Bellis perennis* (margarita), *Haplopappus baylahuen* Remy, *Haplopappus remyanus*, *Haplopappus multifolius* Philippi ex Reiche y *Haplopappus foliosus*. Según lo descrito en el libro de Medicamentos herbarios tradicionales (2010) las especies de *Haplopappus* nombradas anteriormente y otras, en Chile son denominadas como un complejo “bailahuén”, ya que se comercializan en forma indistinta por presentar las mismas propiedades, diferenciándose principalmente por su composición química (Roldan et al., 2007; Heuskin et al., 2009; Muley et al., 2009; Ciler, 2009). Por tanto, desde aquí en adelante se mencionará la especie como bailahuén.

Las especies de *Haplopappus sp.* crecen en hábitats caracterizados por condiciones de alto estrés, que incluyen altos niveles de radiación, sequía, baja fertilidad del suelo y pastoreo, que limitan su regeneración natural.

Es un género exclusivamente americano y crece en regiones próximas a Argentina y provincias del norte de Chile (Roldan et al., 2007). Su distribución geográfica en Chile se extiende entre las provincias de Antofagasta, Atacama y Coquimbo (Figura 1) (Tortosa & Bartoli, 2002; González et al., 2012).

Popularmente es conocido con los nombres de “baylahuén”, “bailahuén” o “failawen” (MINSAL, 2010). Este grupo de plantas es ampliamente utilizado en todo el territorio chileno, desde las comunidades Aymara en el norte hasta las comunidades Mapuche en el sur, y en las grandes ciudades por diferentes grupos sociales. El nombre “bailahuén” deriva del idioma mapuche ‘vaifahuen’ que significa medicina para hervir (Urzúa et al., 1995).

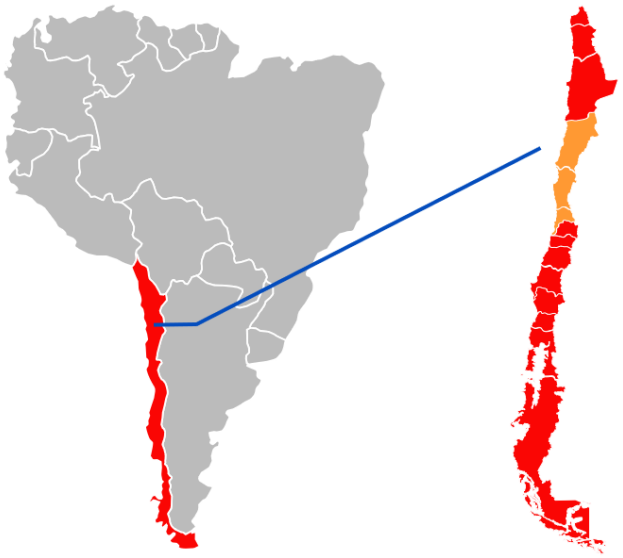


Figura 1. Distribución geográfica de *Haplopappus spp.* en Chile. En naranjo se encuentran las provincias de Antofagasta, Atacama y Coquimbo (Elaboración propia).

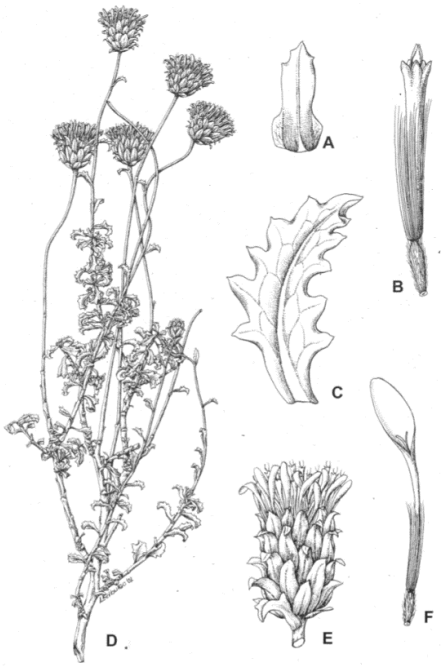


Figura 2. *Haplopappus spp..* A: filaria. B: flor tubulosa. C: hoja. D: planta. E: capítulo. F: flor ligulada (Dibujos Tortosa & Bartoli, 2002).

Bailahuén es un arbusto de 25 a 40 centímetros (cm) de altura, de estructura leñosa en la parte inferior, sin pelos, resinoso, con hojas abundantes, lisas, de márgenes dentadoespinosos, poco flexibles, de 1 a 3,5 cm de longitud por 1 a 2 cm de ancho. Además, cuenta con inflorescencia amarilla y florece desde septiembre a diciembre, con resina que despide un olor característico (MINSAL, 2010) (Figura 2).

En el territorio nacional, esta planta es citada en la comunidad Atacameña de Socaire y en la ciudad de Iquique con utilidad para reumatismo, como afrodisíaco y para el tratamiento del resfriado y la tos. La comunidad Taira también informó sobre los usos tradicionales contra infecciones hepáticas y urinarias (Ortiz et al., 2019).

La producción de bailahuén con fines medicinales proviene de la colección silvestre, generalmente solo se utilizan las partes aéreas, pero en su mayoría bailahuén es erradicada por ser considerada maleza. La sobreexplotación actual ha limitado fuertemente las poblaciones naturales de bailahuén y su antiguo uso común como planta medicinal popular en Chile (Vogel et al., 2005).

En América del Sur, el bailahuén es una planta común que se utiliza por sus propiedades medicinales que incluyen el tratamiento de enfermedades del estómago y del hígado (Elgueta et al., 2021), presentando, además, propiedades coleréticas y colagogas. Es utilizado tradicionalmente por la población local, pero también se exporta en pequeñas cantidades como digestivo en bolsitas de té (Vogel et al., 2005). Se ha reportado que los extractos e infusiones de bailahuén tienen una alta capacidad antioxidante (Elgueta et al., 2021). Además, de otras propiedades como citoprotector e inmunomodulador (Vogel et al., 2005).

Leaman et al. (2007), informan que fabricantes alemanes de fármacos homeopáticos manifiestan que los preparados de bailahuén no son de uso común. El único productor adquiere 40 kilogramos (Kg) de materia vegetal cada 10 años, lo que alcanza para elaborar un gran volumen de tintura madre. Esto explica la poca cantidad de *Haplopappus baylahuen* destinada a la homeopatía.

1.2. Compuestos de interés en *Haplopappus spp*.

Las especies producen una gran cantidad de exudados resinosos de ramas y hojas, y aunque las propiedades medicinales de bailahuén se asocian al material resinoso, se ha trabajado poco sobre la química y las actividades biológicas de estas mezclas (Torres et al., 2004). Estos exudados se utilizan en el tratamiento de heridas infectadas, para promover la cicatrización de heridas de caballo y como estimulantes digestivos (Urzúa et al., 2006).

Diferentes autores informan la detección de diversos compuestos que podrían entregar una justificación a las actividades terapéuticas más conocidas. Vogel et al. (2005) realizaron un estudio *in vitro* de la actividad antioxidante del bailahuén y otras especies de *Haplopappus*. En el estudio se indica que, las resinas se sometieron a caracterización mediante cromatografía de capa fina (TLC), detectando la presencia de flavonoides, pocas cumarinas, y alta concentración de terpenos, concluyendo que las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de bailahuén alcanzan valores similares a los reportados para catequina, un contribuyente a la actividad captadora de radicales libres, que se utiliza como compuesto estándar en la peroxidación lipídica. En cambio, las otras especies de *Haplopappus* estudiadas (*H. rigidus*, *H. multifolius* y *H. taeda*) mostraron efectos antioxidantes significativamente más altos que el bailahuén. Además, Elgueta et al. (2021), indican que los compuestos fenólicos podrían ser los componentes antioxidantes responsables de desactivar los radicales libres en función de su capacidad para donar átomos de hidrógeno a estos, pudiendo ser útil estos compuestos para desarrollar nuevos agentes farmacológicos frente a diferentes patologías humanas.

También, Urzúa et al. (1995), utilizaron los exudados resinosos de diferentes especies de *Haplopappus*, sin contabilizar el bailahuén, identificando mediante TLC y espectroscopia IR (Espectroscopía infrarroja) e ^{1}H NMR (Resonancia magnética nuclear de protón) mezclas complejas de terpenoides con trazas de flavonoides, exceptuando *H. multifolius*, en que se obtuvo una mezcla de cumarinas y flavonoides, identificando prenyletina y aesculetina (compuestos cumarínicos) como componentes principales, junto con los flavonoides quercetina y O-metilquercetina. De la resina de *H. velutinus* solo se aislaron trazas de

flavonoides, kaempferol-3-metiléter y kaempferol-3,7-dimetiléter. La variación en la composición química de las diferentes especies indicaría que diversos tipos de compuestos son responsables de las actividades biológicas reportadas.

Becerra et al. (2010), evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de bailahuén, el cual fue obtenido mediante hidrodestilación acoplado a aparato Clevenger y caracterizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), obteniendo como compuestos mayoritarios benceno (17,8%), ciclohexadieno (13,7%), azuleno (9,7%), α-cadinol (5,5%), naftaleno (5,3%), eicosano (5,2%), bergamotol (2,2%) y pineno (1,9%). Los ensayos dieron como resultado una inhibición del 38% de *Fusarium oxysporum*, utilizando el aceite esencial al 1%. El aceite esencial de bailahuén solo ha sido caracterizado por Becerra et al. (2010), mientras que los demás reportes trabajan los exudados de la planta, indagando muy poco en el quimiotipo de la especie, sin poder definir los metabolitos que podrían ser los causantes de los efectos farmacológicos más conocidos de bailahuén.

1.3. Aceite esencial de *Haplopappus spp.*

Los aceites esenciales se encuentran en células especializadas llamadas glándulas, conductos, sacos, o simplemente reservorios dentro del vegetal y que finalmente son los que proporcionan el aroma característico a cada espécimen. Presentan como característica principal su compleja composición química y su fuerte carácter aromático, siendo mezclas de sustancias obtenidas de las plantas (Espinosa & Rocha, 2019; Ortuño, 2006).

El bailahuén constituye una materia prima al ser una planta aromática, concentrando una gran cantidad de esencias, ya sea empleando toda la planta, solo sus hojas, flores o raíces. Los aceites se encuentran en pequeña concentración en la planta, generalmente son difíciles de obtener, por lo que es necesaria una gran cantidad de material vegetal, sumándole a esto su carácter volátil y fácil susceptibilidad de alteración. Hoy en día, los métodos de análisis modernos permiten una identificación exhaustiva de los componentes presentes en los aceites esenciales, entregando la posibilidad de obtener e identificar los metabolitos que le otorgan propiedades farmacológicas a la planta (Ortuño, 2006).

Por tanto, los aceites esenciales corresponden a diferentes compuestos, tales como hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles que se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas. Económicamente, son productos naturales de gran importancia para la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos. Se conocen aproximadamente 3000 tipos de aceites y cerca de 300 son usados comercialmente en el mercado de aromas y fragancias. Además, están conformados por metabolitos de bajo peso molecular que en su mayoría son insolubles en agua; esta característica y su volatilidad, es la base para su extracción. Existen diversas técnicas para obtener los aceites esenciales de los vegetales, las que varían según la parte de la planta que se trata, su fragilidad y sus características botánicas (Espinosa & Rocha, 2019).

La hidrodestilación o destilación del material vegetal por arrastre de vapor son técnicas ampliamente utilizadas a causa del equipo sencillo y a su gran versatilidad en el momento de aplicarlo a diferentes materiales vegetales. La destilación por arrastre de vapor consiste

en una vaporización a temperaturas inferiores de las de ebullición de cada uno de los metabolitos volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial, los vapores salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida. Los dos productos inmiscibles, el agua y aceite, finalmente se separan en un dispositivo decantador, siendo una técnica muy utilizada a nivel industrial debido a su alto rendimiento (Muthumperuma et al., 2016; Espinosa & Rocha, 2019). A diferencia de la hidrodestilación, en esta se sumerge el material vegetal con el agua, generando el arrastre del aceite esencial junto al vapor de agua, generando exudación, la difusión del aceite de la superficie externa del material vegetal en el agua, luego se produce la condensación y finalmente la decantación del aceite que por la inmiscibilidad con el agua por diferencia de densidad se separa de la fase acuosa (Cerpa, 2007; Obregon Mariano, 2018).

La principal técnica de caracterización de los analitos presentes en el aceite esencial corresponde a GC-MS, técnica que utiliza un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS), y es utilizada para la detección, cuantificación e identificación de los analitos presentes en una muestra. En esta técnica se debe considerar la volatilidad, termolabilidad, polaridad y peso molecular alto de los analitos de interés, por lo que estos deben ser estables hasta temperaturas 300-350°C, y existir en la fase gaseosa sin experimentar ninguna modificación química (Stashenko & Martínez, 2010).

La técnica consiste en la inyección de la muestra en el puerto de inyección del GC, la cual avanza hacia la columna empaquetada, cuya fase estacionaria está fijada en ésta. Esta columna se ubica dentro un horno, donde los componentes de la muestra eluirán a diferentes velocidades, dependiendo de su afinidad por la fase estacionaria, teniendo un tiempo de retención en la columna. La diferencia de movilidad en la columna generará diferentes *peaks* cromatográficos que podrán ser analizados tanto cualitativamente como cuantitativamente mediante espectrometría de masas, la cual proporciona un espectro característico de cada molécula permitiendo obtener información estructural que permitirá identificar cada analito del extracto. Además, la espectrometría de masas representa una gráfica correspondiente al cromatograma o TIC (total ion current), entregando un pico gaussiano de área que es proporcional a la concentración de los compuestos detectados (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la química de las especies de *Haplopappus*, sin contabilizar bailahuén, se ha investigado principalmente por la composición del exudado, por lo que se sabe muy poco sobre la identidad química de los componentes que se encuentran en el aceite esencial de bailahuén. También, se ha descrito la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos de *H. multifolius* y *H. taeda* contra microorganismos patógenos humanos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Padilla et al., 2021) y se han utilizado los extractos hidroetanólicos de *H. baylahuen* Remy como bactericida, pero no sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*, u otros microorganismos de interés clínico (Elgueta et al., 2021).

La creciente resistencia bacteriana a las sustancias antimicrobianas se ha convertido en una preocupación que va ascendiendo en todo el mundo. El aumento de la resistencia

bacteriana está impulsando el resurgimiento de la investigación en cuanto al papel antimicrobiano de las plantas contra cepas bacterianas resistentes, teniendo en cuenta que a lo largo de la historia las propiedades terapéuticas de estas especies nativas se han utilizado para tratar enfermedades en humanos (Padilla et al., 2021).

S. aureus es una bacteria Gram positiva, considerada un patógeno potencial por causar múltiples infecciones en humanos y animales. Es una de las especies consideradas más virulentas, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos, hasta infecciones graves que amenazan con la vida. Presenta resistencia a múltiples antibióticos y a través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. Además, esta bacteria puede ser adquirida a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente (Cervantes-García et al., 2014).

La necesidad de nuevos desinfectantes y tratamientos para infecciones clínicas causadas por bacterias multirresistentes ha llevado al estudio de extractos y aceites esenciales de plantas con el objetivo de utilizar antimicrobianos naturales y no químicos (Carhuallanqui Pérez et al., 2020). En Chile se han realizado diferentes estudios en plantas nativas con el fin de demostrar su capacidad bioactiva sobre diferentes tipos de microorganismos, así se han estudiado especies de la familia Asteraceae con respecto a su potencial antimicrobiano. Sin embargo, la detección del compuesto bioactivo puro del aceite esencial de bailahuén y la concentración mínima inhibitoria (CMI) no se ha abordado en estudios previos.

Por otro lado, como Urzúa et al. (1995) indican, al comparar diferentes especies de *Haplopappus,* se comprueba que comparten actividad antimicrobiana similar, aunque difieren en su composición química. Es por ello que, la **hipótesis** de esta unidad de investigación es que el aceite esencial de *Haplopappus sp.* presenta un quimiotipo con actividad antibacteriana. *Staphylococcus aureus* representa un grave problema de salud, esto es debido a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbimortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. Por lo que las **preguntas de investigación** son: ¿Cuál es la composición química del aceite esencial de *Haplopappus sp.*? y ¿El aceite esencial de *Haplopappus sp.* tiene propiedades antibacterianas de interés clínico?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

- Relacionar la composición química y la bioactividad antibacteriana del aceite esencial de *Haplopappus sp.*

2.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar los metabolitos secundarios del aceite esencial de *Haplopappus sp.*
- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp.* sobre *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* y *L. monocytogenes.*
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Haplopappus sp*. sobre *S. aureus, E. coli* y *P. aeruginosa.*

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Material vegetal

El material vegetal seco de *Haplopappus sp.* fue adquirido de Australis Herbolaria ©, Santiago, Chile. Según la ficha técnica de la empresa en relación con *H. baylahuen* Remy, se indica qué: (Tabla 1)

Tabla 1. Ficha técnica de *H. baylahuen* R. deshidratado (Australis Herbolaria ©)

Procedencia del material vegetal	Chile
Partes de la especie vegetal	Hojas y tallos
Procesado de la especie vegetal	Cosecha manual; deshidratación en horno industrial a 60°C por 8 h.
Controles de la especie vegetal	Organolépticos, humedad, niveles de pureza, selección y envasado
Almacenamiento materia vegetal	Recipientes cerrados, lugar fresco y seco. Temperatura ambiente (10-25°C)

Una vez adquirido el material vegetal, se almacenó en el laboratorio a temperatura ambiente, sin exposición directa a la luz y fue identificado botánicamente por la Mg. Pamela Ramírez, curadora del Herbario de VALPL de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Playa Ancha, en el Laboratorio de botánica de la Universidad de Playa Ancha.

3.2. Identificación botánica por histología de *Haplopappus sp.*

Se utilizó el método de Schultze para la identificación botánica del bailahuén (Dizeo de Strittmater, 1973; Albornoz, s/a). Este es un método que sólo debe aplicarse bajo campana, ya que la reacción genera gases tóxicos.

Para comenzar, en un vaso precipitado se colocaron 3 g de cristales de $KClO_3$ y 30 mL de HNO_3. Luego se añadió el material vegetal en la solución. Posteriormente el material vegetal se pinchó con una aguja histológica para comprobar su consistencia, la cual fue blanda y pulposa. Luego se interrumpió la reacción, trasladando el material vegetal a una cápsula con amoniaco, para finalizar lavando con agua destilada. Después se trasladó el material a una placa Petri nueva con agua y se continuó el trabajo bajo la lupa para observar con detalle los restos del mesófilo que habían quedado y así limpiarlos con un pincel muy fino, ayudándose siempre de una pinza o una aguja para sostener el material.

Una vez limpia la muestra, se colocó el material vegetal en un portaobjetos, estirando suavemente con el pincel y la aguja. Se agregó una gota de safranina diluida para colorear y escurrir el excedente. Finalmente se agregó una gota de gelatina (colapez), previamente mezclada con glicerina, sobre el material vegetal estirado y coloreado y se colocó con el cubreobjetos. La muestra se selló con esmalte de uñas transparente, esparciendo con la brocha por los bordes del cubreobjetos.

La observación y comparación de los tejidos se realizó en un microscopio óptico con los diferentes oculares (4x, 10x y 40x) para distinguir con detalle el tipo de estomas, el tipo de

células epidérmicas y epinervias en algunos casos, así como los distintos tipos de pelos y glándulas que se puedan presentar.

3.3. Obtención del aceite esencial de *Haplopappus sp.*

El aceite esencial de *Haplopappus sp.* fue obtenido mediante destilación por arrastre de vapor, según el montaje adaptado que se muestra en la figura 3, cuyo procedimiento se llevó a cabo en las dependencias del Laboratorio de Química de Metabolitos Bioactivos de la Facultad de Farmacia, UV. Este método se desarrolló a partir del procedimiento de Salomé-Abarca et al. (2015).

Se utilizó 1 Kg de material vegetal seco (Australis Herbolaria ©), el cual fue finamente cortado de forma manual y se introdujo en un balón de tres bocas de 1000 mL, junto a tres perlas de ebullición, cubierto con agua destilada, el cual se calentó sobre una manta calefactora. Una de las bocas del balón se conectó a un embudo de adición (para mantener una reserva de agua destilada), la otra se conectó al condensador, que finalmente se unió con el balón receptor, y la última se selló con un tapón de vidrio. El tiempo de la destilación se mantuvo entre 3.5-4 h, contabilizando luego de destilar la primera gota de hidrolato, la que se recogió en un balón receptor para realizar una posterior extracción.

El hidrolato fue combinado con cloruro de sodio, NaCl (Winkler), (por cada 250 mL de la mezcla se utilizaron 12,5 g de NaCl), de tal manera de saturar la fase acuosa. Posteriormente, la mezcla se colocó en un embudo de decantación de 500 mL para llevar a cabo la extracción líquido-líquido. Para ello, se realizaron tres extracciones utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) (Merck). El volumen de las porciones de diclorometano fue de 75 mL cada una. Ya separada la fase acuosa de la orgánica, y combinadas las tres porciones orgánicas, se agregó sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro (Winkler) como desecante y se dejó reposar la fase orgánica por 10 min, bajo campana. Posteriormente, se realizó una filtración por gravedad para separar el desecante de la mezcla “aceite+disolvente orgánico” y esta última se llevó a un evaporador rotatorio (DRAGONLAB) a 120 rpm y 50°C, para obtener finalmente el aceite esencial de *Haplopappus sp.*

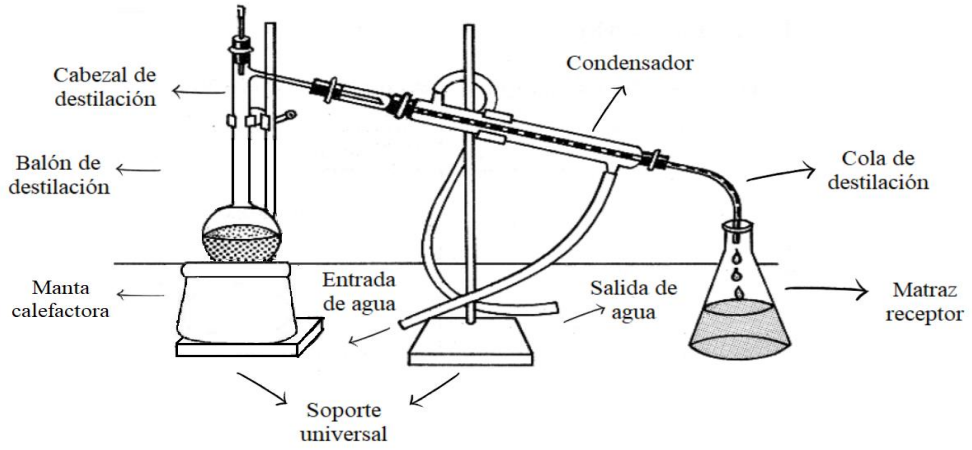


Figura 3. Montaje del equipo de destilación por arrastre de vapor. Imagen adaptada de Castillo et al., (2013).

Finalmente, se determinó el porcentaje de rendimiento de la obtención del aceite esencial mediante la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\%R = \frac{masa\ final\ (g)}{masa\ inicial\ (g)}\ x\ 100$$

Ecuación 1. Fórmula que determina el porcentaje de rendimiento.

3.4. Caracterización física del aceite esencial de *Haplopappus sp.*

3.4.I. Características organolépticas:

Se realizó una inspección de la impresión visual, considerando su color, brillo, y al ser una sustancia aromática se considera su olor.

3.4.II. Índice de refracción:

El procedimiento se llevó a cabo a partir del protocolo de Fuentes & Rodríguez (2020). Para la determinación del índice de refracción del aceite esencial, se utilizó un refractómetro de Abbé (ZUZI 325). Se abrió el prisma y se frotaron ambas caras con un trozo de algodón humedecido con acetona. Se introdujeron unas gotas de aceite esencial de *Haplopappus sp.* sobre la superficie del prisma inferior, de manera que quedó totalmente cubierto y luego se cerró. Posteriormente, se giró el prisma hasta una delineación bien definida entre el campo claro y oscuro con la intersección de los hilos entrecruzados. Finalmente, se efectuó la lectura del índice de refracción.

Para esta propiedad, es necesario hacer una corrección por temperatura, por lo que se trabaja con una ecuación de índice de refracción corregida (Ecuación 2). Esto se realiza dado que, por lo general, no se trabaja a la temperatura de 20°C, donde se consideran los índices de refracción teóricos reportados.

$$\eta_D^{20} = \eta_D^T + (0.00045)(T - 20°C)$$

Ecuación 2. Fórmula que determina índice de refracción corregido.

3.5. Caracterización del aceite esencial mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se realizó un espectro infrarrojo del aceite de *Haplopappus sp.* para identificar las bandas de absorción características de los componentes que forman parte de éste. Para ello, se caracterizó cualitativamente cada banda obtenida en el espectro para obtener información acerca de los grupos funcionales presentes en la muestra, lo que debiese estar en concordancia con la identificación estructural realizada por GC-MS.

Se utilizó el espectrómetro Nicolet iS5 (Thermo Scientific). Primero se realizó el background, considerado un blanco, y luego se analizó la muestra problema. La celda de vidrio fue previamente limpiada con un algodón con diclorometano para así agregar en el centro una gota del aceite esencial de *Haplopappus sp.*, formando una delgada película. Posteriormente se insertó en una ranura del equipo para realizar la lectura del espectro.

Los espectros FT-IR tienen un rango espectral de 4000-1000 cm^{-1}. El análisis de los espectros se realizó con el software OMNIC 9.1.27 (Bañuelos-Valenzuela et al., 2018).

3.6. Caracterización química del aceite esencial mediante GC-MS

La caracterización y cuantificación del aceite esencial de *Haplopappus sp.* se llevó a cabo a partir del protocolo de Villagra et al. (2021).

La caracterización del aceite esencial de *Haplopappus sp.* se realizó mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) realizado en un equipo GC-MS QP2010 Plus, Shimadzu, en las dependencias del Laboratorio de Cromatografía de la Farmacopea Chilena de la Facultad de Farmacia, UV. Se utilizó una columna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm df). Se preparó 10 mL de una disolución stock de 940 ppm en diclorometano del aceite esencial y a partir de ella se evaluó una serie de diluciones, 500; 250 y 100 ppm, siendo esta última dilución la óptima para la inyección y realización del análisis. Se inyectó 1,0 µL de la disolución del aceite esencial en modo splitless con las siguientes condiciones cromatográficas: 50°C/5 min y un aumento de 8°C/min hasta 280°C, los que se mantuvieron por 15 min. Se usó como gas portador helio con un flujo de 1,0 mL/min. Se dispuso una ionización por impacto electrónico a 70 eV y una temperatura de la línea de transferencia de 280°C. La adquisición del espectro de masas se realizó en un rango de 35 a 500 m/z, con modo full SCAN a una frecuencia de 1,56 scan/s. Un estándar de *n*-alcanos C_7-C_{30} (Supelco) se utilizó para calcular los índices de Kovats (IKs) (Ecuación 3).

$$IK = \left[\frac{t_{r\,(desconocido)} - t_{r\,(n)}}{t_{r\,(N)} - t_{r\,(n)}}\right] \times (100 \times z) + (100 \times n)$$

Ecuación 3. Fórmula para determinar IK en una cromatografía gaseosa de temperatura programada.

Donde IK= índice de retención de Kovats; n = número de átomos de carbono en el alcano más pequeño; N = número de átomos de carbono en el alcano más grande; z = diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más pequeño y el más grande; tr = tiempo de retención.

Los compuestos se identificaron por comparación de IKs y espectros de masas (MS), con literatura (Wiley y NIST). Utilizando el software GCMS Labsolutions (Shimadzu) se integró el área bajo la curva de cada señal cromatográfica, relacionándola con la del estándar interno ($C_{17}H_{15}ClO_3$; 4-clorobenzoato de 4-alil-2- metoxifenilo; V agregado: 10 µL de concentración 100 µg/mL en DCM), así se obtuvo la proporción relativa de cada metabolito secundario, expresada como % de abundancia relativa de emisión. Se realizó un análisis semicuantitativo de los datos para reconocer y proponer quimiotipos contenidos en el aceite esencial de *Haplopappus sp*.

3.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp..*

Esta actividad se realizó en colaboración con la Dra. Jessica Bravo Garrido en el Laboratorio de Productos Naturales Bioactivos de la Facultad de Medicina de la Universidad Diego Portales (UDP) y con la Dra. Tania Bahamóndez en el Laboratorio de Farmacotecnia Antimicrobiana (LADEFAM) de la Facultad de Farmacia, UV.

3.7.A.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo (UDP)

Primero se realizó la identificación bacteriana de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, mediante tinción Gram (Biopack, coloración de Gram).

Las cepas utilizadas para los ensayos de actividad antimicrobiana fueron cepas Gram negativas de *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 026) y *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa* aislado clínico); cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes* ATCC BAA 751). Las bacterias se cultivaron y mantuvieron en agar nutritivo (Becton Dickinson).

Los cultivos activos fueron preparados por siembra con asa en loop a placas de agar nutritivo (Becton Dickinson) para bacterias y se incubaron durante 18 a 24 h a 37°C.

3.7.A.2. Actividad antimicrobiana en ensayos de difusión en agar (UDP)

Se realizó el método de difusión en agar para determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp.* y concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre las cepas estudiadas.

Se tomaron 3-5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología desde el agar nutritivo para bacterias, se suspendieron en 5 mL de solución salina 0,85 % estéril. La suspensión resultante se agitó vigorosamente durante 15 s y se ajustó la densidad de la suspensión celular equivalente a $1{,}5x10^8$ cel/mL (equivalente a 0,5 de la escala de McFarland) medidos en un turbidómetro OXOID. Las placas se inocularon en un lapso óptimo de 15 min después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo. Una tórula de algodón se sumergió en ella. La tórula se rotó varias veces y presionó firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido, para eliminar el exceso de líquido. Se inoculó la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (MH) (DIFCO, Becton Dickinson) para bacterias, por rayado con la tórula sobre toda la superficie. Este procedimiento se repitió rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final se pasó la tórula sobre los bordes del agar.

Luego, una vez rotulado el material, se depositaron 5 µL del aceite esencial (solución), sin diluir (0,9 µg/µL). Como control negativo se utilizó una placa inoculada sin tratamiento y como control positivo una placa inoculada con un disco de ampicilina 10 µg para *S. aureus* y se incubó a 37°C durante 18 a 24 h. En el caso de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes* se utilizó discos de levofloxacino 5 µg, cefotaxima/ácido clavulánico 30/10 mg y levofloxacino 5 µg como control positivo, respectivamente.

La determinación de la concentración del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (µg/mL) se realizó considerando un valor de densidad para los aceites esenciales estandarizada anteriormente en el laboratorio.

La inhibición de crecimiento bacteriano se midió según el diámetro del halo de inhibición donde fue aplicado el aceite esencial y se midió con caliper registrándose los resultados en milímetros (mm). Los ensayos se realizaron en triplicado (CLSI, 2015).

3.7.A.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) (UDP)

La CMI del aceite esencial fue determinada usando el método de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos. Los ensayos fueron hechos en caldo Mueller-Hinton. El rango de concentración de los compuestos fue de 0,12 a 64 µg/mL. La determinación de las concentraciones del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (µg/mL) se realizó considerando un valor de densidad para los aceites esenciales estandarizada anteriormente en el laboratorio.

El inóculo se preparó según el protocolo descrito en el punto 3.7.A.2 y se ajustó a una concentración final $3{,}0x10^8$ cel/mL medido en un espectrofotómetro UV-VIS TU1800 a 520 nm.

De la columna 2 a la 10 se agregó 100 µL de medio MH líquido DMSO 2% y a la columna 1 se agregó 26 µL de aceite esencial de bailahuén (100%) más 174 µL de MH líquido DMSO 2%, generando un volumen final de 200 µL. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, tomando 100 µL de la columna 1 para verterlos a la columna 2 y mezclarlo con el medio, luego se tomaron 100 µL de la columna 2 y se depositaron en la columna 3 y, luego se mezclaron con el medio, así sucesivamente. De esta manera de la columna 1 a la 10 hubo un volumen final de 100 µL. En la columna 11 se añadieron 200 µL de bacteria como control positivo y en la columna 12 200 µL de MH líquido DMSO 2% como control negativo.

Finalmente se añadieron 100 µL de la suspensión bacteriana de la columna 1 a la 10, completando el volumen final de 200 µL.

La lectura de placas para bacterias se realizó en un lector de microplaca, Multiskan GOThermo Scientific a 520 nm. Los datos fueron expresados como concentración (µg/mL) de aceite esencial de *Haplopappus sp.* (CLSI, 2015).

3.7.B.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo (UV)

La cepa utilizada para los ensayos de actividad antimicrobiana fue la cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 29213). Se efectuó la siembra de *S. aureus* en agar TSA, incubándose por 24 horas a 37°C. A partir de las bacterias cultivadas en el agar TSA se prepararon suspensiones en medio de cultivo TSB con cuatro a cinco colonias. Luego, los tubos con las suspensiones se incubaron por 24 horas a 37°C en un incubador con agitación a 200 rpm.

Al día siguiente, la suspensión bacteriana fue centrifugada a 4000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se redispersó el sedimento en aproximadamente 10 mL de PBS, utilizando el vortex. Luego se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 10 min. Nuevamente se desechó el sobrenadante y se redispersó el sedimento en 10 mL de TSB. A partir de esta suspensión, se preparó una suspensión preajustada, evitando la transferencia de agregados visibles al cultivo diluido.

Se midió la absorbancia del medio (blanco) y la suspensión preajustada a 625 nm en el rango 0,08-0,10. Luego, esta suspensión se diluyó 1:100 para la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

3.7.B.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del cloranfenicol como control positivo (UV)

Este procedimiento estandarizado para la determinación de CMI fue basado en ESCMID (2003).

La CMI de cloranfenicol fue determinada usando el método de microdilución seriada en caldo en placas de 96 pocillos. Se preparó una solución stock de cloranfenicol 512 µg/mL, para ser usado como control positivo, el cual fue diluido seriadamente al medio para testear un rango de 11 diluciones en cuadruplicado en un volumen final de 100 µL (Figura 4).

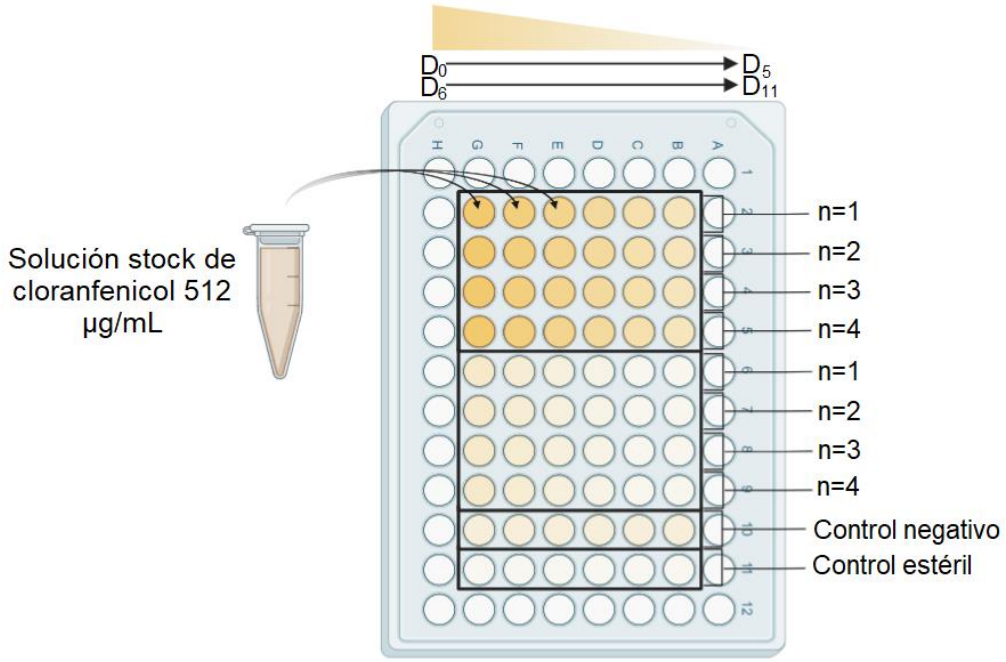


Figura 4. Método de microdilución en caldo de cloranfenicol como control positivo (Elaboración propia).

Luego, se añadió 100 µL de suspensión bacteriana ajustada en todos los pocillos de las columnas 3 a la 11, obteniendo un volumen final de 200 µL. Además, se agregaron 200 µL

de medio TSB a los 6 pocillos de control estéril y 100 µL a los 6 pocillos del control negativo más 100 µL de suspensión bacteriana ajustada. La placa fue incubada protegida de la luz a 37°C a 200 rpm por 24 horas en incubador orbital.

3.7.B.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial (UV)

Este procedimiento estandarizado para la determinación de CMI fue basado en ESCMID (2003).

La CMI del aceite esencial fue determinada usando el método de microdilución en caldo seriado en placas de 96 pocillos.

Los cultivos en suspensión se diluyeron según lo descrito anteriormente. El aceite esencial fue diluido seriadamente al medio para testear un rango de 9 diluciones en cuadruplicado a partir de una solución de concentración 10% (100 µL aceite esencial + 900 µL TSB). 100 µL de estas soluciones de *Haplopappus sp.* fueron combinadas con 100 µL de suspensión bacteriana ajustada anteriormente en placas de 96 pocillos de fondo plano. Se reservaron 4 pocillos para el control negativo (sin tratamiento, solo medio de cultivo) y 3 pocillos para el control positivo usando la concentración determinada previamente (cloranfenicol para *S. aureus*) (Figura 5). Como blanco de absorbancia, también se midió la absorbancia de las diluciones del aceite esencial sin bacteria. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas con agitación a 75 rpm.

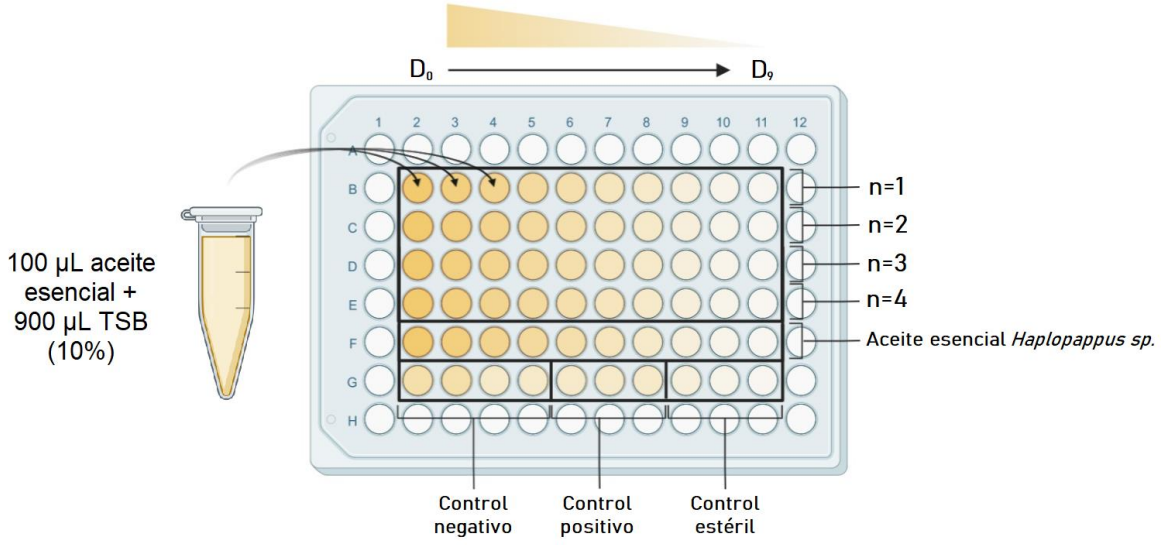


Figura 5. Método de microdilución en caldo del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (Elaboración propia).

El efecto inhibitorio del aceite de *Haplopappus sp.* fue determinado por lectura de las microplacas a 625 nm. La absorbancia de los pocillos con tratamiento con *Haplopappus sp.* fue comparada respecto a la absorbancia del control negativo (que representa un 100% de

proliferación o 0% de inhibición). Los datos fueron expresados como %proliferación (promedio ± desviación estándar).

3.7.B.4 Conteo de colonias viables *S. aureus* (UV)

El conteo de colonias sobrevivientes fue determinado a partir de la misma placa usada en método de microdilución en caldo seriado en placas de 96 pocillos de 7.B.3. Luego de la determinación de la absorbancia de la placa, se tomaron 50 µL de cada uno de los cuatro pocillos de las diluciones 5; 2,5; 1,25 y 0,625% del aceite esencial y del control negativo. Estos volúmenes fueron llevados a una nueva placa, donde los sobrenadantes fueron diluidos al décimo en PBS.

Ya realizada la microdilución se realizó la siembra por goteo en agar TSA para cuantificar las unidades formadoras de colonias sobrevivientes. Se usó una placa de gar TSA para cada dilución y una para el control negativo. Las placas de agar se dividieron en 6 partes, rotulándolas con las diluciones (0-5) y la correspondiente concentración del aceite esencial. En cada sección se sembraron 3 gotas de 10 µL. Finalmente, se esperó a que se secaran las gotas sobre la placa y se incubaron invertidas a 37°C. Al día siguiente se contaron las colonias sobrevivientes, siendo la dilución contable la primera que presentó de 3 a 30 colonias. Los datos fueron expresados como cuenta total viable (UFC/mL).

3.7.B.5. Prevención de la formación de biopelículas

En primer lugar, se removieron los sobrenadantes de cada pocillo de la placa de 96 pocillos que en que se realizó la CMI del aceite esencial de *Haplopappus sp*. Luego se lavó la placa dos veces con agua destilada y se secó sobre una toalla de papel. Posteriormente, se agregaron 200 µL de metanol en cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min con el objetivo de fijar las biopelículas. Ya concurrido el tiempo se retiró el metanol de cada pocillo y se dejó secar al aire durante la noche. Después, se agregaron 200 µL de cristal violeta al 0,1% (%p/v) a cada pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente, se retiró el cristal violeta y la placa se volvió a lavar con agua destilada. Una vez seca, el cristal violeta retenido en los pocillos fue disuelto en 200 µL de ácido acético al 30% (%v/v) por 30 min antes de medir la absorbancia a 590 nm por espectrofotometría.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación botánica por histología del bailahuén

El estudio de las cutículas del bailahuén de Australis Herbolaria © y del bailahuén de referencia (*Haplopappus baylahuen* J. Remy) (Certificado en Herbario de VALPL de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Playa Ancha) (Figura 6) demostró que la muestra proveniente de la herbolaria es una planta del género *Haplopappus*, pero no específicamente *Haplopappus baylahuen*, evidenciado principalmente por la distribución de los estomas, que en *Haplopappus sp*. (designación para la muestra de la herbolaria) es más aglomerada que en *H. baylahuen* (Figura 6. A). En *Haplopappus sp.* los estomas son claramente del tipo actinocítico, es decir, de células radiadas con varias células anexas, cuyos ejes mayores son perpendiculares al contorno de las células oclusivas, rodeando el estoma (Figura 6. B y C). En *H. baylahuen* los estomas tienen una tendencia intermedia entre actinocítico y anisocítico (Figura 6. F) mencionado también por González et al (2017). Ambos presentan glándulas secretoras pluricelulares que se pueden observar bien en las figuras 6. B y E, pero presentan una leve diferencia dada por la profundidad a la que se presentan respecto a la epidermis, *Haplopappus sp.* de manera más profunda (Figura 6. B y C) que *H. baylahuen* (Figura 6. D y E).

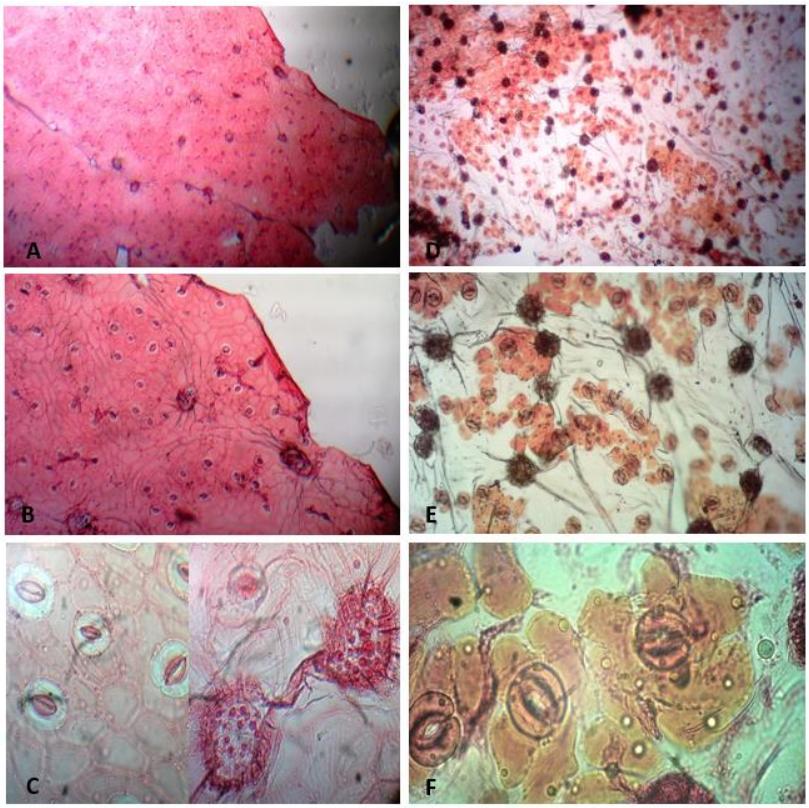


Figura 6. Identificación botánica de *Haplopappus baylahuen* R. Comparación de tejidos al microscopio óptico para diferenciar distribución de estomas y células anexas. A(4x), B(10X)

y C(40X) *Haplopappus sp*. (Bailahuén de herbolaria). D(4x), E(10X) y F(40X) *Haplopappus baylahuen* J. Remy (Bailahuén de referencia Voucher VALPL_PLV:2284).

Adicionalmente, la literatura reporta que bailahuén considera a diferentes especies del género *Haplopappus*. El libro Medicamentos Herbarios Tradicionales considera a *H. multifolius, H. remyanus, H. foliosus,* y otras especies como bailahuén, debido a que se les atribuyen propiedades medicinales idénticas, empleándolas indistintamente para los mismos fines. Roldan et al., (2007) exponen que se habla de un complejo, formado principalmente por *H. baylahuen, H. taeda* y *H. multifolius* ya que se comercializan en forma indistinta por presentar las mismas propiedades y que se diferencian principalmente por su composición química. Esto podría indicar que la identificación botánica podría variar dependiendo de la especie a comparar, como en este caso, utilizando *Haplopappus baylahuen* J. Remy, lo cual se podría interpretar en que la especie trabajada de Australis Herbolaria es diferente, ya sea *H. multifolius, H. remyanus, H. foliosus, H. taeda,* etc.

4.2. Obtención del aceite esencial de *Haplopappus sp*.

La técnica utilizada para obtener el aceite esencial de *Haplopappus sp.* fue destilación por arrastre de vapor (con vapor interno), obteniendo un 0,2107% de rendimiento, a partir de 1 Kg de material vegetal seco. Si bien en esta técnica se pueden generar cambios en la calidad del aceite esencial que se obtiene, debido a que algunos de los componentes de éste, tales como ésteres, terpenos y aldehídos pueden hidrolizar o polimerizar debido al contacto directo con el agua en ebullición, se intentó mantener una temperatura constante de ebullición del agua, además de mantener un volumen constante de la misma, de tal manera de evitar la degradación térmica de los analitos.

El material trabajado es seco, por lo que pudo presentar una diferencia de rendimiento en comparación con una planta recién cosechada. Ortuño, (2006) indica que la diferencia de rendimiento puede ser muy pequeña si es que el secado se lleva a cabo de forma ligera, como dejar a la planta cortada en la sombra en un sitio ventilado durante un tiempo orientativo de 1-2 días, así la planta pierde la tercera parte a la mitad de su peso debido a la evaporación de agua, sin pérdida de los componentes del aceite esencial. Por lo que el secado completo no es recomendable ya que el material vegetal se vuelve quebradizo, facilitando la evaporación de la esencia antes de la destilación, con posibilidad de obtener un aceite esencial de calidad inferior si los componentes más volátiles se han evaporado en el secado.

Entonces, esto podría indicar que al utilizar material seco los metabolitos presentes en la planta podrían ser degradados.

4.3. Caracterización física del aceite esencial de *Haplopappus sp.*

La caracterización física del aceite esencial de *Haplopappus sp.* permitió determinar sus características organolépticas e índice de refracción a temperatura ambiente.

4.3.I. Características organolépticas:

En la tabla 2 se muestran las principales características organolépticas del aceite esencial de *Haplopappus sp.* obtenido por destilación por arrastre de vapor.

Tabla 2. Características organolépticas del aceite esencial de *Haplopappus sp.*.

Impresión visual	Color: amarillo intenso, oro Brillo: brilloso Aspecto general: Líquido a temperatura ambiente, oleoso.
Olor	Olor característico a aceite esencial, aromático, dulce, fuerte, levemente cítrica

4.3.II. Índice de refracción:

Los índices de refracción del aceite esencial se realizaron por triplicado obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3):

Tabla 3. Índice de refracción del aceite esencial de *Haplopappus sp.*.

Índice de refracción a 12°C	**Fórmula de corrección de índice de refracción**	**Índice de refracción corregido a 20°C**
1511,0	$\eta_D^{20} = 1511{,}0 + (0{,}00045)(20°C - 12°C)$	1511,0
1509,5	$\eta_D^{20} = 1509{,}5 + (0{,}00045)(20°C - 12°C)$	1509,5
1509,0	$\eta_D^{20} = 1509{,}0 + (0{,}00045)(20°C - 12°C)$	1509,0
Promedio Índice de refracción ($\bar{X}$)		1509,8
Desviación estándar		0.8
Índice de refracción aceite esencial *Haplopappus sp.*		**1509,8 ± 0.8**

Con el valor del índice de refracción se pueden realizar deducciones en cuanto a los componentes del aceite esencial. Valores mayores a 1,47 indican la presencia de compuestos aromáticos oxigenados, ya sean alcoholes, cetonas, ésteres, entre otros, proporcionado el aroma característico de la especie (Coronel & Piedra, 2014; García, 2010). La combinación de este parámetro con valores de densidad superiores a 0.9 permiten validar la presencia de este tipo de compuestos, por lo tanto, se hace necesario en un futuro determinar la densidad del aceite esencial (Domínguez, 1973).

Además, S. García, (2010) indica que los índices de refracción de los aceites esenciales son altos, con un promedio de 1,500 a 20°C, por lo que el índice de refracción del aceite esencial de *Haplopappus sp.* se encontraría cercano al promedio estimado. Cymerman, (1962) determinó el índice de refracción de *Haplopappus pectinatus* Philippi a 22°C con un

valor de 1,497 y al estimar el índice de refracción del aceite de *Haplopappus sp.* a 22°C se obtuvo 1,509.8, por lo que las especies tendrían un valor cercano, validando así el valor estimado del índice de refracción del aceite esencial de *Haplopappus sp.* obtenido.

La temperatura es un parámetro de influencia en las mediciones de índice de refracción, ya que en la mayoría de los líquidos éste disminuye aproximadamente 0,00045 al aumentar 1 ºC (*La Guía MetAs*, 2008). Por esta razón, es que se consideró la corrección del índice de refracción del aceite de bailahuén en función de la temperatura experimental.

4.4. Caracterización del aceite esencial mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se realizó la espectroscopía infrarroja junto al programa OMNIC 9 obteniendo el siguiente espectrograma (Figura 7):

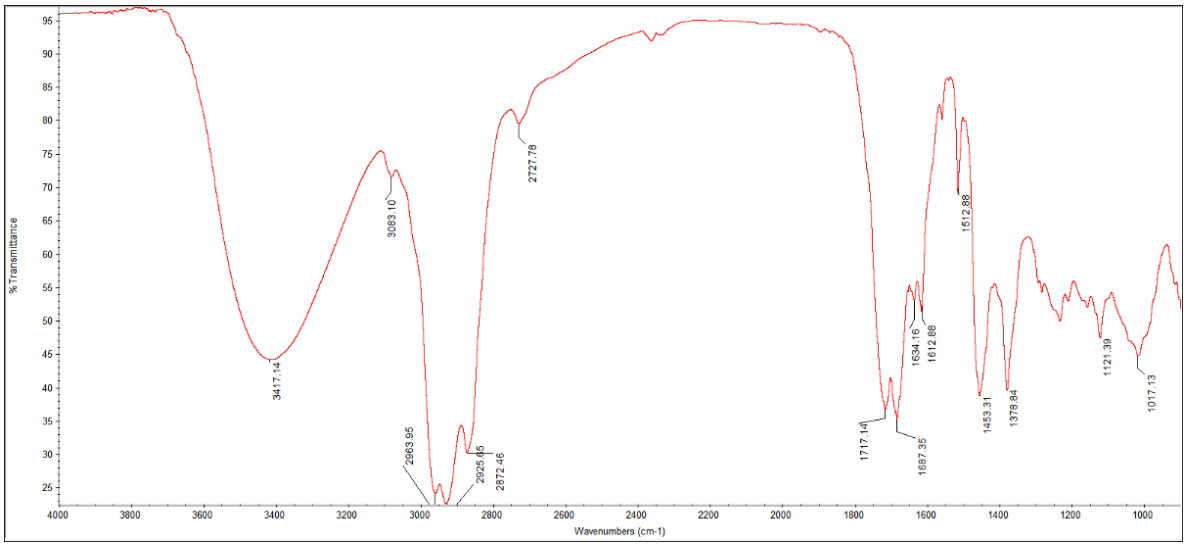


Figura 7: Espectro infrarrojo del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (Espectrómetro Nicolet iS5 (Thermo Scientific)).

La región infrarroja del espectro electromagnético consta de un rango que puede ser dividida en tres zonas, en este caso el rango es de 4000-1000 cm^{-1}. La identificación de grupos funcionales fue realizada por comparación con tablas espectroscópicas, desarrollando una asignación cualitativa de los posibles grupos funcionales que podrán estar presente en las diferentes moléculas contenidas en el aceite esencial de *Haplopappus sp.* (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del aceite esencial de *Haplopappus sp.*.

Grupo Funcional	Frecuencia $cm^{-1(e)}$	Intervalo de frecuencia $cm^{-1(t)}$	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3417,14	3400-3300	O-H	

	1121,39	1260-1100	C-O	Tensión
Aldehídos	2872,46 2727,78	~ 2850 y ~ 2750	C-H	Tensión
	1717,14	~ 1725	C=O	
Aromático	1612,88 1453,31	~ 1600 y ~ 1475	C=C	Tensión
	2963,95	3020-3000	sp^2 C-H	Tensión
Alcanos	2925,65	2950-2800	sp^3 C-H	Tensión
	1453,31	~1465	CH_2	
	1378,84	~1375	CH_3	
Alquenos	3083,10	3100-3010	=CH	Tensión
Cetonas	1717,14	~ 1725	C=O	Tensión
Ésteres	1240,55	1260-1230	C-C(O)-O (acetato)	Tensión
	1717,14	1750-1735	C=O	Tensión

[e]: dato experimental
[t]: intervalo teórico

La figura 7 muestra el espectro infrarrojo obtenido del aceite esencial de *Haplopappus sp.*, dadas las señales y análisis con tablas espectroscópicas (Tabla 4) se podría inferir que estos son algunos de los grupos funcionales presentes en las diferentes moléculas del aceite esencial, ya que hay bandas que se encuentran en los rangos característicos de cada grupo funcional.

El objetivo de identificar las principales bandas de absorción del aceite esencial es compararlas con las bandas teóricas de absorción de diferentes grupos funcionales, ya que cada grupo funcional cuenta con una señal característica, entregando una estimación de las moléculas, sin identificar moléculas completas (Mondragón, 2017). Las frecuencias obtenidas indica que hay presencia de alcoholes, aldehídos, compuestos aromáticos, alcanos, cetonas y éster, teniendo con ello una caracterización cualitativa preliminar del aceite esencial de bailahuén.

4.5. Caracterización química del aceite esencial mediante GC-MS

La caracterización del aceite esencial de *Haplopappus sp.* se llevó a cabo mediante GC-MS, identificando 25 metabolitos (55,55%) de un total de 37 compuestos (Figura 8), comparando con la biblioteca Wiley229, NIST27 y NIST124 a nivel de similitud (Match) >70%, índices de Kovats en literatura y espectros de masas (Tabla 5).

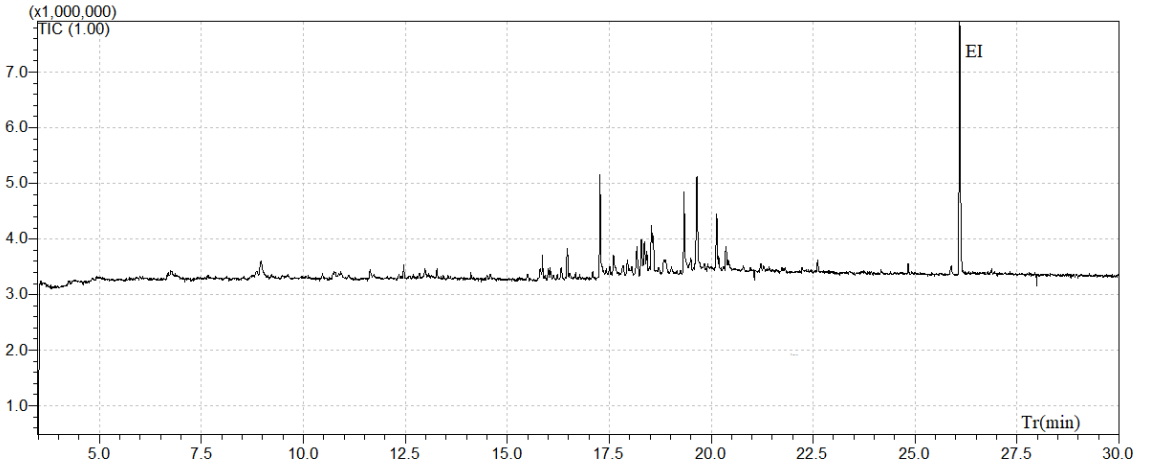


Figura 8. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Haplopappus sp.* EI = Estándar interno ($C_{17}H_{15}ClO_3$: 4-clorobenzoato de 4-alil-2- metoxifenilo; 100 µg/mL) (Equipo GC-MS QP2010 Plus, Shimadzu).

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Haplopappus sp.* obtenida mediante GC-MS.

T_R (min)	IK_{cal}	IK_{lit}[a]	Compuesto[b]	Abundancia relativa (%)	Id.[c]
6,682	1026	1026[1]	*p*-cimeno	0,56	A
8,846	1106	1100[2]	*l*-linalool	0,93	A
8,958	1111	1110[3]	2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol	3,22	A
10,474	1180	1177[1]	4-terpineol	0,86	A
10,755	1192	1195[4]	2-(acetilmetil)-3-careno	1,49	A
11,640	1238	1236[5]	verbenona	1,16	A
12,982	1310	1307[6]	isoascaridol	0,85	A
13,278	1327	1325[7]	4,6-dimetildodecano	1,10	A
14,108	1376	1373[8]	α-cedreno	0,54	A
14,503	1400		NI (alcano ramificado no identificado)	0,43	
14,587	1405	1406,4[9]	γ-4-dimetil bencenobutanal	0,52	A
15,498	1463	1462,8[10]	α-humuleno	0,56	A
15,809	1483	1483[11]	(-)-massiolactona	1,31	A
15,863	1487	1486[12]	α-curcumeno	2,25	A
16,052	1499	1500[13]	zingibereno	0,95	A
16,136	1505	1504[13]	α-muuroleno	0,27	A
16,322	1517	1519[14]	germacreno D	1,29	A
16,473	1528		NI (sesquiterpeno no identificado)	3,33	
16,535	1532	1531[15]	5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona,	0,44	A
17,092	1570	1567[16]	+/--trans-nerolidol	0,63	A
17,275	1583	1581,8[17]	(+)-spatulenol	12,82	A
17,430	1593		NI (sesquiterpeno no identificado)	0,71	
17,848	1623	1625[18]	guaiol	1,42	A
17,951	1631		NI (sesquiterpeno no identificado)	1,52	
18,177	1647		NI (sesquiterpeno no identificado)	4,69	
18,292	1656	1650[19]	eudesmol	5,06	A
18,368	1661		NI (sesquiterpeno no identificado)	2,81	
18,417	1665		NI	2,07	

18,540	1674	IKNI	triciclo[3.2.1.0(2,7)]-2,3,4,5-tetrametiloct-3-eno	8,50	
19,337	1733	1486[12]	α-curcumeno	11,58	B
19,497	1746	1745[20]	epóxido de aromadendreno	0,96	A
19,648	1757	1758[21]	(*E*)-nuciferol	12,91	A
20,133	1795	1796[22]	(*Z*)-acetato de bergamotol	5,96	A
20,366	1813		NI (sesquiterpeno no identificado)	2,95	
22,615	1998		NI (alcano ramificado no identificado)	1,29	
24,833	2186		NI (alcano ramificado no identificado)	0,98	
25,886	2273		NI (alcano ramificado no identificado)	1,05	

a. Números: Referencias a continuación T_R: Tiempo de retención. IKNR = Índice de Kovats no reportado. IK_{cal} = ïndice de Kovats calculado. IK_{lit} = Índice de Kovats reportado en literatura.

b. NI = Compuesto no identificado.

c. A = Identificado por espectro de masas y tiempo de retención desde librería de datos ([a]. Ver referencias). B = Identificado por espectro de masas.

En la actualidad solo hay tres antecedentes de la identificación del quimiotipo de *Haplopappus; H. baylahuen*, *H. foliosus* y *H. greenei.* Becerra et al. (2010) identificaron 8 compuestos en el aceite esencial de *H. baylahuen* mediante GC-MS: naftaleno (5,3%), azuleno (9,7%), pineno (1,9%), α-cadinol (5,5%), benceno (17,8), ciclohexadieno (13,7%), bergamotol (2,2%) y eicosano (5,2%). Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta unidad de investigación indicaría que no hay similitudes entre sus composiciones químicas.

Alejandro Urzúa et al. (2010) identificaron 29 metabolitos secundarios del aceite esencial de *H. foliosus* mediante GC-MS, teniendo en abundancia relativa un alto porcentaje; limoneno (28%), epi-biciclosquifelandreno (9,84%), acetato de bornilo (7,47%), 4-terpineol (6,36%), *p*-cimeno (6%) y agarospirol (5,53%). Algunos de estos compuestos coinciden con lo obtenido en la caracterización química de *Haplopappus sp*. Además, se encuentran presentes germacreno D y spatulenol, pero en menor abundancia (<5%).

Por otro lado, Demirci et al. (2006) identificaron 104 metabolitos en el aceite esencial de *H. greenei* mediante GC-MS, destacando la presencia de carvacrol (8,7%), β-pineno (7,6%) y óxido de cariofileno (5,8%), acompañados de componentes presentes en *Haplopappus sp.*, como linalool (0,4%), verbenona (0,5%), *p*-cimeno (0,5%), α-curcumeno (0,6%), 4-terpineol (2.0%) y spatulenol (3,4%).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta unidad de investigación indicaría que hay similitud entre los metabolitos secundarios del aceite esencial entre *Haplopappus sp., H. foliosus* y *H. greenei*, aunque difieren en abundancia relativa.

Por otra parte, al realizar una asociación con los resultados espectroscópicos (FT-IR) se comprueba la presencia de los grupos funcionales caracterizados anteriormente.

Diversos factores pueden alterar la composición química de los aceites esenciales, como las condiciones intrínsecas (genéticas, etapa de crecimiento) y extrínsecas, como los procesos climáticos, estacionales, ambientales y de destilación. Estos factores deben ser considerados, así como el método de cultivo: fertilizantes, abonos y pesticidas; época de recolección y parte de la planta; manejo del material vegetal: fresco, seco o fermentado. (Dunkić et al., 2007; Ricaldi, 2014). En esta unidad de investigación, estas variables no fueron consideradas, ya que se trabajó con un material de herbolaria, que, si bien contaba con una ficha técnica, no informa cada uno de estos parámetros.

En el caso de *Haplopappus sp.* se obtuvo un quimiotipo más diverso, con una presencia mayoritaria (<5%) de α-curcumeno, (E)-nuciferol, (+)-spatulenol, y triciclo[3.2.1.0(2,7)]-2,3,4,5-tetrametiloct-3-eno (Figura 9).

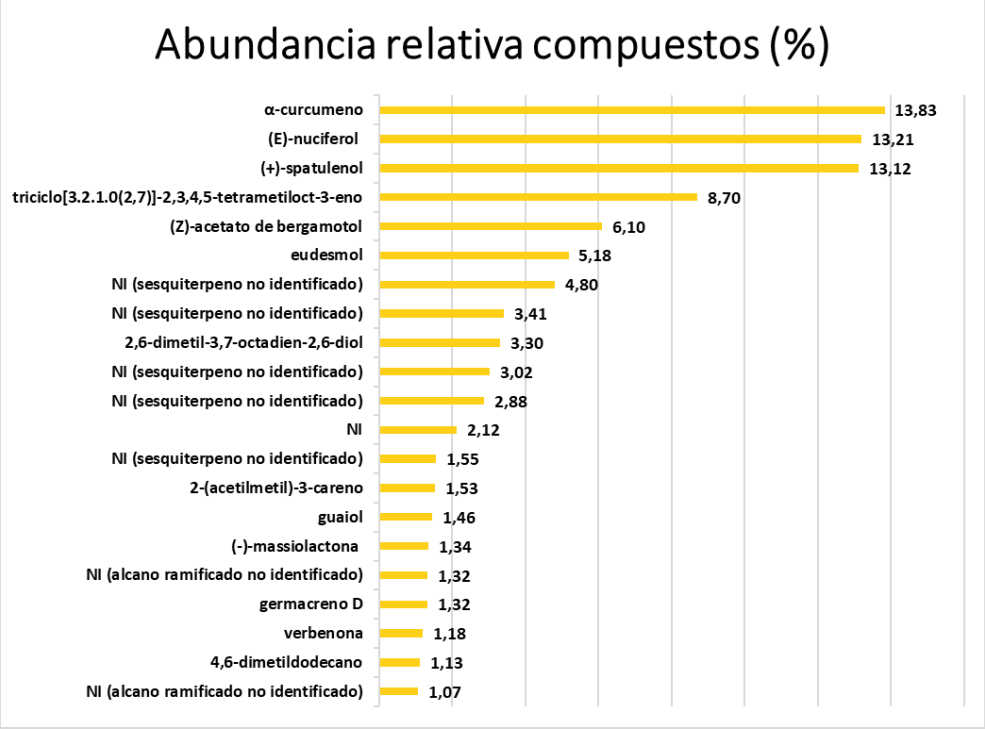


Figura 9. Abundancia relativa (%) del quimiotipo del aceite esencial de *Haplopappus sp.*.

Los compuestos de mayor proporción de la caracterización química del aceite esencial fueron en su mayoría sesquiterpenos, monoterpenos y alcanos ramificados (Figura 10).

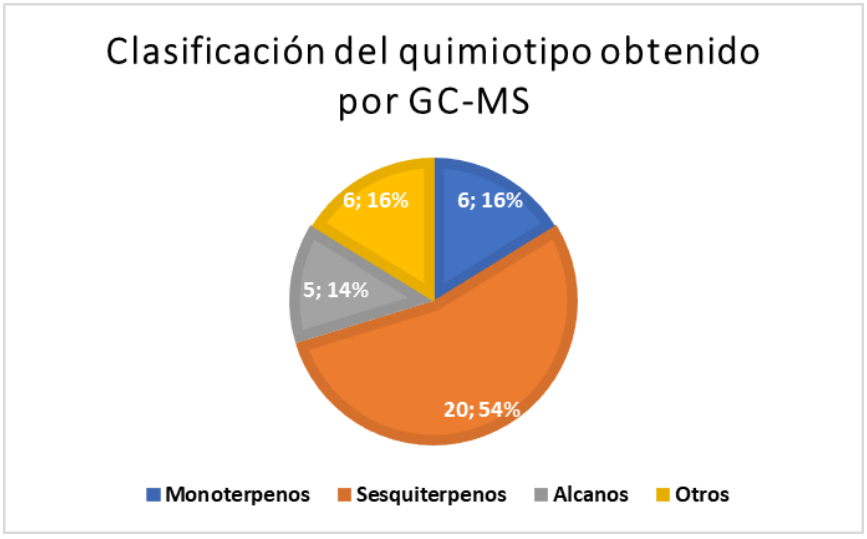


Figura 10. Metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Haplopappus sp.*.

Los metabolitos secundarios de las plantas se agrupan en cuatro clases principales: terpenos; compuestos fenólicos como cumarinas, flavonoides, lignina y taninos; glicósidos como saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos; y alcaloides (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009). Destacando en este caso los terpenos.

Los resultados obtenidos son novedosos dada la escasez de antecedentes reportados en la actualidad que respalden el quimiotipo del aceite esencial de *Haplopappus sp*. sugiriendo que continúe la investigación para la validación de los metabolitos identificados en este estudio. Se debe procurar hacer la identificación botánica dado que la especie utilizada en esta unidad de investigación se adquirió incorrectamente como *Haplopappus baylahuen* Remy, sin embargo, es rescatable que la identificación botánica permite validar la especie vegetal y con ello, finalmente, mediante este tipo de investigación, se puede informar el quimiotipo de la especie y así evitar la confusión entre especies. Esto no descarta que las especies tengan metabolitos similares, aunque varíen en las proporciones de emisión (% de abundancia relativa), como también puedan compartir propiedades terapéuticas similares.

4.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp.* en ensayos de difusión en agar (UDP).

Se evaluó la actividad antimicrobiana en ensayos de difusión en agar tanto de las cepas Gram negativas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Figura 11 y 12).

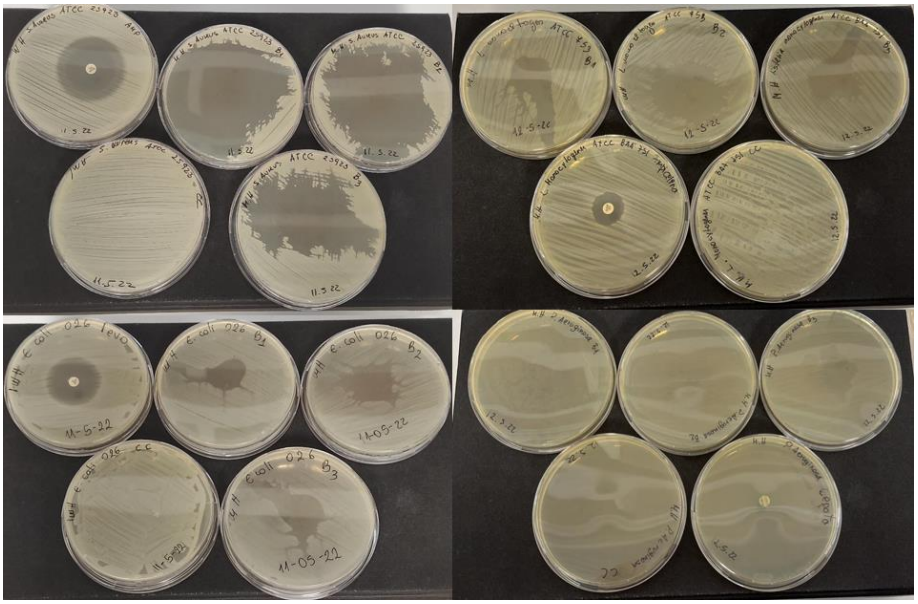


Figura 11. Ensayo de difusión en agar del aceite esencial de *Haplopappus sp.* en *S. aureus, L. monocytogenes, E. coli* y *P. aeruginosa*. Antibióticos: Ampicilina 10 µg, levofloxacino 5 µg, cefotaxima/ácido clavulánico 30/10 mg y levofloxacino 5 µg, respectivamente.

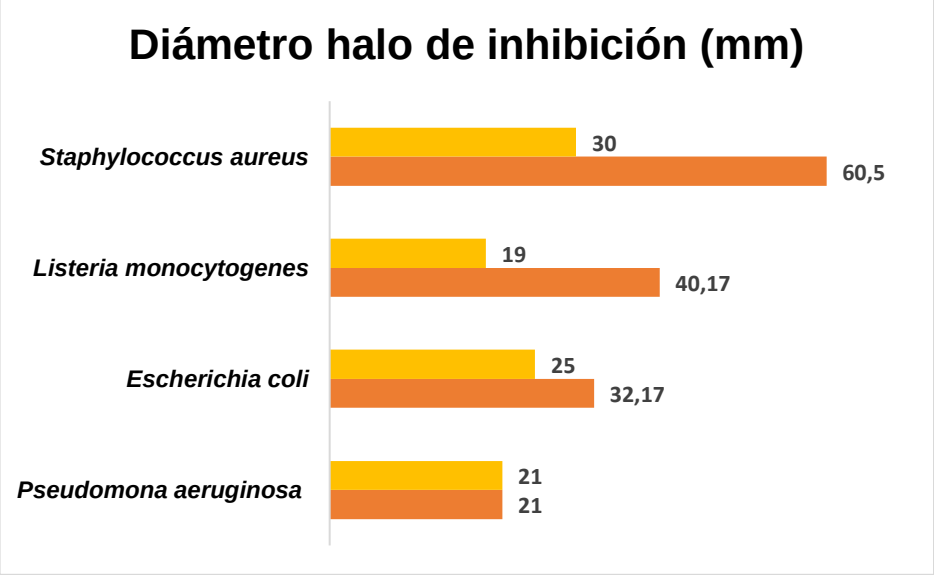


Figura 12. Gráfica de zonas de inhibición (mm) del aceite esencial de *Haplopappus sp*. en diferentes cepas bacterianas. En naranjo se encuentra la zona de inhibición resultante del aceite esencial de *Haplopappus sp* en *S. aureus, L. monocytogenes, E. coli* y *P. aeruginosa.* En amarillo antibióticos: Ampicilina 10 µg, levofloxacino 5 µg, levofloxacino 5 µg y cefotaxima/ácido clavulánico 30/10 mg, respectivamente.

El aceite esencial de *Haplopappus sp.* presentó actividad antibacteriana frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa.*

Los resultados preliminares del estudio de actividad antimicrobiana demuestran que el aceite esencial de *Haplopappus sp.* ejerció un fuerte efecto inhibitorio (> 20 mm) sobre 4 cepas bacterianas, destacando frente a *S. aureus*, mostrando un halo de inhibición de 60,5 mm promedio. Se podría afirmar que el aceite esencial presenta una mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas que Gram-negativas al comparar los diámetros de los halo de inhibición obtenidos, esto se puede atribuir a la relación estructura-actividad entre los compuestos del aceite esencial de *Haplopappus sp.* y las cepas estudiadas, también podría ser por un posible sinergismo de metabolitos secundarios, lo que lograria potenciar la actividad antimicrobiana.

Una variedad de métodos puede ser utilizada para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a antimicrobianos, el de uso más común en los laboratorios de microbiología es la difusión en agar estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido y algunos de crecimiento fastidioso (Cona T., 2002).

Las pruebas de susceptibilidad antibacteriana son técnicas importantes en muchas disciplinas de la ciencia y son utilizadas para determinar la resistencia de cepas a antimicrobianos y la eficacia de nuevos fármacos, es por esto por lo que los aceites esenciales emergen como una fuente potencial importante para la búsqueda de

medicamentos contra enfermedades causadas por microorganismos (Ramírez & Marín, 2012), entregando una nueva posibilidad de agentes antimicrobianos.

Los ensayos de susceptibilidad están indicados para apoyar la quimioterapia antimicrobiana de tratamiento en procesos infecciosos por bacterias en que la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir en forma confiable su susceptibilidad. Además, estos ensayos basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zona correlacionados con la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos (Prat, 2005).

Es por lo anterior mencionado, que el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo con tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards/NCCLS) (Mamani, 2015).

Rota et al. (2008) indican que la efectividad antimicrobiana del aceite esencial depende del tipo de microorganismo evaluado y clasificado en la zona de inhibición del crecimiento dentro de 3 categorías: $\geqslant$ 20 mm es fuertemente inhibitoria; < 20-12 mm inhibitoria moderado-leve; y ≤ 12 mm no es inhibitoria. Clasificando así el aceite esencial de *Haplopappus sp.* como un agente fuertemente inhibitorio frente a las cepas estudiadas, siendo estas bacterias sensibles frente al aceite esencial.

Urzúa et al, (1995) estudiaron la actividad antimicrobiana de exudados resinosos de diferentes especies de *Haploppapus* (*H. diplopappus*, *H. anthylloides, H. schumannii, H. cuneifolius, H. velutinus, H. uncinatus, H. multifolius, H. illinitus* y *H. foliosus*) en *E. Coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Las especies *H. anthylloides, H. schumannii, H. cuneifolius* y *H. uncinatus* mostraron ligera actividad frente a *E. coli* (9-10 mm de zona de inhibición); *H. diplopappus*, *H. anthylloides, H. multifolius* y *H. illinitus* ligera actividad frente a *P. aeruginosa*; y *H. uncinatus* mayor actividad (11-13 mm de zona de inhibición) y las demás especies ligera actividad en *S. aureus*.

Padilla et al, (2021) utilizó extractos etanólicos e infusiones de *H. multifolius* y *H. taeda* contra microorganismos patógenos, mostrando una alta actividad (inhibición moderada-leve) en bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* y *L. monocytogenes,* en comparación con una actividad débil en algunas bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, y *P. aeruginosa*. La relación entre el quimiotipo del aceite esencial de *Haplopappus sp*. y su actividad antimicrobiana se discuten en la sección 4.11.

4.7. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) del aceite esencial de *Haplopappus sp.* (UDP)

El aceite esencial de *Haplopappus sp.* mostró actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. La Tabla 6 muestra la CMI frente a estas bacterias.

Tabla 6. Valores de CMI para el aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp*. frente a cepas de *S. aureus, E. coli* y *P. aeruginosa.*

AE	CMI (µg/mL) *S. aureus*	CMI (µg/mL) *E. coli*	CMI (µg/mL) *P. aeruginosa*
Haplopappus sp.	8	64	64

La concentración mínima antimicrobiana del aceite esencial sobre el crecimiento de *S. aureus* fue menor en comparación con la CMI en *E. coli* y *P. aeruginosa*, dando un resultado similar al ensayo de difusión en agar, lo que se podría interpretar en que el aceite esencial de *Haplopappus sp.* tiene mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, por lo que podría ser selectivo a estas.

Actualmente, no existen estudios del aceite esencial de *Haplopappus sp.* como posible agente antimicrobiano, pero Ortiz et al. (2019) estudiaron la actividad antimicrobiana del extracto de acetato de etilo de *H. rigidus* en diferentes especies de bacterias, incluyendo *S. aureus* ATCC 25923, obteniendo una CMI >100 µg/mL. Comparando el aceite esencial de *Haplopappus sp*. con *H. rigidus*, indicaría que tiene una actividad fuertemente inhibitoria en esta cepa.

La OMS indica que la resistencia a los antimicrobianos supone una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial y requiere medidas por parte de todos los sectores del gobierno y la sociedad. La resistencia actual es un reto mayor para el futuro, por ello se han realizado diversas investigaciones desde los últimos 30 años del siglo pasado hasta nuestros días en todos los países, sobre todo para conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia y la creación de nuevos productos farmacéuticos y naturales para hacerle frente (Serra, 2017). Por lo que se podría señalar que el aceite esencial de *Haplopappus sp.* es una alternativa antimicrobiana frente a inconvenientes en el éxito de tratamiento de enfermedades bacterianas, debido a la resistencia que los microorganismos desarrollan frente al uso de fármacos convencionales.

4.8. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) del aceite esencial de *Haplopappus sp.* en *S. aureus* (UV)

Primero fue necesario determinar la CMI del cloranfenicol, para ser usado como control positivo. Se evaluaron 12 concentraciones del antibiótico (de 0,125 a 256,0 µg/mL). La CMI del cloranfenicol como control positivo sobre *S. aureus* (ATCC 29213) fue de 16 µg/mL, generando un % de inhibición de 94,7% (Figura 13). Por lo tanto, esta fue la concentración usada como control positivo en la evaluación del aceite esencial.

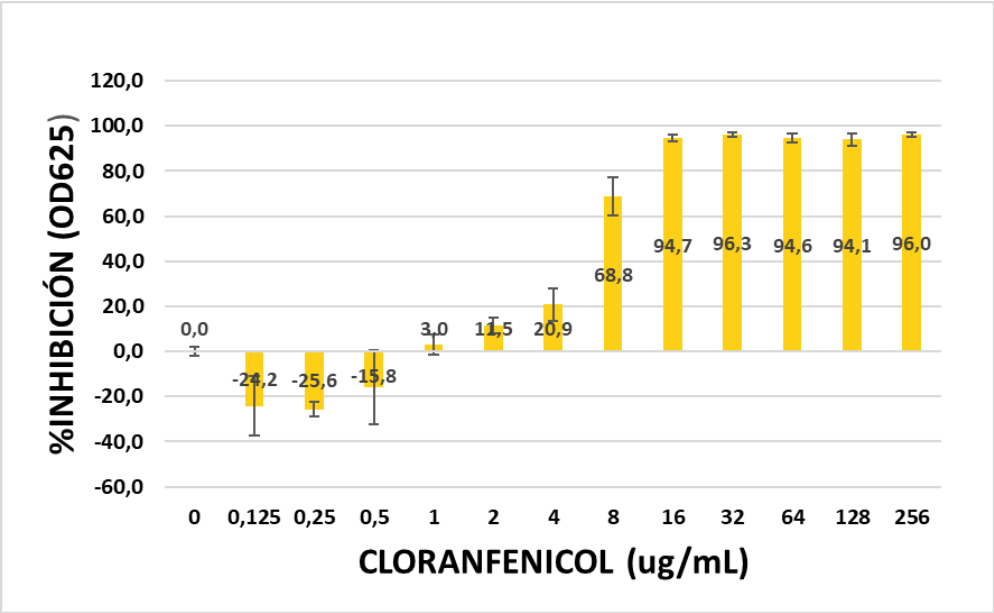


Figura 13. Efecto del cloranfenicol en *S. aureus* por microdilución en caldo.

Para determinar la CMI del aceite esencial de *Haplopappus sp.* en *S. aureus* se evaluaron 10 concentraciones (de 0.01 a 5.0%). Resultando una CMI de 2,5%, causando un % de inhibición de 96,7% (Figura 14).

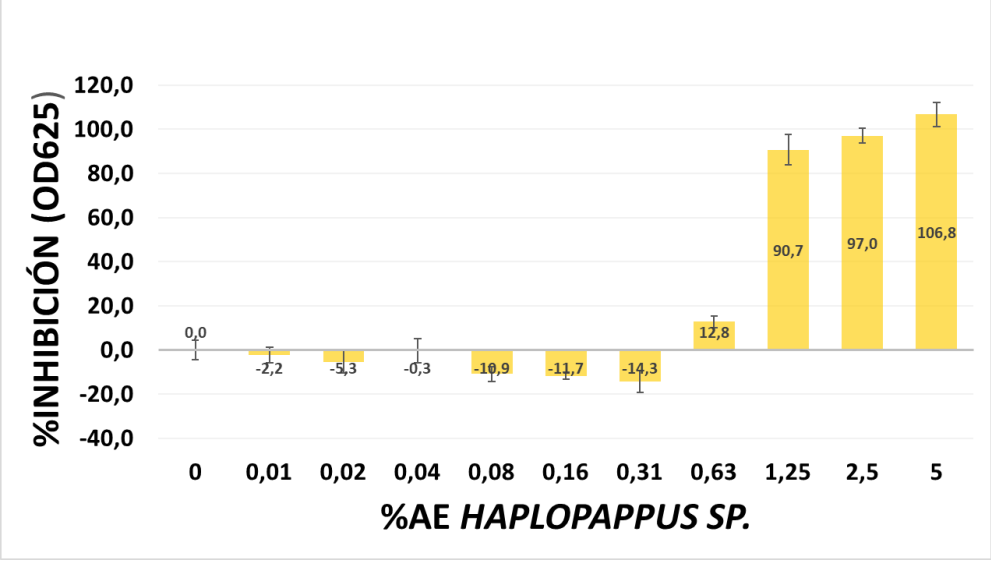


Figura 14. Efecto del aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp.* en *S. aureus* por microdilución en caldo.

El gráfico de porcentaje de proliferación del aceite esencial de *Haplopappus sp.* demuestra que, con concentraciones crecientes de aceite esencial, la tasa de inhibición celular

aumentó correspondientemente, en otras palabras, a mayor concentración del aceite esencial el porcentaje de proliferación es menor y a concentraciones bajas del aceite la tasa de proliferación es mayor, por lo que hay presencia de crecimiento bacteriano.

Este método es una prueba de susceptibilidad de dilución estandarizado, el cual proporciona ventajas: Los resultados generados por un método de prueba de dilución pueden ser cuantitativos (CMI), además de cualitativos (susceptible, intermedio y resistente). Los resultados cuantitativos aumentan el potencial para optimizar un régimen de dosificación basado en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que impulsan la eficacia clínica. En segundo lugar, los métodos de dilución en caldo permiten la prueba de bacterias cuyas características de crecimiento son menos susceptibles a las pruebas de difusión en disco (Miller et al., 2005).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. La CMI se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana (Horna et al., 2005).

En este procedimiento se preparan diluciones del antimicrobiano a estudiar utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo (Picazo, 2000). En este caso, al utilizar diferentes concentraciones del aceite esencial se determinó que a una concentración de 2,5% frente a *S. aureus* no se presenta crecimiento visible del microorganismo después de su incubación, es decir, a concentración 2,5% se obtiene como resultado un porcentaje de inhibición cercano al 100%.

Cueva, (2016) indica que los aceites esenciales son fuentes potenciales de nuevos compuestos antimicrobianos sobre todo contra patógenos bacterianos. Estudios *in vitro* han mostrado que los aceites esenciales inhiben el crecimiento bacteriano, pero varían en su eficacia debido a que los componentes químicos que actúan como agentes antimicrobianos varían en tipo y concentración.

Actualmente, no hay literatura referente a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Haplopappus sp.*, por lo que no se puede realizar una comparación de la CMI de *Haplopappus sp.* en *S. aureus*. Por otra parte, Ortiz et al., (2019) reportan que el extracto de *Haplopappus rigidus* Phil no presentó actividad inhibitoria observada en *Staphylococcus*, difiriendo con los resultados obtenidos, considerando que son de la misma familia. Esto se podría relacionar con que ambas especies presentan diferencias en su quimiotipo o en la abundancia relativa de los metabolitos secundarios que emiten, indicando que no todas las especies de *Haplopappus* presentan actividad antimicrobiana sobre *S. aureus.*

4.9. Conteo de colonias viables (UV)

S. aureus fue susceptible al aceite esencial de *Haplopappus sp.*, confirmando su actividad antibacteriana a concentraciones iguales o superiores a 1,25% (Figura 15).

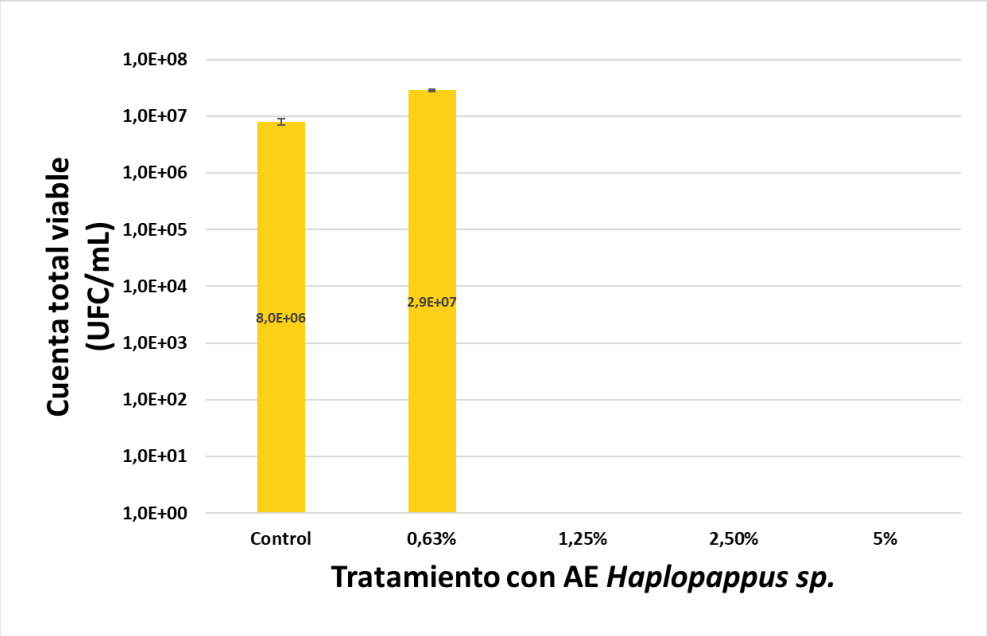


Figura 15. Cuenta total viable (UFC/mL) de *S. aureus* tratado con aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp.*

Se observa que hay inhibición bacteriana total (no hay presencia de crecimiento contalble) a partir de 1,25% de aceite esencial de *Haplopappus sp.*, siendo esta concentración la CMI del aceite esencial.

El método de conteo de colonias o unidades formadoras de colonias (UFC) es una estrategia para contabilizar microorganismos en muestras ambientales y de laboratorio, es un procedimiento fácil, rápido y económico. El método utilizado con más frecuencia para la medición de poblaciones bacterianas es el recuento en placa. Una ventaja importante de esta técnica es que mide el número de células viables. El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia y se suele informar como UFC. Cuando se realiza el recuento en placa es importante que crezca sólo un número limitado de colonias en la placa, en este caso el rango utilizado fue 3-30 colonias (Herigstad et al., 2001; Morales-García et al., 2016).

Por tanto, a concentraciones altas de aceite esencial de *Haplopappus sp.* no hay presencia de colonias contables, lo que refleja el efecto inhibitorio, por lo que se presume que al no presenciar células viables las bacterias no podrían crecer y dividirse para producir colonia (UFC), pero al utilizar una concentración de 0,63% de aceite esencial hay una cantidad

cercana al control, generando así células viables que crecen y se dividen para producir colonias.

4.10. Prevención de la formación de biopelículas (UV)

El aceite esencial de *Haploppapus sp.* fue efectivo frente a la prevención de la formación de biopelículas de *S. aureus* (Figura 16).

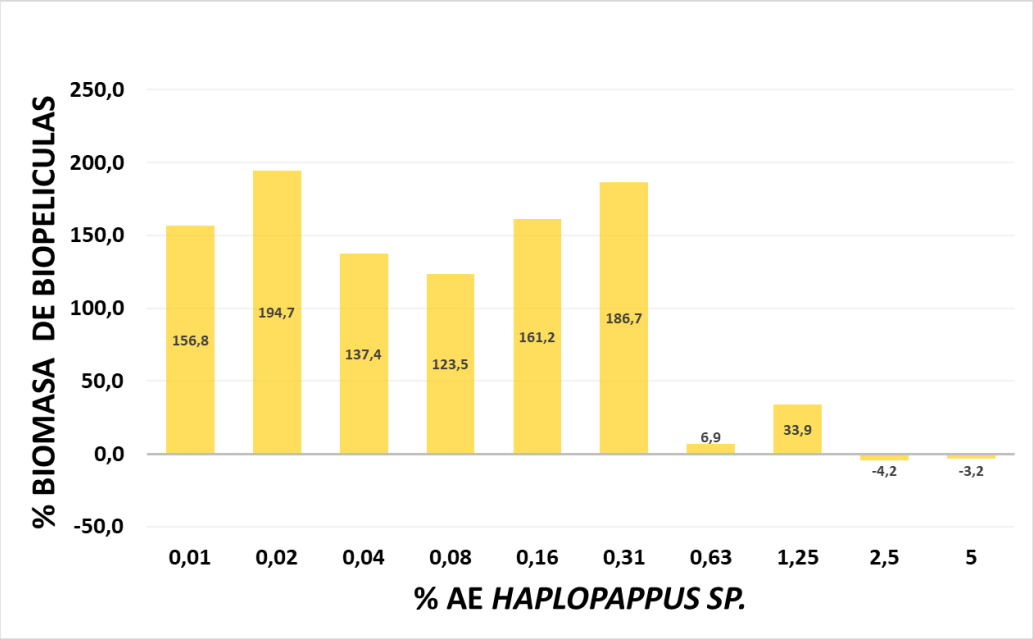


Figura 16. Formación de biopelículas de *S. aureus* frente al aceite esencial (AE) de *Haplopappus sp.*

El aceite esencial de *Haplopappus sp.* tiene efecto inhibitorio a concentraciones iguales o superiores al 2,5% (CMI) según lo determinado por el ensayo de microdilución en placa. A estas concentraciones, también se observa el efecto preventivo de la formación de biopelículas a través de la tinción cristal violeta. Este efecto inhibitorio también se observa, pero en menor medida a partir del 0,6%. Esto resulta interesante ya que el aceite esencial podría tener efecto inhibitorio de la formación de biopelícula a una concentración menor a su CMI medida por cuenta total viable. Es decir, a pesar de haber bacterias sobrevivientes (Figura 14), estas no serían capaces de formar la biopelícula, una forma de crecimiento microbiano que le confiere mayor resistencia a las condiciones ambientales.

En concentraciones menores a 1,25% se observó crecimiento de biopelícula en las paredes de las microplacas, por lo que los pozos de estas zonas se encontraron teñidos con cristal violeta. *S. aureus* es una bacteria Gram-positiva, por lo que tiene una capa gruesa de peptidoglucano (o mureína), la cual retiene el complejo de cristal violeta, generando así la tinción, ya sea en células vivas o muertas (Mollinedo Patzi & González Villalobos, 2014). Esta cepa puede generar biopelículas, debido a que produce poli-N-acetilglucosamina, el

cual constituye la matriz de la biopelícula, ayudando a adherirse a la superficie y colonizar, además así protege a las bacterias de la fagocitosis, pudiendo prolongar la infección y colonización (Charri & Huamán, 2017). Por lo que el aceite esencial de ***Haplopappus sp.*** a concentraciones ≥2.5% inhibe la formación de esta matriz, previniendo la formación de biopelículas en la superficie de los pocillos.

4.11. Relación entre el quimiotipo del aceite esencial de *Haplopappus sp.* y su actividad antimicrobiana

En la literatura se reportan diferentes metabolitos con actividad antimicrobiana, como *l*-linalool, 4-terpineol, verbenona, α-curcumeno, zingibereno, α-muuroleno, germacreno D, +/--trans-nerolidol, (+)-spatulenol, guaiol y eudesmol (Bonilla et al., 2016; Braca et al., 2008; Ćavar et al., 2008; Choudhary et al., 2007; Duman et al., 2019; Kuang et al., 2018; Mamani, 2015; Norajit et al., 2007; Ossa-Tabares et al., 2020). Estos forman parte del 39,22% de la abundancia relativa total del aceite esencial de *Haplopappus sp.* Todos estos compuestos son terpenos.

Los terpenos, también llamados terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). En los aceites esenciales los terpenos son los compuestos más abundantes, entre sesquiterpenos y monoterpenos. Los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios poseen un amplio espectro de actividad biológica, en particular antimicrobiana, como en este caso (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009; Bueno-Sánchez et al., 2009).

Mantilla, (2018) indica que el mecanismo de acción como agentes antimicrobianos no ha sido estudiado en gran detalle considerando el gran número de componentes químicos presentes en los aceites esenciales. Los aceites son altamente lipofílicos por lo que son capaces de disolverse en las membranas biológicas alterando estructuras y volviéndose más permeables permitiendo la salida de iones y otros contenidos celulares. También, los aceites esenciales se relacionan con bajas concentraciones y con cambios en la estructura celular, lo que podría inhibir la respiración y alterar la permeabilidad de la membrana celular del microorganismo, mientras que altas concentraciones provocarían daños severos a la membrana y la pérdida de homeostasis, dando lugar a la muerte celular.

En el caso de la lactona y alcanos presentes en la identificación química del aceite esencial de *Haplopappus sp.*, se tienen antecedentes como agentes antibacterianos. Se ha demostrado que (-)-massiolactona tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus.* Esto podría explicar el efecto inhibidor del aceite esencial en *S. aureus*, por ejemplo (Zhang et al., 2021).

5. CONCLUSIONES

La identificación química fue estudiada a base de la composición del aceite esencial de *Haplopappus sp*., evidenciando una abundancia relativa mayoritaria de sesquiterpenos. Este quimiotipo tendría relación con la actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus y L. monocytogenes*) con actividad fuertemente inhibitoria sobre bacterias Gram-positivas.

La CMI en cepa Gram-positiva fue menor en comparación con las bacterias Gram-negativas, indicando una posible selectividad al ser mayormente susceptibles al aceite esencial, debido a una posible relación estructura-actividad o sinergismo de los compuestos del aceite esencial de *Haplopappus sp*., especialmente por la abundancia relativa mayoritaria de terpenos, los cuales se relacionan con dicha actividad, además de la lactona presente en el quimiotipo.

Con estos resultados se comprueba que el aceite esencial de *Haplopappus sp*. tiene propiedad antimicrobiana, por lo que se podría potenciar su uso y futuras investigaciones contra otras cepas bacterianas de relevancia clínica. Este aceite esencial representa una promisión como agente natural para el desarrollo de formulaciones antimicrobianas, entregando una alternativa frente a la resistencia a antibióticos, así se podría disminuir la prolongación de estancias hospitalarias y aumento la mortalidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

Albornoz P. (s/a). Técnicas Histológicas Vegetal. HISTO–NOA, Histoteca Vegetal Virtual de la Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo-UNT. Revisión Online (Marzo 2022) (http://histonoa.csnat.unt.edu.ar/pdf/T%C3%A9cnicas_histol%C3%B3gicas_vegetal_Histo-NOA.pdf)

Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119–145.

Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., & Meza-López, C. (2018). Composición química y FTIR de extractos etanólicos de Larrea tridentata, Origanum vulgare, Artemisa ludoviciana y Ruta graveolens. *Agrociencia*, 309–321.

Becerra, J., Bittner, M., Hernández, V., Brintrup, C., Becerra, J., & Silva, M. (2010). Actividad de aceites esenciales de Canelo, Queule, Bailahuén y Culén frente a hongos fitopatógenos. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *9*(3), 212–215.

Bonilla, D. M., Mendoza, Y., Moncada, C. E., Murcia, O., Rojas, Á. P., Calle, J., Nerio, L., & Pinzón, R. (2016). Efecto del aceite esencial de Rosmarinus officinalis sobre Porphyromonas gingivalis cultivada in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, *45*(2), 275–287. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n2.59942

Braca, A., Siciliano, T., D'Arrigo, M., & Germanò, M. P. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of Momordica charantia seed essential oil. *Fitoterapia*, *79*, 123–125. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.002

Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R., & Stashenko, E. (2009). Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, *41*, 231–235. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=343835696004

Castillo, J., Gurrola, A., Herrera, T., Islas, Y., Márquez, A., Martínez, A., Ramírez, S., & Ramírez, V. (2013). Métodos de Separación y Purificación de Sustancias. Manual de Prácticas. In *Métodos de Purificación y Separación de sustancias* (pp. 60–134).

Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., & Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. *Food Chemistry*, *111*, 648–653. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.033

Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización.* [Tesis de pregrado, Universidad de Valladolid]. ANIPAM - Asociación Nacional Interprofesional de Plantas Aromáticas y Medicinales https://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.pdf

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, M. (2014). Características generales del Staphylococcus aureus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio*, *61*(1), 28–40. https://doi.org/10.1108/eb020168

Charri Macassi, K. M., & Huamán Torres, C. F. (2017). *Actividad del aceite esencial de*

Cinnamomum zeylanicum "Canela" frente a biopelículas de Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus inducidas in vitro sobre lentes de contacto blandos". [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Choudhary, M. I., Batool, I., Atif, M., Hussain, S., & Atta-ur-Rahman. (2007). Microbial transformation of (-)-guaiol and antibacterial activity of its transformed products. *Journal of Natural Products*, *70*, 849–852. https://doi.org/10.1021/np068052a

Ciler, M. (2009). Calcium oxalate crystals in Aster squamatus and Bellis perennis (Asteraceae: Astereae). *Phytologia Balcanica*, *15*(2), 255–259. https://doi.org/https://doi.org/10.17129/botsci.259

Cona T., E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectologia*, *19*(2), 77–81. https://doi.org/10.4067/s0716-10182002019200001

Coronel, I., & Piedra, J. (2014). *Estudio de las propiedades físicas y composición química de los aceites esenciales de las hojas de Peperomia inaequalifolia Ruiz & Pav. y Piper pubinervulum C. DC., y del rizoma de Renealmia thyrsoidea subsp. thyrsoidea* [Tesis de pregrado]. Universidad Politécnica Salesiana Ecuador https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6632

Cueva, L. (2016). *Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Citrus limon sobre el crecimiento de Listeria monocytogenes* [Tesis de pregrado]. UNT - Universidad Nacional de Trujillo https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9024.

Cymerman, A. (1962). *Características y composición de los aceites esenciales de algunas especies aromáticas de Río Negro* [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Biblioteca Digital FCEN - UBA http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1139_Cymerman.pdf

Demirci, B., Baser, K. H. C., Tabanca, N., & Wedge, D. E. (2006). Characterization of volatile constituents of Haplopappus greenei and studies on the antifungal activity against phytopathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3146–3150. https://doi.org/10.1021/jf053222v

Dizeo de Strittmater, C. (1973). Nueva Técnica de diafanización. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 15 (1): 126-129.

Domínguez, Xorge (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. https://books.google.cl/books?id=YwGStgAACAAJ

Duman, A., Telci, I., Dayisoylu, K., Digrak, M., Demirtas, Í., & Alma, M. (2019). Evaluation of Bioactivity of Linalool-rich Essential Oilsfrom Ocimum basilucum and Coriandrum sativum Varieties. *Natural Product Communications*, *5*(6), 969–974.

Dunkić, V., Bezić, N., Ljubešić, N., & Bočina, I. (2007). Glandular hair ultrastructure and essential oils in Satureja subspicata Vis. ssp. subspicata and ssp. liburnica Šilić. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *49*(2), 45–51.

Elgueta, E., Mena, J., & Orihuela, P. (2021). Hydroethanolic Extracts of Haplopappus baylahuen Remy and Aloysia citriodora Palau Have Bactericide Activity and Inhibit the Ability of Salmonella Enteritidis to Form Biofilm and Adhere to Human Intestinal Cells.

BioMed Research International, 1–9. https://doi.org/10.1155/2021/3491831

ESCMID. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *EUCAST Discussion Document*, *9*, 1–7. http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x

Espinosa, N., & Rocha, A. (2019). Los aceites esenciañes y su importancia. *Planta*, *15*(26), 1–72.

Flores, D., & Rodríguez, N. (2008). *Plantas medicinales de la familia Asteraceae con actividad antimicrobiana* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México https://repositorio.unam.mx/contenidos/327289.

Fuentes, J., & Rodríguez, H. (2020). Constantes físicas de compuestos orgánicos: Punto de fusión, de ebullición, densidad e índice de refracción. *Academia*, 3–5. https://www.academia.edu/36279829/Constantes_físicas_de_compuestos_orgánicos_Punto_de_fusión_de_ebullición_densidad_e_índice_de_refracción

García, R., & Loría, R. (1974). Estudio preliminar de un preparado nematocida. Una experiencia negativa pero de gran utilidad. *Revista Médica Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz*, *9*(1), 69–74.

García, S. (2010). Caracterización fisicoquímica de aceite esencial de limón de Tucumán. *Cuartas Jornadas de Jóvenes Investigadores UNT - CONICET*, 1–9. http://scait.ct.unt.edu.ar/pubjornadas2010/trabajos/199.pdf

González, B., Vogel, H., Razmilic, I., San Martín, J., & Doll, U. (2012). Biomass, resin and essential oil content and their variability in natural populations of the Chilean crude drug “bailahuén” (Haplopappus spp.). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *11*(1), 66–73.

González, B., Vogel, H., & Martín, J. S. (2017). Histological leaf characterization of four Bailahuen species (Haplopappus spp.) for taxonomic identification for quality control of the drug. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 4, 41–45. doi:10.1016/j.jarmap.2016.08.0

Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletin Intexter (U.P.C.)*, *122*, 35–41.

Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *44*, 121–129. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4

Heuskin, S., Godin, B., Leroy, P., Capella, Q., Wathelet, J.-P., Verheggen, F., Haubruge, E., & Lognay, G. (2008). Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of Matricaria chamomilla L. (Asteraceae) and Nepeta cataria L. (Lamiaceae). *Journal of Chromatography A*, *1216*, 2768–2775. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.109

Jansen, R., Michaels, H., Wallace, R., Kim, K.-J., Keeley, S., Watson, L., & Palmer, J. (1992). Chloroplast DNA Variation in the Asteraceae: Phylogenetic and Evolutionary Implications. *Molecular Systematics of Plants*, 252–279. https://doi.org/10.1007/978-1-

4615-3276-7_11

Kuang, C., Lv, D., Shen, G., Li, S., Luo, Q., & Zhang, Z. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of volatile oil extracted from Chrysanthemum morifolium Ramat. *Food Scientist & Technologists*, *55*(7), 2786–2794.

La Guía MetAs. (2008). Metrología de Refracción. In *La guía MetAs* (Vol. 12, p. 3). MetAs & Metrólogos Asociados.

Leaman, D., Walter, S., Laird, S. A., Pierce, A. R., Lange, D., Lagos-witte, S., Kumba, F. F., Katjivena, H., Hofbauer, N., Bhattarai, N., Karki, M., & Mcguffin, M. (2007). Medicinal Plant Conservation. *Newsletter of the Medicinal Plant Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission*, *138*, 1–31.

Mamani, E. (2015). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de Aloysia triphylla (Cedrón) sobre cepas de Escherichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus y Bacillus cereus* [Tesis de pregrado]. Universidad Alas Peruanas https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/4226?show=full

Mantilla, C. (2018). *Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto Citrus paradisi ("tangelo") frente a Staphylococcus aureus in vitro*. [Tesis de pregrado] Universidad Alas Peruanas https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/3005

Miller, R. A., Walker, R. D., Carson, J., Coles, M., Coyne, R., Dalsgaard, I., Gieseker, C., Hsu, H. M., Mathers, J. J., Papapetropoulou, M., Petty, B., Teitzel, C., & Reimschuessel, R. (2005). Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*, *64*, 211–222. https://doi.org/10.3354/dao064211

MINSAL. (2010). *MHT: Medicamentos Herbarios Tradicionales*.

Mollinedo Patzi, M. A., & González Villalobos, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica*, *49*, 2609–2613. https://doi.org/10.2307/j.ctvkjb56f.8

Mondragón, P. (2017). Espectroscopía de infrarrojo para todos. In *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.* (Primera). CIATEJ. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf

Morales-García, Y., Hernández-Canseco, J., Ramos-Castillo, G., Pérez y Terron, R., & Muñoz-Rojas, J. (2016). Cuantificación de Penicillium sp. por el método de goteo en placa. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, *3*(2), 12–19.

Muley, B., Khadabadi, S., & Banarase, N. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of Calendula officinalis Linn (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *8*(5), 455–465.

Muñoz M., O., Montes, M., & Wilkomirsky, T. (2004). *Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología*. https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/19111#.YVOqrPDCVxE.mendeley

Muthumperuma, C., Stalin, N., Das, A., & Sudhakar Swamy, P. (2016). Chemical profiling of leaf essential oil, Antioxidant potential and Antibacterial activity of Syzygium

lanceolatum (Lam.) Wt. & Arn. (Myrtaceae). *Free Radicals and Antioxidants*, *6*(1), 1–10. https://doi.org/10.5530/fra.2016.1.2

National Committee for Clinical Laboratory Standards, N. (2015). M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, *35*(M02-A12), 73. www.clsi.org.

Norajit, K., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2007). Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. *Molecules*, *12*, 2047–2060. https://doi.org/10.3390/12082047

Obregon Mariano, E. W. (2018). *Analisis comparativo de la hidrodestilación co el arrastre de vapor para la extracción de aceites esenciales de la cascara de naranja*. [Tesis de pregrado] Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión.

Ortiz, S., Lecsö-Bornet, M., Bonnal, C., Houze, S., Michel, S., Grougnet, R., & Boutefnouchet, S. (2019). Bioguided identification of triterpenoids and neolignans as bioactive compounds from anti-infectious medicinal plants of the Taira Atacama's community (Calama, Chile). *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2018.10.029. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30412750.

Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes.* (1st ed.). Editorial AIYANA.

Ossa-Tabares, J. C., Llanos, C. J., & García, A. M. (2020). Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) ATCC 6919. *Biomédica*, *40*, 693–701. https://doi.org/10.7705/biomedica.5122

Padilla, C., Lobos, O., Poblete-Tapia, P., & Carrasco-Sánchez, V. (2021). Antimicrobial activity of bioactive compounds of Haplopappus multifolius and haplopappus taeda against human pathogenic microorganisms. *Iranian Journal of Microbiology*, *13*(1), 98–103. https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5498

Picazo, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *1*(11), 1–54.

Prat, S. (2005). Prueba de suceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. *Instituto de Salud Pública de Chile*, 40. http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf

Ramírez, L., & Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica*, *17*(50), 152–157. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84923878022

Ricaldi, J. (2014). *Análisis GC-MS de la composición fitoquímica del aceite esencial de Chiuyche (Satureja incana)* [Tesis de postgrado]. In Universidad Nacional Del Centro Del Perú https://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/3186

Roldan, R., Gurni, A., & Bassols, G. (2007). Estudio micrografico de tres especies del género Haplopappus -Asteraceae-. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *6*(5), 217–218.

Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. *Food Control*, *19*(7), 681–687. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007

Ruiz-Reyes, E., & Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *CENIC Ciencias Biológicas*, *46*(1), 9–24. http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB 21-14_M.pdf

Salinas, Ruth & García, Margarita & Velásquez, Aurora. (2016). Biotecnología y etnomedicina para el desarrollo humano. Crea Ciencia Revista Científica, *9*(2), 46–55. 10.5377/creaciencia.v9i2.2874.

Salomé-Abarca, L. F., Soto-Hernández, R. M., Cruz-Huerta, N., & González-Hernández, V. A. (2015). Chemical composition of scented extracts obtained from calendula officinalis by three extraction methods. *Botanical Sciences*, *93*(3), 633–638. https://doi.org/10.17129/botsci.143

Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Medicas, 16(3), 402–419. Disponible en: http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013

Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, *2*, 29–47. http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a3.pdf

Stashenko, Elena E, & Martínez, J. R. (2010). GC y GC-MS : Configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, *2*(3), 33–59. http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n3/v2n3a3.pdf

Téllez, C. (2019). *Aplicaciones de la Espectroscopía Infrarroja en el análisis de alimentos* [Tesis de pregrado]. Universidad de Sevilla. https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/91690/TÉLLEZ MESA%2C CLARA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Torres, R., Faini, F., Delle Monache, F., & Delle Monache, G. (2004). Two new O-geranyl coumarins from the resinous exudate of Haplopappus multifolius. *Fitoterapia*, *75*(1), 5–8. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2003.06.003

Tortosa, R., & Bartoli, A. (2002). Revisión de las especies argentinas del género Haplopappus (Asteraceae, Astereae). *Boletín Sociedad Argentina*, *37*(1–2), 115–133.

Urzúa, A., Jara, F., Tojo, E., Wilkens, M., Mendoza, L., & Rezende, M. C. (2006). A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudate of Haplopappus uncinatus. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*, 297–301. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.042

Urzúa, A., Torres, R., Muñoz, M., & Palacios, Y. (1995). Comparative antimicrobial study of the resinous exudates of some Chilean Haplopappus (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *45*, 71–74. https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01196-7

Urzúa, Alejandro, Santander, R., Echeverria, J., Cabezas, N., Palacios, S. M., & Rossi, Y. (2010). Insecticide properties of the essential oils from haplopappus foliosus and Bahia Ambrosoides against the house fly, Musca Domestica L. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *55*(3), 392–395. https://doi.org/10.4067/S0717-97072010000300026

Villagra, C., Vera, W., Lenitz, S., & Bergmann, J. (2021). Differences in volatile emissions between healthy and gall-induced branches of Haplopappus foliosus (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume *98*, 104309, ISSN 0305-1978, https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104309. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197821000879)

Vogel, H., González, M., Faini, F., Razmilic, I., Rodríguez, J., San Martín, J., & Urbina, F. (2005). Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-species known as bailahuén. *Journal of Ethnopharmacology*, *97*(1), 97–100. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.027

Zhang, H. Q., Chi, Z., Liu, G. L., Zhang, M., Hu, Z., & Chi, Z. M. (2021). Metschnikowia bicuspidate associated with a milky disease in Eriocheir sinensis and its effectitve treatment by Massoia lactone. *Microbiological Research*, *242*. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126641

1. Adams, R.P.; González Elizondo, M.S.; González Elizondo, M.; Slinkman, E., *DNA fingerprinting and terpenoid analysis of Juniperus blancoi var. huehuentensis (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico*, Biochem. Syst. Ecol., 2006, 34, 3, 205-211, https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.11.004.

2. Maia, J.G.S.; Andrade, E.H.A.; da Silva, A.C.M.; Oliveira, J.; Carreira, L.M.M.; Araújo, J.S., *Leaf volatile oils from four Brazilian Xylopia species*, Flavour Fragr. J., 2005, 20, 5, 474-477, https://doi.org/10.1002/ffj.1499.

3. Nickavar, B.; Salehi-Sormagi, M.H.; Amin, Gh.; Daneshtalab, M., *Steam volatiles of Vaccinium arctostaphylos*, Pharm. Biol., 2002, 40, 6, 448-449, https://doi.org/10.1076/phbi.40.6.448.8449.

4. Gkinis, G.; Tzakou, O.; Iliopoulou, D.; Roussis, V., *Chemical Composition and Biological Activity of Nepeta parnassica Oils and Isolated Nepetalactones*, Z. Naturforsch. C:, 2003, 58, 681-686.

5. Isidorov, V.; Zenkevich, I.; Sacharevich, T., *Calculation of Gas Chromatographic Retention Indices for Monoterpenes and Terpenoids from Their Physico-Chemical Constants*, Chem. Anal. (Warsaw), 1997, 42, 627-634.

6. Jardin, C.M.; Jham, G.N.; Dhingra, O.D.; Freire, M.M., *Composition and Antifungal activity of the essential oil of the Brazilian Chenopodium ambrosioides L.*, J. Chem. Ecol., 2008, 34, 9, 1213-1218, https://doi.org/10.1007/s10886-008-9526-z.

7. Liu, Y., Xu, X.-L., and Zhou, G.-H. 2007. Comparative study of volatile compounds in traditional Chinese Nanjing marinated duck by different extraction techniques. Int. J. Food Sci. Technol. 42:543-550.

8. Marongiu, B.; Porcedda, A.P.S.; Casu, R.; Pierucci, P., *Chemical composition of the oil and supercritical CO2 extract of Schinus molle L.*, Flavour Fragr. J., 2004, 19, 6, 554-558, https://doi.org/10.1002/ffj.1350.

9. Andriamaharavo, N.R., Retention Data. NIST Mass Spectrometry Data Center., NIST Mass Spectrometry Data Center, 2014.

10. Ament K.; Kant M.R.; Sabelis M.W.; Haring M.A.; Schuurink R.C., *Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants*, Plant Physiol., 2004, 135, 1, 483-495, https://doi.org/10.1104/pp.103.038315.

11. Ferhat, M.A.; Tigrine-Kordjani, N.; Chemat, S.; Meklati, B.Y.; Chemat, F., *Rapid Extraction of Volatile Compounds Using a New Simultaneous Microwave Distillation: Solvent Extraction Device*, Chromatographia, 2007, 65, 3-4, 217-222, https://doi.org/10.1365/s10337-006-0130-5.

12. Adams, R.P.; Morris, J.A.; Pandey, R.N.; Schwarzbach, A.E., *Cryptic speciation between Juniperus deltoides and Juniperus oxycedrus (Cupressaceae) in the Mediterranean*, Biochem. Syst. Ecol., 2005, 33, 8, 771-787, https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.01.001.

13. da Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A.; Zoghbi, M.G.B.; Luz, A.I.R.; da Silva, J.D.; Maia, J.G.S., *The essential oils of Lantana camara L. occurring in North Brazil*, Flavour Fragr. J., 1999, 14, 4, 208-210, https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-

1026(199907/08)14:4<208::AID-FFJ811>3.0.CO;2-F

14. Tepe, B.; Askin Akpulat, H.; Sokmen, M.; Daferera, D.; Yumrutas, O.; Aydin, E.; Polissiou, M.; Sokmen, A., *Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of Pimpinella anisetum and Pimpinella flabellifolia from Turkey*, Food Chem., 2006, 97, 4, 719-724, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.045.

15. Radulovic, N.; Dordevic, N.; Markovic, M.; Palic, R., *Volatile constituents of Glechoma Hirsuta Waldst. Kit. and G. Hederacea L. (Lamiaceae)*, Bull. Chem. Soc. Ethiop., 2010, 24, 1, 67-76, https://doi.org/10.4314/bcse.v24i1.52962.

16. Zeng, Y.-X.; Zhao, C.-X.; Liang, Y.-Z.; Yang, H.; Fang, H.-Z.; Yi, L.-Z.; Zeng, Z.-D., *Comparative analysis of volatile components from Clematis species growing in China*, Anal. Chim. Acta., 2007, 595, 1-2, 328-339, https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.022

17. Zhao C.X.; Li, X.N.; Liang Y.Z.; Fang H.Z.; Huang L.F.; Guo F.Q., *Comparative analysis of chemical components of essential oils from different samples of Rhododendron with the help of chemometrics methods*, Chemom. Intell. Lab. Syst., 2006, 82, 1-2, 218-228, https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.08.008.

18. Bartley, J.P.; Jacobs, A.L., *Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger (Zingiber officinale)*, J. Sci. Food Agric., 2000, 80, 2, 209-215, https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000115)80:2<209::AID-JSFA516>3.0.CO;2-8 .

19. Stokes, S.L.; Cole, R.A.; Rangelova, M.P.; Haber, W.A.; Setzer, W.N., *Cruzain inhibitory activity of the leaf essential oil from an undescribed species of Eugenia from Monteverde, Costa Rica*, Natural Product Communications, 2007, 2, 12, 1211-1213.

20. Lawal, O.A.; Oyedelji, A.O., *Chemical composition of the essential oils of Cyperus rotundus L. from South Africa*, Molecules, 2009, 14, 8, 2909-2917, https://doi.org/10.3390/molecules14082909

21. Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

22. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 91749962, (Z)-alpha-Bergamotol acetate. Retrieved July 4, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Z_-alpha-Bergamotol-acetate#section=Computed-Properties.