

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA

Facultad de Ciencias de la Salud Escuela de Farmacia

Potencial antimicótico y antibacterial *in vitro* de la colofonia y la trementina, derivados de la resina oleosa de la conífera endémica *Pinus occidentalis*, en el municipio de Jarabacoa, Provincia La Vega.



Trabajo de Grado presentado por
Werner Schulz Calvo

Para la Obtención del Grado de
Licenciado en Farmacia

Santo Domingo D.N.

2014

DEDICATORIA

El siguiente trabajo de grado va especialmente dedicado a mis padres Alba Gladys Calvo y Werner Schulz, por el apoyo incondicional que me proporcionaron en todo momento; a mi segunda madre Dany Calvo de Thom, a mis hermanos, familia y amigos cercanos.

Gracias por el apoyo directo o indirecto brindado.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta investigación hubiese sido imposible sin la colaboración de las personas que menciono a continuación:

Primeramente a mi querida profesora y asesora; Lic. Carolina Lerebours, MSc. por su entrega y dedicación, además de hacer también suya esta investigación. Gracias por ser mi guía en esta interesante aventura.

A la Lic. Marixa Ramírez Ramírez, por compartir conmigo sus conocimientos de manera desinteresada, siempre en disposición de ayudarme con la realización de varias pruebas indispensables para esta investigación.

A la Lic. Ana Mercedes Brito, por su esfuerzo y su impecable trabajo en la parte de bioanálisis, que terminó arrojando varios de los frutos esperados. Gracias por su compromiso para con este trabajo.

Al Lic. Manuel Vázquez Tineo, MSc. por sus consejos y recomendaciones, además de facilitarme las instalaciones de LINFLAMED para la realización de las pruebas y experimentos.

A la Lic. Norma Rodríguez del departamento de control de calidad del Laboratorio Veterinario Central LAVECEN, por prestar sus servicios en el análisis cromatográfico de las muestras.

También a todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron con mi tesis.

Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL.....Página

CAPITULO I – ASPECTOS INICIALES DE LA INVESTIGACIÓN

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
OBJETIVOS: General y Específicos.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	15

CAPITULO II – MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1	Descripción del área de estudio.....	17
2.2	Fitoterapia e Historia.....	18
2.3	Actividad biológica de los Fitoterapéuticos.....	19
2.4	Antimicrobianos.....	20
2.4.1	Antifúngicos Naturales.....	20
2.5	Coníferas.....	22
2.5.1	<i>Pinaceae</i>	23
2.5.2	Género <i>Pinus</i>	23
2.5.3	<i>Pinus occidentalis</i>	24
2.5.3.1	Taxonomía.....	25
2.5.3.2	Distribución geográfica del <i>P. occidentalis</i>	25
2.5.3.3	Fenología.....	25
2.5.3.4	Adecuación al sitio.....	26
2.5.3.5	Factores que influyen en la producción del bosque de Pino Criollo.....	27
2.6	Resina Oleosa de pino.....	28
2.6.1	Trementina.....	29
2.6.2	Colofonia.....	29
2.7	Composición química de la resina oleosa.....	30
2.7.1	Terpenos.....	31
2.7.2	Pineno y ácidos resínicos, "potencial farmacológico".....	32
2.7.3	Componentes neutros de la resina oleosa.....	34

2.7.4	Reactividad de los terpenoides de la Trementina.....	34
2.7.5	Reactividad del ácido abiético de la Colofonia.....	35
2.8	Microbiología.....	36
2.8.1	Hongos.....	36
2.8.2	Bacterias.....	38
2.8.3	Microorganismos patógenos.....	40
2.8.4	Dermatofitos.....	41
2.9	Bacterias seleccionados.....	42
2.9.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.9.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
2.9.3	<i>Salmonella typhi</i>	44
2.9.4	<i>Proteus mirabilis</i>	45
2.10	Hongos seleccionados.....	45
2.10.1	<i>Candida albicans</i>	45
2.10.2	<i>Microsporium canes / M. gypsiun</i>	46
2.10.3	<i>Trichophyton rubrum</i>	47
CAPITULO III – MARCO METODOLÓGICO		
3.1	Descripción del área de estudio.....	49
3.2	Dimensión de la investigación.....	49
3.3	Tipo de estudio.....	50
3.4	Universo.....	50
3.5	Muestra.....	50
3.6	Técnicas de recolección de datos.....	50
3.6.1	Revisión bibliográfica.....	50
3.6.2	Observación de campo.....	51
3.6.3	Recolección de la muestra.....	51
3.6.4	Técnicas de investigación.....	51
3.7	Metodología experimental.....	52
3.7.1	Aceites Esenciales.....	52
3.7.2	Destilación por arrastre de vapor, para la obtención de los derivados de la resina.....	53
3.7.3	Extracto alcohólico.....	54

3.7.3.1	Preparación de la solución hidroalcohólica de colofonia.....	54
3.7.4	Antibiograma.....	56
3.7.4.1	Agar Sabouraud.....	57
3.7.4.2	Método de difusión en Agar o Técnica de Kirby Bauer.....	58
3.7.4.3	Método de dilución (Escala de Mc Farland).....	59
3.7.4.4	Interpretación de los halos de inhibición.....	62
3.7.5	Fundamentos de la Cromatografía de Gases/Masa (GC-MS).....	63
3.7.5.1	Análisis cromatográfico de la trementina.....	64
3.7.5.2	Análisis cromatográfico de la solución hidroalcohólica de colofonia.....	64

CAPITULO IV – ASPECTOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN

4.1	Resultados.....	66
4.1.1	Tabulación de los resultados de los antibiogramas.....	66
4.1.2	Tabulación de los resultados de los hongos analizados.....	67
4.1.3	Tabulación de los resultados de las bacterias analizadas.....	68
4.1.4	Cultivos con presencia de halos de inhibición.....	69
4.1.5	Resultados de la cromatografía.....	72
4.2	Discusión y análisis de resultados.....	73
4.3	Conclusiones.....	75
4.4	Recomendaciones.....	77
4.5	Bibliografía.....	79
4.5.1	Sitios web.....	84
4.5.2	Imágenes y gráficos.....	85
4.6	Anexos.....	86
4.6.1	Acrónimos.....	86
4.6.2	Glosario.....	87
4.6.3	Certificación Jardín Botánico Nacional.....	91
4.6.4	Resultados de la Cromatografía Gas/Masa.....	91

CAPÍTULO I
ASPECTOS INICIALES DE LA INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Este trabajo se realizó con el fin de observar y determinar el efecto antimicrobiano de los derivados de la resina oleosa del pino endémico dominicano, comúnmente llamado Pino Criollo, *Pinus occidentalis*. Los derivados en cuestión son la trementina y colofonia pura, que fueron obsequiados por la Fábrica de Trementina de Jarabacoa, Eeli Ylitalo y Sucesores, ubicada en el municipio de Jarabacoa, provincia La Vega.

Se elaboró un extracto alcohólico del derivado resinoso de colofonia, mientras que la trementina, por ser un aceite esencial, se utilizó en estado puro. Las cepas patógenas ante las cuales se comprobó el efecto antimicrobiano de las sustancias, fueron las siguientes: Cepas bacterianas utilizadas; *Estafilococo aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Proteus mirabilis*; Cepas de hongos y levaduras; *Microsporum canes*, *Microsporum gypsum*, *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*. Estos microorganismos fueron otorgados por la sección de Micología del Instituto Dermatológico y Cirugía de la Piel Dr. Huberto Bogaert Díaz (IDCP) y el Laboratorio Clínico Amadita, ubicados en Santo Domingo, Distrito Nacional.

Se utilizaron dos métodos de Antibiograma para el análisis de las muestras, el método de difusión para la susceptibilidad *in vitro* de las bacterias en cuestión y el método de dilución para el análisis de la susceptibilidad *in vitro* de los hongos, frente a la colofonia y la trementina, previamente adecuadas para estas pruebas. Los controles positivos utilizados en ambos casos fueron; para las siembras por difusión, discos impregnados de antibióticos convencionales de amplio espectro, y para los hongos sembrados por dilución, 50 microlitros de Ketoconazol. En los controles negativos, se utilizó agua y dimetil sulfóxido respectivamente.

Al analizar los resultados de los diferentes ensayos se observó que el extracto etanólico de colofonia presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Microsporum canes*, *Microsporum gypsum*, *Trichophyton rubrum* y *Pseudomonas aeruginosa*. mientras que el aceite de trementina mostró actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Microsporum canes*, *Microsporum gypsum*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: antibiograma, colofonia, trementina, resina oleosa, cepas, antimicrobiano.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies vegetales más usadas y conocidas por el ser humano, se encuentran las coníferas, que se desarrollaron a partir del Cretácico. Muchas coníferas poseen gran importancia para el hombre por constituir una fuente de materias de interés como la madera, de múltiples aplicaciones en construcción, ebanistería etc; además de ser una fuente de resinas, bálsamos y aceites, o simplemente por el interés de sus semillas comestibles (Izco, Jesús, et. al, 2004).

En el ecosistema de montañas de La Española se encuentra la conifera *Pinus occidentalis*, endémica, una especie forestal conocida por su valor comercial, muy explotada en la República Dominicana por su madera para la construcción. Los campesinos le llaman "Pino Criollo" o "Pino de Cuaba" por sus propiedades combustibles, ya que es altamente inflamable y de la cual se extrae una resina oleosa compuesta por trementina y colofonia, entre otros derivados secundarios menos importantes. Esta resina es la responsable de proteger a esta especie de los hongos patógenos que puedan afectarle.

La diversidad biológica con la que cuenta República Dominicana es muy amplia, repartida en diferentes ecosistemas que se desarrollan en el territorio insular, naturaleza que contiene en su esencia, componentes para la sanación de un gran número de enfermedades que aquejan al ser humano.

Los hongos son microorganismos eucariotas complejos, que a través de diversos mecanismos biológicos logran proliferar y mantenerse vigentes en el medio en que habitan. Son los recicladores por excelencia de la biomasa terrestre, que guardan una relación simbiótica con gran parte de los seres vivos de nuestro planeta. En la mayoría de los casos, se trata de una simbiosis beneficiosa para ambas partes, lo cual no aplica para el caso de los hongos patógenos.

Son comunes las micosis que afectan la piel de los seres humanos provocadas por hongos oportunistas, que llegan a desarrollarse a partir de hongos saprófitos, como es el caso de la *Candida albicans*. Los derivados de la resina oleosa del Pino Criollo prometen poseer potencial fungicida y bactericida ante algunas cepas de hongos y bacterias patógenas. La futura investigación intentará dilucidar dicho potencial.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento de la resistencia microbiana ante los antimicóticos y antibióticos convencionales, ha incentivado la búsqueda de nuevos principios activos, para poder aniquilar las cepas resistentes. En estos últimos años, la investigación farmacéutica se ha inclinado a moléculas sintetizadas en el laboratorio, extracción de principios fitoquímicos y recientemente, con la incursión de la biotecnología, en medicamentos elaborados a través de recombinación genética (Lope H. Towers, 2001).

El bienestar va estrechamente ligado a la salud. Se ha observado, en el uso etnobotánico de los pueblos, el potencial farmacológico de la flora, que por ausencia de investigaciones puntuales en este ámbito no se han aprovechado.

Las infecciones por hongos superficiales son las micosis más comunes en todo el mundo y constituyen un problema de salud pública especialmente en países tropicales. El clima húmedo, la sobrepoblación y las malas condiciones higiénicas han conducido a un aumento de la prevalencia de estos patógenos. Estas micosis han adquirido renovada importancia además, por ser una causa de consulta médica frecuente (Rubio MC, Rezutsa A, Gil J Ruesca RB., 1999).

La resistencia de los hongos a los fármacos antimicóticos, la toxicidad de ellos y muchas veces su elevado costo, ha provocado una intensa búsqueda de moléculas nuevas, obtenidas por síntesis o bien desde fuentes naturales. Una de ellas es la investigación en plantas, la cual se realiza en muchas latitudes con resultados muy promisorios, pues se han encontrado, por ejemplo, efectos antimicóticos en muchos extractos vegetales utilizando diversos solventes, o en aceites esenciales (Sanabria A, Mantilla J.R., 1986).

Los remedios naturales hacen parte de una muy difundida tradición empírica en nuestro país, apoyada en elementos culturales y en la notable diversidad de nuestra flora. Muchas plantas eran extensamente utilizadas por la población en forma empírica para tratar diversas enfermedades, entre ellas las infecciosas.

Dentro de estas especies de plantas, la conífera endémica, *Pinus occidentalis*, libera una resina oleosa cuya función es proteger la especie vegetal de los microorganismos fitopatógenos, sobre todo de hongos; este simple hecho sugiere el potencial fungicida que posee la resina en si misma (Schuller., 1967).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Investigar el potencial antimicótico y antibacteriano *in vitro* de la colofonia y la trementina, derivados de la resina oleosa de la conífera endémica, *Pinus occidentalis*, en el municipio de Jarabacoa, Provincia La Vega.

Objetivos Específicos

- Realizar revisiones bibliográficas relacionadas con la especie vegetal endémica, su ecología, distribución geográfica y sobre características específicas de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*.

- Observar e investigar acerca del proceso de extracción de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*.

- Colectar muestras de colofonia y trementina, derivados directos de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*, obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor en las instalaciones de la Fábrica de Trementina de Jarabacoa, provincia La Vega.

- Efectuar la dilución de las muestras con los solventes (grado reactivo) requeridos.

- Evaluar la actividad fungicida de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis* por pruebas de Resistencia y Sensibilidad *in vitro*, frente a cepas de hongos y bacterias patógenas contra el ser humano.

- Validar la composición química de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis* por el método de Cromatografía de Gases.

JUSTIFICACIÓN

El *Pinus occidentalis* es una especie vegetal que expele una resina oleosa, la cual cumple la función de proteger al pino ante el ataque de hongos patógenos que le afectan. De la resina pueden obtenerse algunos derivados, de ser tratada químicamente. Dentro de estos derivados hay dos principales, la colofonia y la trementina. La trementina es el aceite inflamable que se obtiene por arrastre de vapor y el residuo sólido resinoso sobrante es la colofonia. Ambas sustancias tienen aplicaciones industriales, además de las aplicaciones farmacológicas que algunos investigadores han reportado (Farjon, A. K. & B. T. Styles. 1997).

Los resultados previos de diversas pruebas físico químicas aplicadas a la resina oleosa del *Pinus occidentalis* y sus derivados, la colofonia y la trementina, arrojan resultados que sugieren el potencial antimicrobiano de estas sustancias (Schuller, 1967).

Los terpenos y terpenoides (constituyentes abundantes de la resina del *Pinus occidentalis* y sus derivados) son los encargados de impartir olor, color, sabor y resistencia al ataque de microorganismos e insectos a la madera de especies forestales (Mc. Murry John., 1984).

La trementina está compuesta por alrededor de un 87.1% a 94.1% de alfa pineno, un terpenoide de acción antiinflamatoria y antimicrobiana de amplio espectro (Fessenden, Ralf J., Fessenden, Joan. S, Organic Marshall W. Logue., 1998).

La colofonia, está constituida básicamente por ácidos resínicos, entre los cuales el ácido abiético se encuentra en mayor proporción. Pese a tratarse de un alérgeno de contacto, se ha demostrado que esta sustancia tiene propiedades de fitoalexina, lo cual implica que cede protección ante los hongos fitopatógenos que atacan el árbol (Schuller., 1967).

Culturalmente el jabón de cuaba, que se fabrica con la trementina de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*, ha sido utilizado de manera empírica por gran parte de la población de nuestro país como antiséptico cutáneo, con resultados beneficiosos.

Estudios de tipo fitoquímico, han arrojado a la luz la composición química cualitativa y cuantitativa de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis* y de otras resinas de pinos ubicados en el país y el caribe. De estos componentes, algunos poseen acción farmacológica y quimioterapéutica clínicamente comprobada (Fessenden Ralf j., Fessenden Joan. S, Organic Marshall W. Logue., 1998).

Esta investigación sobre el *Pinus occidentalis*, está soportada por la importancia de la categoría biológica de esta especie vegetal como una conífera endémica y su gran abundancia en el país (Olof Schwartz., 1788).

La validación de la acción antimicótica y antibacteriana de la resina del *Pinus occidentalis* por medio de este estudio, teniendo antecedentes reportados por otros investigadores en otras latitudes del mundo, podría en un futuro estimular a la industria farmacéutica al desarrollo de formas farmacéuticas especializadas para beneficio de la salud del pueblo dominicano.

En la República Dominicana no se han reportado hasta la fecha investigaciones sobre aspectos farmacológicos de esta especie vegetal endémica, por lo que es justificable y de gran interés realizar esta investigación que posiblemente contribuirá muy puntualmente con la farmacología nacional, como una alternativa en el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos patógenos que afectan la salud de la población dominicana.

HIPÓTESIS

El *Pinus occidentalis* es una especie vegetal endémica ampliamente estudiada desde el punto de vista botánico pero no farmacológico, en la República Dominicana.

La Resina pura, la colofonia y la trementina del *Pinus occidentalis* son fuentes naturales de principios activos antimicóticos y antibacterianos.

Las investigaciones sobre especies vegetales como el *Pinus occidentalis* que contienen principios bioactivos que contrarrestan las infecciones micóticas y bacterianas, son oportunidades para la industria de medicamentos.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 Descripción del área de estudio



El área de estudio de esta investigación es el municipio Jarabacoa, creado según la ley 530 del 3 de septiembre de 1858 y pertenece a la región Cibao Sur. Está ubicado en el mismo centro de la Cordillera Central que se levanta en una altiplanicie mar (msnm). Limita al norte

de 525 metros sobre el nivel del con la provincia Concepción de La Vega a la cual pertenece, al sur con el municipio Constanza, al este con la provincia Monseñor Nouel, y al oeste con la provincia Santiago. Los distritos municipales del municipio son: Buena Vista y Manabao. La superficie es de 673.9 km² y su densidad poblacional de 84 habitantes por km².

La población de Jarabacoa es de 29,230 hombres y 27,573 mujeres, sumando un total de 56.803 habitantes, según datos del censo del año 2010 realizado por la Oficina Nacional de Estadísticas (ONE). Su orografía la integran los ríos Yaque del Norte, Jimenoa y Baiguate. Las vías de acceso principales conducen a La Vega, Constanza, Manabao, Jumunuco, Tavera y Jánico. Esta localidad presenta un clima tropical lluvioso; aunque está atenuado debido a su altitud que son 500 msnm. Presenta una temperatura promedio anual de 22 °C (72 °F) y lluvias abundantes durante casi todo el año (IX Censo Nacional de Población y Vivienda 2010, ONE).

Las tierras del municipio son de alta y variada productividad cuenta con una producción de hortalizas en gran escala, lechugas, tomates, berenjenas, zanahorias, remolachas, tayotas, berro y repollo que se utilizan para el consumo interno y para la exportación. Existen también viveros

forestales, ornamentales y frutales, producción de café procesado en factorías con alta tecnología científica y fábrica de pantalones etc (Resumen Agrometeorológico, 2011).

En el municipio de Jarabacoa el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales identifica 8 Áreas Protegidas, correspondientes a la Reserva Científica Ebano Verde, Parque Nacional Armando Bermúdez, Parque Nacional Baiguatú, Vía Panorámica Carretera Bayacanes - Jarabacoa, Área Nacional de Recreo Guaguí, Monumento Natural Jimenoa, Parque Nacional José del Carmen Ramírez y la Reserva Científica Las Neblinas (Atlas de los Recursos Naturales de República Dominicana, 2003).

Este municipio constituye la vía de acceso principal hacia el Pico Duarte, el más grande de las Antillas con 3,175 msnm (Philip Steele, Keith Lye, 2003).

2.2 Fitoterapia e Historia

El conocimiento de las propiedades terapéuticas de las plantas se encuentra en auge debido a los descubrimientos constantes de nuevas especies de plantas, que hacen que día a día se sumen importantes investigaciones clínicas y se descubren o confirman numerosos efectos farmacológicos.

La fitoterapia pertenece al ámbito de la medicina y se relaciona estrechamente con la botánica y el estudio del metabolismo secundario vegetal. La farmacéutica tiene su aproximación a la fitoterapia en la farmacognosia. La Fitoterapia moderna, se basa en el conocimiento de la Farmacología, y considera los aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos de los medicamentos basados en plantas medicinales, en estudios preclínicos y clínicos, sin olvidar su origen en el conocimiento ancestral y la experiencia de prueba y error heredada de las pasadas generaciones (69).

En épocas en que el hombre sólo tenía a su disposición los recursos que el planeta le otorgaba, buscó en éstos las herramientas para disminuir el dolor físico y evitar la muerte. Entre los recursos más aprovechados por distintas culturas a través de la historia, se encuentran los recursos minerales, animales y vegetales. Éstos constituyeron hasta mediados del siglo XX los recursos terapéuticos por excelencia con un enfoque distinto en distintas partes del mundo.

Con el tiempo estas terapias características locales pasaron a conformar la llamada medicina tradicional y al ser preservada por los pueblos originarios fue llamada medicina aborígen o autóctona, existiendo estos términos hasta nuestros días, al igual que las recetas tradicionales o autóctonas que agrupan tanto usos, formas de preparación, administración, dosis, entre otros parámetros farmacológicos modernos (Bodeker G, Kronenberg F).

Paracelso, el padre de la farmacología química, médico y químico suizo en pleno Renacimiento, fue el primero en señalar que las propiedades medicinales de las plantas radican en sus principios activos aislables por técnicas alquímicas. Esta observación constituye la base de la Farmacología moderna (Montes M, Wilkomirsky T). Luego y gracias al desarrollo de la síntesis química, hombres de ciencia lograron “copiar” núcleos básicos de moléculas exitosas desde la naturaleza para mejorarlas haciéndolas más selectivas y seguras.

En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades (69).

2.3 Actividad biológica de los Fitoterapéuticos

A diferencia de la medicina sintética o convencional, la fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas. Estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, etc), y también productos de éstas, resultados de tratamientos directos con algún disolvente o medio que concentre los compuestos afines y facilite su administración, son los llamados extractos. En cualquier caso en esta matriz compleja nos encontramos con un sin número de compuestos de diferente naturaleza química, a esta mezcla se la llama fitocomplejo (Hoffmann A).

El fitocomplejo es la mezcla de sustancias activas y otras acompañantes que actúan en conjunto para lograr un mismo fin terapéutico, que no sería el mismo si se administraran por separado, o sea como monosustancias.

Estas sustancias activas son llamadas técnicamente metabolitos secundarios y se refieren a las sustancias que son el producto secundario de la fotosíntesis y que intervienen en procesos vegetales como la defensa frente a patógenos, y protección a los rayos UV, entre otros (Vivanco J, Cosio E, Loyola-Vargas V, Flores H). La mezcla de metabolitos secundarios son únicos para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores (Trease, Evans W.).

2.4 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias utilizadas en el tratamiento de las infecciones, sean causadas por bacterias, hongos, parásitos o virus. Uno de los principales avances en la historia de la salud humana ha sido el descubrimiento de los antimicrobianos, que han aliviado el sufrimiento y salvado miles de millones de vidas a lo largo de los últimos 70 años. Entre los antimicrobianos se encuentran los antibióticos, algunos agentes quimioterapéuticos, los antifúngicos, los antiparasitarios y los antivíricos (70).

2.4.1 Antifúngicos Naturales

Se entiende por antifúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte. Dado que los hongos además de tener usos beneficiosos para el ser humano (levadura del pan, hongos de fermentación de los quesos, los vinos, la cerveza, entre otros muchos ejemplos) forman parte del colectivo de seres vivos que pueden originar enfermedades en el ser humano. El conocimiento y uso de los antifúngicos es de vital importancia a la hora de tratar muchas enfermedades (70).

En la actualidad se dispone de varios agentes antimicóticos que se han obtenido de plantas con buenos resultados tanto *in vitro* como *in vivo*. De la destilación de las hojas de la planta australiana *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té (Tea Tree Oil), un fitofármaco que ha mostrado acción antimicótica por acción directa de sus componentes activos terpinen-4-ol y 1,8-cineol, a una concentración que varía de 29% al 45% y del 4% al 16.5%.

El aceite se utiliza para tratamiento de las infecciones en la piel causadas por hongos de los géneros *Cándida* y *Malassezia* y en las onicomicosis causadas por dermatófitos (Carson, C.F., Riley, T.V).

En los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los compuestos del ajo (*Allium sativum*) se ha demostrado un importante efecto antimicótico atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como contra especies de dermatófitos y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*. La alicina, aunque es efectiva, ve limitado su uso por su inestabilidad; en contraste, el ajoeno, producto de la degradación de la alicina, es un compuesto más estable y la formulación tópica para el tratamiento de *tinea pedis*, *cruris* y *corporis* ha mostrado resultados considerables (Ledezma, E., Marcano, K., Jorquera, A.).

Así mismo, de la planta *Eucalyptus globulus* se obtienen aceites esenciales, extractos e infusiones con actividad antimicótica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol. El uso tópico del extracto crudo y el aceite esencial producen irritación dérmica y dermatitis de contacto (Folium Eucalypti. WHO monographs on selected medicinal plants).

Las plantas *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis* son fuente de las moléculas timol y carvacrol, ambas con reconocido efecto desinfectante en heridas y componentes de enjuagues bucales. Asimismo, es reconocida su actividad principalmente contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Saprolegnia* y *Zygorhynchus* (Herba Thymi. WHO monographs on selected medicinal plants).

Otras moléculas producidas por las plantas son las fito defensinas, de naturaleza peptídica y ricas en cisteína, con capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios morfológicos y daño en algunas de sus estructuras celulares (De Lucca, A.J., Walsh, T.J, Hancock, R.E., Chapple, D.S, Selitrennikoff, C.P.). En las semillas de la planta *Zea mays* se encuentra la proteína zeamatina, que tiene como función proteger a la planta de hongos patógenos por la capacidad de producir lisis osmótica. En el patógeno humano *Candida albicans*, la molécula impide el crecimiento a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,5 mg/l (Stevens, D.A., Calderon, L., Martínez, M., Clemons, K.V., Wilson, S.J., Selitrennikoff, C.P).

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las principales moléculas con actividad antimicótica obtenidas de plantas, y los hongos sobre los cuales han mostrado actividad.

Compuesto	Fuente	Actividad
Amfotericina B	<i>Streptomyces noursei</i>	Antimicótico de amplio espectro
Nistatina	<i>Streptomyces nodosus</i>	<i>Candida</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Dermatófitos
Polioxinas	<i>Streptomyces cacaoi</i>	<i>Candida albicans</i>
Nikomycinas	<i>Streptomyces sendae</i>	Levaduras y hongos filamentosos
Mucidina	<i>Oudemansiella mucida</i>	Dermatófitos
Aureobasidina A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida</i>
Equinocandinas	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus sydowi</i> , <i>Zalerion arboricola</i>	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pneumocystis jiroveci</i>

Tabla: A.C. Mesa Arango, J.G. Bueno Sánchez y L.A. Betancur Galvis

2.5 Coníferas

Es un grupo botánico de distribución muy amplia y uno de los recursos renovables más importantes del mundo. Se pueden considerar las reinas del reino vegetal por su porte majestuoso así como por sus dimensiones. Son las especies forestales dominantes en los climas fríos, en las latitudes altas y en las altas montañas de latitudes medias incluso tropicales. Entre las coníferas se encuentran los árboles más altos y también los más longevos (*Sequoia sempervirens/ Sequoia roja de California*). Las coníferas son mucho más resistentes a la sequía que los árboles excepto la *chamaeciparis*. Es propio de las coníferas la resina y sus característicos frutos procedentes de inflorescencias (Joan Bordas).

Desde el punto de vista anatómico/ morfológico las coníferas (*Pinophyta o Coniferophyta*) son árboles o arbustos dioicos o monoicos con la corteza rugosa o lisa, en placas grandes y gruesas con fisuras o en tiras largas y delgadas. Las ramas laterales están bien desarrolladas. Las hojas son simples y pueden ser en forma de aguja, escama, lineares, lanceoladas, a veces oblongas o falcadas. Por lo general las hojas son persistentes por más de un año, pero a veces son deciduas. Su madera posee un xilema compacto compuesto principalmente de traqueidas con paredes gruesas y poros uniseriados o multiseriados.

En contraste con angiospermas, el xilema carece de vasos. Frecuentemente presentan canales resiníferos en su madera, la corteza, las hojas o los conos. Los estróbilos o conos, son monoesporangiados. Los conos microesporangiados o polínicos son simples, formados de microesporófilas arregladas en forma de hélice alrededor de un eje central de 2 a muchos microesporangios ubicados distalmente en la cara abaxial (David S. Gernandt¹, Jorge A. Pérez de la Rosa).

2.5.1 *Pinaceae*

Arboles o arbustos minoicos de hasta 40, siempre verdes, resinosos. Hojas lineares o aciculares , solitarias o agrupadas en fascículos de hasta seis hojas por fascículo, mas o menos espiraladas o con disposición irregular sobre las ramas. Estróbilos microesporangiados agrupados, los esporófilos adnados a dos esporangios fértiles, estróbilos megasporangiados generalmente con las bracteas arregladas en espiral sobre un eje central cada una sostenida sobre una rama ovulífera o menos plana con 2 óvulos. Fruto un cono, las escamas del cono maduro aveces deciduas, abriéndose o permaneciendo cerradas; semillas aladas o sin alas (Hector Narave Flores, Kent Taylor).

2.5.2 Género *Pinus*

Pinus es un género de plantas vasculares (generalmente árboles y raramente arbustos), comúnmente llamadas pinos, pertenecientes al grupo de las coníferas y, dentro de éste, a la familia de las pináceas, que presentan una ramificación frecuentemente verticilada y más o menos regular.

La copa puede ser piramidal o redondeada y, en los árboles adultos, ancha y deprimida. Los macroblastos presentan hojas escuamiformes sin clorofila, mientras que los braquiblastos son muy cortos, con una vaina membranosa de escamas y están terminados por dos a cinco hojas lineares o acículas, con dos o más canales resiníferos cada una. Los conos masculinos se desarrollan en la base de los brotes anuales. Los estróbilos presentan escamas persistentes, siendo las tectrices rudimentarias e inclusas y las seminíferas suele presentar una protuberancia u ombligo en su parte externa (apófosis) maduran bienal o trienalmente. Las semillas son aladas con la testa más o menos lignificada. Numerosas especies se cultivan desde muy antiguo por sus piñones o con fines ornamentales o forestales, lo que dificulta el establecimiento de sus áreas originales.

Existen alrededor de 110 especies de pino en el mundo. Los pinos son nativos del Hemisferio Norte, con sólo una especie encontrada al sur del Ecuador, en la isla de Sumatra (2°S, el pino de Sumatra). En Norteamérica se ubican desde los 66°N en Canadá (pino Jack) hasta los 12°N por el sur en Nicaragua (pino caribeño). Las montañas subtropicales y tropicales de México albergan la mayor diversidad de especies de este género, con cerca de 47. El oeste de Estados Unidos (California) es el segundo lugar del planeta con más diversidad de pinos. En Eurasia se encuentran desde las Islas Canarias y Escocia por el Oeste hasta el lejano oriente ruso, y por el sur desde las Filipinas hasta los 70° N en Noruega y Siberia oriental (pino escocés y pino enano siberiano respectivamente). Siete especies son nativas y originarias de la península Ibérica y zonas aledañas y han sobrevivido y desarrollado desde tiempos remotos. En el norte de África existen pinos en las zonas montañosas, así como en los Himalayas y en el sureste asiático. Se han introducido pinos en áreas templadas y subtropicales del Hemisferio Sur, incluyendo Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Uruguay, Paraguay, Nueva Zelanda y Australia, donde crecen extensamente como recurso maderero, e inclusive algunas especies se han convertido en invasoras (71).

2.5.3 *Pinus occidentalis*

Pinus occidentalis, pino criollo o pino de cuaba pertenece a la familia de las *Pinaceae*, originario de la isla de La Española, donde es un endemismo. Se producen semillas entre noviembre y enero. Es el árbol más abundante de la República Dominicana; forma densos pinares en la Cordillera Central y Sierra de Bahoruco. Crece hasta 30 m de altura; tronco recto de hasta 2m de diámetro. Esta especie es monoica; es decir, produce conos masculinos y femeninos en el mismo árbol. Sus semillas son aladas, dispersas por el viento. Es una de las pocas coníferas de La Española. Crece en los bosques húmedos y ocupa diferentes tipos de suelos y ambientes, aguantando temperaturas que varían de 30 a -20 °C, situados a elevaciones desde 120 a 3.175 msnm, en el Pico Duarte. Su madera es de buena calidad y tradicionalmente ha sido utilizada en la fabricación de muebles, combustible y extracción de resina, Olof Schwartz, 1788 (72).



Pinus occidentalis, Foto: W. Schulz

2.5.3.1 Taxonomía	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Pinophyta</i>
Clase	<i>Pinophyta</i>
Orden	<i>Pinales</i>
Familia	<i>Pinaceae</i>
Género	<i>Pinus</i>
Especie	<i>P. occidentalis</i>

Tabla: Taxonomía, *Pinus occidentalis*. wikipedia

2.5.3.2 Distribución geográfica del *P. occidentalis*

Según Klotz y Torres (1991), el *Pinus occidentalis*, sw. muestra un rango ecológico extremadamente amplio. Su distribución natural, es decir sin impacto humano, es difícil de reconstruir. Los pinares de la alta montaña, arriba de los 2500 msnm, son una comunidad clímax climático, causado por las temperaturas bajas. El pino a baja altitud es un elemento de la sucesión, que siempre estuvo presente en esta zona habitaba en áreas perturbadas por desprendimientos de tierras, huracanes e incendios.

En la República Dominicana, los bosques naturales de tiempo largo con predominio de *Pinus occidentalis*, sw. se encuentran a partir de 800 msnm. A partir de 2000 msnm prácticamente no existen otras especies arbóreas que no sean pinares. Se dividen los bosques existentes del país en "pinares de elevación intermedia" y en "pinares de la zona alta de la Cordillera Central" (Klotz y Torres, 1991).

2.5.3.3 Fenología

Según Liogier (1978 y 1994), Sprich (1994) y experiencias de técnicos del Plan Sierra (1991), la fenología del *Pinus occidentalis*, sw. abarca los siguientes:

1. Hojas: Hay generalmente 4 ó 5 agujas por fascículo (a veces 3) de 11 a 18 cm. de largo.

2. Tronco y corteza: Tronco recto y cilíndrico con una corteza color marrón tornándose a negro principalmente cuando está mojada.

3. Madera: Color amarillo con betas color marrón.

4. Flores: Cada árbol presenta flores femeninas y masculinas (especie monoica). Las flores femeninas aparecen generalmente en las partes más altas de las copas y en el exterior de las mismas las masculinas en las ramas bajas y en el interior de las mismas.

5. Frutos: Los conos son de 5 a 8 cm. de largo y contienen semillas aladas. Se consigue aproximadamente 63,000 semillas por Kg. (Mediciones de la cosecha de 1993 en el Plan Sierra, República Dominicana).

6. Hábitat: El árbol crece hasta más de 30 m de altura y más de 100 cm de diámetro de altura en los sitios de mejor crecimiento. Con el aumento de la altitud sobre el nivel del mar disminuye la altura de los pinos y alcanza solamente 8 m. en el área del Pico Duarte (3,175 msnm).

2.5.3.4 Adecuación al Sitio

1. Suelo: Suelos pobres y lateríticos, también suelos arenosos y/o pedregosos, siempre y cuando sean suelos bien drenados. No crece en suelos con problemas de drenaje.

2. Luz: es una especie que necesita la luz directa del sol (planta heliófita), aguanta cierta competencia, principalmente en sus primeros años.

3. Precipitación: Crece en regiones desde 800 hasta más 2,300 mm/año, con 5 meses de sequía al año con muchas diferenciaciones, según las condiciones locales.

4. Temperatura: Crece en áreas con temperaturas medias desde 6 °C (Pico Duarte 3,175 msnm) hasta 25 °C. En la zona alta de la Cordillera Central, la temperatura puede bajar hasta - 8 °C y frecuentemente puede haber varias semanas con heladas.

5. Uso: La madera del *Pinus occidentalis*, sw. se usa en ebanistería, carpintería y construcciones y como postes y varas (madera rolliza). También se puede utilizar como leña o para producir carbón (Liogier, 1978,1994) y (Sprich,1994).

Se puede extraer la resina, que se usa como materia prima para la fabricación de aguarrás, jabones, etc. La cuaba o madera resinosa la utilizan los campesinos para alumbrarse y calentarse. Se usa en té, mezclada con otras hojas, contra la gripe y resfriados. En Haití, se ha usado la resina y la esencia de trementina, contra una serie de dolencias, tanto internas como externas. La trementina es rubefaciente; se usa en linimentos y otros usos farmacéuticos.

Del pino se saca también las materias primas para la fabricación de varios productos de limpieza doméstica (Liogier, 1978 y 1994) y (Sprich, 1994).

2.6.3.5 Factores que Influyen en la Producción del Bosque de Pino

Según (Geilfus, 1994) citado por Martínez y Recio (2006), hay diversos factores del clima que influyen notablemente en la existencia de la planta. Estos factores zonifican geográficamente las especies; además pueden producir diferencia en el desarrollo de una misma especie dependiendo de la zona en que se desarrolle, por ejemplo, no es posible que exista *Pinus occidentalis*, sw. en una zona donde cae nieve, puesto que el árbol no la resiste. (Geilfus, 1994).

La luminosidad es un factor muy importante en el desarrollo del árbol y por ende del bosque. Las plantas responden de diversas maneras a los cambios diurnos, nocturnos y estacionales (Geilfus, 1994). Aspectos tales, como el fotoperiodismo ejercen una influencia considerable sobre el crecimiento vegetativo de las plantas leñosas, mientras que fotoperíodos cortos inducen a la latencia. Este fenómeno puede ejemplificarse en la naturaleza, por las diferentes respuestas a los crecimientos estacionales de una misma especie en diferentes latitudes.

La temperatura influye en todas las funciones vitales de los vegetales. El término período se encuentra íntimamente ligado a la reacción fotosintética, así como también, con la velocidad y tipo de reacciones que suceden en la planta durante la noche (Geilfus, 1994).

En general, la temperatura influye principalmente en el crecimiento vegetativo de las plantas y en la germinación de las semillas. Factores como la precipitación y el suelo, también ejercen una gran influencia sobre la producción de un bosque. En la mayoría de los casos pueden zonificar las especies, limitando con esto el crecimiento y el buen desarrollo de los árboles en determinadas zonas, donde las condiciones requeridas no se cumplen (Geilfus, 1994),(72).

2.6 Resina oleosa de coníferas

La resina es una secreción orgánica que producen muchas plantas, particularmente los árboles del tipo conífera. Es muy valorada por sus propiedades químicas y sus usos asociados, como por ejemplo la producción de barnices, adhesivos y aditivos alimenticios. También es un constituyente habitual de perfumes o incienso. En muchos países, entre ellos España, es frecuente referirse a la "resina" como "resina de pino" ya que esta conífera es su principal fuente.

No existe acuerdo en la denominación de la resina y sus derivados. Se utilizará la denominación aceptada por la Academia de la Lengua Española (Diccionario de la lengua española (22.^a edición), Real Academia Española, 2001). Cuando pueda dar origen a confusión se incluyen los sinónimos utilizados con más frecuencia.

Resina: es la sustancia sólida o de consistencia pastosa, insoluble en el agua, soluble en el alcohol y en los aceites esenciales, y capaz de arder en contacto con el aire, obtenida naturalmente como producto que fluye de varias plantas.

Trementina: es un jugo casi líquido, pegajoso, odorífero y de sabor picante, que fluye de los pinos, abetos, alerces y terebintos. Se emplea principalmente como disolvente en la industria de pinturas y barnices. También se conoce como miera y algunas veces como resina.

Aguarrás: Aceite volátil de trementina, usado principalmente como disolvente de pinturas y barnices. También se la conoce como trementina o esencia de trementina.

Colofonia: Resina sólida, producto de la destilación de la trementina, empleada en farmacia y para otros usos. A veces se utiliza el término resina para nombrar a este producto sólido.

Pez (femenino): Sustancia resinosa, sólida, lustrosa, quebradiza y de color pardo amarillento, que se obtiene echando en agua fría el residuo que deja la trementina al acabar de sacarle el aguarrás. Es una colofonia más o menos impurificada. El término incluye también sustancias sintéticas con propiedades similares a las resinas naturales. De esta forma las resinas se dividen en: resinas naturales y resinas sintéticas (68).

2.6.1 Trementina



Aceite de Trementina,
Foto:W. Schulz

La trementina es el líquido que se obtiene de la destilación por arrastre de vapor de la resina oleosa que es extraída por resinación de diversas especies de coníferas y de varias especies de árboles terebintáceos. Es usada como disolvente de pinturas, materia prima para la fabricación de compuestos aromáticos sintéticos y algunos desinfectantes. Es un líquido casi incoloro de olor característico. En la actualidad se la obtiene en grandes cantidades como subproducto de la producción de celulosa (materia prima de la fabricación de papel) en industrias que usan como materia prima coníferas (74).

2.6.2 Colofonia

La colofonia, también conocida como pecastilla, es una resina natural de color ámbar obtenida de las coníferas por exudación de los árboles en crecimiento o durante la extracción de los tocones. Es la fracción no arrastrable por vapor de la oleoresina y está constituida de una mezcla de ácidos resínicos, mayoritariamente el ácido abiético. Ha sido el tradicional agente de encolado en masa del papel, utilizado desde principios del siglo XIX, para impartir resistencia a la penetración por los fluidos.



Colofonia, Foto:W. Schulz

Otros usos actuales son la adición de colofonia modificada al caucho de los neumáticos para conferirles mayor plasticidad, el chicle es fundamentalmente colofonia, las lacas de calidad llevan una parte importante de colofonia, las colas termoestables también la incorporan. La colofonia es un aislante de alta calidad que se incorpora a numerosos circuitos eléctricos. También es un ingrediente importante en el barniz usado en técnicas de grabado como el aguafuerte para proteger de la corrosión ácida las partes no rascadas de la lámina metálica al hacer el grabado. El ámbar del Báltico es colofonia fósil.

Es la resina sólida, parda o amarillenta, residuo de la destilación de la trementina. Se emplea en farmacia, en la fabricación de barnices, para dar adherencia al arco de algunos instrumentos de cuerda y dar adherencia en el uso de riscados en la pandereta o pandero cuequero. También es el componente fundamental de la resina usada en soldadura de estaño en electrónica.

También se utiliza en escalada, viene en polvo con o sin mezclar con magnesio para impregnarse las manos y hacerlas más adherentes a la roca. También es usada como cola para encuadernar libros. Igualmente los ballets o grupos de danza la utilizan cuando ciertos foros o alguna sede de presentación es resbaladiza. Los bailarines pisan esta resina antes de entrar al escenario para evitar caídas. Además resulta componente fundamental para la elaboración de jabones mediante la saponificación de las grasas, pues de otra manera el jabón se enranciaría en plazo medio-corto.

Se emplea, asimismo, junto con clorato de potasio y lactosa, para la obtención de la fumata blanca, el humo blanco que anuncia al mundo que la Iglesia católica tiene nuevo Papa (75).

2.7 Composición química de la Resina Oleosa de Pino

La resina es una mezcla compleja de terpenos, ácidos resínicos, ácidos grasos y otros componentes complejos: alcoholes, ésteres etc (Hernández Lázaro,2009). La proporción de cada componente es función de la especie arbórea y el origen geográfico. Valores típicos son:

- 60-75 % de ácidos resínicos.
- 10-15 % de terpenos.
- 5-10 % de sustancias varias y agua.

Por destilación a presión ambiente, es posible separar dos fracciones:

- 60 - 75 % de Colofonia.
- 15 - 25 % de aguarrás y agua.

2.7.1 Terpenos

Los terpenos son hidrocarburos complejos de forma general C_nH_{2n-4} , de la serie del isopreno, que está formado por dos dobles enlaces y que unidos por cadenas orgánicas forman un grupo de compuestos con características propias y que determinan la variedad de los efectos terapéuticos que se presentan en las plantas que los contienen (Solomons, 1997).

Se encuentran en los aceites esenciales de las plantas. Sus estructuras guardan relación con el cimeno (para-metilisopropilbenceno) por formar una molécula derivada de la condensación de dos isoprenos.

Una de las fuentes principales de terpenos y terpenoides es la resina de los pinos, exudados arbóreos que se producen cuando se practican incisiones en la corteza de estas especies. Las resinas u oleorresinas son una mezcla de ácidos resinosos (ácidos diterpenoicos) disueltos en una mezcla de hidrocarburos terpénicos (Solomons, 1997).

Mediante la destilación por arrastre de vapor de la resina de los pinos se obtiene una fracción volátil conocida como aceite de trementina o aguarrás, que incluye hidrocarburos terpenos y terpenoides tales como, α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, farneseno, β -felandreno, Δ^3 -careno, borneol, canfeno, terpinoleno, metilcarvinol, p-cimol, longuifoleno. Especies de pinos y su contenido de α - pineno:

Pinus tropicalis

93,2 - 96,9 %

Pinus occidentalis

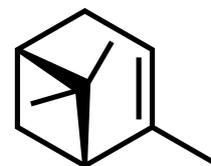
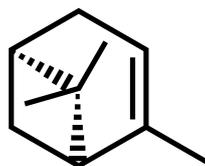
87,1 – 94,1 %

Pinus cubensis

76,6 – 88,6 %

Pinus caribaea

67,3 – 91,0 %



(+)- α -pinene (-)- α -pinene

alfa/ beta pinene, Imagen: wikipedia

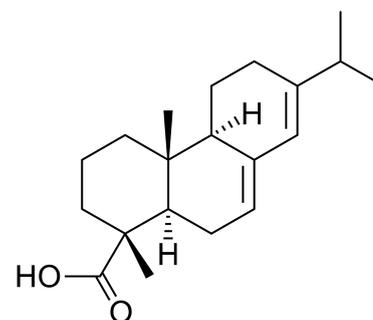
Las especies de *Pinus tropicalis*, *occidentalis* y *cubensis* además presentan β - pineno y cantidades porcentuales muy pequeñas de los demás terpenos, mientras que el *Pinus caribaea* presenta altos contenidos de β - felandreno.

La resina de los pinos son mezclas de compuestos terpénicos, cuando se destila la resina se obtienen dos fracciones, una fracción volátil conocida como aceite de trementina formada por monoterpenos y monoterpenoides y una fracción no volátil conocida como pez rubia o colofonia. La oleorresina contiene de 16-20 % de aceite de trementina y de 64-70 % de colofonia.

Los terpenos y terpenoides son los encargados de impartir olor, color, sabor y resistencia al ataque de microorganismos e insectos a la madera de especies forestales (Fessenden Ralf j., Fessenden Joan. S, 1998).

2.7.2 Pineno y ácidos resínicos, "Potencial farmacológico"

El pineno es el nombre común que se utiliza para referirse a dos monoterpenos bicíclicos isómeros, el alfa-pineno y el beta-pineno, que son componentes principales de la resina de pino y de otras coníferas, y justo por esta razón tiene este nombre, aunque es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza.



ácido abiético, Imagen: wikipedia

Los pinenos no solo los encontramos en el reino vegetal, ya que los dos compuestos forman parte del sistema químico de comunicación de los insectos y actúan como repelentes para los insectos.

Tienen una amplia actividad antibiótica, incluso frente a patógenos resistentes a los antibióticos. Una de las mayores actividades terapéuticas que tienen es la de anti-inflamatorio, bloqueando la señalización inflamatoria de las prostaglandinas de manera similar al mirceno. También tienen actividad como bronco-dilatador en humanos cuando vienen inhalados a bajas concentraciones, y entonces este efecto podría influir en una mayor absorción de los cannabinoides en los pulmones al fumar, o al vaporizar cannabis con altos contenidos en alfa y beta pineno, aumentando las concentraciones plasmáticas y, como consecuencia, el efecto de los cannabinoides (76).

El alfa-pineno es un inhibidor de la acetilcolinoesterasa, pudiendo tener efectos favorables sobre la memoria y pudiendo disminuir los efectos negativos del THC sobre esta misma, aunque actualmente esta es una mera hipótesis. A parte de su actividad, el alfa-pineno ha servido también como base biosintética para los ligandos del receptor cannabinoide CB2. En las distintas variedades de cannabis el pineno parece ser muy estable en su expresión, conformando alrededor del 10% y llegando a un máximo del 15-20% de la composición de terpenos.

Los ácidos resínicos son compuestos diterpenóicos de fórmula general $C_{20}H_{30}O_2$. Se clasifican de acuerdo a su estructura en dos series, abietano y pimarano. Los ácidos resínicos de la serie abietano tienen un sistema de dobles enlaces y un grupo isopropílico como sustituyente en el tercer anillo, mientras que en el caso de los ácidos resínicos de la serie pimarano tienen un grupo vinílico y un grupo metilo en la misma posición (75,76).

Los ácidos de la serie abietano representan alrededor del 80 %, sin embargo durante el procesamiento de la resina pueden ocurrir algunas reacciones tales como isomerización y oxidación. (Puzanova 1988, Dunaev 1986).

Los ácidos grasos están presentes en algunos extractivos de pinos y en la fracción tall oil. Estos consisten primariamente en ácidos de 18 átomos de carbono (C18), siendo predominantes el oleico y el linoleico y en menor proporción el palmítico y el esteárico.

2.7.3 Componentes neutros de la resina oleosa

La fracción de compuestos neutros está constituida por una mezcla compleja de alcoholes de alto peso molecular, anhídridos de ácidos, aldehídos ésteres, esteroides, terpenos, algunos hidrocarburos y resenos amorfos. Estos materiales neutros tienen un fuerte efecto sobre las propiedades de las colofonias, (Johanssen, 1982). De la fracción neutra los ésteres de resinas y ácidos grasos constituyen el 60 % (Johanssen, A. 1982) Los ácidos resínicos corresponden a los encontrados en la fracción ácida y los ácidos grasos en los compuestos neutros, predominando los de C18. (Kirk, 1968), sin embargo la porción de alcoholes provenientes de los ésteres es ligeramente diferente en cada colofonia. En pequeñas cantidades están presentes el isopimaral, pimarinal y eliotimol. (Lange, 1987). Se han publicado altos contenidos porcentuales, alrededor del 20 %, de compuestos neutros en colofonias Rusas (Kosikova 1987).

Se ha encontrado algunos esteroides, fundamentalmente el β -sitosterol y puede ser separado probablemente como compuesto epimérico de C20-22 (Conner, 1975).

2.7.4 Reactividad de los terpenoides de la Trementina

La reactividad de la trementina varía en dependencia del contenido de α -pineno, debido a que es el isómero predominante y más reactivo de esta mezcla de mono y sesquiterpenos presentes en este aceite esencial. El α -pineno es un material de partida para la síntesis de otros terpenoides (alcoholes, aldehídos y cetonas). A partir del α - pineno se ha sintetizado linalol (Semikolenov, 2001). La reacción de deshidrogenación del pineno para obtener p-cimeno se ha investigado en condiciones de catálisis con Pd (paladio) (Roberge, 2001). La isomerización selectiva del pineno utilizando ácidos de Lewis, en soporte de sílica y nanopartículas de dióxido de titanio, ha sido estudiada por Neri (2005), para obtener aldehído canfolénico.

El β -pineno, componente también presente, es el material de síntesis para la producción de geraniol, nerol, linol, mirceno y otros que pueden ser usados como intermediarios en síntesis orgánica (Templeton, 1969). A partir del β -pineno bajo condiciones catalíticas se ha obtenido Nopol (Mukesh, 2006). También ha sido utilizado para la obtención de terpenos quirales mediante la reducción de cetonas con borano. (Krzemiński, 2005). Cataldo F. ha publicado la radiopolimerización del β -pineno (Cataldo, 2006).

2.7.5 Reactividad de los ácidos resínicos de la Colofonia

Los ácidos resínicos tienen dos centros de reactividad, el sistema de dobles enlaces y el grupo carboxilo por lo que experimenta reacciones típicas de los dienos y de los ácidos carboxílicos. Cuando la reacción ocurre por el doble enlace pueden producirse reacciones de isomerización, oxidación, hidrogenación, dehidrogenación, desproporción, polimerización, ozonólisis, entre otras (Takeda, 1968). La reacción más estudiada es la que tiene lugar con el anhídrido maleico. En un inicio esta reacción se estudiaba con propósitos teóricos, posteriormente fue usada para la cuantificación de ácido levopimárico en oleoresina (Ruzicka, 1932). El resultado de los estudios demostró la formación de un aducto mediante la reacción de Diels- Alder. El ácido levopimárico reacciona con anhídrido maleico a temperatura ambiente en medio ácido. Por encima de 150 °C se produce la reacción de isomerización del ácido abiético en levopimárico, con formación del aducto el cual tiene importantes aplicaciones industriales. Se han realizado muchos estudios cinéticos relacionados con esta reacción empleando métodos espectroscópicos, demostrando la no formación de un simple producto. En la mezcla compleja el principal componente es el aducto de ácido levopimárico (ácido maleopimárico). También se obtiene el aducto del ácido palústrico y del neoabiético, siendo esta reacción explotada en la industria del papel y para la obtención de derivados del ácido maleopimárico (Siedov, 1974; Shukla, 1985). Schuller (1967) ha publicado derivados del ácido levopimárico (ésteres, imidas y amidas), presentando muchos de ellos actividad biológica y encuentran su aplicación como plaguicidas y fungicidas (Clinton, 1964).

La obtención de algunos derivados polifuncionales como aminoácidos y aminoalcoholes han sido estudiadas por Irishmetov (1972); Humplett (1961). Se ha estudiado el uso de aminas y amidas del ácido maleopimárico en la producción de polímeros para la producción de fibras sintéticas (Sabyasachi, 1984; Panda, 1984). Ha sido estudiada la reacción de colofonia y ácidos resínicos con formaldehídos (Rohde, 1973; Shirankov, 1976, 1977) para obtener derivados hidroximetilados que encuentran su aplicación como reaccionantes para la formación de poliuretanos.

La colofonia tratada con compuestos organosulfurados produce el ácido 9-10 secodehidroabiético que participa en el comercio de los poliuretanos (Thorpe, 1975). Otras posibilidades sintéticas se basan en la reactividad de los grupos vinílicos exocíclicos de los ácidos de la serie pimaranos, lo que puede ser útil en la preparación de intermediarios químicos en la obtención de polímeros (Collier, 1977). En la colofonia son utilizadas las reacciones típicas de los ácidos carboxílicos. La formación de sales de sodio han sido tradicionalmente utilizadas como emulgentes aniónicos para muchos fines. Los ésteres son obtenidos por la reacción de alcoholes polihidroxilados. La combinación de estos ésteres con compuestos fenólicos y resinas polieésteres han sido muy utilizadas en la fabricación de barnices (Gordon, 1955). Otras reacciones tales como la reducción del grupo carboxilo a hidroxilo y la obtención de nitrilo publicados por Bardyshev tienen su utilidad en la industria del plástico (Bardyshev, 1970). Mediante la reacción de hidrogenación de las colofonias se produce alcohol hidroabiético (Lazier, 1944) que puede ser útil como intermediario en la producción de ésteres y el aducto de óxido de etileno. La reacción de descarboxilación es utilizada para producir aceite de colofonia con gran utilidad en la industria. (Vasiliev, 1938; Casey, 1960).

2.8 Microbiología

La microbiología es la ciencia que estudia los microorganismos, grupo grande y diverso de organismos microscópicos que viven en forma de células aisladas o grupo de células; también comprende a los virus, que son microscópicos pero no son celulares. Los microorganismos influyen extensamente en la vida tanto y constitución tanto física como química de nuestro planeta. Son los encargados de los ciclos de los elementos químicos indispensables para la vida, incluidos carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno, carbono y oxígeno, además estos realizan más fotosíntesis que las plantas verdes. Los microorganismos constituyen el 90% de la biomasa de toda la biosfera. Los seres humanos tenemos una relación estrecha con los microorganismos; más del 90% de las células del cuerpo corresponden a microbios (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010).

2.8.1 Hongos

Dentro de la variedad microbiológica los dos tipos de microorganismos de interés para esta investigación son los hongos y las bacterias

En biología, el término Fungi (latín, literalmente "hongos") designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y protistas. Esta diferenciación se debe, entre otras cosas, a que poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las plantas, que contienen celulosa. Se ha descubierto que organismos que parecían hongos en realidad no lo eran, y que organismos que no lo parecían en realidad sí lo eran, si llamamos "hongo" a todos los organismos derivados del que ancestralmente adquirió la capacidad de formar una pared celular de quitina. Debido a ello, si bien este taxón está bien delimitado desde el punto de vista evolutivo, aún se están estudiando las relaciones filogenéticas de los grupos menos conocidos, y su lista de subtaxones cambió mucho con el tiempo en lo que respecta a grupos muy derivados o muy basales.

En la mayoría de los casos, sus representantes son poco conspicuos debido a su diminuto tamaño; suelen vivir en suelos y juntos a materiales en descomposición y como simbioses de plantas, animales u otros hongos. Cuando fructifican, no obstante, producen esporocarpos llamativos (las setas son un ejemplo de ello). Realizan una digestión externa de sus alimentos, secretando enzimas, y que absorben luego las moléculas disueltas resultantes de la digestión. A esta forma de alimentación se le llama osmotrofia, la cual es similar a la que se da en las plantas, pero, a diferencia de aquéllas, los nutrientes que toman son orgánicos. Los hongos son los descomponedores primarios de la materia muerta de plantas y de animales en muchos ecosistemas, y como tales poseen un papel ecológico muy relevante en los ciclos biogeoquímicos.

Los hongos tienen una gran importancia económica: las levaduras son las responsables de la fermentación de la cerveza y el pan, y se da la recolección y el cultivo de setas como las trufas. Desde 1940 se han empleado para producir industrialmente antibióticos, así como enzimas (especialmente proteasas). Algunas especies son agentes de biocontrol de plagas. Otras producen micotoxinas, compuestos bioactivos (como los alcaloides) que son tóxicos para humanos y otros animales. Las enfermedades fúngicas afectan a humanos, otros animales y plantas; en estas últimas, afecta a la seguridad alimentaria y al rendimiento de los cultivos.

Los hongos se presentan bajo dos formas principales: hongos filamentosos (antiguamente llamados "mohos") y hongos levaduriformes. El cuerpo de un hongo filamentoso tiene dos porciones, una reproductiva y otra vegetativa. La parte vegetativa, que es haploide y generalmente no presenta coloración, está compuesta por filamentos llamados hifas (usualmente microscópicas); un conjunto de hifas conforma el micelio (usualmente visible). A menudo las hifas están divididas por tabiques llamados septos (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010).

Los hongos levaduriformes o simplemente levaduras son siempre unicelulares, de forma casi esférica. No existen en ellos una distinción entre cuerpo vegetativo y reproductivo.

Dentro del esquema de los cinco reinos de Wittaker y Margulis, los hongos pertenecen en parte al reino protista (los hongos ameboides y los hongos con zoosporas) y al reino Fungi (el resto). En el esquema de ocho reinos de Cavalier-Smith pertenecen en parte al reino Protozoa (los hongos ameboides), al reino Chromista (los Pseudofungi) y al reino Fungi todos los demás.. La diversidad de taxa englobada en el grupo está poco estudiada; se estima que existen 1,5 millones de especies, de las cuales apenas el 5% han sido clasificadas. Durante los siglos XVIII y XIX, Linneo, Christian Hendrik Persoon, y Elias Magnus Fries clasificaron a los hongos de acuerdo a su morfología o fisiología. Actualmente, las técnicas de Biología Molecular han permitido el establecimiento de una taxonomía molecular basada en secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN), que divide al grupo en siete filos. La especialidad de la medicina y de la botánica que se ocupa de los hongos se llama micología, donde se emplea el sufijo -mycota para las divisiones y -mycetes para las clases.

2.8.2 Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células procariotas, por lo que a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y ésta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

Del estudio de las bacterias se encarga la bacteriología, una rama de la microbiología. La presencia frecuente de pared de pépticoglicano junto con su composición en lípidos de membrana son la principal diferencia que presentan frente a las arqueas, el otro importante grupo de microorganismos procariotas.

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, (Fredrickson J, Zachara J, Balkwill D, *et al* 2004) en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (Whitman W, Coleman D, Wiebe W., 1998).

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de éstas. Como ejemplo cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, solamente la mitad de los filos conocidos de bacterias tienen especies que se pueden cultivar en el laboratorio, por lo que una gran parte (se supone que cerca del 90 %) de las especies de bacterias existentes todavía no ha sido descrita.

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el tracto digestivo. Aunque el efecto protector del sistema inmunológico hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas, incluyendo cólera, difteria, escarlatina, lepra, sífilis, tifus, etc. Las enfermedades bacterianas mortales más comunes son las infecciones respiratorias, con una mortalidad solo para la tuberculosis de cerca de dos millones de personas al año (48).

En todo el mundo se utilizan antibióticos para tratar las infecciones bacterianas. Los antibióticos son efectivos contra las bacterias ya que inhiben la formación de la pared celular o detienen otros procesos de su ciclo de vida. También se usan extensamente en la agricultura y la ganadería en ausencia de enfermedad, lo que ocasiona que se esté generalizando la resistencia de las bacterias a los antibióticos.

En la industria, las bacterias son importantes en procesos tales como el tratamiento de aguas residuales, en la producción de mantequilla, queso, vinagre, yogur, etc., y en la fabricación de medicamentos y de otros productos químicos (Ishige T, Honda K, Shimizu S; 2005).

Aunque el término bacteria incluía tradicionalmente a todos los procariotas, actualmente la taxonomía y la nomenclatura científica los divide en dos grupos. Estos dominios evolutivos se denominan Bacteria y Archaea (arqueas). La división se justifica en las grandes diferencias que presentan ambos grupos a nivel bioquímico y genético (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010).

2.8.3 Microorganismos Patógenos

Algunos microorganismos son capaces de penetrar y multiplicarse en otros seres vivos, a los que perjudican, originando una infección; son los denominados microorganismos patógenos. Los problemas que causa una infección dependen del tipo de patógeno, el modo en que se transfiere, dosis o concentración de patógenos, persistencia de los microorganismos y la resistencia del organismo infectado.

La dosis de infección significa el número de microorganismos que entra en el cuerpo antes de que se produzca la infección o enfermedad. Esta dosis es muy baja para los virus y protozoos parásitos. La persistencia de los microorganismos depende del tiempo viable de los microorganismos cuando no se encuentran en el huésped humano. Por ejemplo, las bacterias son generalmente menos persistentes mientras los quistes de los protozoos son los más persistentes (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010).

Los jóvenes, personas mayores y enfermos de otras patologías son los menos resistentes a las enfermedades y por lo tanto son más frágiles. Cuando una persona es infectada, los patógenos se multiplican en el huésped, y esto supone un riesgo de infección o enfermedad. No todas las personas infectadas por patógenos enferman. Las personas que enferman pueden contagiar y extender la enfermedad mediante las secreciones y mediante contacto directo de alguna manera con la mucosa del infectado.

2.8.4 Dermatofitos

Los dermatofitos son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anejos cutáneos. La principal característica de ellos es que invaden las capas superficiales queratinizadas de la piel, pelos y uñas. Algunos atacan la queratina, allá donde esté en la Naturaleza; otros son altamente especializados y, por tanto, restringen su patogenicidad a ciertos huéspedes y tejidos. Producen manifestaciones clínicas muy variables, desde síntomas leves, hasta lesiones supuradas e inflamatorias intensas, que reciben el nombre genérico de dermatofitosis o tiñas (Emmons CW; Binford CH, Utz JP, Kwon-Chung KJ. *Medical Mycology*; 1977).

Emmons, en 1934, clasificó los dermatofitos en tres géneros anamórficos (asexuales): *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, clasificación que sigue aceptándose en la actualidad. Los teleomorfos de los dermatofitos se clasifican en un género, *Arthroderma*. Por otra parte, según la adaptación de cada una de las especies o variedades de estos hongos a diferentes animales u otros reservorios ecológicos se dividen, clásicamente, en especies geofílicas, zoofílicas y antropofílicas.

Los dermatofitos antropofílicos causan micosis sólo en el hombre, entre ellos: *Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Epidermophyton floccosum* etc. Entre los dermatofitos zoófilos, que originan micosis en los animales, a partir de los cuales se infecta el hombre, se puede citar a *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, var. *mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Microsporum gallinae*, etc. Por último, los geófilos, especies que se encuentran en el suelo como saprófitos, nutriéndose de la queratina existente en él (pelos, escamas, plumas) y con quienes tanto el hombre como los animales se infectan directamente: *Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum*, *Microsporum nanum*, *Microsporum cookei* (Crissey JT, Lang H; 1995).

De las distintas especies antes citadas, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *E. floccosum* son de distribución universal, siendo las que se aislan con más frecuencia en nuestro medio. La localización y aspecto de la lesión nos orientará sobre la posible implicación de un determinado dermatofito. Así, las especies pertenecientes al género *Microsporum* afectan al pelo y

la piel, *E. floccosum* invade la piel y las uñas y *Trichophyton* infecta tanto el pelo como la piel y las uñas (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010).

2.9 Bacterias seleccionadas

2.9.1 *Staphylococcus aureus*

Este patógeno (pronunciación: /,stafilo'kokus 'awrews/), conocido como estafilococo áureo, o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente (Hurtado, MP; de la Parte, MA; Brito A, Julio 2002). Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos (Lowy, Franklin D., 1998).

2.9.2 *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria flagelada con forma de bastoncillo, que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es una bacteria muy extendida, y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas, ya que sus necesidades alimenticias son mínimas, aunque las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos. En los seres humanos puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano.

Es muy poco frecuente que la *Pseudomonas aeruginosa* produzca trastornos en personas sanas. La enfermedad se origina como resultado de alteraciones en las defensas normales del huésped. Esto puede suponer la pérdida de protección que proporcionan las membranas mucosas o la piel, como ocurre con la "otitis externa". Sus mínimas necesidades de nutrición, adaptabilidad y relativa resistencia a los antibióticos permiten a esta bacteria sobrevivir cerca de su anfitrión (Ryan KJ,2004).

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son graves, especialmente cuando existe bacteremia. Ésta suele presentarse en pacientes con enfermedad grave de base, larga estancia hospitalaria y uso previo de antibióticos.

Al parecer la lesión inicial provocada por la *P. aeruginosa* al epitelio respiratorio y otras mucosas está mediada por pili o fimbrias y por un exopolisacárido mucoide conocido como alginato. Existen receptores de estas adhesinas en las células epiteliales (45).

El microorganismo produce diversas enzimas extracelulares como la proteasa alcalina, elastasa, fosfolipasa, citotoxina y exoenzimas A y S. La alteración de los tejidos del huésped por estos productos bacterianos extracelulares crea las condiciones necesarias para la proliferación e invasión bacteriana y la consiguiente destrucción del tejido.

La *Pseudomonas aeruginosa* frecuentemente ocasiona infecciones adquiridas en el hospital, prolongando el período de hospitalización, incrementando los costos médicos, particularmente en pacientes inmunocomprometidos o críticamente enfermos.

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son difíciles de tratar debido a que las cepas responsables pueden ser resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación. Puede ocurrir resistencia antibiótica durante o después del tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010).

El espectro clínico de las infecciones es muy cambiante y está influenciado por factores dependientes del huésped, el agente y el medio ambiente, por ello es importante revisar periódicamente las características clínicas y microbiológicas de las infecciones como parte de un sistema de vigilancia epidemiológica y control de las mismas.

2.9.3 *Salmonella typhi*

La *S. typhi* es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno. Pertenece al serotipo 9,12, en base a los epítopes de la tivelosa, el azúcar repetida en su antígeno O. El antígeno flagelar "d" es el más preponderante, aunque algunas cepas de Indonesia poseen otro antígeno denominado "z"; lo que significa que expresan un flagelo muy diferente en secuencia de aminoácidos al encontrado en las cepas de otras regiones del mundo. Además de los antígenos O y H, tiene en su exterior una cápsula de polisacáridos denominada Vi (por antígeno de "virulencia").

Estos bacilos no producen esporas. La mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos, que rodean a la célula. Interesantemente, existen cepas no móviles en Indonesia, en donde la incidencia de la fiebre tifoidea es más alta.

La *S. typhi* produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol, sin la producción de gas; pero no fermenta la lactosa, sacarosa, la ramnosa y otros azúcares. Produce nitrito a partir de nitrato y también produce ácido sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. *S. typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospedantes.

La fiebre tifoidea prevalece principalmente en países en vías de desarrollo, donde normalmente significa un reto a las autoridades en salud pública. Hay aproximadamente 17 millones de casos anuales con casi 600,000 muertes, principalmente en Asia y África.

Las más altas incidencias de fiebre tifoidea se encuentran en Indonesia y en algunos puntos del sureste asiático, como Papua Nueva Guinea, en donde puede alcanzar niveles de 103 por cada 100,000 habitantes. En otros lugares en Asia la incidencia es menor. Interesantemente, la mayoría de los casos en las regiones de mayor incidencia, se encuentran en niños en edad escolar de 13 a 19 años de edad (89).

2.9.4 *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis es un bacilo gram negativo, facultativamente anaeróbico. Muestra aglutinación, motilidad, y actividad ureasa. *P. mirabilis* causa el 90% de todas las infecciones por 'Proteus'. Viene de la Tribu *Proteae*.

Esta bacteria de colonias redondeadas tiene la habilidad de producir grandes niveles de ureasa. La ureasa hidroliza urea a amoníaco, (NH₃) y eso hace a la orina más alcalina. Y al subir la alcalinidad puede liderar la formación de cristales de estruvita, carbonato de calcio, y/o apatita. Esta bacteria puede encontrarse en cálculos, y esas bacterias escondidas allí, pueden reiniciar una infección post tratamientos antibióticos. Al desarrollarse los cálculos, después de un tiempo pueden seguir creciendo más y causar obstrucción dando fallas renales (Frénod, Emmanuel, 2006). *Proteus mirabilis* también puede producir infecciones de heridas, septicemia y neumonías, sobre todo en pacientes hospitalizados.

2.10 Hongos seleccionados

2.10.1 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los Sacaromicetos (Ryan KJ, 2004). Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.

Candida albicans puede asumir patogeneidad provocando la candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginosis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel.

En un físico debilitado, inmunodeprimido o convaleciente de un larga cura antibiótica, la *Candida* se multiplica en modo anómalo y, atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando la candidemia. Este fenómeno da lugar a algunos síntomas abdominales: mala digestión, gases e hinchazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión (Jewetz, Melnick y Adelberg, 2010). La candidosis induce también una disminución de la absorción de las sustancias nutritivas por lo que se podría producir un estado de malnutrición.

2.10.2 *Microsporum canes* / *M. gypseum*

Microsporum es un género de hongos causantes de la tiña de la cabeza, *tiña corporis*, (dermatofitosis) entre otras micosis. Es un hongo filamentoso queratinofílico incluido en el grupo de los dermatofitos. *Microsporum* forma tanto macroconidios como microconidias, las macroconidias hifas son hialinas, multiseptada, variable en forma, fusiforme, en forma de huso y obovadas, de entre 7 y 20 por 30 a 160 um de tamaño. Sus características de forma, tamaño y de la pared celular son características importantes para la identificación de especies. Las microconidias son hialinas, unicelulares, piriforme o claviforme, de paredes lisas, de 2,5 a 3,5 por 4-7 um de tamaño y no para el diagnóstico de cualquier especie. La separación de este género de *Trichophyton* se basa esencialmente en la rugosidad de la pared celular macroconidial, aunque en la práctica a veces puede ser difícil de observar (Ryan KJ, 2004).

Mientras que el hábitat natural de algunas de las especies de *Microsporum* es el suelo (la especie geofílica), otras afectan principalmente a diversos animales (especies zoofílicas) o humanos (la especie antropofílicas). Algunas especies están aisladas de suelo y los animales (geofílica y zoofílicas). La mayoría de las especies de *Microsporum* están ampliamente distribuidos en el mundo mientras que otros han restringido la distribución geográfica (Ryan KJ; 2004).

2.10.3 *Trichophyton rubrum*

Es un hongo dermatofito antropofílico. Es la causa más frecuente de enfermedades de la piel como el pie de atleta, prurito del jockey y tiña. Este hongo se describió por primera vez por Malmsten en 1845. El crecimiento de las colonias de *Trichophyton* es de lento a moderadamente rápido. La coloración de frente puede ser blanco, beige amarillento claro o violeta rojizo. Reverso pálido, amarillento, marrón o marrón rojizo. Así mismo este hongo es la causa más común de infecciones en las uñas. Este es un hongo unicelular (90).

CAPÍTULO III
ASPECTOS METODOLÓGICOS

ASPECTOS METODOLÓGICOS

3.1 Descripción del área de estudio



Municipio de Jarabacoa, La Vega, R.D. Imagen: Google Maps

El área de estudio de esta investigación es el municipio Jarabacoa, creado según la ley 530 del 3 de septiembre de 1858 y pertenece a la región Cibao Sur. Está ubicado en el mismo centro de la Cordillera Central que se levanta en una altiplanicie mar (msnm). Limita al norte

de 525 metros sobre el nivel del con la provincia Concepción de La Vega a la cual pertenece, al sur con el municipio Constanza, al este con la provincia Monseñor Nouel, y al oeste con la provincia Santiago. Los distritos municipales del municipio son: Buena Vista y Manabao. La superficie es de 673.9 km² y su densidad poblacional de 84 habitantes por km².

Puntualmente el estudio se realizará en la Fábrica de Trementina “Eeli Ylitalo y sucesores” establecida por un finlandés desde 1929, ubicada en la carretera Belarmino Ramírez, Altos del Yaque, Jarabacoa. Esta fábrica se dedica a la fabricación y comercialización de Trementina y sus derivados, como Aceites Creosotados, Creolina Vegetal, entre otros.

3.2 Dimensión de la investigación

La investigación tuvo una trayectoria limitada solo al objeto de estudio.

3.3 Tipo de estudio.

Este estudio fue de carácter experimental, exploratorio, descriptivo, analítico y bibliográfico, considerándose como un diseño mixto.

3.4 Universo

El universo de la investigación estaba constituido por las plantaciones de *Pinus occidentalis* sembrados en los alrededores de la Fábrica de Trementina Eeli Ylitalo y Sucesores, de Jarabacoa, Provincia La Vega.

3.5 Muestra

Fue tomada al azar de manera aleatoria de la población del universo de estudio en esta investigación.

3.6 Instrumentos de recolección de datos

3.6.1 Revisión bibliográfica

Se utilizaron fuentes primarias siendo estas las que contienen información nueva y original, tales como revistas científicas, investigaciones, documentos de archivos, entre otras. En fuentes secundarias referidas a las que contienen información obtenida de las fuentes primarias, entre otras, en la biblioteca del Herbario del Jardín Botánico Nacional Rafael María Moscoso; bibliotecas de las universidades UNPHU, UASD, Fundación Global Democracia y Desarrollo (FUNGLODE), biblioteca de Gaia Tropical Inc, Internet (Google académico, Sitios web.).

3.6.2 Observación de campo

Se hicieron observaciones descriptivas del área de estudio que es la Fábrica de Trementina “Eeli Ylitalo y Sucesores”, ecología de la especie vegetal, flora y fauna asociada, parámetros físicos como temperatura, luz y humedad y el proceso de obtención de la muestra que consiste en la resina oleosa, de la que forman parte la colofonia y la trementina.

3.6.3 Recolección de muestra

Se colectaron muestras de la corteza, frutos, flores y agujas (hojas) en fundas Ziploc y fueron llevadas al Herbario del Jardín Botánico Nacional Rafael María Moscoso, para su certificación por parte de los técnicos competentes. La resina oleosa fue colectada del tronco de la especie vegetal en estudio. Las muestras de colofonia y la trementina puras, fueron cedidas por los propietarios de la fábrica de Trementina de Jarabacoa, Eeli Ylitalo y Sucesores, establecida por el finlandés Eeli Ylitalo desde 1929, ubicada en la carretera Belarmino Ramírez, Altos del Yaque, Jarabacoa. Esta fábrica se dedica a la fabricación y comercialización de Trementina y sus derivados, como Aceites Creosotados, Creolina Vegetal, entre otros.

3.6.4 Técnicas de investigación

En el LINFLAMED (UASD) las muestras colectadas se adecuaron con los solventes (grado reactivo) y requeridos por la técnica química específica revisada en la bibliografía, para fines de estudio con una extracción alcohólica. En cuanto a la investigación de los efectos antimicrobianos se utilizaron la técnica de Resistencia o Sensibilidad *in vitro* de Kirby Bauer, además del método o técnica de Siembra por Dilución en Agar, utilizando diferentes cepas puras de hongos y bacterias patógenas para humanos, sembradas en placas de Petri por embadurnamiento y dilución respectivamente.

Se investigó la composición química de la resina oleosa (colofonia y trementina) por análisis cromatográfico, en un Cromatógrafo de gases (GC-MS), para con ello validar los resultados obtenidos y publicados por otros investigadores en otras partes del mundo, citados en la bibliografía.

3.7 Metodología Experimental

3.7.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y «virtudes curativas únicas». Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan exquisitas como el jazmín. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible (Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F; 2002).

El término esencias o aceites esenciales se aplica a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla y a las sustancias semisintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales. El término aceites esenciales puros se utiliza para resaltar la diferencia entre los aceites naturales y los sintéticos (Norman Shealy, 1999).

Están presentes en distintas partes de la planta:

en las flores (como en el caso de la lavanda, el jazmín y la rosa)

en todo el árbol (como sucede con el eucaliptus)

en las hojas (la citronela)

en la madera (el sándalo)

en la raíz (el vetiver)

en la resina que exudan (el incienso, el pineno, la mirra y el benjuí)

en la cáscara de los frutos (el limón, la naranja y la bergamota)

La destilación por arrastre de vapor se emplea con frecuencia para separar aceites esenciales de tejidos vegetales. Los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos,

terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles, y se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas (Norman Shealy, 1999).

En el vegetal, los aceites esenciales están almacenados en glándulas, conductos, sacos, o simplemente reservorios dentro del vegetal, por lo que es conveniente desmenuzar el material para exponer esos reservorios a la acción del vapor de agua.

Los aceites esenciales son productos naturales aplicados en diferentes industrias, como son la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros usos. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas.

La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada Destilación por Arrastre de Vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerá de la técnica que se utilice para el aislamiento.

3.7.2 Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es una técnica empleada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables.

Ley de Dalton: Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles sigue la Ley de Dalton sobre las presiones parciales, que dice que: cuando dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión que si estuviera solo y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total del sistema. Su expresión matemática es la siguiente: $P'_j = P_1 + P_2 + \dots + P_n$



Fábrica de Trementina
Jarabacoa, Foto: W. Schulz

Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil.



Fábrica de Trementina
Jarabacoa. Foto: W. Schulz

Si uno de dos líquidos es agua (destilación por arrastre con vapor de agua) y si se trabaja a la presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua a una temperatura inferior a 100 °C. Esto es muy importante cuando el compuesto se descompone a su temperatura de ebullición o cerca de ella.

En general, esta técnica se utiliza cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto.

Esta fue la técnica utilizada por los encargados de la Fábrica de Trementina de Jarabacoa, Eeli Ylitalo y sucesores, para la obtención de los derivados de la resina oleosa. Por motivos de privacidad no nos permitieron entrar a las instalaciones donde se trabaja la resina de pino, se limitaron a mostrarnos el exterior de la fábrica y a cedernos muestras de los derivados obtenidos por esta técnica. El aceite obtenido fue el aceite de trementina en estado puro, y el residuo resinoso la colofonia.

3.7.3 Extracto alcohólico

Es el transporte de sustancias activas contenidas en una planta o sustancia vegetal mediante el alcohol como solvente, en este caso, la droga o parte activa de la planta se diluye en el alcohol conservando sus propiedades terapéuticas.

3.7.3.1 Preparación de la solución hidroalcohólica de colofonia

Antes de iniciar, se verificó de manera cualitativa la solubilidad de la colofonia en distintos solventes (grado reactivo), entre los cuáles se encontraban hexano, éter y alcohol etílico. El solvente



Colofonia en balón,
Foto: W. Schulz

más adecuado resultó ser el alcohol etílico al 95% (grado reactivo), por lo que se procedió a trabajar con este compuesto.

Pasos:

- Se redujo en trozos una pequeña cantidad de colofonia sólida y se trituró con ayuda de un mortero.

- Se pesaron 40 g de la Colofonia cuasi pulverizada y se vertió en un balón de 500 ml para someterla a calor y destilar por reflujo con una solución de alcohol etílico, previamente preparada al 80% V/V.

- Se vertieron 200 ml de la solución alcohólica en el balón, junto a los 40 g de colofonia, agitando y sometiendo a calor con llama leve durante unos 45 min.

- A los 30 minutos ya se apreciaba un cambio de color en la solución, señal de que la destilación por reflujo estaba avanzada. El material sólido del fondo o residuo de colofonia era cada vez menor.

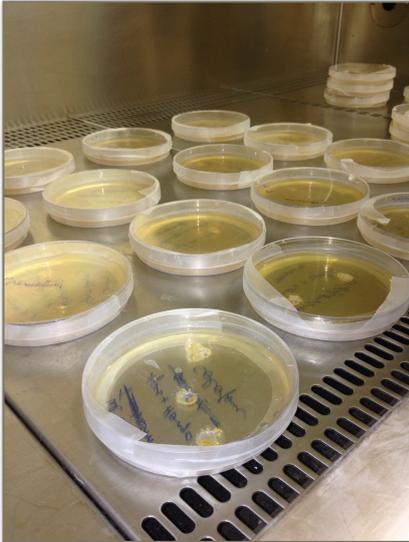
- Una vez transcurridos los 45 min, fue apagada la llama y se dejó enfriar por un espacio de tiempo de unos 20 minutos. Tras esto se separó el balón del destilador y con ayuda de un embudo y papel de filtro, fue filtrada la solución hidroalcohólica y depositada en un Erlenmeyer.

- Fue cerrado el Erenmayer con un topón de goma y sellado con Parafina, para evitar el escape del alcohol etílico (líquido muy volátil), lo cual alteraría la concentración de la solución.



Extracto alcohólico,
Foto: W. Schulz

3.7.4 Antibiogramas



Antibiogramas (cultivos),
Foto: W. Schulz

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no sólo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene a la larga consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos haya adquirido tanta importancia y sea indispensable para hacer de los antibióticos un uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes

terapéuticos. El conocimiento de la sensibilidad a los antibióticos, del microorganismo causante de una enfermedad, no es sólo importante para

hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que además en aquellos casos en los cuales el paciente presente intolerancia a determinado fármaco, permite seleccionar el más adecuado para ese paciente en particular (Clavell, L.; 1992).

Los antibiogramas son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos ante una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antimicrobianos y los microorganismos en un determinado paciente. Entre los factores podemos resaltar:

- Factores del agente antimicrobiano o Farmacocinética
- Unión a proteínas del plasma
- Vías de administración
- Acción bacteriostática o bactericida
- Concentración en el sitio de la infección
- Factores del huésped

- Enfermedad
- Estado inmunológico
- Formación de absceso
- Presencia de cuerpo extraño
- Función renal y hepática
- Cumplimiento del tratamiento
- Factores del microorganismo o Virulencia
- Alta concentración de microorganismos
- Infección mixta
- Desarrollo de resistencia durante el tratamiento

La metodología usada para realizar el antibiograma toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder *in vivo* a un determinado antibiótico. Existen diversos métodos para determinar la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, presentando además cada uno de estos métodos, múltiples variantes (Clavell, L.; 1992).

Cualquiera que sea el método seleccionado, el medio de cultivo a emplear debe ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitorio sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos o quimioterápicos ensayados. Usualmente se utiliza el agar de Muller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento. Cuando se trata de estreptococos u otros microorganismos exigentes, se le añade al Mueller-Hinton, 5% de sangre desfibrinada. De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel. La variante más utilizada de este método es la de Kirby-Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición (Palavecino Rosales E. 1997).

3.7.4.1 Preparación del Agar Sabouraud

El bajo pH del medio Agar Sabouraud resulta favorable para el crecimiento de los hongos y ligeramente inhibitorio para las bacterias. En caso de requerirse un incremento en la inhibición del crecimiento de bacterias, se suelen añadir agentes antimicrobianos como la gentamicina que inhibe

el crecimiento de los microorganismos gram negativos o el cloramfenicol que tiene un amplio espectro de acción.

Procedimiento:

Se suspendieron 65 g de medio deshidratado Sabouraud en un litro de agua destilada. Se calentó agitando frecuentemente y se dejó hervir durante 1 minuto hasta disolver completamente los ingredientes. Se evitó el sobrecalentamiento. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Luego se distribuyó en las placas y se enfrió el medio a temperatura ambiente antes de su utilización.



Agar Sabouraud,
Foto: W. Schulz

3.7.4.2 Método de Difusión en Agar o Técnica de Kirby-Bauer

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar por embadurnamiento, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35 o 37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de



Método Dilución, Foto:
W. Schulz

inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards).

Procedimiento:

Sobre la superficie de una placa con agar Sabouraud se inocularon una cantidad estandarizada de bacterias, sembradas de forma pareja para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano.

A continuación se colocaron discos de papel de filtro impregnados con concentraciones de 20 y 40 microlitros respectivamente en cada una de las placas. Se utilizaron cuatro placas para cada una de las siguientes cepas bacterianas, las cuales fueron donadas por el Laboratorio Clínico Amadita:

- *Estafilococo aureus* ATCC-25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853
- *Salmonella typhi* ATCC-140228
- *Proteus mirabilis* ATCC-12453

Las placas se organizaron de la siguiente manera: De las cuatro placas usadas para cada cepa, a la primera le impregnaron dos discos con concentraciones de 20 y 40 microlitros de aceite de trementina, respectivamente. A la segunda placa, dos discos impregnados con 20 y 40 microlitros de la solución hidroalcohólica de Colofonia. La tercera placa se usó para el control positivo con discos impregnados de antibióticos convencionales de amplio espectro. La cuarta placa como control negativo, sin aplicación de discos. Esto para cada una de las cepas de los microorganismos mencionados.

Las sustancias a estudiar y los antibióticos difundieron desde el papel filtro al agar de forma radial. Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C (este parámetro fue respetado, porque a temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento de los gérmenes y la difusión de las sustancias, dando halos irregulares difíciles de medir), y luego se midieron los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas confeccionadas para dichas interpretaciones.

3.7.4.3 Método de dilución (Escala de Mc Farland)

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado (macrodilución) de antimicrobiano.

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi) automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste.

Procedimiento del método de dilución

- Se preparó el Agar Saboroud con Cloranfenicol según las instrucciones que indica el respaldo o la literatura del producto.

- Se vertieron 5 ml de solución salina fisiológica (estéril) en cada uno de los respectivos tubos de ensayo que contenían las colonias con las cepas de hongos repletas de esporas, con quienes se realizaron las pruebas. Se agitó la solución salina vertida, con una espátula de tamaño pequeño hasta que las esporas se dispersaran lo suficiente en la solución, luego, esta suspensión de esporas se vertió en otro tubo de ensayo limpio, cada una por separado. Este procedimiento se efectuó con cada cepa de hongo.



Método Dilución, Foto:
W. Schulz

Los hongos que se utilizaron para estos antibiogramas fueron donados por el departamento de Micología del Instituto Dermatológico y Cirugía de la Piel Dr. Huberto Bogaert Díaz (IDCP), estas cepas son consideradas muestras clínicas o virulentas, ya que fueron aisladas de pacientes que visitan dicho centro de salud:

Microsporum canes

Microsporum gypseum

Candida albicans

Trichophyton rubrum

- Después de preparar las suspensiones de inóculos, en el laboratorio de toxicología de la facultad de Ciencias de la UASD con ayuda de un Espectrofotómetro Ultravioleta, fue medida la absorbancia de cada una de las suspensiones microbianas, a una longitud de onda de 625 nm. Se adecuaron las concentraciones de los microorganismos suspendidos en cada tubo según la escala de Mc Farland, que indica que la absorbancia debe ser de 0.5, esto se consiguió diluyendo las suspensiones microbianas con agua salina estéril o concentrándolas aún más, según la absorbancia arrojada para cada caso.



Espectrofotómetro UV, Foto: W. Schulz

- Luego de esto se mezclaron 5 ml de cada una de las suspensiones microbianas o inóculos por separado con 95 ml de agar sabouraud y cloranfenicol (ya preparado y licuado a una temperatura de 45 °C), mas 5 ml de dimetil sulfóxido (agente tensoactivo).

- Cada dilución se mezcló por unos segundos y luego estas se vertieron, cada una, en 4 placas de Petri respectivamente, para un aproximado de 25 ml de agar por placa.

- Los medios se dejaron solidificar y luego se aperturaron dos pozos cilíndricos en cada placa, con ayuda del dorso cóncavo de pipetas de pequeño tamaño. La dimensión de cada pozo era de 3 mm de altura o profundidad y un diámetro de 5 mm.

- Se vertió una gota de agar en cada uno de los pozos para sellar el fondo de los mismos.

- Las cuatro placas por cepa se dividieron de la siguiente manera:

Placa 1: Placa con Trementina,

se vertieron 50 microlitros de aceite de trementina en ambos pozos

Placa 2: Placa con Extracto Alcohólico de Colofonia,

se vertieron 50 microlitros de solución hidroalcohólica de colofonia en ambos pozos

Placa 3: Placa con Ketoconazol (Control positivo),
se vertieron 50 microlitros de ketoconazol en solución en ambos pozos.

Placa 4: Control Negativo,
a esta placa no se le efectuaron perforaciones ni se le aplicó sustancia alguna.

Una vez efectuado esto, las placas se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 24 horas, luego se llevaron a la nevera, con temperatura controlada por otras 48 horas y tras esto se evaluó el crecimiento de las colonias. Verificamos la presencia o ausencia del halo de acción antimicótica.

3.7.4.4 Interpretación de los halos de inhibición

Comparando los diámetros del halo de inhibición con las CMI, se han fijado unos criterios para clasificar las cepas estudiadas. De esta forma se han fijado tres categorías: sensible (S), intermedia (I) y resistentes (R). Anteriormente se añadía la categoría moderadamente sensible (MS) que tiende a eliminarse y los resultados correspondientes a la misma se han situado en la categoría de intermedia.

El término **sensible** indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, en función del tipo de infección y de la especie considerada.

El término **intermedio** indica que el halo de inhibición traducido en valores de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas cocentraciones de antimicrobiano (p. ej. orina) o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual. El NCCLS también incluye en esta categoría aquellos casos de antimicrobianos con márgenes de toxicidad

estrechos en los que pequeños errores técnicos podrían suponer cambios de interpretación en la categoría clínica.

Finalmente, el término **resistente** se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano (82).



Incubadora, Foto: W. Schulz

Para la medición de los halos de inhibición microbial provocado por sustancias de origen natural, las medidas de los halos resultantes nos indican:

Sensible (S), > 15 mm

Intermedio o Moderadamente sensible (I) $> 9 < 15$ mm

Resistente (R). < 9 mm

3.7.5 Fundamentos de la Cromatografía de Gases/Masa (GC-MS)

La cromatografía es una técnica para separar las sustancias químicas que se basa en las diferencias en conductas partitivas de una fase móvil y de una fase estacionaria para separar los componentes en la mezcla. La muestra es transportada por una corriente de gas a través de una columna empacada con un sólido o tal vez recubierta con una película de algún líquido. Debido a su simplicidad, sensibilidad y efectividad para separar los componentes de la mezclas, la cromatografía de gases es una de las herramientas mas importantes en química. Es ampliamente usada para análisis cuantitativos y cualitativos de mezclas, para la purificación de compuestos y para la determinación de constantes termoquímicas tales como calores de solución y vaporización, presión de vapor y coeficientes de actividad (Andreas Hoffman, 2001).

La cromatografía de gases es también utilizada para monitorear los procesos industriales en forma automática: se analizan corrientes de gas periódicamente y se analizan reacciones de forma manual o automática para contrarrestar variaciones no deseadas. La espectrometría de masas (MS) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga. De esta manera la espectrometría de masas es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos. La MS brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales inorgánicos y orgánicos (Andreas Hoffman, 2001).

Procedimiento:

Para esta investigación se analizó la composición cualitativa de las sustancias, realizando un análisis cromatográfico a través de un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Detector de Masas. El análisis cromatográfico fue efectuado por los técnicos encargados del departamento de Control y Calidad del Laboratorio Central Veterinario LAVECEN, bajo la dirección de la Lic. Norma Rodríguez, gerente responsable. El análisis realizado es de tipo cualitativo, ya que solo interesaba corroborar la existencia de algunos terpenoides y componentes importantes en cada una de las sustancias, para compararlas con las fuentes bibliográficas.

3.7.5.1 Análisis cromatográfico de la trementina

Se tomaron 500 microlitros de la muestra, esta se disolvió en 2 ml de acetonitrilo, se dejó evaporar, se reconstituyó con un ml de acetona y luego se inyectó en el Cromatógrafo GC masa, todo esto para no afectar la columna del cromatógrafo y que el análisis diera resultados.

3.7.5.2 Análisis cromatográfico de la solución hidroalcohólica de colofonia

Se tomaron 200 microlitros de la muestra, esta se disolvió en 2 ml de acetonitrilo, se dejó evaporar, se reconstituyó con 1 ml de acetona y luego se inyectó en el Cromatógrafo GC masa, todo esto para no afectar la columna del cromatógrafo y que el análisis diera resultados.

CAPITULO IV
ASPECTOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN

ASPECTOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Resultados

Fruto de los análisis efectuados, se presenta de manera tabulada la recopilación de los datos resultantes.

4.1.1 Tabulación de los resultados de los Antibiogramas

Cepas de Hongos	Extracto Etanólico de Colofonia	Escencia de Trementina	Control (+) Ketoconazol	Control (-)
- <i>Microsporium canes</i>	10 mm	11 mm	20 mm	--
- <i>Microsporium gypsium</i>	30 mm (halo oscuro)	35 mm (halo oscuro)	17 mm	--
- <i>Candida albicans</i>	--	10 mm	30 mm	--
- <i>Trichophyton rubrum</i>	10 mm	--	23 mm	--

Fuente: W. Schulz, 2014

Cepas de Bacterias	Extracto Etanólico de Colofonia	Escencia de Trementina	Control (+) Antibióticos convencionales	Control (-)
- <i>Estafilococo aureus</i>	--	--	18 mm	--
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14 mm	26 mm	19 mm	--
- <i>Salmonella typhi</i>	--	--	15 mm	--
- <i>Proteus mirabilis</i>	--	--	17 mm	--

Fuente: W. Schulz, 2014

Los resultados arrojados por los antibiogramas demuestran que los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*, trementina y colofonia, ejercieron efecto antimicrobiano ante varios de los microorganismos analizados en esta investigación, estos fueron *Microsporium canes*, *Microsporium gypsium*, *Trichophyton rumbrum*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El efecto antimicrobiano fue medido por el diámetro del halo de inhibición, el cuál se ve afectado por dos factores, la susceptibilidad del microorganismo y la potencia antimicrobiana del extracto vegetal. Las cepas de *Estafilococo aureus*, *Salmonella typhi* y *Proteus mirabilis* mostraron resistencia ante las sustancias estudiadas.

4.1.2 Tabulación de los resultados para los hongos analizados

Cepas de Hongos	Escencia de Trementina	Resultado
- <i>Microsporium canes</i>	11 mm	acción fungicida / intermedio o moderadamente sensible
- <i>Microsporium gypsium</i>	35 mm (halo oscuro)	acción fungistática / sensible
- <i>Candida albicans</i>	10 mm	acción fungicida / intermedio o moderadamente sensible
- <i>Trichophyton rubrum</i>	--	no se verificó halo de acción / resistente

Fuente: W. Schulz, 2014

Estos resultados nos muestran que dentro de las cepas de hongos analizadas el aceite de trementina ejerció; acción fungicida intermedia o moderadamente sensible ante el *Microsporium canes*, acción fungistática sensible ante el *Microsporium gypsium*, acción fungicida intermedia o moderadamente sensible ante la *Candida albicans*; ante el *Trichophyton rubrum* no se verificó halo de acción antimicótico.

Cepas de Hongos	Extracto Etanólico de Colofonia	Resultados
- <i>Microsporium canes</i>	10 mm	acción fungicida / intermedio o moderadamente sensible
- <i>Microsporium gypsium</i>	30 mm (halo oscuro)	acción fungistática / sensible
- <i>Candida albicans</i>	--	no se verificó acción / resistente
- <i>Trichophyton rubrum</i>	10 mm	acción fungistática / intermedio o moderadamente sensible

Fuente: W. Schulz, 2014

Estos resultados nos muestran que dentro de las cepas de hongos analizadas el extracto hidroalcohólico de colofonia ejerció; acción fungicida intermedia o moderadamente sensible ante el *Microsporium canes*, acción fungistática sensible ante el *Microsporium gypsum*, ante la *Candida albicans* no se verificó halo de acción antimicótico, y acción fungistática intermedia o moderadamente sensible ante el *Trichophyton rubrum*.

4.1.3 Tabulación de los resultados para las bacterias analizadas

Cepas de Bacterias	Escencia de Trementina	Resultados
- <i>Estafilococo aureus</i>	--	no se verificó acción / resistente
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26 mm	acción bactericida / sensible
- <i>Salmonella typhi</i>	--	no se verificó acción / resistente
- <i>Proteus mirabilis</i>	--	no se verificó acción / resistente

Fuente: W. Schulz, 2014

Estos resultados muestran que dentro de las cepas de bacterias analizadas el aceite de trementina no ejerció acción antimicrobiana ante *Estafilococo aureus*, *Salmonella typhi* ni *Proteus mirabilis*. Ante la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ejerció un efecto bactericida sensible.

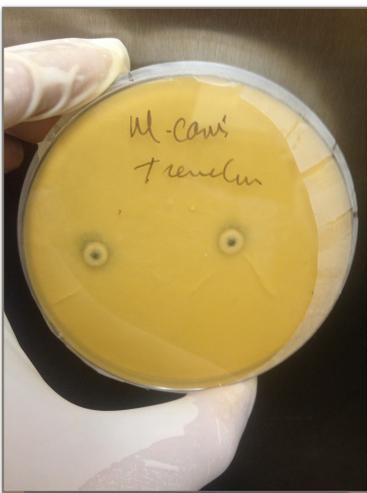
Cepas de Bacterias	Extracto Etanólico de Colofonia	Resultados
- <i>Estafilococo aureus</i>	--	no se verificó acción / resistente
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14 mm	bacteriostático / intermedio o moderadamente sensible
- <i>Salmonella typhi</i>	--	no se verificó acción / resistente
- <i>Proteus mirabilis</i>	--	no se verificó acción / resistente

Fuente: W. Schulz, 2014

Estos resultados muestran que dentro de las cepas de bacterias analizadas el extracto hidroalcohólico de colofonia no ejerció acción antimicrobiana ante *Estafilococo aureus*, *Salmonella typhi* ni *Proteus mirabilis*. Ante la *Pseudomonas aeruginosa* ejerció un efecto bacteriostático intermedio o moderadamente sensible.

Los microorganismos ante los cuales los derivados de la resina mostraron actividad antimicrobial fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *Microsporium canes*, *Microsporium gypsium*, *Trychophyton rubrum* y *Candida albicans*. Limitándonos al universo de los microorganismos estudiados, los derivados de la resina oleosa del pino ejercieron una acción antimicrobial de 4 hongos/bacteria.

4.1.4 Cultivos con presencia de halo de inhibición



Mycosporium canes
Trementina

Foto: Werner Schulz



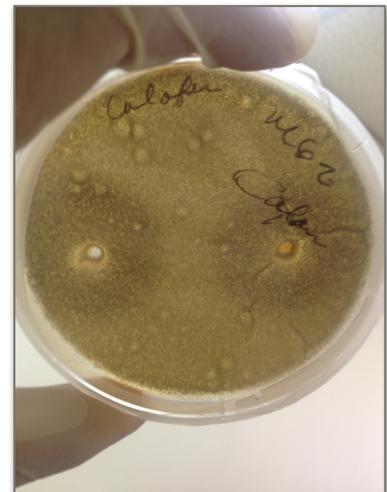
Mycosporium canes
Colofonia

Foto: Werner Schulz



Mycosporium gypsium
Trementina

Foto: Werner Schulz



Mycosporium gypsium
Colofonia

Foto: Werner Schulz



Candida albicans
Trementina

Foto: Werner Schulz



Candida albicans
Colofonia

Foto: Werner Schulz



Trichophyton rubrum
Trementina

Foto: Werner Schulz



Trichophyton rubrum
Colofonia

Foto: Werner Schulz



Pseudomonas aeruginosa
Trementina

Foto: Werner Schulz



Pseudomonas aeruginosa
Colofonia

Foto: Werner Schulz

Para los casos del *M. rubrum* y el *M. gypsum*, la acción farmacológica antifúngica mostrada fue fungistática, los halos después de inhibidos fueron recolonizados por la cepas, tras 24 horas. Lo mismo sucedió con la *Pseudomonas aeruginosa*, en la placa que se aplicó extracto alcohólico de colofonia.

Los resultados para la *Candida albicans* y el *M. canis* son de acción moderadamente inhibitoria, pero fungicida, pues aunque el diámetro de los halos de inhibición sea de longitud reducida, no se verifica una recolonización de los halos en estos cultivos, por parte de los microbios.

4.1.5 Resultados de la Cromatografía de Gas Masa

En el anexo se exponen los picos de algunos de los componentes químicos que contienen las respectivas muestras, corroborando con esto la autenticidad de los derivados estudiados durante esta investigación.

No fue posible hacer la detección de la presencia de ácido abiético, ni ácido pimárico (componentes de la colofonia), debido a que el cromatógrafo utilizado no poseía un estándar de referencia de estas moléculas en su archivo.

Más adelante se exponen los picos obtenidos durante el análisis, validando la presencia de los siguientes componentes: alfa pineno, beta pineno, ciclohexano, limoneno y 3-careno. El Sample Name usado para la colofonia fue cera.

4.2 Discusión y análisis de resultados

Mc Murry, John Abreu, y J. M Schuller, son de los pocos autores cuyas fuentes bibliográficas contienen información de estudios realizados a la resina de pino, desde el punto de vista farmacológico. Estos autores confirman el potencial que posee la sustancia, además de otras cualidades farmacológicas descubiertas, como actividad antiinflamatoria, antiulcerosa, etc. Dicho potencial antimicrobiano queda corroborado con los resultados obtenidos en la presente investigación, por la presencia de los halos de inhibición en las distintas cepas analizadas ante los derivados de la resina oleosa del pino endémico, *Pinus occidentalis*.

Otras investigaciones, que aparecen con mayor frecuencia en fuentes bibliográficas, si bien no nos informan acerca de investigaciones efectuadas con la propia resina o alguno de sus derivados, si arrojan información acerca de investigaciones realizadas con los compuestos constituyentes principales de la resina (alfa pineno, beta pineno, ácido abiético etc.). Estudios acerca del potencial antimicrobiano de diversos aceites esenciales que poseen alfa y/o beta pineno como parte de sus elementos integrales, han mostrado tener acción antimicrobiana.

Entre estas investigaciones se puede citar el estudio realizado a la *Melaleuca alternifolia* o aceite del árbol del té, un potente antiséptico natural de origen australiano que mostró actividad antibacteriana, antivírica, antifúngica, antiprotozoaria, antiinflamatoria y antioxidante. La actividad más estudiada de esta especie vegetal fue la antibacteriana, y con los estudios quedó demostrado que su contenido de alfa-pineno, beta-pineno y linanol contribuyen con esta actividad (88). El alfa y beta pineno son parte de los terpenoides constituyentes de las sustancias analizadas en este estudio y que se encuentran en mayor proporción. Se infiere que juegan un papel fundamental en la actividad antimicrobiana.

La determinación de la bioactividad del aceite esencial de *M. atropurpureum* se realizó sobre cepas de: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *C. albicans*, Pese a que no se observó una relación directa entre la composición del aceite esencial y la potencia del mismo como antimicrobiano, si se verificó efecto antimicrobiano, aún cuando el mecanismo de acción o las sustancia reponsables de dicho efecto no

hayan quedado dilucidados. Sorprendentemente este aceite esencial tiene una concentración de un 75% de alfa pineno en su composición (26).

Otras Investigaciones han revelado que el uso etnobotánico del aceite esencial de *Aroeira dosertao*, planta medicinal muy usada en Brasil y cuyo aceite se usa con fines terapéuticos contra afecciones cutáneas y problemas relacionados con dolencias respiratorias y urinarias, está compuesto en un 80% por alfa pineno. Se asume que esta sustancia puede ser directamente responsable de dichos efectos farmacológicos, entre los cuales se verifica efecto antimicrobiano (4).

La investigación de la Actividad Antimycobacteriana de Terpenos mostró que el alfa pineno presentó actividad antibacteriana frente a cepas del género *Mycobacterium* (12). Se investigó la actividad biológica del ácido abiético y este estudio reveló que la sustancia presenta inhibición ante la *Chromobacterium violaceum* (41). El ácido abiético es un ácido resínico que se encuentra en gran proporción en la fracción no arrastrable por vapor de la resina, la colofonia.

Pese a que no se sabe a ciencia cierta si el alfa pineno es directamente responsable de la actividad antimicrobiana presentada en las experimentaciones descritas, podemos inferir que por el hecho de ser un componente común de las sustancias analizadas en los estudios expuestos, que la molécula en si misma guarda potencial antimicrobiano. Es muy probable que la interacción entre los distintos metabolitos secundarios sinergice o potencie el efecto antimicrobiano propiciado por el alfa pineno y en algunos casos lo inhiba, dependiendo de la cepa microbiana ante la cual se enfrente la molécula.

Aún con toda esta información, son pocos los estudios puntuales que se han realizado acerca del potencial farmacológico de las resinas oleosas de pinos, menos aún de la especie endémica *Pinus occidentalis*. Por tratarse de un trabajo innovador este análisis comparativo buscó soporte en investigaciones que guarden alguna relación directa o indirecta con el estudio.

4.3 Conclusiones

Se concluye que esta investigación es una innovación y un aporte a la industria farmacéutica nacional, como una posible alternativa a la antibioterapia ante organismos tan resistentes como la *Pseudomonas aeruginosa*. Se trata de un aporte en el ámbito micológico con resultados de impacto frente a los dermatofitos estudiados y la *Candida albicans*. Las conclusiones sacadas de esta investigación son las siguientes:

1. Los derivados de la resina oleosa del pino endémico de la Española, *Pinus occidentalis*, poseen principios activos antimicóticos y antibacterianos.

2. Se infiere que el contenido de terpenoides, como el alfa y beta pineno, además de los ácidos resínicos presentes en las sustancias, son los responsables de la acción farmacológica antimicrobiana.

3. Este hallazgo corrobora el uso popular o etnobotánico que antropológicamente se le ha venido dando a los preparados dermocéuticos, fabricados a base de cuaba (resina de pino), tanto para la asepsia cutánea como la higiene íntima.

4. Los derivados mostraron acción fungicida y fungistática contra todos los hongos del género *Microsporum* y *Trichophyton* cultivados durante la experimentación, lo cual es un indicativo de que futuros fármacos a base de estos derivados o a base de los principios activos de estos derivados, podrían contrarrestar las dermatofitosis ocasionadas por las cepas analizadas, y probablemente otros dermatofitos.

5. Este hallazgo podría tener un impacto económico interesante, de continuar estudiándose los derivados analizados para fines de producción de fármacos, ya que aparte de tratarse de una especie endémica, se trata además del árbol más abundante en número de La Española.

6. El análisis cromatográfico cualitativo de las sustancias estudiadas arrojó la presencia de algunas de las moléculas constitutivas principales encontradas en fuentes bibliográficas, corroborando con ello la autenticidad de los derivados analizados.

4.4 Recomendaciones

- Investigar la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria, de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*, para que se produzca acción antimicrobiana con las cepas que presentaron halos de inhibición durante la presente investigación; *Candida albicans*, *P. aeruginosa*, *M. canis*, *T. rubrum*, *M. gypsiium*.

- Verificar el potencial antimicrobiano de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis* ante otras cepas de microorganismos; para este caso podrían incluirse parásitos, además de otros hongos y bacterias.

- Proponer al Estado y a la Industria Farmacéutica Nacional la formulación de preparados dermatocéuticos (de uso tópico), como soluciones, geles, crema y/o ungüentos, para la aplicación de los derivados de la resina, a una concentración determinada sobre la piel, como tratamiento ante distintas dermatofitosis cutáneas; como pie de atleta, onicomycosis, tiñas en la epidermis etc.

- Proponer al Estado y a la Industria Farmacéutica Nacional la preparación de preparados tópicos de uso veterinario, ya que la acción antimicrobiana mostrada por los derivados de la resina abarca dermatofitos zoófilos patógenos.

- Verificar a través de pruebas experimentales el intervalo de tiempo mínimo necesario, además de la concentración mínima requerida, para que los derivados de la resina oleosa provoquen muerte microbiana total. Esto, específicamente para los cepas en que el halo de inhibición de los cultivos se produjo por acción fungistática; *T. rubrum*, *M. gypsiium*.

- Investigar cuales son las moléculas constitutivas de las sustancias estudiadas que ejercen la acción antimicrobiana, y de ser posible determinar su mecanismo farmacodinámico.

- Investigar a través de pruebas experimentales cómo incrementar el diámetro del halo de acción antimicrobiano para el caso de las cepas investigadas que padecieron acción bactericida y fungicida, ocasionadas por los derivados de la resina, ya sea concentrando las sustancias activas

aún más o mezclándolas con algún solvente o sustancia que logre sinergizar su acción antimicrobiana; *P. areuginosa*, *C. albicans*.

- Investigar a través de algún método analítico instrumental moderno, la composición cuantitativa de los componentes constituyentes, de los derivados de la resina oleosa del *Pinus occidentalis*; trementina y colofonia.

4.5 Bibliografía

1. Abreu, J. M. Resina, corcho y frutos forestales. Boletín de información agraria El Campo. Abril- junio.1985. Numero 98. España. Citado por González Pérez, M. 1996. Los programas estratégicos de carácter sectorial. Experiencias en el sector de la resina en Cuba. Universidad de La Habana. Tesis (en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Económicas). Ministerio de Educación Superior.
2. Alexopoulos, Constantine John. Mims, C. W., Blackwell. 1996. Introductory Micology. Cuarta Edición. John Wiley & Sons, Inc.. New York. 868 páginas
3. Aljos Farjon and Brian T. Styles. 1997. Pinus (Pinaceae) (1ra Edición). New York, Estados Unidos de América.: The New York Botanic Garden. 291 páginas.
4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE AROEIRA-DOSERTÃO, QUIMIOTIPO, Deusielly, A. (UFRN) ; Aquino, N. (UFC) ; Araujo, R. (UFRN) ; Silveira, E. (UFC).
5. Ascioğlu S, Rex JH, DE Pauw, Bennett JE. 2002. Definición oportunista infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunocomprometidos con cáncer y trasplante de células madre hematopoyéticas. Internista. 37:7-14
6. Badillet G. Les dermatophytes. Atlas clinique et biologique. Varia Editorial, París, 1974.
7. Beneke ES, Rogers AL. Medical mycology manual, 4a ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1980.
8. Bertram G. Katzung. 2010. Farmacología Básica y Clínica. 11va Edición. Santa Fe, México.: Mc Graw Hill Interamericana Editores. 1218 páginas.
9. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S126-S133, 2014 DOI: 10.7550/rmb.32195. David S. Gernandt1 y Jorge A. Pérez-de la Rosa. Páginas 126-128.
10. Bodeker G, Kronenberg F. A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. AJP 2002; 92: 1582-91
11. Bueno JG, Isaza G, Gutiérrez F, Carmona WD, Pérez JE. 2001. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente por posibles efectos inmunoestimulantes. Rev. Med. Ris. 7: 7-11.

12. Bueno Sanchez, Juan Gabriel(edt); Martinez Morales, Jairo Rene(edt); Stashenko, Elena(edt).
Título: Actividad antimicobacteriana de terpenos / Antimycobacterial activity of terpenes Fuente:
Rev. Univ. Ind. Santander, Salud;41(3):231-243, ago.-dic. 2009. tab, graf
13. Buitagro, G.E. Dermatomicosis en población de Manizales. Rev. Biomédica 1994. 14 :77-84.
14. Carson, C.F., Riley, T.V. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil.
Contact Dermatitis 2001; 45: 65-67.
15. Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales.
Segunda edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
16. Combatamos la Resistencia a los Antimicrobianos. 2011. Organización Mundial de la Salud.
17. Cracraft J, Grifo F.T. 1999. The living planet in crisis. Biodiversity science and policy. 159
páginas. Dobler,
18. Crissey JT, Lang H, Parish LC. Manual of medical micology. Blackwell Science. 1995. pp
37-82.
19. De Lucca, A.J., Walsh, T.J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging
pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 1-11.
20. De Lucca, A., Walsh, T. Antifungal peptides: Origin, activity, and therapeutic potential. Rev
Iberoam Micol 2000; 17: 116-120.
21. Diccionario enciclopédico popular ilustrado Salvat (1906-1914)
22. Dr. C. Norman Shealy. España: Könemann, Enciclopedia Ilustrada de Remedios Naturales.
1999. ISBN 3-8290-1714-6.
23. Emmons CW; Binford CH, Utz JP, Kwon-Chung KJ. Medical Mycology, 3a ed. Lea and
Febiger, Philadelphia 1977, pp 275-277.
24. Esipov, Sergei E. and J. A. Shapiro (1998). «Kinetic model of *Proteus mirabilis* swarm colony
development». Journal of Mathematical Biology.
25. Fessenden Ralf j., Fessenden Joan. S, Organic Marshall W. Logue. An International Thomson
Publishing. Company, 1998.
26. FLORA AROMÁTICA DE LA YUNGA. COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES M.M. Oliva¹, M.S. Demo¹, M.L.
López², M.P. Zunino, C. Martini, S.M. Faillaci, A. Rotman, O. Ahumada y J.A. Zygodlo.
Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto. 2 Cátedra
de Química Orgánica - Productos Naturales. FCEFYN. UNC-IMBIV.

27. Flores de Veracruz. Fascículo 98. Mayo 1997. Pinaceae. Hector Narave Flores y Kent Taylor. Instituto de Ecología A. C Xalapa Veracruz. Universidad de California.
28. Fredrickson J, Zachara J, Balkwill D, et al (2004). «Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington state». *Appl Environ Microbiol* 70 (7): pp. 4230 - 41
29. Guenter. 1999. Manejo y Tablas de Rendimiento de *Pinus occidentalis* (1era Edición). Servicio Alemán de Cooperación Social Técnica (DED). San José de las Matas, República Dominicana. 153 páginas.
30. Hancock, R.E., Chapple, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1317-1323.
31. Hernández Lázaro (2009): La profesión de resinero: el ocaso de un oficio centenario. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, DL 2009.
32. Hoffmann A. Plantas Medicinales de Uso Común en Chile. Santiago, Chile: Editorial Fundación Claudio Gay. 1992. p. 178.
33. Hurtado, MP; de la Parte, MA; Brito A (Julio 2002). «*Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica.» (HTML). *Rev Soc Ven Microbiol (Venezuela: Scielo)* 22 (2): pp. 112-118.
34. Ishige T, Honda K, Shimizu S (2005). «Whole organism biocatalysis». *Curr Opin Chem Biol* 9 (2): pp. 174 - 80. PMID 15811802.
35. Isaza G, Bueno J, Jaramillo R, Gutiérrez F, Guzmán AM. 2001. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente en 4 ciudades del centro occidente colombiano. *Medomai*. 2:8-9.
36. Jawetz, Melnick y Adelberg. 2011. *Microbiología Médica*. 25va Edición. Santa Fe, México.: Mc Graw Hill Interamericana Editores. 815 páginas. •Madigan Michael T., Martinko Jhon M., Parker, Jack. 2003. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación, S. A.. Madrid. 1096 páginas.
37. Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. y Donoghue, M. J. (2002)"Secondary Plant Compounds". En: *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. 2nd. ed. Sinauer Axxoc, Estados Unidos.
38. Ledezma, E., Marcano, K., Jorquera, A. y cols. Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: A double-blind and comparative study with terbinafine. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 829-832

39. Liogier, Alain Henri. 2000. Diccionario Botánico de Nombres Vulgares de la Española. 2da Edición. Jardín Botánico Nacional. Santo Domingo, República Dominicana. 598 páginas.
40. Lowy, Franklin D. (20 -agosto-1998). «Staphylococcus aureus infections» (en inglés, PDF). NEJM (Estados Unidos: Massachusetts Medical Society) 339 (8): pp. 520-532.
41. Marinaldo Sousa de Carvalho, Ácido Abiético como intermediario clave y síntesis de diterpenos con actividad biológica. Tesis de Doctorado. Universidad Estatal de Campinas. Instituto de Química
42. Martínez A. Torres J.M. 1978. Micosis que afectan Piel y Mucosas. Ediciones Norma, Barcelona, 34-71.
43. Mc. Murry John. Organuc chemistry JTP. An International Thomson Publisking Compary 1984.
44. Montes M, Wilkomirsky T. Compendio de Fitoterapia. Concepción, Chile: Editorial. Universidad de Concepción; 1996; p. 4-9.
45. Murria. K. Rosenthal. G. S. Kobashi. M. A. Pfaller, Microbiología Médica 4º edición P. R. Playfarir.
46. Pérez, Odalís G., 2011. La Escritura Académica. Las fases del proceso de investigación; EDIT.as, Santo Domingo, República. Dominicana 392 páginas.
47. Palavecino Rosales E. 1997. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.1997;26:156-160.
48. Rappé M, Giovannoni S. «The uncultured microbial majority». Annu Rev Microbiol 57: pp. 369 - 94. PMID 14527284.
49. Rev Esp Quimioterap, Diciembre 2004; Vol.17 (No 4): 325-331© 2004 Prous Science, S.A.- Sociedad Española de Quimioterapia.
50. Rimoli, Renato O., 2012. Diccionario de Términos Ambientales, Instituto Panamericano de Geografía e Historia. Santo Domingo, República. Dominicana. 479 páginas.
51. Rubio MC, Rezutsa A, Gil J, Ruesca RB. 1999. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. Rev. Iberoam. Micol. 16:16-22.
52. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4ª edición). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
53. Sanabria A, Mantilla J.R. 1986. Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. Revista Colombiana de Ciencias químico farmacéuticas. 15:17-22.
54. Selitrennikoff, C.P. Antifungal proteins. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 2883-2894.
55. Solomons, G."Química Orgánica" University of South Florida 1997.

56. Stevens, D.A., Calderon, L., Martínez, M., Clemons, K.V., Wilson, S.J., Selitrennikoff, C.P.
57. Stephen J. McPhee. 2011. Fisiopatología de la Enfermedad, Una introducción a la Medicina Clínica. 6ta Edición. Santa Fe, México.: Mc Graw Hill Interamericana Editores. 742 páginas.
58. Swanson SJ, Snider C, Braden CR, et al. (2007). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. 356. pp. 21–28.
59. Trease, Evans W. Farmacognosia. 15th ed. España: Editorial Elsevier Limited. 2006. p. 41-51.
60. Vivanco J, Cosio E, Loyola-Vargas V, Flores H. Mecanismos Químicos de Defensa en las Plantas. INVYICIE. Prensa Científica, S.A. Versión on-line. España: 2005; p. 1-8.
61. Whitman W, Coleman D, Wiebe W (1998). «Prokaryotes: the unseen majority». Proc Natl Acad Sci U S A 95 (12): pp. 6578 - 83.
62. World Health Organization. *Aetheroleum Melaleucae Alternifoliae*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 2002; 172-179.
63. World Health Organization. *Folium Eucalypti*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 2002; 106-113.
64. World Health Organization. *Herba Thymi*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 1999; 259-266.
65. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida vaginitis* model. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 361-364.

4.5.1 Sitios web

66. Eeli Ylitalo y Sucesores, Pioneros de la Fabricación de Trementina (en línea) (30 de Abril de 2008) disponible Municipios de República Dominicana (En línea) (03 de Abril 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Jarabacoa>.
67. Terpenos y Terpenoides, Herbolaria (en línea) <http://herbolaria.wikia.com/wiki/Terpenoides>
68. Resina de Pino (en línea) (15 de Febrero de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Resina> •Tu municipio en Cifras ONE, Jarabacoa (en línea) <http://www.one.gob.do/themes/one/dmdocuments/TMC/La%20Vega/Jarabacoa.pdf>
69. Historia de la Fitoterapia <http://es.m.wikipedia.org/wiki/Fitoterapia> <http://web.sinectis.com.ar/fitomedicina/Introfito.html.2006/05/28>. <http://www.salud.net/index.php?optiofitoterapia=192.html> <http://plantasquecuran.com/plantas-medicinales/romero.html> 2008/11/0
70. Antifúngicos Naturales <http://es.m.wikipedia.org/wiki/Antif%C3%BAngico>
71. Género pinus <http://es.m.wikipedia.org/wiki/Pinus>
72. Pinus occidentalis <http://m.monografias.com/trabajos69/desarrollo-pinus-occidentalis-grevillea-robusta/desarrollo-pinus-occidentalis-grevillea-robusta2.shtml>
73. «resina», Diccionario de la lengua española (22.^a edición), Real Academia Española, 2001, <http://lema.rae.es/drae/?val=resina>, <http://es.m.wikipedia.org/wiki/Resina>
74. (trementina) <http://es.m.wikipedia.org/wiki/Trementina>
75. (colofonia) <http://es.m.wikipedia.org/wiki/Colofonia>
76. pineno y ácidos resínicos <http://www.fundacion-canna.es/colaboraciones>
77. Hongos Hipertextos del área de Biología <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungi.htm>
78. dermatofitos <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/dermatof.pdf>
79. candida <http://www.probioticosysalud.com/probioticos-beneficios/probioticos-infeccion-urinaria-prevenir/>
80. Microsporium http://www.doctorfungus.org/thefungi/Microsporium_spp.php
81. cromatografía de gases <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21937/Capitulo5.pdf>
82. Antibiograma Kirby Bauer http://www.britanialab.com.ar/k07_04.html
83. Cromatógrafo de Gas/Masa <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21937/Capitulo5.pdf>

4.5.2 Imágenes y gráficos

84. *Pinus occidentalis* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=268872&lvl=3>
85. alfa pineno http://es.m.wikipedia.org/wiki/Alfa-pineno#/image/Archivo:Alpha-Pinene_Isomers.svg
86. ácido abiético http://es.m.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_abi%C3%A9tico#/image/Archivo:Abietic_acid.svg
87. Tabla de Antifúngicos Naturales <http://seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>
88. *Melaleuca alternifolia*: UN ANTISEPTICO NATURAL <http://www.ukendu.com/index.php/pedi-relax-crema-antirozaduras.html> <http://www.ukendu.com/index.php/rf-melaleuca-champu-caspa-seca-150ml.html> <http://www.ukendu.com/index.php/tea-tree-aceite-10ml-madalbal.html>
89. *Salmonella typhi* <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
90. *Trichophyton rubrum* http://es.m.wikipedia.org/wiki/Trichophyton_rubrum

4.6 Anexos

4.6.1 Acrónimos:

LINFLOMED: Laboratorio de la Flora Medicinal

LAVECEN: laboratorio Central Veterinario

IDCP: Instituto Dermatológico y Cirugía de la piel Dr. Huberto Bogaert Díaz

UASD: Universidad Autónoma de Santo Domingo

UNPHU: Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña

UFC: Unidades formadoras de Colonias

GC-MS: Cromatografía de Gases/Masa

LA: Laboratorio Amadita

msnm: Metros sobre el nivel del mar

mm: Milímetro

ml: Mililitro

pH: Potencial de hidrógeno

l: Litro

°C: Grados Celsius

°F: Grados Fahrenheit

FUNGLODE: Fundación Global Democracia y Desarrollo

km²: Kilometro cuadrado

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

nm: nanómetro

(S): Sensible

(I): Intermedio

(R): Resistente

(MR): Moderadamente resistente

4.6.2 Glosario

Ácido abiético: también conocido como ácido abietínico o ácido sílvico, es una resina ácida, y es el principal agente irritante del pino.

Alfa pineno: es un compuesto orgánico de la clase terpeno, uno de los dos isómeros de pineno. Se trata de un alqueno y contiene un reactivo anillo de cuatro miembros. Se encuentra en los aceites de muchas especies de árboles de coníferas, en particular el pino.

Antibacterial: sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias.

Antibiograma: es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos.

Antimicrobiano: es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios, tales como bacterias, hongos, parásitos o virus.

Antimicótico: toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

Bacteria: son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).

Bactericida: sustancias secretadas por los organismos como medios defensivos contra las bacterias. Antimicrobianos de efecto lísico o lítico (Lisis) en las bacterias, provocan una reducción en la población bacteriana en el huésped o en el uso de sensibilidad microbiana.

Beta pineno: es un monoterpeno, un compuesto orgánico que se encuentra en las plantas. Es uno de los dos isómeros de pineno, el otro es α -pineno. Es un líquido incoloro soluble en alcohol, pero no en agua. Tiene un olor amaderado -pino verde-.

Biológico: relacionado con la ciencia que tiene como objeto de estudio a los seres vivos y, más específicamente, su origen, su evolución y sus propiedades: nutrición, morfogénesis, reproducción, patogenicidad, etc.

Bioterapias: tratamiento para el que se usan sustancias elaboradas por organismos vivos para tratar enfermedades.

Colofonia: es una resina natural de color ámbar obtenida de las coníferas por exudación de los árboles en crecimiento o durante la extracción de los tocones. Es la fracción no arrastrable por vapor de la oleoresina y está constituida de una mezcla de ácidos resínicos, mayoritariamente el ácido abiético.

Conífera: son el grupo más importante de gimnospermas desde un punto de vista ecológico y económico. En un momento fueron dominantes en las comunidades de plantas en todo el mundo. En la actualidad fueron reemplazadas en muchos lugares por las angiospermas, pero todavía son dominantes en muchos bosques de coníferas.

Cromatografía: es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Cromatógrafo de gases-masas: es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad.

Dermatofito: (del griego dermatos, piel y el sufijo phyto, vegetal) son hongos hialinos que parasitan el tejido queratinizado.

Dermatosis: enfermedad cutánea (término médico: dermatosis) es una enfermedad de la piel.

Dermatológico: relacionado con la estructura y función de la piel, así como de las enfermedades que le afectan, ofreciendo su prevención, diagnóstico y tratamiento.

Ecología: es la ciencia que estudia a los seres vivos, su ambiente, la distribución, abundancia y cómo esas propiedades son afectadas por la interacción entre los organismos y su ambiente.

Endémico: es un término utilizado en biología para indicar que la distribución de un taxón está limitada a un ámbito geográfico reducido y que no se encuentra de forma natural en ninguna otra parte del mundo.

Extracto: es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo.

Farland Mc, escala: en microbiología, los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10.

Halo de inhibición: zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

Hongo: grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y protistas. Esta diferenciación se debe, entre otras cosas, a que poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las plantas, que contienen celulosa.

In vitro: se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Kirby-Bauer: (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

Microorganismo: es un ser vivo, o un sistema biológico, que solo puede visualizarse con el microscopio.

Patógeno: un patógeno (de los elementos compositivos pato- y -geno, y estos del prefijo griego παθο- [patho-], ‘dolencia’ o ‘afección’, y la raíz griega γεν [guen], ‘generar’, ‘producir’), también llamado agente biológico patógeno, es todo agente que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea este humano, animal o vegetal.

Pinus: es un género de plantas vasculares (generalmente árboles y raramente arbustos), comúnmente llamadas pinos, pertenecientes al grupo de las coníferas y, dentro de éste, a la familia de las pináceas, que presentan una ramificación frecuentemente verticilada y más o menos regular.

Reactivo: toda sustancia que interactúa con otra en una reacción química y que da lugar a otras sustancias de propiedades, características y conformación distinta, denominadas productos de reacción o simplemente productos.

Resina: es una secreción orgánica que producen muchas plantas, particularmente los árboles del tipo conífera. Es muy valorada por sus propiedades químicas y sus usos asociados, como por ejemplo la producción de barnices, adhesivos y aditivos alimenticios.

Saprófito: se llama saprotrofia a la dependencia que muchos organismos, llamados saprótrofos, tienen para su nutrición de los residuos procedentes de otros organismos, tales como hojas muertas, cadáveres o excrementos, con una digestión extracelular y externa.

Trementina: es el líquido que se obtiene de la destilación con vapor de la resina oleosa que es extraída por resinación de diversas especies de coníferas y de varias especies de árboles terebintáceos. Es usada como disolvente de pinturas, materia prima para la fabricación de compuestos aromáticos sintéticos y algunos desinfectantes.

4.6.3 Certificación jardín Botánico Nacional

4.6.4 Resultados de la Cromatografía Gas/Masa

(páginas siguientes)

HOJA DE EVALUACIÓN

Werner Schulz Calvo

Sustentante

Lic. Carolina Lerebours Bautista, MSc.

Asesora

Jurado

Jurado

Jurado

Lic. Rhayza Almanzar de Mena

Directora de la Escuela de Farmacia

Dr. José Asilis Záiter

Decanato de la Facultad
de Ciencias de la Salud

Calificación_____

Fecha_____

