



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**

Estudio fitoquímico y aceites esenciales de las hojas de *Clusia minor* L (Clusiaceae).

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado de la Licenciatura en Química

**Br. Edinson Gil Contreras
Tutor: Dr. Carmelo Rosquete
Cotutora: Dra. Rosa Aparicio.**

Mérida-Venezuela.

Reconocimiento-No comercial- Compartir igual

www.bdigital.ula.ve

A quien dedico su tiempo, lucha y trabajo para ver mi triunfo.
Hoy tus sueños se cumplen y se ven reflejados en el ser que soy.
Gracias por ser mi hermano y amigo. Eres esa luz que siempre me guiara.

II

Reconocimiento-No comercial- Compartir igual

AGRADECIMIENTOS.

- Dios gracias por permitirme culminar este logro.
- A mi padre y madre quienes han llenado de fuerzas mis días, por sus consejos y por la ayuda que me han brindado día a día, muy agradecido por todo, “Gracias”.
- A Karely por la ayuda, consejos, por confiar en mí y traer ese regalo que llena de alegría mi corazón.
- Al Prof. Carmelo Rosquete por su enseñanza y por compartir sus conocimientos, gracias Amigo.
- A mis grandes amigos: Jeffri, Juli, Tefi, Yayo y Yoxi.
- A mis amigos Cheche, Jesús, Génesis, May y Ninin, gracias por compartir tantas horas de estudio y por cada enseñanza brindada.
- A todos mis compañeros de estudio que de alguna manera me hicieron parte de ellos durante estos años. María Puentes gracias por su mano amiga.
- A todos los profesores del Laboratorio por aportar en algún momento sus conocimientos.

RESUMEN.

En este Trabajo Especial de Grado se plasma una revisión bibliográfica exhaustiva tanto de la familia Clusiaceae como del género *Clusia* y la especie *Clusia minor* L. enfocada en lo referente a la Botánica, Fitoquímica, Etnomedicina y Farmacología. En la parte experimental se describe el estudio fitoquímico del extracto de hexano de las hojas de *Clusia minor* L. señalando las diferentes técnicas que permitieron la separación y purificación de los compuestos, así como el uso de las técnicas espectroscópicas que permitieron elucidar la estructura del componente mayoritario (*trans*-escualeno). Adicionalmente, 12 compuestos fueron identificados utilizando CG/EM. También se estudió la actividad antibacteriana del aceite esencial, siendo este activo frente a tres bacterias: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.

www.bdigital.ula.ve

ABSTRACTS.

One comprehensive literature review of the family Clusiaceae, genus *Clusia* and the specie *Clusia minor* L. is reflected in this monography focused in relation to botanic, phytochemical, ethnomedical, and pharmacological aspects. The experimental part describes the phytochemical study of *Clusia minor* L. leaves hexane extract pointing the techniques that allowed the separation and purification of compounds, as well as the use of spectroscopic techniques that allowed the elucidating of the structure of the major component (*trans*-squalene). In addition, 12 compounds were identified using GC/MS. It also studied the antibacterial activity of the essential oil, still this active against three bacteria: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*.

www.bdigital.ula.ve

CONTENIDO.

	Pág.
Presentación.	I
Dedicatoria.	II
Agradecimientos.	III
Resumen.	IV
Abstracts.	V
Contenido.	VI
Índice de tablas.	X
Índice de figuras.	XI
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1. Clasificación botánica.	3
2.1.1. Familia Clusiaceae.	3
2.1.2. Género <i>Clusia</i> .	4
2.1.3. <i>Clusia minor</i> L.	6
2.1.4. Distribución geográfica mundial de <i>Clusia minor</i> L.	7
2.1.5. Taxonomía, clasificación, sinonimia, nombres comunes y dimensiones.	7
2.2. Importancia del estudio de <i>Clusia minor</i> L.	8
2.3. Estudios fitoquímicos reportados para la familia Clusiaceae.	8
2.3.1. Terpenoides.	8
2.3.2. Esteroides.	10
2.3.3. Flavonoides.	11
2.3.4. Cumarinas.	13
2.3.5. Benzofenonas.	14
3. Marco teórico.	16
3.1. Aceites esenciales.	16
3.1.1. Clasificación de los aceites esenciales.	16
3.1.1.1. Consistencia.	16
3.1.1.1.1. Esencias fluidas.	16
3.1.1.1.2. Bálsamos.	17
3.1.1.1.3. Oleorresinas.	17
3.1.1.2. Origen.	17
3.1.1.2.1. Aceites naturales.	17
3.1.1.2.2. Aceites artificiales.	17
3.1.1.2.3. Aceites sintéticos.	17
3.1.1.3. Naturaleza química.	17
3.1.2. Características físicas de los aceites esenciales.	18
3.1.3. Características químicas de los aceites esenciales.	18
3.1.3.1. No terpenoides.	18
3.1.3.2. Terpenoides.	18
3.1.4. Uso de los aceites esenciales.	18
3.1.5. Métodos de obtención de los aceites esenciales.	18

3.1.5.1.	Destilación por arrastre con vapor de agua utilizando trampa de Clevenger.	20
3.1.5.2.	Extracción con solventes volátiles.	20
3.1.5.3.	Enfleurage.	20
3.1.5.4.	Extracción con microondas.	20
3.1.6.	Técnicas de identificación de los aceites esenciales.	20
3.1.6.1.	Cromatografía de gases (CG).	20
3.1.6.2.	Espectrometría de masas (EM).	21
3.1.6.3.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).	21
3.1.6.4.	Índice de Kováts	21
3.2.	Técnicas de extracción.	21
3.2.1.	Tipos de extracciones.	21
3.2.1.1.	Extracción líquido-líquido.	22
3.2.1.1.1.	Extracción líquido-líquido simple.	22
3.2.1.1.2.	Extracción líquido-líquido continua.	23
3.2.1.2.	Extracción sólido-líquido.	23
3.2.1.2.1.	Extracción sólido-líquido discontinua.	24
3.2.1.2.2.	Extracción sólido-líquido continua.	24
3.3.	Técnicas cromatográficas de separación y purificación de los compuestos obtenidos.	25
3.3.1.	Cromatografía de adsorción.	25
3.3.1.1.	Cromatografía líquido-sólido o en columna (CC).	25
3.3.1.2.	Cromatografía de capa fina (CCF).	26
3.3.1.3.	Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).	26
3.3.2.	Cromatografía de partición o reparto.	26
3.3.3.	Cromatografía de exclusión por tamaño.	27
3.3.4.	Cromatografía de intercambio iónico.	27
3.4.	Técnicas de espectroscópicas y espectrométricas.	27
3.4.1.	Espectroscopia de absorción infrarroja (IR).	28
3.4.2.	Espectroscopia de masa atómica.	28
3.4.3.	Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-vis).	28
3.4.4.	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).	29
3.4.4.1.	Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹ H).	29
3.4.4.2.	Resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN- ¹³ C).	30
3.4.4.3.	Resonancia magnética nuclear bidimensional.	30
3.4.4.3.1.	¹ H- ¹ H COSY (Correlation Spectroscopy).	31
3.4.4.3.2.	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) ó HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation).	31
3.4.4.3.3.	HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).	31
3.5.	Bacterias.	32
3.5.1	Características generales de las bacterias.	32
3.5.2.	Técnicas de tinción para identificación de las bacterias.	32
3.5.2.1	Tinción de Gram.	33
3.5.2.2.	Tinción de Ziehl-Neelsen.	33
3.5.2.3.	Diferencias de las bacterias gram-positivas y gram-negativas.	33
3.5.3.	Actividad antibacteriana.	34

3.5.4.	Antibióticos.	35
4.	Hipótesis	37
5.	Objetivos.	37
5.1.	Objetivo general.	37
5.2.	Objetivos específicos.	37
6.	Metodología y plan de trabajo.	38
7.	Parte experimental.	39
7.1.	Selección de la planta e identificación.	39
7.2.	Estudio de antecedentes botánicos y fitoquímico.	39
7.3.	Recolección de la planta.	39
7.4.	Preparación del material vegetal.	39
7.5.	Extracción del material vegetal.	39
7.5.1.	Obtención del aceite esencial.	39
7.5.2.	Obtención del extracto vegetal.	40
7.6.	Separación y purificación de los compuestos.	40
7.6.1.	Cromatografía de columna de vidrio.	40
7.6.2.	Cromatografía de capa fina y capa fina preparativa.	40
7.7.	Técnicas utilizadas para la identificación de los compuestos.	41
7.7.1.	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).	41
7.7.1.1.	Identificación del aceite esencial por CG/EM.	41
7.7.1.2.	Identificación de los compuestos aislados (1A, 2B y 3C) mediante CG/EM.	41
7.7.2.	Técnicas espectroscópicas utilizadas para la identificación del compuesto (1A).	42
7.8.	Determinación de la actividad antibacteriana.	42
7.9.	Esquema de trabajo (obtención de los extractos).	43
7.10.	Esquema de trabajo (obtención del aceite esencial).	44
7.11.	Desarrollo experimental.	45
7.11.1	Extracción sólido-líquido con soxhlet.	45
7.11.2.	Extracción líquido-líquido en hexano, diclorometano y <i>n</i> -butanol.	45
7.11.3.	Aislamiento y purificación del extracto en hexano.	46
7.11.3.1	Separación y purificación de las fracciones 1A, 2B y 3C.	47
7.11.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana.	48
7.11.4.1.	Preparación del inóculo bacteriano.	49
7.11.4.2.	Preparación de los discos.	49
7.11.4.3.	Preparación de las placas e inoculación.	49
7.11.4.3.1.	Preparación de las placas.	49
7.11.4.3.2.	Incubación.	49
7.11.4.4.	Lectura de las pruebas.	50
7.11.4.5.	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).	50
8.	Resultados y discusión.	51
8.1.	Extracción del aceite esencial.	51
8.1.1.	Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial.	53
8.1.2.	Identificación de las fracciones 1A, 2B y 3C.	54
8.1.3.	Fracción 1A.	61
9.	Conclusiones.	73

10.	Recomendaciones.	74
11.	Bibliografía.	75
12.	Glosario.	79

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág	
Tabla # 1	Géneros presentes en la familia Clusiaceae.	4
Tabla # 2	Algunas especies del género <i>Clusia</i> reportadas en Venezuela.	6
Tabla # 3	Principales sectores, usos y tipos de aceites esenciales.	19
Tabla # 4	Resultados obtenidos de las extracciones.	46
Tabla # 5	Resultados de las cromatografías en columna en Sephadex (S).	46
Tabla # 6	Resultados de la cromatografía en columna de la muestra Cm-H.	47
Tabla # 7	Resultados de la cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).	48
Tabla # 8	Bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizadas.	48
Tabla # 9	Antibióticos utilizados para control positivo.	49
Tabla # 10	Resultados obtenidos de la extracción del aceite esencial.	51
Tabla # 11	Componentes identificados en el aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L.	52
Tabla # 12	Datos de la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las hojas de <i>Clusia minor</i> L.	53
Tabla # 13	Compuestos identificados en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas de las fracciones separadas.	54
Tabla # 14	Datos de espectros RMN- ¹³ C y RMN- ¹ H	63
Tabla # 15	Datos de espectros RMN- ¹³ C y RMN- ¹ H reportados en la literatura.	63

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág	
Figura 1	Distribución mundial de la familia Clusiaceae.	3
Figura 2	Distribución mundial del género <i>Clusia</i> .	5
Figura 3	Algunas especies del género <i>Clusia</i> .	5
Figura 4	Estructura química de los terpenoides aislados de la familia Clusiaceae.	10
Figura 5	Estructura química de los esteroides aislados de la familia Clusiaceae.	11
Figura 6	Flavonoides: Estructuras básicas y tipos.	12
Figura 7	Estructura químicas de los flavonoides aislados de la familia Clusiaceae.	13
Figura 8	Estructura química de las cumarinas aisladas de la familia Clusiaceae.	14
Figura 9	Estructura química de las benzofenonas aislados de la familia Clusiaceae.	15
Figura 10	Embudo de separación para extracciones líquido-líquido simples.	23
Figura 11	Equipo de extracción con Soxhlet.	24
Figura 12	Envolturas de las bacterias gram-positivas y gram-negativas	35
Figura 13	Equipo de hidroddestilación con trampa de Clevenger.	40
Figura 14	Espectro de masas de 1,4-dimetil-7-(1-metiletil)-azuleno (1A).	55
Figura 15	Espectro de masas de éster metílico del ácido hexadecanoico (2B).	56
Figura 16	Espectro de masas de éster etílico del ácido hexadecanoico (2B).	56
Figura 17	Espectro de masas de éster metílico del ácido octadec-9-en-1-oico (2B).	57
Figura 18	Espectro de masas de éster metílico del ácido octadecanoico (2B).	57
Figura 19	Espectro de masas de éster etílico del ácido octadec-9-en-1-oico (2B).	58
Figura 20	Espectro de masas de éster etílico del ácido octadecanoico (2B).	58
Figura 21	Espectro de masas de éster metílico del ácido octadeca-10,13-dien-1-oico (3C).	59
Figura 22	Espectro de masas de éster etílico del ácido octadec-10-en-1-oico (3C).	59
Figura 23	Espectro de masas de éster etílico del ácido octadeca-9,12-dien-1-oico (3C).	60
Figura 24	Espectro de masas de éster etílico del ácido octadeca-9,12,15-trien-1-oico (3C).	60
Figura 25	Espectro de masas de α -tocoferol (vitamina E) (3C).	61
Figura 26	Espectro de CG/EM de la muestra 1A.	61
Figura 27	Posibles estructuras del compuesto aislado.	65
Figura 28	Estructura del isómero todo <i>trans</i> del escualeno (compuesto 1A).	66
Figura 29	Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹ H) de escualeno.	67

Figura 30	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ¹³ C) de escualeno (ampliación 1).	68
Figura 31	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ¹³ C) de escualeno (ampliación 2).	69
Figura 32	Espectro de masas de escualeno.	70
Figura 33	Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹ H) de escualeno reportado.	71
Figura 34	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ¹³ C) de escualeno reportado.	75

www.bdigital.ula.ve

1. INTRODUCCIÓN.

Las especies de plantas conocidas oscilan entre 250.000 y 500.000. Esta es una riqueza que no se aprovecha totalmente, a pesar de que su uso en el tratamiento de diversas enfermedades es ancestral. Dicha costumbre se ha conservado hasta nuestros días, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etno-farmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica. Los vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Por esta razón, dichas moléculas pueden ser candidatas para estudio *in vitro* contra agentes micóticos implicados en infecciones humanas. (Mesa y col, 2011).

A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de procesos complejos de síntesis orgánica desembocaron la puesta en marcha por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, creyendo en las acciones atribuibles a dichas sustancias, donde la cantidad de principio activo es superior al que posee la planta. Estudios revelan que muchos productos herbarios y sus compuestos aislados tienen efectos potencialmente dañinos.

No debemos olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. 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 secundarios 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 (Celi, 2009). Los medicamentos tradicionales son usados en gran cantidad por la población mundial, y en algunos países están ampliamente incorporados al sistema de salud pública. La medicina tradicional responde a las necesidades de salud de la gran mayoría de la población de países que

están en vías de desarrollo. Venezuela es uno de los diez países que posee gran diversidad y variedad de plantas que son utilizadas para fines medicinales.

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base lipídica encontradas prácticamente en todas las plantas; son muy numerosas y están ampliamente distribuidos en las distintas partes de la planta: raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; separables por métodos químicos o físicos, como la destilación por arrastre con vapor, extracción con solventes volátiles y otros. (Peredo y col, 2009).

El uso de los aceites esenciales en la medicina ha despertado un interés de estudiar cualitativamente *in vitro* las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales; este posee propiedades terapéuticas e inhibidoras de hongos y bacterias.

Clusiaceae (Guttiferae) es una familia formada por árboles o arbustos, raras veces hierbas, que generalmente contienen resina o látex de color blanco o amarillo y se caracterizan por presentar hojas carnosas. Generalmente son plantas unisexuales, están distribuidas en trópicos, zonas boscosas y húmedas. Engloban plantas de interés económico por la producción de frutos comestibles, maderas, fármacos y tintes. Los estudios previos realizados en Clusiaceae indican que esta familia tiene variadas actividades biológicas, lo que hace de ellas una fuente interesante de compuestos activos que pueden ser usados con fines farmacológicos tales como: actividad antimicrobiana (gran diversidad de bacterias), actividad quimiopreventiva contra el cáncer, antioxidante, antiinflamatoria, antihepatotóxica y actividad inhibitoria del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). (Stevens, 2007).

El género más representativo e importante es *Clusia*, que es conocido por sus propiedades biomédicas útiles. Las especies de este género tienen diversas actividades biológicas, lo que demuestra su papel como fuente prometedora de fitocompuestos activos / fitometabolitos biomédicos que pueden utilizarse para antimicrobianos (Bailon *et al.*, 2015).

Las hojas para realizar este estudio fueron recolectadas en la confluencia de los ríos Chama y Mucujún, sector El Arenal, municipio Libertador, Estado Mérida-Venezuela.

2. ANTECEDENTES.

2.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.

2.1.1. FAMILIA CLUSIACEAE.

Árboles, arbustos, terrestres, a veces epífitos o escandentes, látex transparente, blanco, amarillo, o de otros colores intensos. Posee hojas opuestas o verticiladas, simples, engrosadas, siempre verdes, de márgenes enteros, con puntos o líneas glandulares y sin estípulas. Las flores son actinomorfas, perfectas o imperfectas en plantas separadas, solitarias o en inflorescencias cimosas. Los periantos: cáliz 2-10 sépalos libres o 4-5 soldadas, corola: 3-12 pétalos. Los estambres: 5 a numerosos, libres o unidos en la base o en 2-5 haces; frecuentemente con glándulas en las anteras. Los gineceos son ovarios ínferos, carpelos 3-5 unidos, óvulos, 1- ∞ por lóculo, axilares o parietales, estilos en número igual al de carpelos, libres o unidos, estigma lobado o peltado. Sus frutos son bayas, drupa o cápsula septicida. Las semillas van de una a numerosas, a veces aladas, pueden presentar arilo, sin endospermo, embrión grande y recto (Hammel *et al.*, 2009).

La familia Clusiaceae se encuentra distribuida a nivel mundial como lo indica la figura 1, se compone de plantas tropicales que incluye aproximadamente 30 géneros y 1090 especies (tabla # 1) (Stevens, 2007).

Esta familia se encuentra dividida en tres subfamilias: Hypericoideae, *Kielmeyeroideae* y Clusioideae; a esta última pertenece el género *Clusia* y la especie *Clusia minor* L (Hammel *et al.*, 2009).



Figura 1: Distribución mundial de la familia Clusiaceae.

Tabla # 1: Géneros presentes en la familia Clusiaceae.

Clusioideae	Hypericoideae	Kielmeyeroideae
<i>Allanblackia</i>	<i>Cratoxylum</i>	<i>Calophyllum</i>
<i>Androstylium</i>	<i>Psorospermum</i>	<i>Caraipa</i>
<i>Chrysochlamys</i>	<i>Thornea</i>	<i>Clusiella</i>
<i>Chrysopia</i>	<i>Triadenum</i>	<i>Haploclathra</i>
<i>Clusia</i>	<i>Vismia</i>	<i>Kayea</i>
<i>Dystovomita</i>		<i>Kielmeyera</i>
<i>Garcinia</i>		<i>Mahurea</i>
<i>Lorostemon</i>		<i>Mammea</i>
<i>Montrouziera</i>		<i>Marila</i>
<i>Moronobea</i>		<i>Neotatea</i>
<i>Pentadesma</i>		
<i>Symphonia</i>		
<i>Thysanostemon</i>		
<i>Tovomita</i>		
<i>Tovomitopsis</i>		

2.1.2. GÉNERO *CLUSIA*.

El género *Clusia* (figura 3) fue descrito por Carl Linnaeus en el año 1653, en su obra *Species Plantarum* (Las Especies de Plantas), y recibió ese nombre en honor al botánico francés Carolus Clusius (1526-1609). Sus especies se distribuyen en el Continente Americano (figura 2) desde el sur de Brasil hasta Florida en los Estados Unidos, por lo que tienen distintos nombres comunes, entre ellos memelita, memela, rattan mexicano, copey o copecillo y chunup. Habitan en comunidades vegetales contrastantes de dunas costeras, hasta selvas altas. Casi todas son dioicas; los machos y las hembras germinan en individuos diferentes, con una morfología particular, frutos dehiscentes (el fruto abre espontáneamente para permitir la salida de las semillas) y presentan varias formas de vida, como los árboles, los arbustos, las hemiepifitas (árboles estranguladores), las epifitas y las enredaderas (Vargas *et al.*, 2006).



Figura 2: Distribución mundial del género *Clusia*.



Clusia criuva.



Clusia fluminensis.



Clusia lanceolata.



Clusia minor L.



Clusia multiflora.



Clusia rosea.

Figura 3. Algunas especies del género *Clusia*.

2.1.3. *CLUSIA MINOR* L.

Árbol o arbusto con alturas de (3-5) m de alto, epipétricos, rara veces epífitas, ramas con epidermis rojiza exfoliante, látex blanco. Hojas obovado-elípticas (4-11) cm de largo y (2,5-6,5) cm de ancho, ápice redondeado a agudo, a veces puntiagudo, base agudo-atenuada, nervios laterales 4-6 por cm; inflorescencias más o menos globosas, pétalos blancos a rosados; ovarios rodeado por un anillo resinoso en el cual se encuentran embebidas 1-3 bolsas de polen, estigmas 5-7 levemente elevados. Fruto globoso a ovoide, (1-1,5) cm de largo, verde a verde-rojo (figura 3).

Común en bosques secos a húmedos, entre (100-2.000) msnm. En Venezuela se encuentra ubicadas en los estados: Amazonas, Anzoátegui, Aragua, Barinas, Bolívar, Cojedes, Delta Amacuro, Distrito Capital, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Monagas, Nueva Esparta, Portuguesa, Sucre, Táchira y Yaracuy (tabla # 2) (Hokche *et al.*, 2008).

Tabla # 2: Algunas especies del género *Clusia* reportadas en Venezuela.

<i>C. alata</i>	<i>C. comans</i>	<i>C. leprantha</i>
<i>C. amabilis</i>	<i>C. crassifolia</i>	<i>C. lopezii</i>
<i>C. amazonica</i>	<i>C. cuneata</i>	<i>C. macropoda</i>
<i>C. androphora</i>	<i>C. duartei</i>	<i>C. maguireana</i>
<i>C. annularis.</i>	<i>C. eugenoides</i>	<i>C. martiana</i>
<i>C. aristeguietae</i>	<i>C. hammeliana</i>	<i>C. parvula</i>
<i>C. articulata</i>	<i>C. hexacarpa</i>	<i>C. phelpsiae</i>
<i>C. asymmetrica</i>	<i>C. huberi</i>	<i>C. phelpsiana</i>
<i>C. aymardii</i>	<i>C. imbricata</i>	<i>C. ptaritepuiensis</i>
<i>C. brachystyla</i>	<i>C. insignis</i>	<i>C. pusilla</i>
<i>C. candelabrum</i>	<i>C. melchiori</i>	<i>C. radiata</i>
<i>C. carachensis</i>	<i>C. microstemon</i>	<i>C. renggerioides</i>

Tabla # 2: ... continuación.

<i>C. cardonae</i>	<i>C. minor</i> L	<i>C. rosea</i>
<i>C. cerroana</i>	<i>C. mirandensis</i>	<i>C. rotundifolia</i>
<i>C. chiribiquetensis</i>	<i>C. multiflora</i>	<i>C. salvinii</i>
<i>C. cochlanthera</i>	<i>C. multilineata</i>	<i>C. savannarum</i>
<i>C. cochlitheca</i>	<i>C. myriandra</i>	<i>C. schomburgkiana</i>
<i>C. columnaris</i>	<i>C. nemorosa</i>	<i>C. schomburgkii</i>
<i>C. fabiolae</i>	<i>C. obovata</i>	<i>C. sipapoana</i>
<i>C. flava</i>	<i>C. octandra</i>	<i>C. spathulaefolia</i>
<i>C. flavida</i>	<i>C. opaca</i>	<i>C. steyermarkii</i>
<i>C. fockeana</i>	<i>C. pachyphylla</i>	<i>C. tabulamontana</i>
<i>C. grammadenioides</i>	<i>C. palmana</i>	<i>C. tetragona</i>
<i>C. grandiflora</i>	<i>C. palmicida</i>	<i>C. trochiformis</i>
<i>C. gratula</i>	<i>C. panapanari</i>	<i>C. troncosii</i>
<i>C. guayanae</i>	<i>C. parvifolia</i>	<i>C. viscida</i>

2.1.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL DE *Clusia minor* L. (Thomas, 1978).

América del Sur: Brasil, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela y Guyana.

Centro América: Desde Panamá al sur de México.

Caribe: Trinidad y Cuba.

2.1.5. TAXONOMÍA, CLASIFICACIÓN, SINONIMIA, NOMBRES COMÚN Y DIMENSIONES.

Reino: Plantae.

Phylum: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida. **Orden:** Theales. **Familia:** Clusiaceae. **Género:** *Clusia*.

Epíteto específico: *minor*. **Autor:** Carlos Linneo. **Nombre científico:** *Clusia minor* L.

Sinónimos: *C. galactodendron*, *C. adorata*, *C. parvicapsula*, *C. parviflora*, *C. venosa*.

Otros nombres comunes: copeisillo. **Altura normal:** (3-5)

2.2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE *CLUSIA MINOR* L.

Las plantas son fuente de moléculas bioactivas en su mayoría, dichas moléculas son usadas para uso médico. Por ejemplo: el acetato de β -amirina presente en especies como *Clusia minor*, realiza una doble rotura de la cadena de ADN, es la forma de daño más severo que incluso puede producir la muerte celular, permitiendo ser usada para destruir las células cancerosas (Celi, 2009).

2.3. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS REPORTADOS PARA LA FAMILIA CLUSIACEAE.

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos y, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. Los principios activos tienen propiedades medicinales o preventivas, o funcionan incrementando el bienestar. El estudio de las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en farmacología. La fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas (Salas, 2006).

2.3.1. TERPENOIDES.

Los terpenos se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono, en unidades de cinco. A un terpeno con 10 átomos de carbono (dos unidades de isopreno) se le denomina monoterpeno, con 15 átomos de carbono (tres unidades de isopreno) se le denomina sesquiterpeno, con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno) diterpeno, con 25 átomos de carbono (cinco unidades de isopreno), llamados sesterterpenos y 30 átomos de carbono triterpenos y así sucesivamente (Wade, 2004).

Los triterpenos son compuestos químicos que atraen mucha atención debido a sus actividades biológicas. Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal formando parte de los diferentes órganos de la planta (frutos, raíces, látex, semillas, hojas y partes aéreas en general).

Químicamente los triterpenos se forman a partir de un esqueleto de 30 carbonos, procedentes de la ciclación 3S-2,3-epóxido-2,3-dihidroescualeno o, más raramente, del mismo escualeno; casi siempre hidroxilados en 3 (debido a la apertura del epóxido). Los triterpenos presentan una gran variedad estructural: las principales diferencias se deben a su configuración y van unidas a la conformación adoptada por el epoxiescualeno (o el escualeno) antes de la ciclación; el catión que se produce en esta ciclación, puede sufrir a continuación una serie de desplazamientos 1,2 de protones y de metilos que justifican la existencia de los diferentes esqueletos tetra- y penta-cíclicos; estos últimos que caracterizan este grupo, comprendiendo cinco anillos de seis miembros (ursanos y oleananos) y cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco (lupanos), y como las moléculas son lipofílicas pueden penetrar, a través de la sangre, la barrera cerebral.

Varios estudios sugieren que los triterpenos ácidos y alcohólicos presentan actividades antitumorales y propiedades citotóxicas contra varias líneas celulares cancerosas de diferentes tejidos (Celi, 2009).

A continuación, se presentan algunos terpenoides aislados de la familia Clusiaceae (figura 4):

- ✓ En Venezuela (2008), el estudio realizado a las ramas y hojas de la especie *Clusia columnaris* Engl., del extracto en hexano se aislaron y caracterizaron los triterpenos tipo eufano [1], [2], [3] y [4] (Compagnone *et al.*, 2008).
- ✓ En Loja-Ecuador (2009), la evaluación del efecto genotóxico del extracto hexánico y los metabolitos secundarios de *Clusia latipes*, fueron aislados dos triterpenos: friedelina [5] y β -amirina [6] (Celi, 2009).
- ✓ El estudio de la actividad antiplasmódica *in vitro* de la especie *Calophyllum inophyllum* (Clusiaceae), se aisló y caracterizó el ácido ursólico [7], el cual presenta actividad antiplasmódica moderada y puede ser empleado como un potencial farmacóforo en el diseño de nuevos antimaláricos (Mesa *et al.*, 2011).
- ✓ El estudio fitoquímico de especies de *Clusia* (*C. rosea* y *C. gardneri*) reportó compuestos presentes en el endocarpo del fruto y con potencial de actividad biológica; estos fueron identificados como: β -amirina [6], eufol [8], Δ^7 -tirucallol [9], policerasoidol [10] (Novais, 2016).

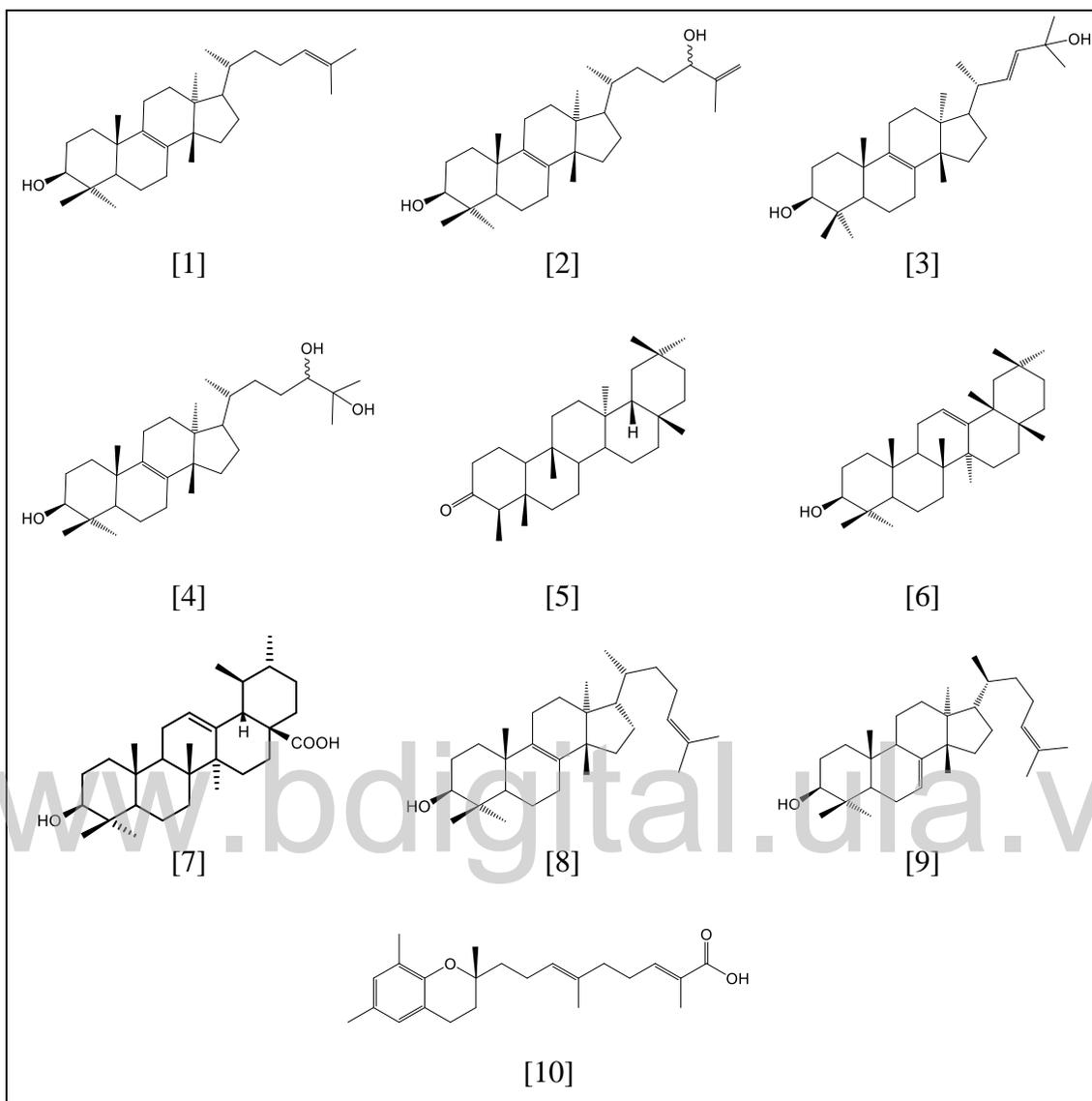


Figura 4: Estructura química de los terpenoides aislados de la familia Clusiaceae.

2.3.2. ESTEROIDES.

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales. Están clasificados como lípidos simples ya que no experimentan hidrólisis como las grasas, aceites y ceras. La familia de los esteroides incluye a una gran variedad de compuestos: las hormonas, los emulsionantes y muchos componentes de las membranas. Son compuestos tetracíclicos que tienen una amplia variedad de funciones biológicas, actuando como hormonas (hormonas sexuales), como emulsionantes (ácidos biliares) y como componentes de la membrana celular (colesterol) (Wade, 2004). Su gran uso en productos

farmacológicos ha despertado el interés del estudio y obtención de dichos compuestos a partir de productos naturales o mediante reacciones sintéticas.

Algunos esteroides reportados para la familia Clusiaceae (figura 5) son:

✓ La investigación de los frutos verdes de *Clusia paralicola* condujo al aislamiento y caracterización del β -sitosterol [11] y el estigmasterol [12] (Oliveira *et al.*, 2012).

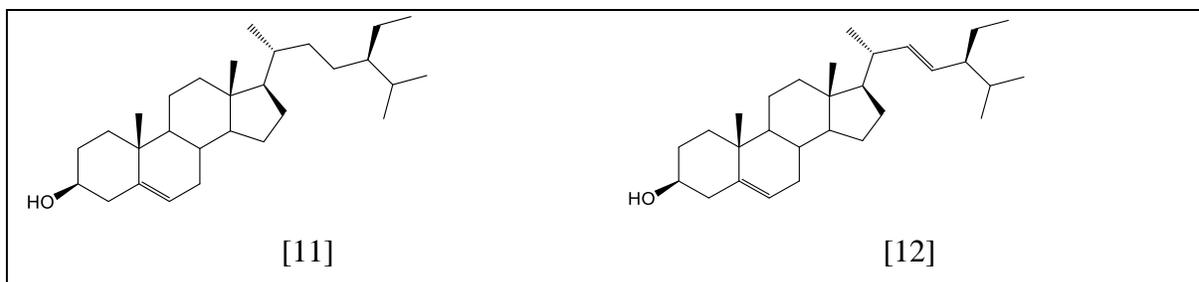


Figura 5: Estructura química de los esteroides aislados de la familia Clusiaceae.

2.3.3. FLAVONOIDES.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana, contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en (figura 6):

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Martínez *et al.*, 2002).

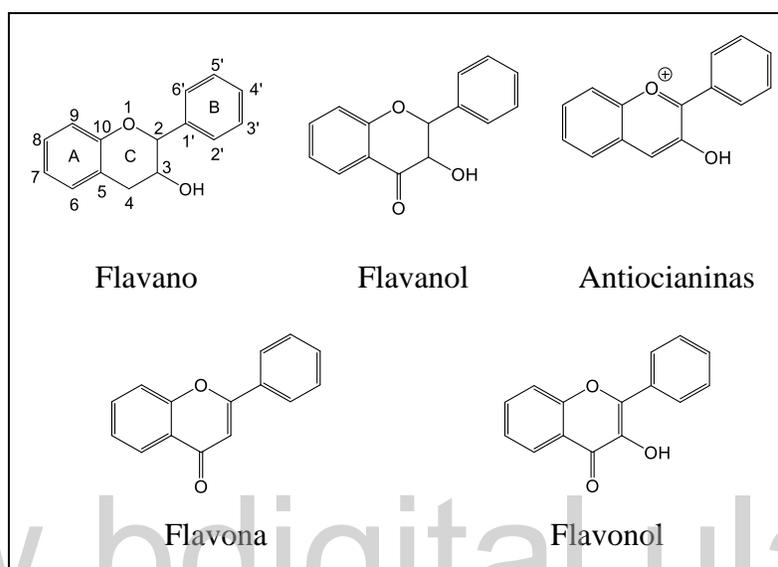


Figura 6: Flavonoides. Estructuras básicas y tipos.

Algunos flavonoides reportados para el género *Clusia* (Figura 7) se describen a continuación:

✓ De los frutos de la especie *Clusia guaviarensis* se aislaron e identificaron los biflavonoides fukugetin [13] y 7-*O*-glucosil-fukugetin [14], los cuales presenta considerables propiedades analgésicas (Martínez *et al.*, 1996).

✓ En el 2004 el estudio de la actividad antimicrobiana de fracciones y compuestos *Calophyllum brasiliense*, se aisló el flavonoide catequina [15], no mostró actividad contra los microorganismos empleados hasta concentraciones de 1000 µg/mL (Pretto *et al.*, 2004).

✓ En Venezuela (2008), el estudio realizado a las ramas y hojas de la especie *Clusia columnaris* Engl., utilizando los extractos más polares de acetato de etilo y *n*-butanol, fueron aislados los siguientes flavonoides: isovitixina [16], vitixina [17], 2''-*O*-xilósido de vitixina [18] y los biflavonoides fukugetina [13], 7-*O*-glucosilo de fukugetina [14], volkensiflavona [19] y volkensiflavona glucosilada [20] (Compagnone *et al.*, 2008).

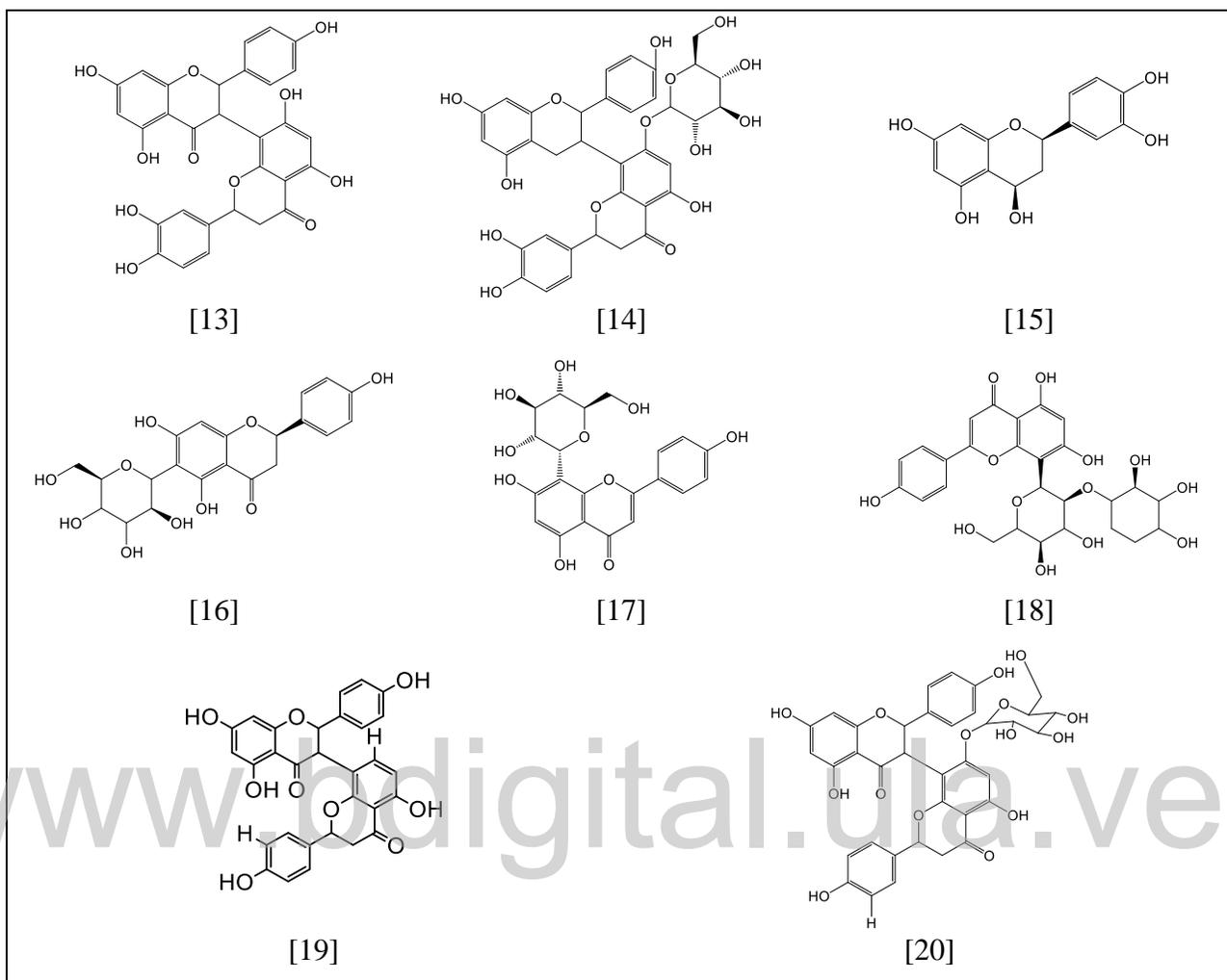


Figura 7: Estructura química de los flavonoides aislados de la familia Clusiaceae.

2.3.4. CUMARINAS.

Las cumarinas comprenden un amplio grupo de sustancias benzo- α -pirona-fenólicas (se han descrito más de mil compuestos) ampliamente distribuidas en la naturaleza. Aunque algunas de ellas son tóxicas para los mamíferos, como las anatoxinas, y se ha descrito fitotoxicidad y fitomutagenicidad para las furanocumarinas, sin embargo, las cumarinas simples son menos tóxicas y presentan un amplio rango de acción farmacológica.

Las cumarinas constituyen un grupo muy extenso de antioxidantes fenólicos naturales. Químicamente, las cumarinas son compuestos heterocíclicos oxigenados derivados de la α -pirona. Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, como constituyentes de muchas plantas y aceites esenciales. (Martín, 1994)

Algunas cumarinas encontradas en la familia Clusiaceae (figura 8):

✓ Del estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad molusquicida de *Colophyllum brasiliense* fue aislado el compuesto (±) mammea A/BB [21] el cual presenta actividad en 10 ppm, con un índice de mortalidad 20 %. (Gasparotto, 2005).

✓ En el estudio de inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 utilizando plantas de la familia Clusiaceae (*Colophyllum brasiliense*), se aisló el (±)-calanolido A [22], dichos compuestos son potentes inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa del VIH-1. (Reyes *et al.*, 2009).

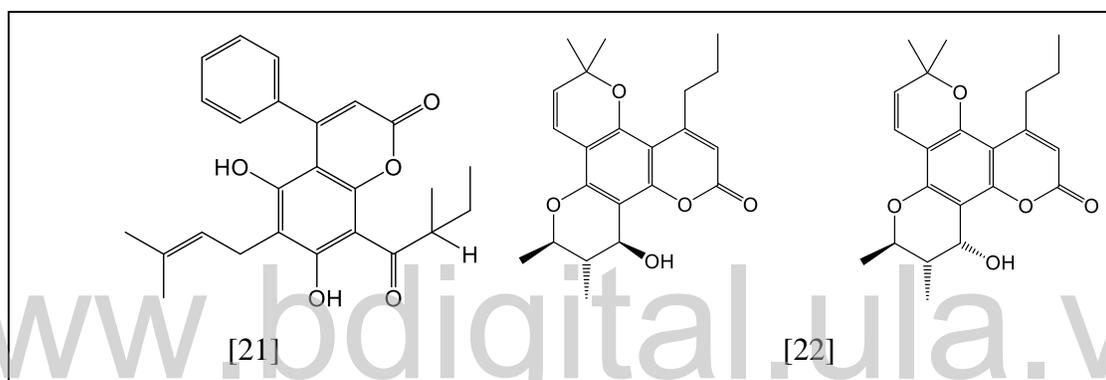


Figura 8: Estructura química de las cumarinas aisladas de la familia Clusiaceae.

2.3.5. BENZOFENONAS.

Las benzofenonas son cetonas aromáticas importantes en la fotoquímica, perfumería y como reactivos en síntesis orgánicas. Ayudan a filtrar las radiaciones. Estas cetonas absorben la radiación y la disipan en forma de calor. Por esa principal característica es utilizada en la producción de perfumes, jabones y protectores solares.

Algunas de las benzofenonas reportadas en el género *Clusia* se muestran en la figura 9:

✓ *Clusia rosea* posee benzofenonas conocidas como: guttiferona E [23] y xantochymol [24], cuyo estudio indica que son compuestos inhibidores del virus VIH (Gustafson *et al.*, 1992).

✓ Del extracto de los frutos de la especie *Clusia multiflora* Kunth se aislaron clusiacitran A [25] y clusiacitran B [26] (González *et al.*, 1994).

✓ Un estudio realizado a los frutos de *Clusia ellipticifolia* reportó el aislamiento de clusiaphenone A [27], isovismiapfenone B [28] y vismiaphenone B [29] (Olivares *et al.*, 1994).

✓ Del extracto en acetona del fruto de la especie *Clusia columnaris* Engl. se aislaron dos benzofenonas poli-isopreniladas: Machuone [30] y clusiachromeno A [31]. (Compagnone *et al.*, 2008).

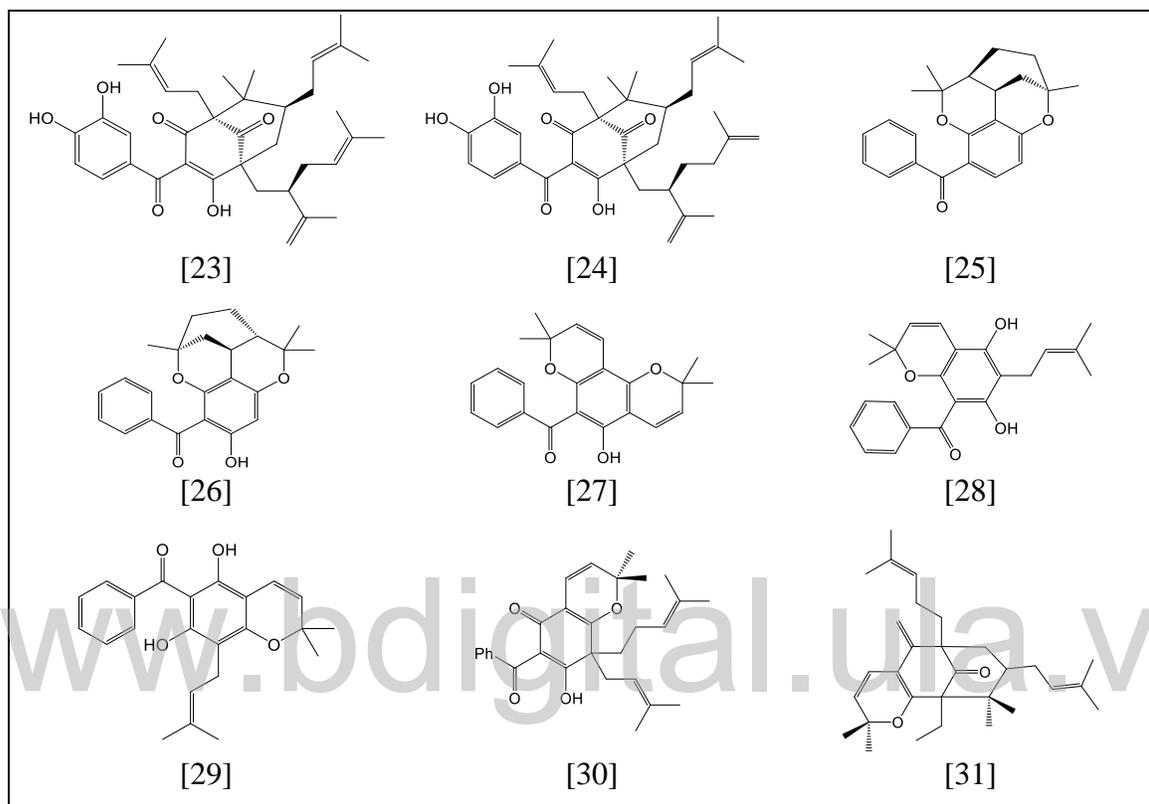


Figura 9: Estructura química de las benzofenonas aisladas de la familia Clusiaceae.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos de aspecto fluido o espeso y de color variable según las plantas de las que estos son extraídos. Son sustancias aromáticas de base lipídica encontradas prácticamente en todas las plantas; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en las distintas partes de la planta: raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; separables por métodos químicos o físicos, tales como la destilación con arrastre con vapor, fluidos supercríticos, centrifugación, extracción por microondas y otros métodos. (Peredo *et al.*, 2009)

Los aceites esenciales son volátiles, en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter, aceites vegetales y minerales, raramente tienen color, su olor es característico, los índices de refracción son muy elevados, su densidad es inferior a la del agua y son líquidos a temperatura ambiente. Generalmente, dependiendo de su estructura química, pueden agruparse en 6 clases: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, lactonas y óxidos (Bonicatto *et al.*, 2007). Tienen numerosas propiedades medicinales que les son comunes. Sus metabolitos secundarios aislados de las plantas, se destacan algunos, de amplio uso en la industria, medicina y uso cotidiano. Son eficaces frente a numerosos gérmenes y virus distintos, así como frente a los hongos. Cada aceite esencial tiene su propia propiedad terapéutica específica.

3.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

3.1.1.1. Consistencia.

De acuerdo a su consistencia se clasifican en: esencias fluidas, bálsamos y las oleorresinas.

3.1.1.1.1. **Esencias fluidas.**

Son líquidos muy volátiles a temperatura ambiente (esencias de albahaca, caléndula, citronela, pronto alivio, romero, tomillo, menta, salvia, limón).

3.1.1.1.2. **Bálsamos.**

Son de consistencia más espesa, poco volátiles, contienen principalmente sesquiterpenoides y son propensos a polimerizarse (bálsamos de Copaiba, bálsamo de Perú, bálsamo de Tolú).

3.1.1.1.3. **Oleorresinas.**

Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada, son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresinas de paprika, de pimienta negra, de clavero). Contienen los aceites esenciales, los aceites fijos, los colorantes y los principios activos de la planta.

3.1.1.2. **Origen.**

En cuanto al origen los aceites esenciales se clasifican en aceites: naturales, artificiales o sintéticos.

3.1.1.2.1. **Aceites naturales.**

Se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna modificación fisicoquímica o química, son costosos y de composición variada.

3.1.1.2.2. **Aceites artificiales.**

Se obtienen por enriquecimiento de esencias naturales con uno de sus componentes; también se preparan por mezclas de varias esencias naturales extraídas de distintas plantas.

3.1.1.2.3. **Aceites sintéticos.**

Son mezclas de diversos productos obtenidos por procesos químicos o preparados mediante procesos de síntesis química, son más económicos y por lo tanto se utilizan mucho en la preparación de sustancias aromatizantes y saborizantes.

3.1.1.3. **Naturaleza química.**

Según la estructura química de los componentes mayoritarios que determinan el olor particular de los aceites, estos se dividen en tres grupos principales:

- ✓ Monoterpenoides: (linalool, nerol, 1,8-cineol, geraniol).
- ✓ Sesquiterpenoides: (farnesol, nerolidol).
- ✓ Compuestos oxigenados: (alcoholes, aldehídos, cetonas).

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%) pero mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias

químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente (Bruneton, 2001).

3.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.

- ✓ Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente, recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos.
- ✓ Su densidad es inferior a la del agua (la esencia de safrán o de clavo constituyen excepciones).
- ✓ Tienen un índice de refracción elevado.
- ✓ Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos, como éter o cloroformo y alcoholes.
- ✓ Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua.

3.1.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Los componentes de los aceites se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

3.1.3.1. No terpenoides.

En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.

3.1.3.2. Terpenoides.

Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente.

3.1.4. USO DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales tienen diversos usos tanto a nivel industrial, en laboratorios de investigación, usos farmacéuticos y en la vida cotidiana (ver tabla # 3).

3.1.5. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: destilación por arrastre con vapor de agua utilizando trampa de Clevenger, extracción con solventes volátiles, *enfleurage*, extracción con microondas y otras técnicas. (Martínez, 1996).

Tabla # 3: Principales sectores, usos y tipos de aceites esenciales.

Sectores	Usos	Tipos de aceite
Industria cosmética y productos de aseo.	Jabones, detergentes, perfumes, maquillajes, colonias, talcos y otros usos	Eucaliptos y derivados, mentas, lavanda, rosas, romero, sábila, coco y otros
Industria de alimentación	Bebidas, dulces, confiterías, salsas, enlatados, bebidas alcohólicas, aromatizantes, crema dentales	Anís, hinojo, vainillas, especias, mentas, coco, cambur, fresa y otros
Industria farmacéutica	Fitocosméticos Cosmecéuticos Homeopatía Aromaterapia Fitofármacos	Limonaria, citronela, eucalipto, romero, lavanda, sábila, geranio, menta y otros

3.1.5.1. Destilación por arrastre con vapor de agua utilizando trampa de Clevenger.

Es el proceso más común para extraer aceites esenciales, más no es aplicable a flores ni a materiales que se condensan. Esta técnica aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite.

La extracción se efectúa cuando el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal y libera la esencia, para luego ser condensada. Con el fin de asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas de aceite, se requiere picar el material según su consistencia.

Una variante de esta última técnica es la llamada "hidrodestilación", donde se coloca una trampa al final del refrigerante, la cual va separando el aceite del agua condensada, con lo cual se mejora y se facilita el aislamiento del aceite esencial. También puede montarse como un reflujo, con una trampa de Clevenger para separar aceites más ligeros que el agua. (Peredo *et al.*, 2009).

3.1.5.2. **Extracción con solventes volátiles.**

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcoholes, cloroformo, entre otros. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.

3.1.5.3. **Enfleurage.**

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otro medio físico-químico. (Martínez, 1996).

3.1.5.4. **Extracción con microondas.**

Esta técnica puede utilizarse asistiendo un método convencional como la hidrodestilación o adaptando un equipo para establecerlo como un método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente. La técnica permite realizar en seco sin disolvente o agua si se emplea materiales frescos. La extracción por microondas ofrece beneficios como una reducción considerable del tiempo, consumo de energía y solventes. (Peredo *et al.*, 2009).

3.1.6. **TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.**

La cromatografía es básicamente una técnica de separación, su gran capacidad para identificar muestras complejas ha conducido a utilizarla como técnica analítica. Entre las técnicas más utilizadas para la identificación de los aceites esenciales se encuentran:

- ✓ Cromatografía de gases (CG).
- ✓ Espectrometría de masas (EM).
- ✓ Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).
- ✓ Índice de Kováts.

3.1.6.1. **Cromatografía de gases (CG).**

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analizan muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar. (Gutiérrez, 2002).

3.1.6.2. Espectrometría de masas (EM).

La espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. (Gutiérrez, 2002).

3.1.6.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. Una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. (Gutiérrez, 2002).

3.1.6.4. Índice de Kováts.

Es útil para identificar un compuesto a partir de su tiempo de retención relativo a los de compuestos similares en una serie homóloga (los que difieren en la cantidad de átomos de carbono en una estructura similar, como en las cadenas de alcanos). Es un método de cuantificación de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla.

3.2. **TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.**

La extracción es una técnica fisicoquímica muy utilizada para la separación de un compuesto que se encuentra en una mezcla o aislar un compuesto orgánico de su fuente natural. Se aplica a todo tipo de mezclas tanto sólidas, líquidas o gaseosas. Esta técnica está fundamentada en la diferencia de solubilidades de los compuestos.

3.2.1. TIPOS DE EXTRACCIONES.

Según la composición y el estado físico de la mezcla se emplean las siguientes técnicas de extracción:

- ✓ Extracción líquido-líquido

- ✓ Extracción sólido-líquido

3.2.1.1. **Extracción líquido-líquido.**

La extracción líquido-líquido es una técnica instrumental utilizada con diversos fines. Suele ser una operación muy habitual en los primeros pasos de un tratamiento de reacción que permite eliminar excesos de reactivos utilizados, así como de algunas impurezas formadas en la reacción. También es una técnica muy utilizada para llevar a cabo la extracción de compuestos orgánicos que se encuentran en fuentes naturales. Este método aprovecha la solubilidad preferencial de un compuesto A en un solvente B.

Las extracciones líquido-líquido se pueden clasificar en:

- ✓ Extracción líquido-líquido simple.
- ✓ Extracción líquido-líquido continua.

3.2.1.1.1. **Extracción líquido-líquido simple.**

La extracción líquido-líquido simple, a menudo llamada extracción con disolventes, consiste en la separación de los constituyentes de una mezcla líquida por contacto con otro líquido inmiscible (parcial o totalmente inmiscible), por lo tanto, no supone cambio de estado físico. Un aspecto muy importante de la técnica de extracción es que, para un mismo volumen final de disolvente orgánico, es más efectivo realizar varias extracciones con un volumen menos que una única extracción con todo el disolvente. Únicamente cuando K (coeficiente de reparto) es muy grande (>100) sería suficiente realizar una única extracción. Se suele utilizar siempre que el reparto del compuesto a extraer en el disolvente de extracción es suficientemente favorable. Generalmente se emplea un embudo de separación para la realización del procedimiento. (Ver figura # 10)

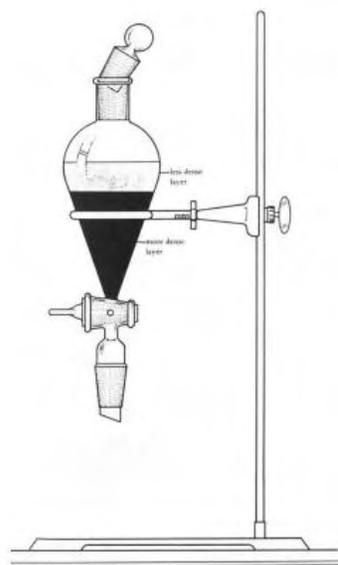


Figura 10: Embudo de separación para extracciones líquido-líquido simples.

3.2.1.1.2. **Extracción líquido-líquido continua.**

Cuando el coeficiente de reparto de un compuesto es muy bajo (cerca de 1), se utiliza un procedimiento que implica una extracción de la fase inicial con porciones nuevas del disolvente orgánico de extracción. Para evitar el uso de grandes cantidades de disolvente, el proceso se hace en un sistema cerrado donde el disolvente se calienta en un matraz y los vapores del disolvente se condensan en un refrigerante. El disolvente condensando con la muestra extraída regresa al matraz inicial y repite el ciclo hasta obtener la mayor extracción posible.

3.2.1.2. **Extracción sólido-líquido.**

Es una técnica que permite separar de una fase sólida uno de sus componentes (soluta) de otra (inerte) mediante el contacto con una fase líquida (solvente) que lo disuelve selectivamente.

Las extracciones sólido-líquido se pueden clasificar de acuerdo a la técnica utilizada en:

- ✓ Extracción sólido-líquido discontinua.
- ✓ Extracción sólido-líquido continua.

3.2.1.2.1. Extracción sólido-líquido discontinua.

La muestra se tritura y se agrega a un vaso de precipitado, un matraz o una cápsula de porcelana, en frío o en caliente, se separa por filtración y se concentra la muestra obtenida.

3.2.1.2.2. Extracción sólido-líquido continua.

La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado como el sistema en Soxhlet.

La extracción Soxhlet (figura 11) consta de las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un balón. 2) ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo. 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón. 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón con solvente. (Núñez, 2008)

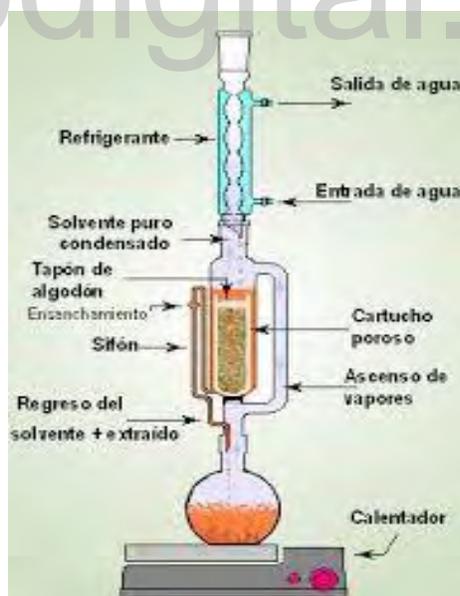


Figura 11: Equipo de extracción con Soxhlet.

3.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.

Las técnicas cromatográficas de purificación consisten en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre una fase estacionaria y una móvil. Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles, una de ellas llamada fase activa o fase móvil, que transporta las sustancias que se separan, y que progresa en relación a otra fase llamada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Teniendo en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria se establece la siguiente clasificación:

- ✓ Cromatografía de adsorción.
- ✓ Cromatografía de partición o reparto.
- ✓ Cromatografía de exclusión por tamaño.
- ✓ Cromatografía de intercambio iónico.

3.3.1. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.

Existen ciertas sustancias sólidas, químicamente inertes, que tienen la propiedad de adsorber o fijar débilmente en su superficie a una gran cantidad de compuestos. La fortaleza con la que se adsorben las sustancias sobre un adsorbente dado varía de un compuesto a otro. Entre los adsorbentes más usuales: sílica gel (óxido de silicio), alúmina (óxido de aluminio), celulosa, fluorosil (silicato de magnesio) y sulfato de calcio. La separación se realiza por la diferente tendencia de adsorción de los compuestos orgánicos por la fase estacionaria. Dependiendo de las interacciones adsorbente-muestra y adsorbente-solventes estas se clasifican en:

- ✓ Cromatografía líquido-sólido o en columna (CC).
- ✓ Cromatografía de capa fina (CCF).
- ✓ Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).

3.3.1.1. Cromatografía líquido-sólido o en columna (CC).

La técnica consiste en rellenar la columna con el adsorbente elegido (seco o húmedo) que debe sedimentar sin que se produzcan canales o grietas. En la parte superior de la columna se coloca la mezcla a separar, llamada cabeza de la columna que se obtiene mezclando el adsorbente con la muestra con el eluyente (fase móvil) que va a ser utilizado en el proceso de separación. Se deja que el eluyente empiece a descender por la columna ya sea por gravedad o

a presión (cromatografía flash). Se produce la adsorción de los componentes con diferentes intensidades logrando que unos avancen más que otros. En la parte inferior de la columna se recogen las diferentes fracciones cromatográficas que se analizan y agrupan en función de sus características.

3.3.1.2. Cromatografía de capa fina (CCF).

Es una adaptación especial de la cromatografía de adsorción en columna muy utilizada en química orgánica ya que entre otras cosas nos permite:

- ✓ Determinar el grado de pureza de una muestra.
- ✓ Comparar muestras.
- ✓ Hacer el seguimiento de una reacción química.
- ✓ Controlar el contenido de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.
- ✓ Determinar las condiciones más adecuadas para una cromatografía en columna.

La fase estacionaria consiste en una fina capa delgada de gel de sílice o alúmina adherida a un soporte de vidrio, aluminio o materiales plásticos con un grosor entre 1 hasta 0,1 – 0,2 mm.

3.3.1.3. Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).

La cromatografía de capa fina preparativa también se puede usar con fines cuantitativos para separar pequeñas cantidades de un compuesto.

Las separaciones preparativas se realizan en placas estándar de 20 x 20 cm (algunas veces en placas de 20 x 40 cm más gruesas). La muestra se aplica en forma de banda lineal mediante una pipeta Pasteur o con un capilar.

Para la cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) podemos utilizar todos los sistemas de disolventes que hemos descrito para la CCFP analítica obteniendo los mismos resultados.

Una vez realizada la cromatografía, las bandas de interés se ponen de manifiesto utilizando una técnica no destructiva con el reactivo adecuado (luz UV o yodo).

3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN O REPARTO.

Técnica donde la separación selectiva de los componentes se produce por el diferente grado de solubilidad que estos puedan tener con las dos fases participantes. Es decir, como si se estuviese produciendo un elevado número de extracciones. Por ello, la fase tiene que ser

inmiscibles entre sí y el soluto sufre un equilibrio de partición entre ambas que queda definido por una constante K , llamada “coeficiente de reparto”, cuyo valor depende para una fase estacionaria determinada y para una fase móvil dada, de la naturaleza del soluto a aislar, lo que origina las diferencias en la retención y la consiguiente separación. El soluto se reparte entre el líquido de la fase estacionaria y la fase móvil, por diferencia de solubilidad, hasta alcanzar el equilibrio.

3.3.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO.

Se usan materiales sintéticos (polímeros) con grados de porosidad controlados que permiten un fraccionamiento de las mezclas en función del tamaño de las moléculas que las componen.

3.3.4. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico y la separación se produce por la unión de los iones a la fase estacionaria. La técnica es muy similar a la utilizada en la cromatografía en columna y la separación se produce en función de la carga que posee el soluto.

Fase estacionaria: resinas de intercambio iónico que tienen la propiedad de separar especies ionizadas (aniones o cationes). La fase móvil: generalmente disoluciones amortiguadoras de pH.

La afinidad de los compuestos por los grupos cargados de la fase estacionaria está influida por el pH que determina su estado de ionización. El intercambiador iónico consiste en una matriz insoluble a la que se han unido covalentemente grupos cargados. Estos grupos cargados pueden ser reversiblemente intercambiados por otros iones de la misma carga sin alterar la matriz (López *et al.*, 2005)

3.4. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS.

La espectroscopia es un término general para la ciencia que trata de las distintas interacciones de la radiación con la materia. Históricamente, las interacciones de interés se producían entre la radiación electromagnética y la materia, sin embargo, ahora el término espectroscopia se ha ampliado para incluir las interacciones entre la materia y otras formas de energía. Ejemplo de ellos son las ondas acústicas y los haces de partículas como iones o electrones. La espectroscopia y los métodos espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico.

Las técnicas comúnmente más utilizadas son las siguientes:

- ✓ Espectroscopia de absorción infrarroja (IR).
- ✓ Espectrometría de masas atómicas.
- ✓ Espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-Vis).
- ✓ Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

3.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INFRARROJA (IR).

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros. Esta técnica es empleada en la caracterización de grupos funcionales presentes en una estructura. Los análisis se realizan en un espectrofotómetro infrarrojo –FT, en pastilla de KBr o en película líquida.

3.4.2. ESPECTROMETRÍA DE MASA ATÓMICA.

Muy utilizada para identificar los elementos presentes en muestras de materias (casi todos los elementos de la tabla periódica), determinar su concentración; en compuestos orgánicos ofrece gran información de la estructura del compuesto (mediante un estudio de sus patrones de fragmentación), masa atómica y/o incluso su fórmula molecular.

Un análisis por espectrometría de masas atómica implica las siguientes etapas: (1) atomización, (2) conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la etapa 1 en un flujo de iones (generalmente iones positivos de una sola carga), (3) separación de los iones formados en la segunda etapa según su relación masa/carga (m/z), donde m es la masa del ion (atómico o molecular) y z es su carga, y (4) recuento del número de iones de cada tipo o medida de la corriente iónica producida cuando los iones formados a partir de la muestra inciden en un detector adecuado. La tercera y cuarta etapa se llevan a cabo en un espectrómetro de masas.

3.4.3. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA/VISIBLE (UV-VIS).

Las medidas de absorción de radiación ultravioleta y visible tienen una gran aplicación en la identificación y determinación de compuestos inorgánicos y orgánicos. La espectroscopia de absorción molecular se basa en las medidas de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico b (cm).

Normalmente, la concentración c de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia. Esta técnica señala la existencia de grupos cromóforos (sistemas con enlaces π , aromáticos, carbonilos). La frecuencia a la que aparece cada banda y los coeficientes de extinción suelen estar tabulados para cada tipo de sistema.

3.4.4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz. En contraste con la absorción UV-vis e infrarroja, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos en vez de los electrones exteriores. Además, es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción.

Los compuestos aislados se caracterizarán por las siguientes RMN:

- ✓ Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H).
- ✓ Resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN- ^{13}C).
- ✓ Resonancia magnética nuclear bidimensional.

3.4.4.1. Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H).

La aplicación más importante de la RMN- ^1H es la identificación y la elucidación estructural de las moléculas orgánicas, órgano-metálicas y bioquímicas; constituye muchas veces un procedimiento útil para la determinación cuantitativa de las especies que absorben. La mayor información que nos proporciona el espectro son el desplazamiento químico (δ), la constante de acoplamiento (J) y la multiplicidad.

La RMN de hidrógeno permite obtener un espectro en donde las señales muestran la ubicación (desplazamiento químico) y disposición de los hidrógenos (especialmente isótopos ^1H cuyo spin es $\frac{1}{2}$) en la molécula analizada. Esto se da en la protección o desprotección electrónica que generan los átomos a los cuales estén directamente enlazados a los átomos adyacentes, permitiendo conocer los ambientes químicos en los que se encuentran los diferentes protones que componen la molécula. Comúnmente se habla de que un espectro RMN está compuesto de dos regiones: campo alto (región hacia la derecha del espectro) donde se ubican los H con mayor protección electrónica y campo bajo (región izquierda del espectro) donde se ubican las señales de los H con mayor desprotección electrónica. Otro tipo de información que

brindan estos espectros, es que las señales pueden verse divididas en función de los hidrógenos vecinos, a lo cual se les denomina acoplamiento. Adicionalmente, el espectro indica la integral, que es la intensidad relativa de cada señal, proporcional al número de protones que la componen.

La mayoría de las señales de protones (^1H) varían entre 0 y 14 δ (ppm respecto al tetrametilsilano).

3.4.4.2. **Resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN- ^{13}C)**.

El principio es el mismo que para el RMN- ^1H y por lo tanto la información que brinda es muy similar. Las principales diferencias, al compararlo con el espectro de RMN de protón radican en: los espectros de ^{13}C son más sencillos, ya que, dependiendo del número de carbonos no equivalentes, las señales aparecen como singuletes.

En condiciones normales, en el espectro de ^{13}C no se observan acoplamientos ^{13}C - ^{13}C debido a su baja abundancia natural (aproximadamente 1% de los átomos de carbono en la muestra son magnéticamente activos).

La escala de los desplazamientos químicos en ^{13}C es mayor, yendo desde 0 hasta un poco más de 200 ppm. La integración de las señales en el espectro ^{13}C no es posible, fenómeno que si ocurre en el espectro de hidrógeno.

Como ventaja fundamental se tiene que el espectro de carbono 13 proporciona información directa acerca de los átomos de carbono que componen la molécula. Además, en el espectro de ^{13}C brinda información de carbonilos y carbonos cuaternarios.

3.4.4.3. **Resonancia magnética nuclear bidimensional**.

Dependiendo de las secuencias de pulsos usadas y de dichos tiempos de espera entre los pulsos se obtienen diferentes espectros, siendo los más usados:

- ✓ ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).
- ✓ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) ó HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation).
- ✓ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

3.4.4.3.1. ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

Es una técnica cuyos espectros aparecen los desplazamientos químicos de ^1H en ambas dimensiones. Es útil para averiguar que espín está acoplado con otros espines. En los espectros COSY aparecen básicamente dos tipos diferentes de señales. Las de la diagonal (señales o picos diagonales) representan el espectro 1D original, tal y como se obtiene en un espectro 1D. Las señales de afuera de la diagonal constituyen los denominados picos o señales de cruce, que indican la existencia de acoplamientos escalares (a través de los enlaces) entre los núcleos. Los correspondientes núcleos acoplados con ellos se pueden encontrar partiendo de las señales de cruce, trazando líneas horizontales y verticales hasta encontrar la diagonal y éstas son las posiciones de las señales de los núcleos acoplados entre sí.

Describe los patrones de acoplamientos entre protones en una molécula, correlaciona todos los desplazamientos químicos de protones magnéticamente diferentes sobre el mismo carbono (geminales) y sobre carbonos contiguos (vecinales), con lo cual es posible ubicar los protones que están acoplados.

Debido a la simetría del espectro, este procedimiento se puede llevar a cabo tanto en el triángulo superior izquierdo como en el inferior derecho (Duddeck *et al.*, 1998).

3.4.4.3.2. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) ó HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation).

Estas dos técnicas detectan las correlaciones entre los núcleos de dos tipos diferentes de átomos que están separados por un enlace. Aunque la secuencia HMQC y HSQC detectan nominalmente las correlaciones a un enlace, en circunstancias excepcionales algunas de estas pueden desaparecer y aparecer las correlaciones a mayores distancias. Esto puede ocurrir cuando el acoplamiento H-C (J) implicado en ese caso está lejos del valor asumido cuando se calcula el periodo (Δ ms), una situación probable en alquinos donde J a uno y dos enlaces son inusualmente grandes. Estas técnicas permiten afirmar la estructura de la molécula estudiada gracias a que su espectro da un pico por par de núcleos acoplados, cuyas dos coordenadas son los desplazamientos químicos de los átomos acoplados.

3.4.4.3.3. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

El experimento HMBC establece correlaciones a larga distancia haciendo uso de la mayor sensibilidad asociada a la detección de protón y es en esencia un HMQC “optimizado” para detectar correlaciones vía acoplamientos pequeños. Los acoplamientos a dos o tres enlaces

protón-carbono raramente sobrepasan 25 Hz, y en ausencia de insaturaciones son generalmente inferiores a 5 Hz. Hay que tener presente que los acoplamientos a tres enlaces pueden ser, y frecuentemente lo son, de magnitud mayor que los correspondientes a dos enlaces.

3.5. BACTERIAS.

Las bacterias son los microorganismos más pequeños que contienen la maquinaria necesaria para crecer y multiplicarse. Se trata de organismos primitivos, de estructura sencilla que han sido capaces de poblar todos los hábitats terrestres y son por ello un grupo muy heterogéneo y con muy diferentes necesidades nutricionales y energéticas.

3.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS.

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría es de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. Las bacterias integran el reino Procariota (*pro* de primitivo y *cariota* de núcleo). Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética.

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Pérez *et al.*, 2000).

Por otro lado, de acuerdo con su nutrición, se pueden clasificar en heterótrofas y autótrofas; siendo las autótrofas aquellas que son capaces de fabricar materia orgánica a través de la luz solar, lo que significa que son fotosintéticas al igual que las plantas (Paredes, 1988).

Algunas bacterias necesitan oxígeno para vivir, en cambio otras, pueden vivir sin tener contacto con el aire y en determinados casos, incluso pueden morir si se las expone al oxígeno. Estas son las llamadas anaeróbicas y para respirar, realizan un complejo proceso conocido como la respiración anaeróbica (Walter *et al.*, 2000).

3.5.2. TÉCNICAS DE TINCIÓN PARA IDENTIFICAR LAS BACTERIAS.

La mayor parte de las bacterias se clasifican como gram positivas o gram negativas con base en su respuesta al procedimiento de tinción de Gram.

3.5.2.1. Tinción de Gram.

El procedimiento recibió su nombre por el histólogo, Hans Christian Gram, quien desarrolló este procedimiento de tinción diferencial en un intento para teñir las bacterias en tejidos infectados.

La tinción de Gram depende de la capacidad de ciertas bacterias (grampositivas) para retener un complejo de cristales de color violeta (un colorante de color violáceo) además de yodo después de un breve lavado con alcohol o acetona. Las bacterias gramnegativas no retienen el complejo de colorante-yodo y se vuelven translúcidas, pero pueden volverse a teñir con safranina (un colorante de color rojo) (Brooks y col. 2010).

3.5.2.2. Tinción de Ziehl-Neelsen.

La tinción de Ziehl-Neelsen ó de los Bacilos Alcohol Ácido Resistentes (BAAR) es una técnica de tinción diferencial rápida y económica, para la identificación de microorganismos patógenos.

Las paredes celulares de ciertos parásitos y bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistente. Las micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium marinum*, así como los parásitos coccídeos como el *Cryptosporidium*, se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia (Walter *et al.*, 2000).

Por su parte, la coloración de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras, esto se debe a que el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante queda atrapado confiriéndole a la bacteria un color rojo mientras aquellas que no retienen el colorante se observan en tonalidad azul (Araque *et al.*, 1999).

3.5.2.3. Diferencias de las bacterias grampositivas y gramnegativas.

La pared de una célula grampositiva está formada por una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglucanos o mureína, situada por fuera de la membrana celular, poseen una gran cantidad de ácido teicoicos y ácidos teicurónicos. Los ácidos teicoicos son polímeros de polifosfato unidos por enlaces tipo éster (fosfodiéster, glicerolfosfato ó ribitolfosfato). Por su parte los ácidos teicurónicos, son polisacáridos del tipo ácido urónico, los

cuales son responsables de la clasificación serológica, la asimilación selectiva de cationes, reserva de fosfatos, adhesión de bacteriófagos y el control de la actividad autocatalítica de la bacteria. Estas bacterias tienen la particularidad de no poseer membrana externa y son capaces de retener el colorante específico.

Las bacterias grampositivas se tiñen de color azul-violeta, mientras que las gramnegativas adquieren un color rosa a rojo.

La pared celular de las bacterias gramnegativa (la cual presenta dos capas, la externa y la interna) es mucho más compleja que las grampositivas (Figura 12). La capa delgada de peptidoglucano, próxima a la membrana plasmática, no constituye más del 5 al 10 % de todo el peso. La proteína más abundante es la lipoproteína de Braun, o lipoproteína de mureína, la cual se encarga de unir la capa de fosfolípidos con los peptidoglucanos.

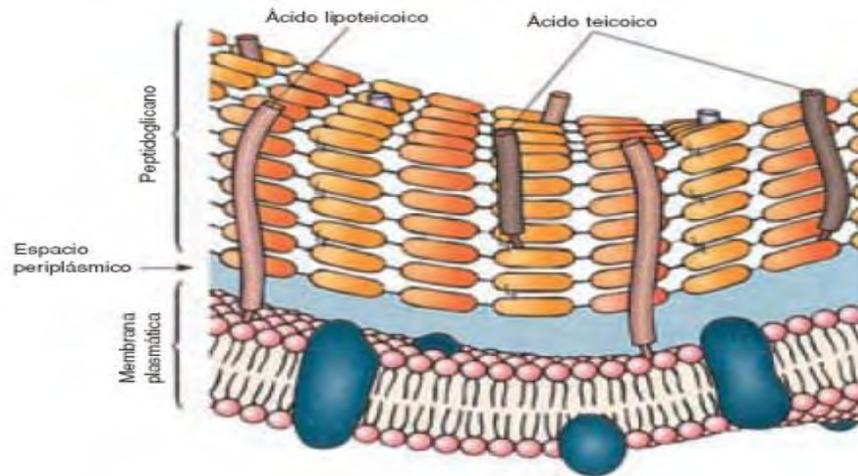
Debido a que la capa de peptidoglucano es delgada (2 a 7 nm) no es capaz de retener al colorante azul-violeta (Prescott *et al.*, 1999).

3.5.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

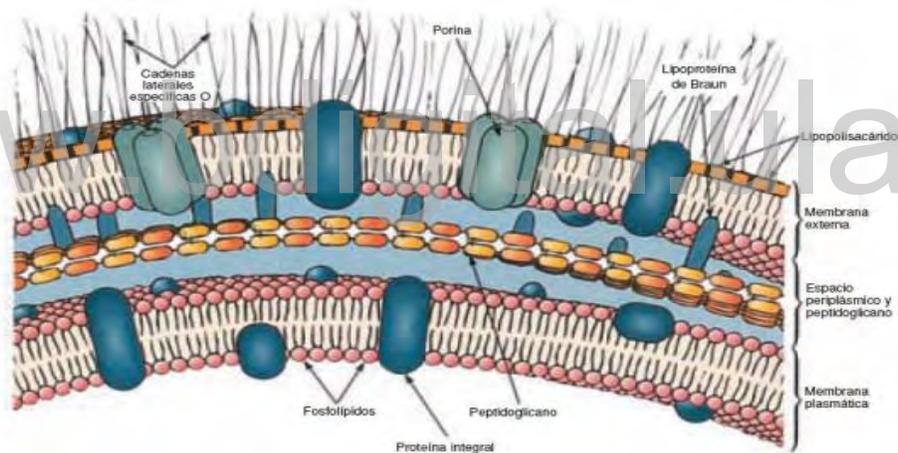
Se estima que en la parte aérea de las plantas existen microorganismos principalmente bacterias. Gran parte de estos forman parte de la ecología vegetal, estableciéndose un equilibrio que se fragmenta por diversos motivos, por ejemplo, con la colonización de una bacteria patógena. Globalmente las plantas producen más de 100.000 productos naturales, esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de bacterias, insectos y otros animales. Un aspecto importante en la demostración de la acción de estos compuestos consiste en bloquear, mediante una mutación, el gen que codifica la producción de actividad antimicrobiana, o de las sustancias que interfieren en su acción (Domingo *et al.*, 2003).

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices. Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, no tienen núcleo ni orgánulos internos (mitocondrias y ribosomas). Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. Son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, encontrándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos

radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior (Prescott *et al.*, 1999).



Envoltura de una bacteria gram-positiva.



Envoltura de una bacteria gram-negativa.

Figura 12: Envolturas de las bacterias gram-positivas y gram-negativas.

5.3.4. ANTIBIÓTICOS.

Los antibióticos se pueden administrar de formas diferentes, no siempre se diseminan con rapidez por todo el cuerpo o matan de forma inmediata todos los patógenos invasores. Una compleja serie de factores influyen en la eficacia de los fármacos. En primer lugar, el fármaco debe ser capaz de alcanzar realmente el lugar de la infección. La forma de administración desempeña un papel importante. Algunos antibióticos, por ejemplo, la gentamicina y otros

aminoglucósido, no se absorben bien por el tubo digestivo y deben inyectarse por vía intramolecular o intravenosa.

Segundo, el patógeno debe ser sensible al fármaco. Las bacterias de los abscesos pueden encontrarse en estado latente, y por lo tanto ser resistentes a las quimioterapias, ya que las penicilinas y otros muchos agentes solo afectan a los patógenos cuando están creciendo y dividiéndose de forma activa. Por una parte, un patógeno, aunque esté creciendo, puede simplemente no ser sensible a un determinado agente. Por ejemplo, las penicilinas y cefalosporinas, que inhiben la pared celular no dañan a los micoplasma, que carecen de paredes celulares.

Tercero, la concentración alcanzada dependerá de la cantidad de fármaco administrada, la vía de administración y la velocidad de absorción, así como de la tasa de aclaramiento o eliminación de tu cuerpo (Prescott *et al.*, 1999).

www.bdigital.ula.ve

4. HIPÓTESIS.

Las hojas de *Clusia minor* L deben poseer compuestos como benzofenonas, flavonoides, terpenos, cumarinas y esteroides similares a los reportados para la familia y género a estudiar. Se espera que los compuestos aislados, así como su aceite esencial, presenten actividades farmacológicas.

5. OBJETIVOS

5.1. **OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la fitoquímica y los aceites esenciales de las hojas de *Clusia minor* L (Clusiaceae).

5.2. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- ✓ Extraer el aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L.
- ✓ Realizar ensayos preliminares de cromatografía de capa fina (CCF) de los extractos para ser utilizados como guía de los posibles compuestos a encontrar.
- ✓ Separar y purificar los compuestos mayoritarios presentes en algunos de los extractos obtenidos con diversos solventes (hexano, diclorometano, *n*-butanol y agua).
- ✓ Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas como: resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases masas acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y rotación óptica las sustancias aisladas de las hojas de *Clusia minor* L.
- ✓ Caracterizar el aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y calcular los valores de los Índices de Kováts.
- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales extraídos de las hojas de *Clusia minor* L. mediante el método de difusión en agar con discos.
- ✓ Contribuir con datos fitoquímicos y sobre la actividad biológica y/o farmacológica de esta especie.

6. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.

El estudio se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- ✓ Realización de estudios preliminares sobre la planta *Clusia minor* L. Recolección, preparación del material vegetal (secar y pulverizar las hojas).
- ✓ Extracción de los aceites esenciales de las hojas frescas y su análisis mediante CG/EM.
- ✓ Extracción, separación y purificación de los compuestos presentes en las hojas de la planta, mediante el uso de técnicas tales como: cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía en columna (CC), cromatografía de capa fina preparativa (CCFP), recristalización y otros métodos.
- ✓ Caracterización e identificación de los compuestos separados y purificados mediante las siguientes técnicas instrumentales: IR, UV, RMN-¹H, RMN-¹³C, EM, y técnicas bidimensionales de RMN ¹H,¹H-COSY, HMQC o HSQC, HMBC, CG/EM, punto de fusión y otras técnicas.
- ✓ Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L mediante el método de difusión en agar con discos.

7. PARTE EXPERIMENTAL.

7.1. SELECCIÓN DE LA PLANTA E IDENTIFICACIÓN.

Se efectuó utilizando la información obtenida durante la revisión bibliográfica de su taxonomía y usos médicos. Su identificación se realizó con ayuda del Dr. José Guevara (Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales) y sitios web.

7.2. ESTUDIOS DE ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y FITOQUÍMICOS.

El estudio se enfocó en la búsqueda de trabajos realizados anteriormente sobre el carácter botánico, fitoquímico y farmacológico, así como información referente a la familia, al género y la especie *Clusia minor* L.

7.3. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA.

En septiembre de 2016 se recolectaron 5,533 g de hoja fresca, en la confluencia de los ríos Chama y Mucujún, sector El Arenal, municipio Libertador, Estado Mérida-Venezuela. Para la confirmación botánica de la especie se preparó una muestra testigo y llevada al Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales (MER) la cual fue identificada como *Clusia minor* L.

7.4. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

Se tomaron 4,435 g de hojas frescas se extendieron en papel cartulina y se secaron a 40 °C en una estufa, luego se molieron para realizar la extracción sólido-líquido continua (soxhlet); 1,098 g de hojas frescas fueron trituradas para realizar la extracción de los aceites esenciales.

7.5. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

7.5.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

1,098 g de hojas frescas se trituraron y se colocaron en un balón de destilación de 12 L, con agua destilada para realizar la hidrodestilación usando una trampa de Clevenger (figura 13). El aceite obtenido se le colocó sulfato de sodio anhidro para eliminarle la humedad, posteriormente se guardó en un tubo ámbar bajo refrigeración a 4 °C, para su posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).



Figura 13: Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger.

7.5.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.

Las hojas secas se molieron y se realizó una extracción sólido-líquido continuo (soxhlet) utilizando metanol como solvente. El extracto obtenido se concentró a sequedad, luego se suspendió sobre agua y se realizó una extracción líquido-líquido continua utilizando tres solventes de manera sucesiva: hexano, diclorometano y *n*-butanol. La solución obtenida con cada solvente se concentró en un rota-evaporador a 40 °C aproximadamente. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante cromatografía de capa fina, para obtener una idea de la cantidad y polaridad relativa de los compuestos presente en cada extracto.

7.6. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

La separación y purificación de los compuestos obtenidos se realizó mediante la utilización de las siguientes técnicas: cromatografía de columna de vidrio (Sephadex y gel de sílice), cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).

7.6.1. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA DE VIDRIO.

Se utilizaron dos tipos de rellenos: con Sephadex LH-20 (cromatografía de exclusión por tamaños para la eliminación de las clorofilas) y gel de sílice 60 (cromatografía de adsorción; 70-230 mesh, Merck, 63 a 200 μ).

7.6.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA Y CAPA FINA PREPARATIVA.

Para la cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) se empleó como adsorbente sílica gel Merck HF 254 (10-40 μ) depositada sobre placas

de vidrio de 0,25 mm y 0,50 mm de espesor respectivamente. La fase móvil para CCF se eligió por tanteo; y para la CCFP, fue escogida utilizando el sistema más adecuado de separación observado y monitoreado por CCF. El revelado de las placas se realizó utilizando una solución de óleum ($H_2O/H_2SO_4/AcOH$ 16:10:74) con un calentamiento posterior de las placas cromatográficas sobre una plancha eléctrica. Las placas se observaron en una lámpara de UV-Vis.

7.7. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

7.7.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM).

El análisis de los compuestos (aceite esencial y compuestos aislados) de las hojas de la *clusia minor* L., se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 6890, equipado con detector de masas marca Hewlett Packard Modelo 5973, inyector automático y una columna capilar HP-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de espesor de la película; la temperatura de la fuente fue de 230 °C; la temperatura del cuadrupolo fue de 150 °C; el gas portador fue helio ajustado a una velocidad lineal de 34 cm/s; la energía de ionización fue de 70 eV; la amplitud del barrido fue de 40-500 amu; la frecuencia de barrido fue de 3,9 barridos/s. La caracterización e identificación de los compuestos obtenidos se realizó utilizando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición (Adams, 2007). El equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de Instrumentación 2, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

7.7.1.1. Identificación del aceite esencial mediante CG/EM.

El volumen inyectado de aceite fue de 1 μ L de una solución al 2 % del aceite esencial. El programa de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial de 60 °C con incremento de 4 °C por minuto hasta una temperatura de 260 °C, con un tiempo de recorrido de 50 minutos; luego de alcanzados los 260 °C se dejó 10 minutos más de recorrido para un tiempo total de 60 minutos.

7.7.1.2. Identificación de los compuestos aislados (1A, 2B, y 3C) mediante CG/EM.

El volumen inyectado fue de 3 mg/ μ L de muestra, con relación de reparto de 1:1. El programa de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial de 100 °C con incremento de

10 °C por minuto hasta una temperatura de 300 °C, con un tiempo de recorrido de 20 minutos, luego de alcanzado los 300 °C se dejó 20 minutos más de recorrido para un tiempo total de 40 minutos.

7.7.2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO (1A).

El compuesto obtenido se identificó mediante resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono (RMN-¹³C).

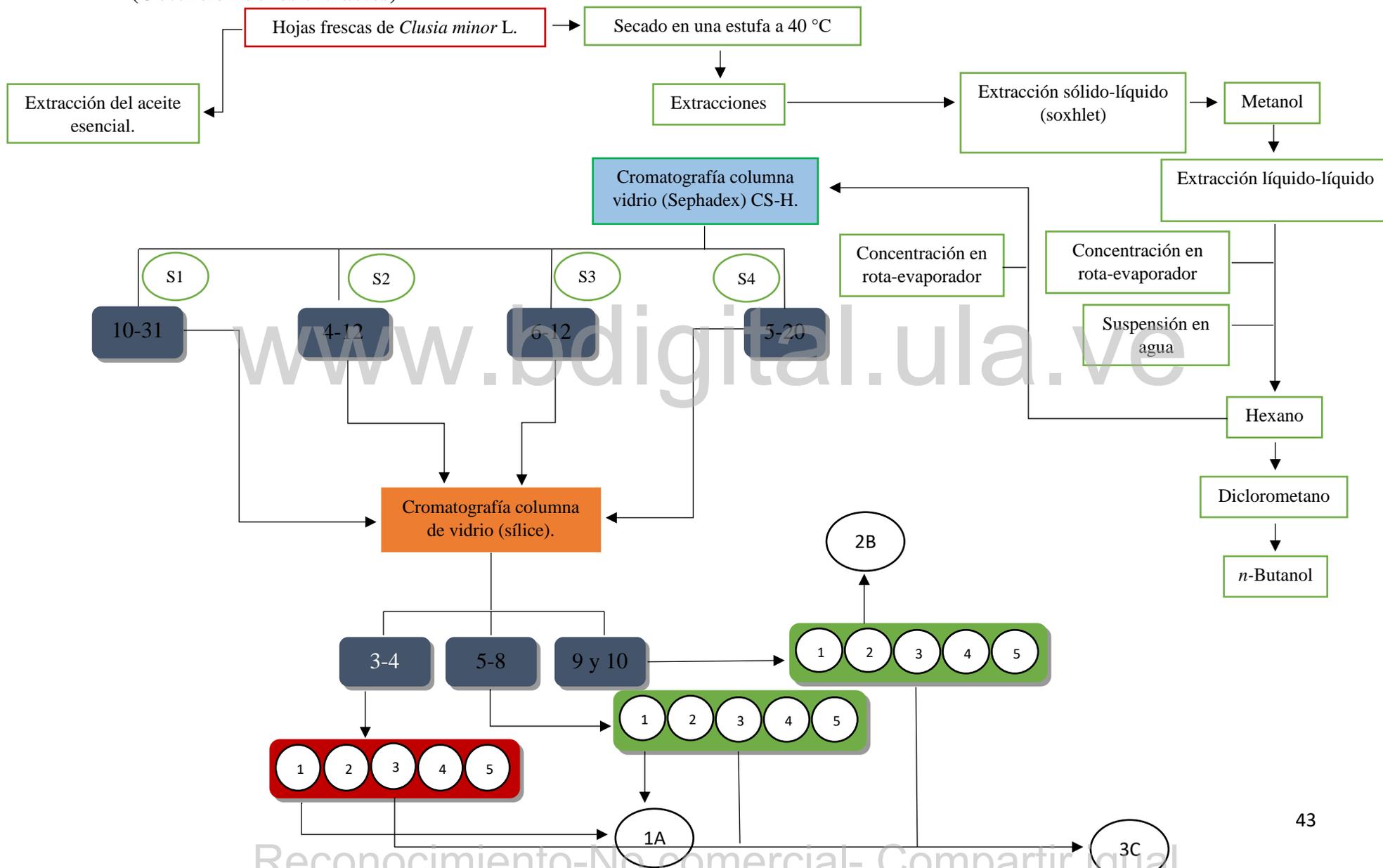
7.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Fue realizado en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la tutoría de las profesoras Yndra Cordero y Ysbelia Obregón. El método utilizado durante este procedimiento fue el de difusión de agar con discos según Kirby-Baüer, las bacterias usadas en este estudio fueron de referencia internacional, pertenecientes a la colección de cultivos tipo americano (Velasco *et al.*, 2007).

www.bdigital.ula.ve

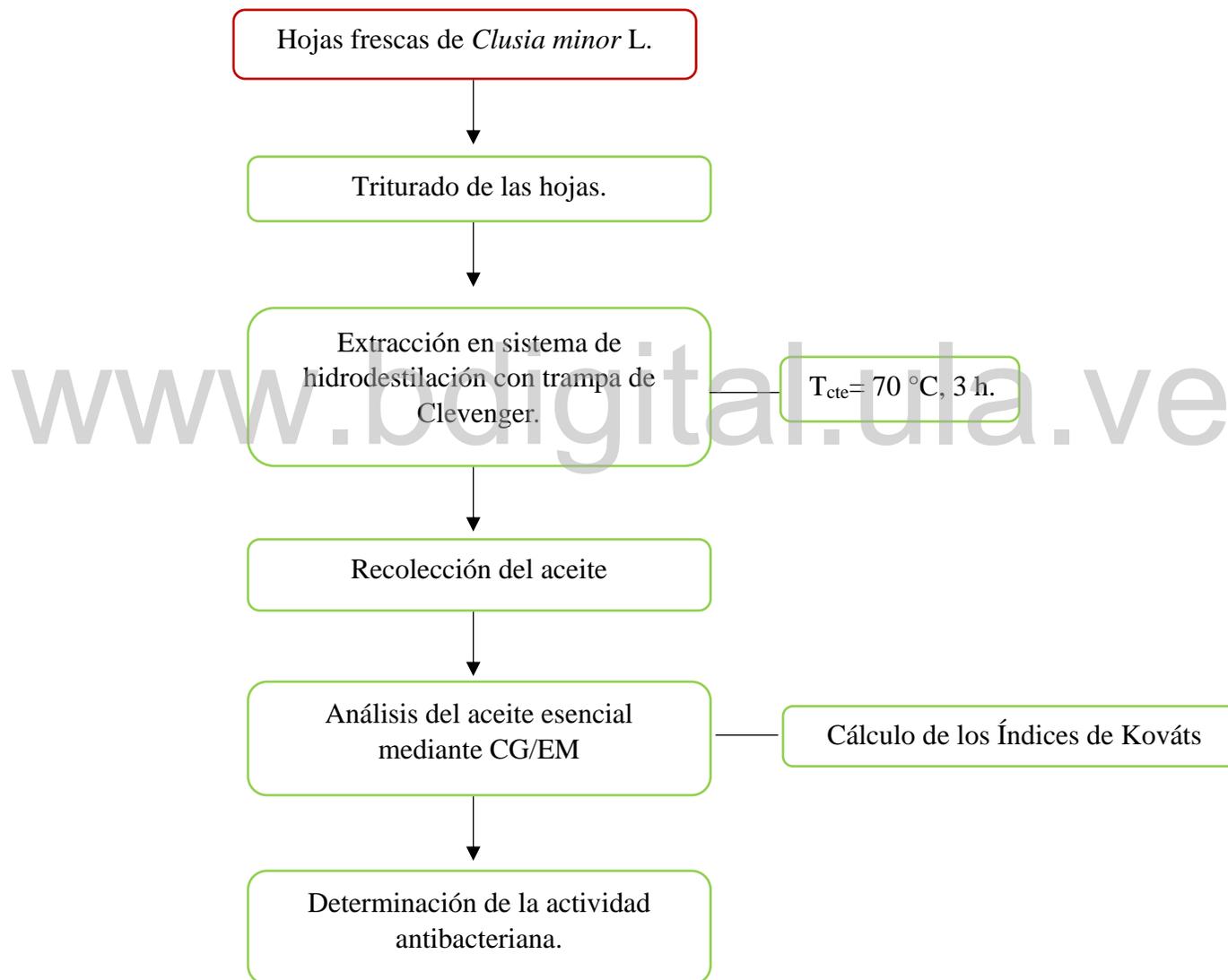
7.9. ESQUEMA DE TRABAJO.

(Obtención de los extractos)



7.10. ESQUEMA DE TRABAJO.

(Extracción del aceite esencial).



7.11. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

7.11.1. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO CON SOXHLET.

Con 805,160 g de hojas secas y molidas se montó el equipo de extracción soxhlet en metanol a una temperatura ≈ 45 °C, con un tiempo de 6 horas aproximadamente.

La extracción soxhlet consta de las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un balón. 2) ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo. 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce la sifonación que vuelve el solvente con el material extraído al balón. 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria hasta que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón con el solvente (metanol). La solución obtenida se concentró a sequedad en un rota-evaporador para luego ser utilizada en la extracción líquido-líquido, los resultados de esta extracción se encuentran descritos en la (tabla # 4).

7.11.2. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN HEXANO, DICLOROMETANO Y *n*-BUTANOL.

Una vez obtenido el extracto metanólico (125,910 g), éste se suspendió en agua y se le realizó la extracción en un extractor líquido-líquido utilizando tres solventes: hexano (extractor para solventes menos densos que el agua), diclorometano (extractor para solventes más densos que el agua) y *n*-butanol (extractor para solventes menos densos que el agua) sucesivamente. Luego de obtener cada extracto estos fueron concentrados a sequedad, los resultados se encuentran descritos en la tabla # 1. En esa tabla se expresan los rendimientos porcentuales de cada extracto respecto al material vegetal y al proceso inmediatamente anterior del cual fue obtenido.

Se analizaron cada uno de los extractos por cromatografía de capa fina haciendo uso de varios solventes y mezclas de estos con el fin de seleccionar el solvente o mezcla que realice una mejor separación; por ser el primer estudio realizado a esta especie se tomó la decisión de iniciar el trabajo con el extracto de hexano, que contienen los compuestos menos polares.

Tabla # 4: Resultados obtenidos de las extracciones.

Tipo de extracción	Vol. solvente (mL)	Muestra vegetal (g)	Extractos obtenido					% de Rendimiento.				
			Metanol (g)	Hexano (g)	Diclorometano (g)	n-Butanol (g)	Residuo	Metanol	Hexano	Diclorometano	n-Butanol	Residuo
S-L	1.600	805,16	125,91	-	-	-	-	15,64	-	-	-	-
L-L	1000	-	125,91	8,334	38,049	5,456	73,25	-	6,62	30,22	4,33	48,18
									1,04	4,72	0,67	9,10

R %: respecto al proceso de extracción L-L.

R %: respecto a la muestra vegetal.

7.11.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO EN HEXANO.

El extracto de hexano (8,334) g se sometió a un proceso de eliminación de clorofila y separación de compuestos mediante cromatografía en columna de vidrio rellena con Sephadex LH-20 utilizando como eluyente una mezcla de hexano-diclorometano-metanol 1:1:1 (mezcla utilizada regularmente para la separación de los compuestos apolares y eliminación de clorofilas). Debido al alto peso de la muestra a separar se repitió el proceso cuatro veces, obteniéndose cierta cantidad de alícuotas para cada columna (tabla # 5); luego de concentrar cada alícuota, se realizó cromatografía de capa fina para agrupar las muestras con los compuestos de mayor similitud y de interés. Las reuniones ejecutadas están plasmadas en la tabla # 5.

Tabla # 5: Resultados de las cromatografías en columna en Sephadex (S).

Columna de Sephadex	Fracciones	Reunión	Peso (g)	Peso total (Cm-H) (g)
S(1)	1-33	10-31	1,141	4,671
S(2)	1-27	4-12	1,219	
S(3)	1-26	6-12	1,173	
S(4)	1-28	5-20	1,138	

La muestra de interés, Cm-H, se recromatografió en columna de vidrio usando como absorbente gel sílice; se preparó una cabeza de columna y se utilizó como solvente una mezcla

hexano/benceno con una proporción (1:1) (mejor mezcla de solventes que permite separar adecuadamente los compuestos). La reunión de las fracciones se realizó utilizando la CCF como criterio. En la tabla # 6, se plasma la cantidad de fracciones obtenidas, las reuniones realizadas, el peso de cada reunión. El residuo (aceite) fue descartado ya que al observar por cromatografía de capa fina (CCF) y revelado en la lámpara Uv-Vis solo se observó una mezcla de clorofilas (coloración verde en el visible y rojas en Uv).

Tabla # 6: Resultados de la cromatografía en columna de la muestra Cm-H.

Peso total (Cm-H) (g)	Fracciones	Reunión.	Nombre.	Peso (g)	Composición
4,671	1-32	3 y 4	R-1	0,211	1 componente mayoritario
		5-8	R-2	0,236	1 componente mayoritario
		9 y 10	R-3	0,309	1 componente mayoritario
		> 10	Residuos	~ 3,9	Mezcla de clorofilas

En la tabla # 6 también se puede observar que en cada una de las agrupaciones se encuentra un compuesto mayoritario y distinguible fácilmente en la cromatografía de capa fina (CCF).

7.11.3.1. Separación y purificación de las muestras 1A, 2B y 3C.

Las fracciones R-1, R-2 y R-3, por separado, fueron sometidas a una cromatografía de capa fina preparativa (CCFP), utilizando como solvente benceno, utilizando 12 placas para las fracciones R-1 y R-2 y 15 placas para la R-3, realizando cuatro recorridos para cada placa. Después de realizar un revelado parcial con óleum, se observaron cinco franjas para cada fracción; las franjas similares de los 3 sistemas de placas se agruparon obteniéndose tres “compuestos” (1A, 2B y 3C). Los resultados se expresan en la tabla # 7.

Tabla # 7: Resultados de la cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).

Muestra						Compuestos
Placa R-1						
Banda	R1-1	R1-2	R1-3	R1-4	R1-5	1A (R1-1 + R2-1) 3 mg
Peso (mg)	1	2	5	20	183	
Placa R-2						
Banda	R2-1	R2-2	R2-3	R2-4	R2-5	2B (R2-2) 5 mg
Peso (mg)	2	5	3	54	172	
Placa R-3						
Banda	1R	2R	3R	4R	5R	3C (R1-3+R2-3+R3-3) 10 mg
Peso (mg)	18	5	2	60	224	

7.11.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

7.11.4.1. Preparación del inóculo bacteriano.

Para la preparación del inóculo bacteriano, se cultivó cada microorganismo en agar Müeller Hinton e incubado durante 18 horas a 37 °C; esto se realiza con el objetivo de que las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano.

Para la incubación se tomó una pequeña cantidad de colonias con un asa en aro, se suspendió en una solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril, seguidamente el inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL. Las bacterias utilizadas están descritas en la tabla # 8.

Tabla # 8: Bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizadas.

Microorganismo	Marca comercial.	
Bacterias gram positivas	<i>Staphylococcus aureus.</i>	ATCC 25923
	<i>Enterococcus faecalis.</i>	ATCC 25853
Bacterias gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	ATCC 25853
	<i>Escherichia colí.</i>	ATCC 25922
	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	ATCC 23357

7.11.4.2. **Preparación de los discos.**

Se cortaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y se organizaron en placas de Petri de vidrio, seguidamente se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), en una campana de flujo laminar, este paso se realizó colocando las placas de Petri abiertas con la cantidad de discos que se utilizarían para el estudio por 45 minutos. Posteriormente se impregnaron los discos con el aceite esencial.

7.11.4.3. **Preparación de las placas e inoculación.**

7.11.4.3.1. **Preparación de las placas.**

A cada placa de Petri se colocó aproximadamente 20 mL del agar Müeller-Hinton previamente preparado y esterilizado, posteriormente se dejó solidificar a temperatura ambiente, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4°C.

7.11.4.3.2. **Incubación.**

Se impregnaron los discos de papel de filtro con 10 µL del aceite esencial a distintas concentraciones (1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm y 62,5 ppm y aceite puro); Se realizó la siembra de cada bacteria a partir del inóculo preparado con un hisopo estéril sobre la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton. Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con el aceite esencial, además se ubicaron discos de antibióticos (susceptibles para cada microorganismo a estudiar) como controles positivos y discos con dimetilsulfóxido como control negativo.

Los controles positivos, estuvieron representados por discos estándares de antibiótico comercial según las recomendaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2017) (tabla # 9).

Tabla # 9: Antibióticos utilizados para control positivo.

Bacteria.	Antibiótico	[] µL
<i>Staphylococcus aureus.</i>	Eritromicina.	15
<i>Enterococcus faecalis.</i>	Ampicilina.	10
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	Piperacilina.	100
<i>Escherichia colí.</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae.</i>		

7.11.4.4. **Lectura de las pruebas.**

El medio de cultivo inoculado se incubó durante 24 horas a 37 °C, se realizó la lectura de los halos de inhibición alrededor de los discos y se expresó en mm, siendo como positivo la presencia de un halo de inhibición.

7.11.4.5. **Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).**

Se determinó la CIM del aceite esencial (AE) que mostró actividad antibacteriana (halo de inhibición), para ello se realizaron diluciones del AE en el rango de concentraciones (1000-62,5) ppm.

www.bdigital.ula.ve

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

En el proceso de hidrodestilación se pesaron 1,098 g de hojas frescas de *Clusia minor* L., se trituraron y se colocaron en un balón con 12 L de agua, el sistema se llevó a temperatura constante de 70 °C durante 3 horas. Luego del tiempo requerido se apagó el sistema, obteniéndose 1,4 mL de aceite esencial, se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminarle la humedad, (tabla # 10). Este se analizó en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG/EM) identificando un total de 22 compuestos (tabla # 11).

Tabla # 10: Resultados obtenidos de la extracción del aceite esencial.

Gramos de hojas frescas.	Volumen de aceite esencial	% de Rendimiento
1,098 g	14 x10 ⁻¹ mL	13 x10 ⁻²

Mediante la comparación de los índices de Kovats (IK) tabulados (Adams, 2007) y calculados (ecu. 1) se pudo identificar 24 compuestos, mediante tres bases de datos del equipo. Los compuestos mayoritarios fueron: β -cariofileno (25,34 %), germacreno-D (13,61 %), δ -cadineno (12,52 %) y α -copaeno (8,78 %). El β -cariofileno se encuentra presente en los aceites esenciales de varias plantas como la canela, el limón, clavo de olor, pimienta, marihuana y otras plantas.

$$IK = 100 z + 100 n \left(\frac{\log t_R(x) - \log t_R(z)}{\log t_R(z+n) - \log t_R(z)} \right)$$

Ecuación 1.

$t_R(x)$	Tiempo de retención corregido de la sustancia x
z y n	Número de átomos de carbonos de las n -parafinas
$t_R(n)$	Tiempos de retención corregidos de las n -parafina (n)
$t_R(z)$	Tiempos de retención corregidos de las n -parafina (z)
$t_R(z+n)$	Tiempos de retención corregidos de las n -parafinas (Stashenko <i>et al.</i> , 2010)

Tabla # 11: Componentes identificados en el aceite esencial de *Clusia minor* L.

Nº de Pico	T.R (min)	% de Area	Compuesto	IK Tabulado.	IK Calculado.
1	3,90	3,79	<i>cis</i> -3-Hexanol	850	856
2	12,05	0,62	Benzoato de etilo	1169	1168
3	17,85	1,63	α -Cubebeno	1345	1352
4	18,71	8,78	α -Copaeno	1374	1378
5	18,99	0,80	β -Bourboneno	1387	1386
6	19,14	0,37	β -Cubebeno	1388	1390
7	20,12	25,34	β -Cariofileno	1417	1423
8	20,36	0,86	β -copaeno	1430	1431
9	21,12	5,77	α -Humuleno	1452	1458
10	21,34	1,65	<i>allo</i> -Aromadendreno	1458	1465
11	21,72	1,15	Cadina-1(6),4-dieno	1475	1478
12	21,81	2,54	δ -muuroleno	1478	1481
13	21,98	13,61	Germacreno-D	1484	1487
14	22,37	2,74	Ledeno	1492	1500
15	22,51	2,60	γ -Amorfeno	1495	1504
16	22,93	2,11	δ -Cadineno	1513	1517
17	23,22	12,52	γ -Cadineno	1522	1526
18	23,44	3,13	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	1529	1533
19	24,99	0,46	Globulol	1568	1580
20	25,98	1,47	Humulano-1,6-dieno-3-ol	1619	1612
21	26,24	0,88	Cubebol	1642	1622
22	26,63	2,17	α -Muurolol	1644	1638
23	26,97	1,97	α -Cadinol	1652	1652
24	38,84	0,72	Ácido oleico	-	2131

IK: Índice de Kováts.

8.1.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL.

En la tabla # 12 se describen los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L., mostrando inhibición del desarrollo de dos bacterias Gram negativas y una Gram positiva, con halos de inhibición entre 7 mm para cada bacteria y con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 62,5, 250 ppm para las Gram negativas y 62,5 ppm para la bacteria gram positiva. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) obtenidas pueden disminuir ya que el halo de inhibición no fue evaluado hasta que su valor fuera cero.

Tabla # 12: Datos de la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las hojas de *Clusia minor* L.

Bacteria	Halo de inhibición (mm)										CIM	
	[AE]						Controles					
							(+)	(-)				
	1000 ppm	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62,5 ppm	100 %	Eri. 15 µg	Amp. 10 µg	Pip. 100 µg	DMSO		
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	8	-	-	27	-	100 %
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	7	7	7	7	9	-	-	27	-	62,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	7	7	0	0	7	-	-	-	-	250
Gram	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	6	32	-	-	-	100 %
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	8	8	8	7	9	-	32	-	-	62,5

Eri: Eritromicina; Amp: Ampicilina; Pip: Piperacilina; DMSO: Dimetilsulfóxido; CMI: Concentración mínima inhibitoria.

La acción inhibitoria contra estas tres bacterias podría atribuirse al compuesto mayoritario presente en el aceite esencial [β -cariofileno (25,34 %)] ya que en el 2008 Gertsch y colaboradores demostraron que el *E*- β -cariofileno es un inhibidor inflamatorio. (Gertsch *et al.*, 2008); es necesario resaltar que no solo el compuesto mayoritario causa la inhibición de estas bacterias, se debe realizar un estudio detallado de los compuestos que fueron identificados en el aceite esencial y así definir cuál o cuáles compuestos causa(n) el efecto inhibitorio sobre las bacterias.

8.1.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES 1A, 2B Y 3C.

Aislado y purificado cada uno de los compuestos, fueron llevados al Laboratorio de Productos Naturales en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis para ser analizados en el cromatógrafo de gases acoplado a masas obteniendo los siguientes compuestos identificados (tabla # 13).

En la tabla # 13 se muestran la identificación química, los tiempos de retención, el área relativa de los picos expresados en porcentaje y los porcentajes de certeza de los compuestos identificados en cada muestra.

Tabla # 13: Compuestos identificados en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas de las fracciones separadas.

Fracción	Pico	TR	% de area	Compuesto	% de certeza
1A	1	9,98	12,65	1,4-Dimetil-7-(1-metiletil)-azuleno	95
	2	19,95	87,35	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaeno (escualeno)	93
2B	1	12,45	27,77	Éster metílico del ácido hexadecanoico	99
	2	13,15	52,98	Éster etílico del ácido hexadecanoico	89
	3	14,09	5,01	Éster metílico del ácido octadec-9-en-1-oico	99
	4	14,29	1,93	Éster metílico del ácido octadecanoico	99
	5	14,70	9,37	Éster etílico del ácido octadec-9-en-1-oico	99
	6	14,89	2,94	Éster etílico del ácido octadecanoico	99
3C	1	14,02	12,80	Éster metílico del ácido octadeca-10,13-dien-1-oico	99
	2	14,09	14,26	Éster etílico del ácido octadec-10-en-1-oico	92
	3	14,67	33,34	Éster etílico del ácido octadeca-9,12-dien-1-oico	98
	4	14,73	32,58	Éster etílico del ácido, octadeca-9,12,15-trien-1-oico	99
	5	22,21	0,97	α -Tocoferol (vitamina E)	97

En la tabla anterior se puede observar que la fracción 1A se identificaron dos compuestos con una abundancia del 87,35 % para el escualeno y un 12,65 % para el 1,4-dimetil-7-(1-metiletil)-azuleno; con estos resultados se decidió purificar el escualeno y realizar su análisis por resonancia magnética nuclear.

Para la fracción 2B se lograron identificar dos compuestos mayoritarios con una abundancia del 52,98 % para el éster etílico del ácido hexadecanoico y un 27,77 % éster metílico del ácido hexadecanoico y cuatros compuestos más con una abundancia ≤ 10 %.

En la fracción 3C fue identificada la vitamina E. Al respecto, en el 2008 Marín y col. identificaron mediante CG/EM vitamina E como compuesto mayoritario con un porcentaje de 26,1 % del extracto de hexano de las hojas de *Clusia minor* L. igualmente en el extracto de hexano de este estudio se identificó con un porcentaje de 0,97 %; la presencia de este compuesto sugiere que es utilizado por las hojas de esta especie como un posible antioxidante. (Marín y col. 2008). Además, se identificaron dos compuestos con un porcentaje de área de 33,34 % para el éster etílico del ácido 9,12-octadecadienoico y un 32,58 % para el éster etílico del ácido, 9,12,15-octadecatrienoico.

A continuación, se presentan los espectros de masas de los compuestos mayoritarios identificados por CG/EM. (figura # 14, a la figura # 25)

Fracción 1A.

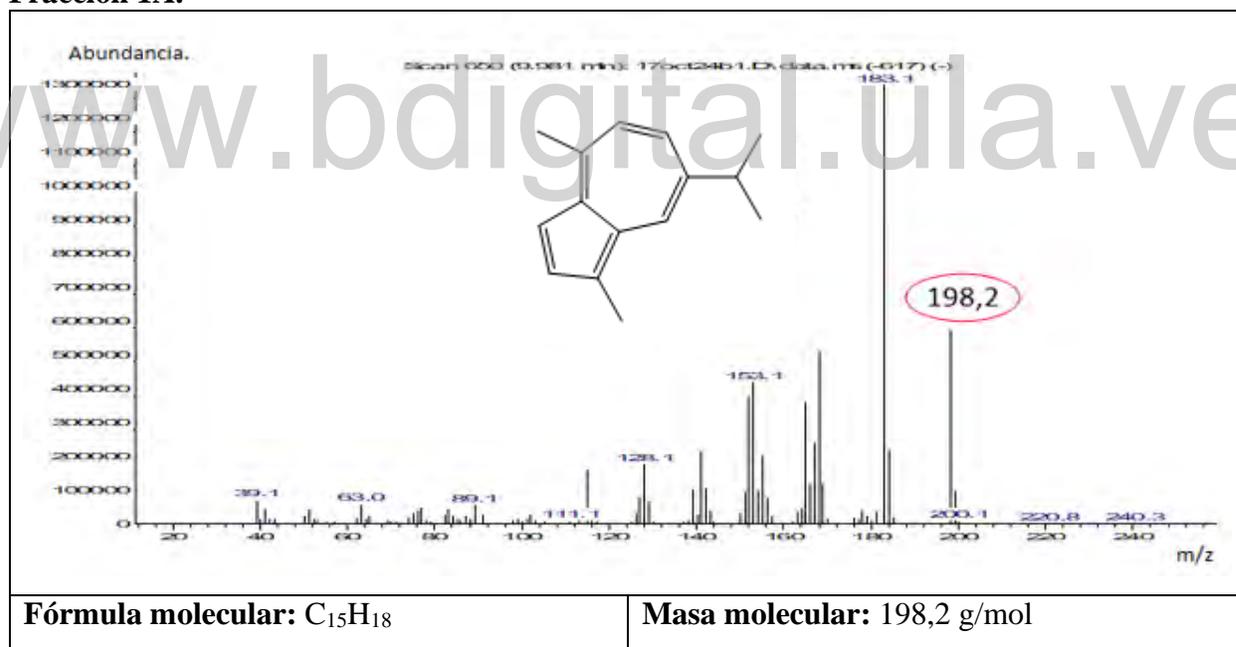


Figura 14: Espectro de masas de 1,4-dimetil-7-(1-metiletil)-azuleno (1A).

Fracción 2B.

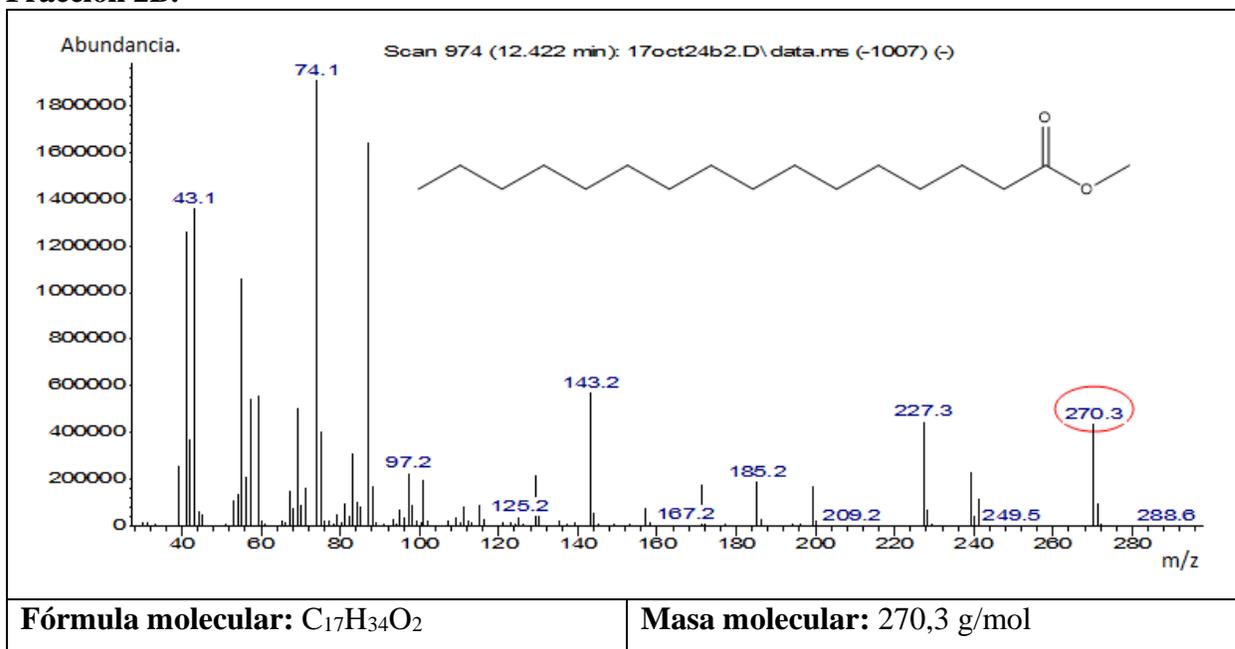


Figura 15: Espectro de masas de éster metílico del ácido hexadecanoico (2B).

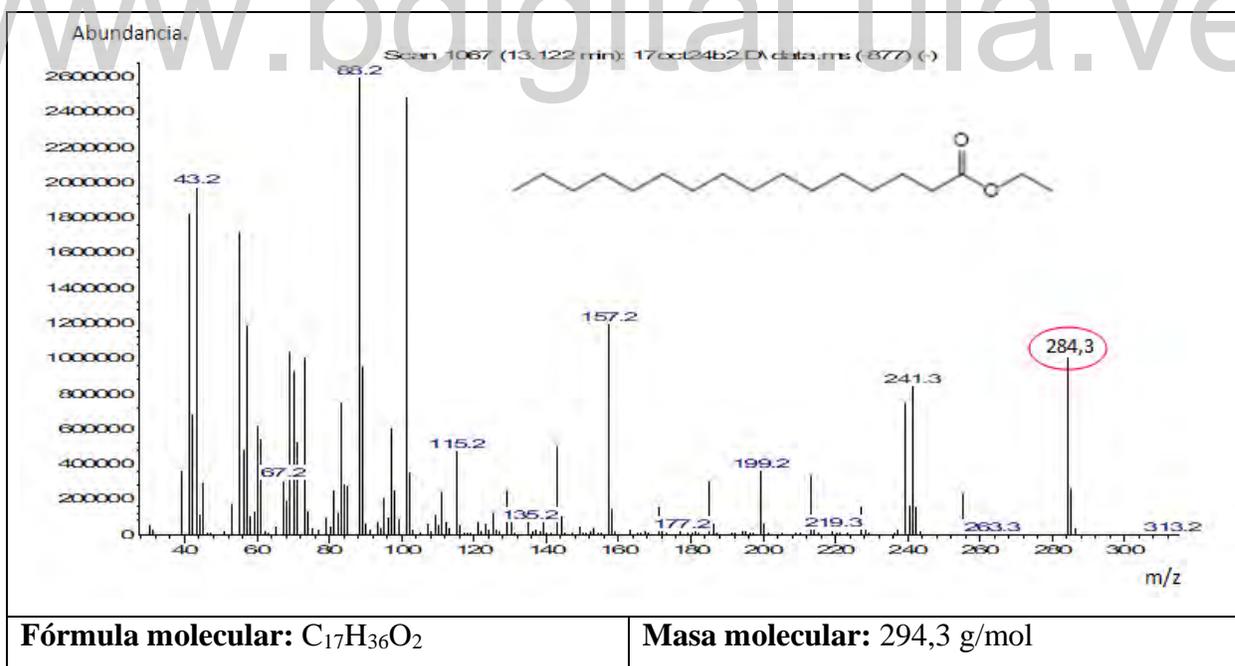


Figura 16: Espectro de masas de éster etílico del ácido hexadecanoico (2B).

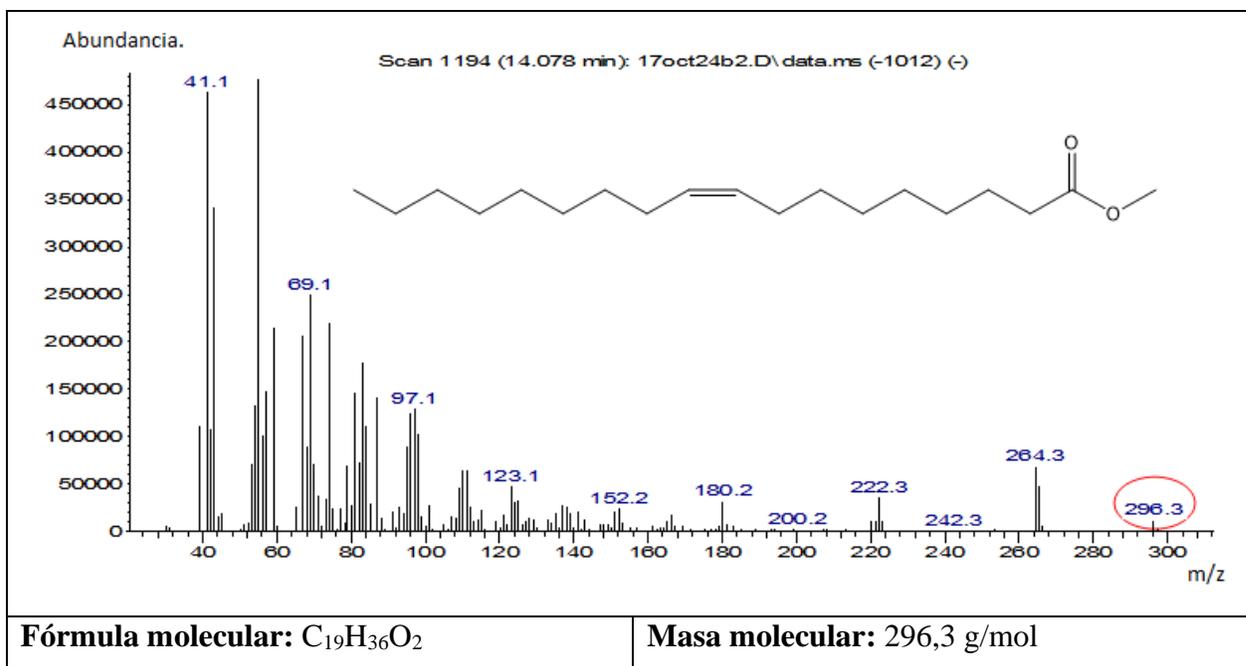


Figura 17: Espectro de masas de éster metílico del ácido octadec-9-en-1-oico (2B).

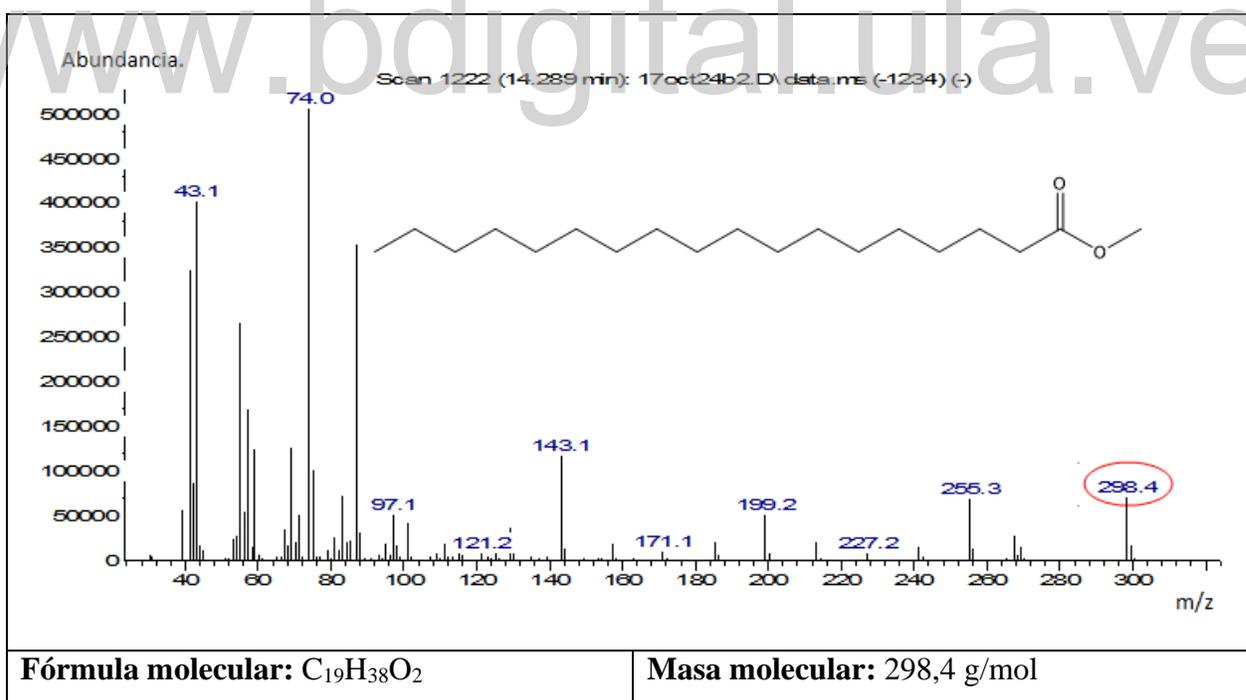


Figura 18: Espectro de masas de éster metílico del ácido octadecanoico (2B).

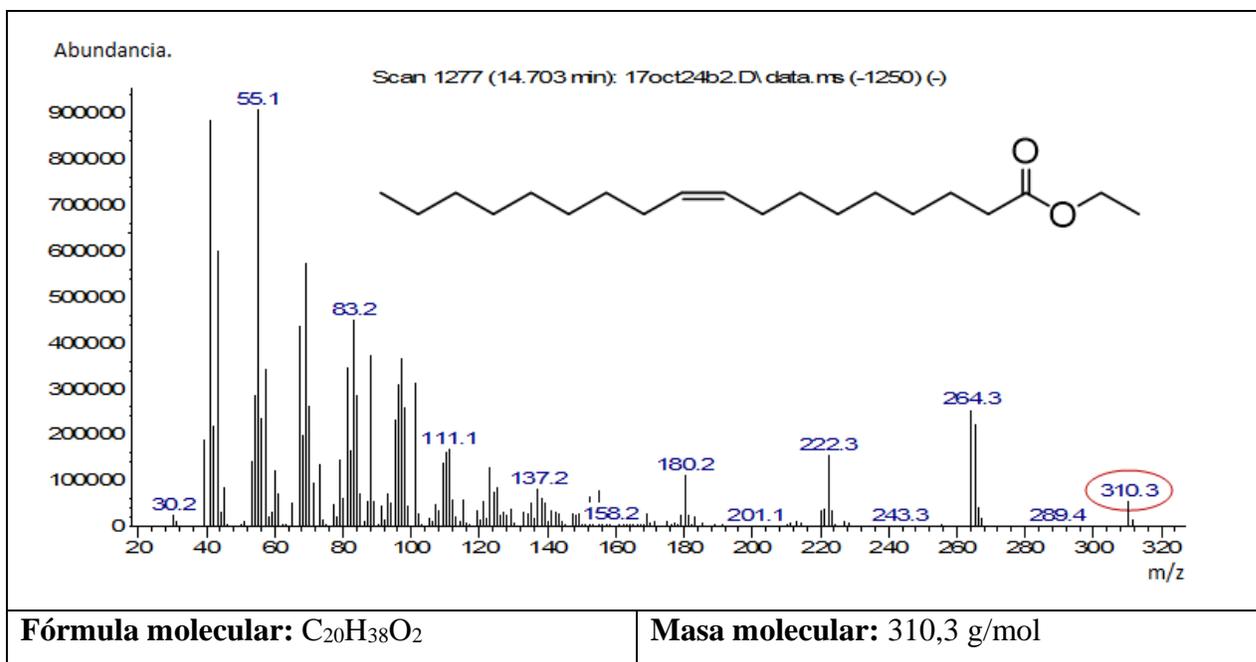


Figura 19: Espectro de masas de éster etílico del ácido octadec-9-en-1-oico (2B).

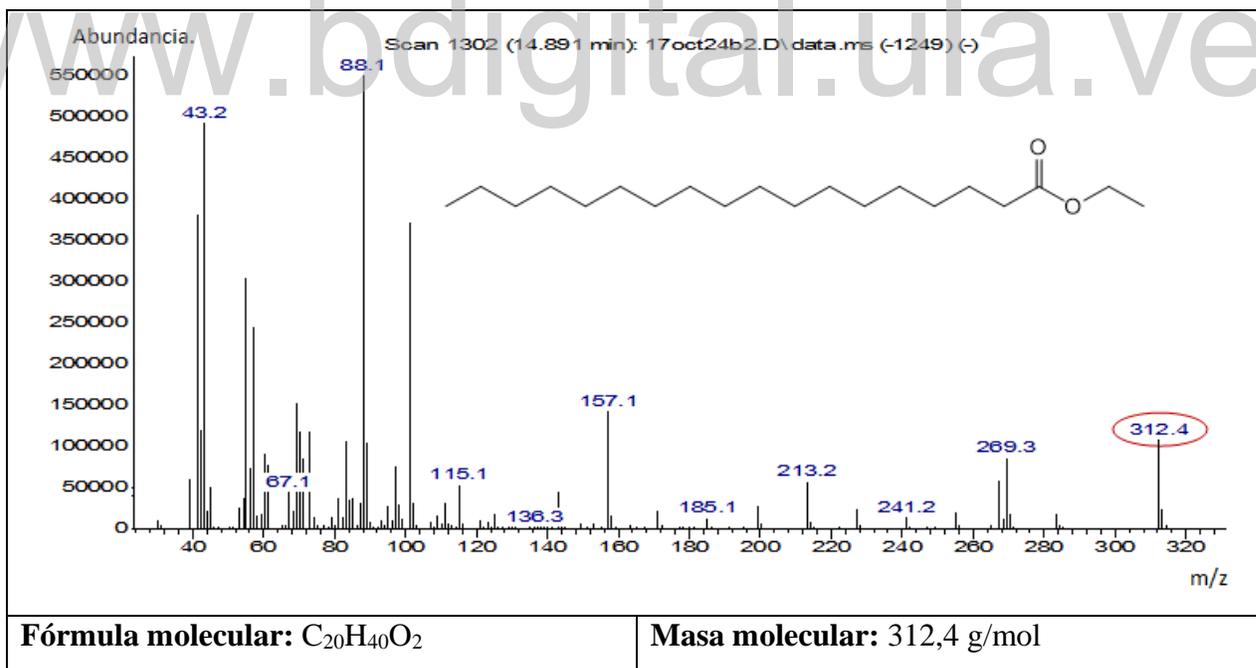


Figura 20: Espectro de masas de éster etílico del ácido octadecanoico (2B).

Fracción 3C.

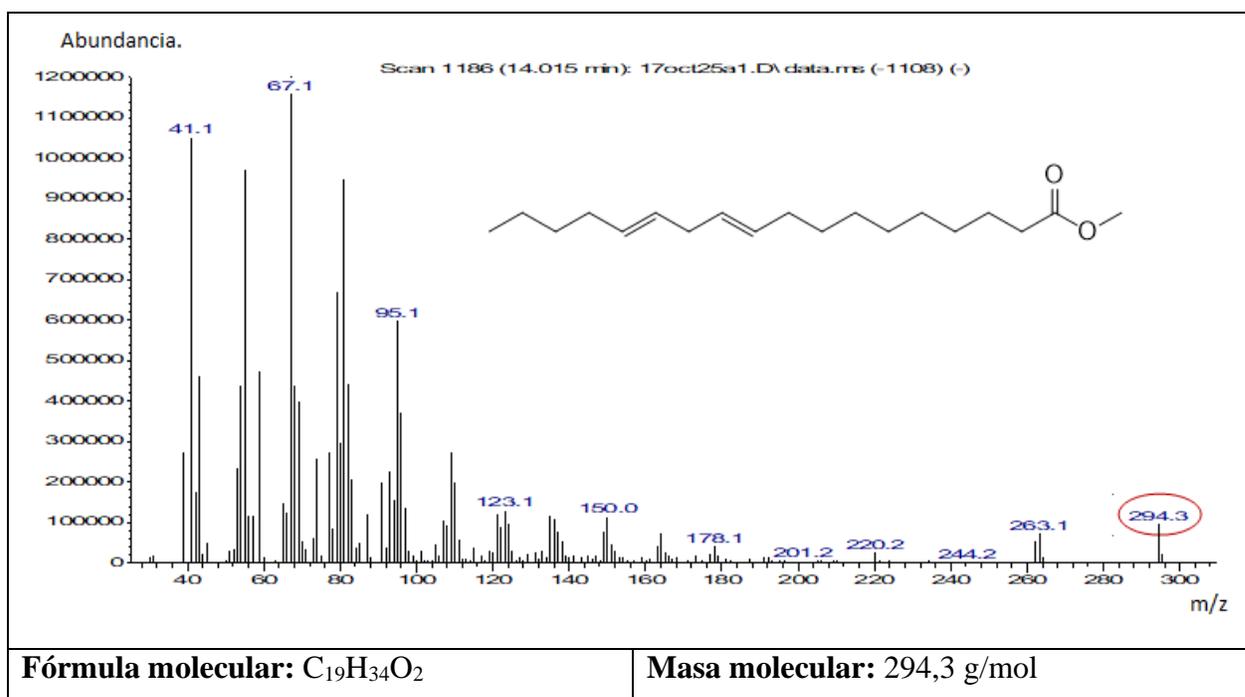


Figura 21: Espectro de masas de éster metílico del ácido octadeca-10,13-dien-1-oico (3C).

www.bdigital.ula.ve

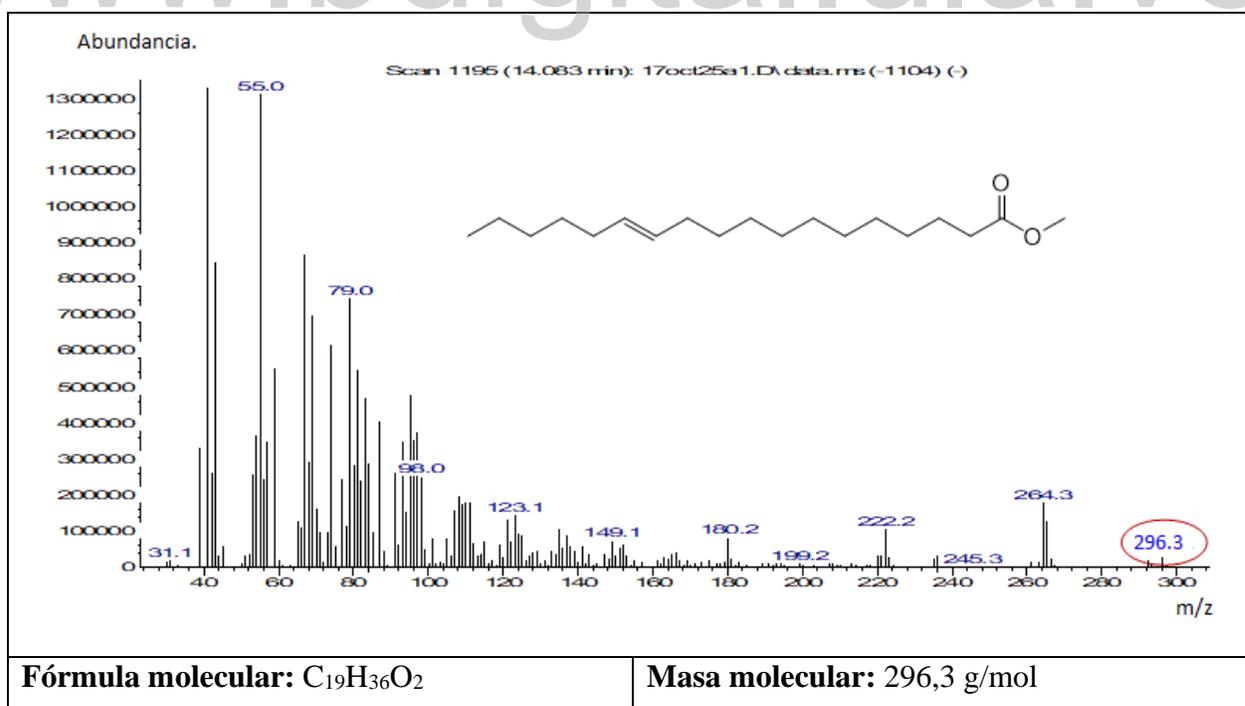


Figura 22: Espectro de masas de éster etílico del ácido octadec-10-en-1-oico (3C).

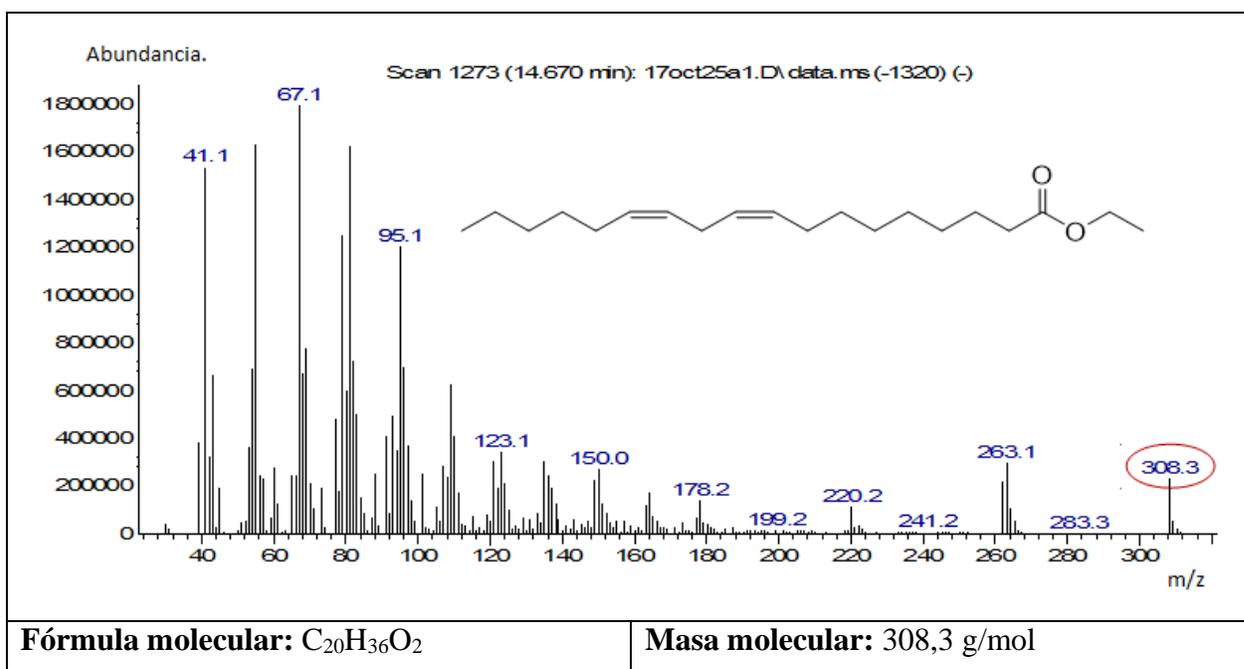


Figura 23: Espectro de masas de éster etílico del ácido octadeca-9,12-dien-1-oico (3C).

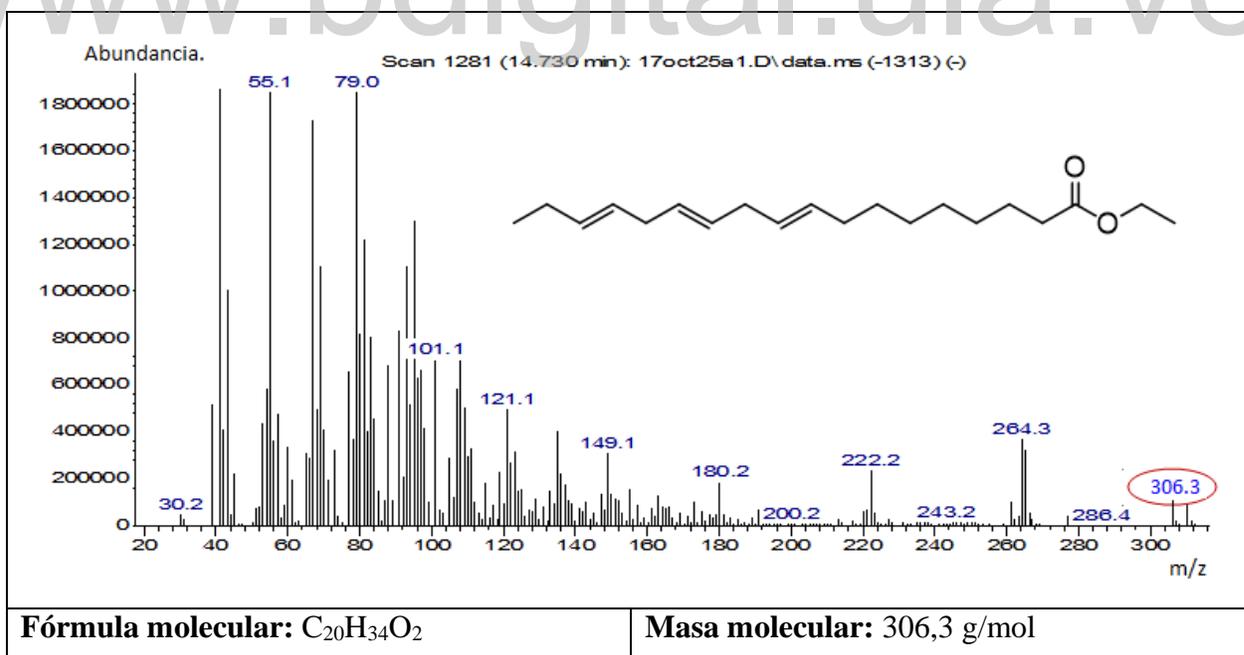


Figura 24: Espectro de masas de éster etílico del ácido 9,12,15-octadecatrien-1-oico (3C).

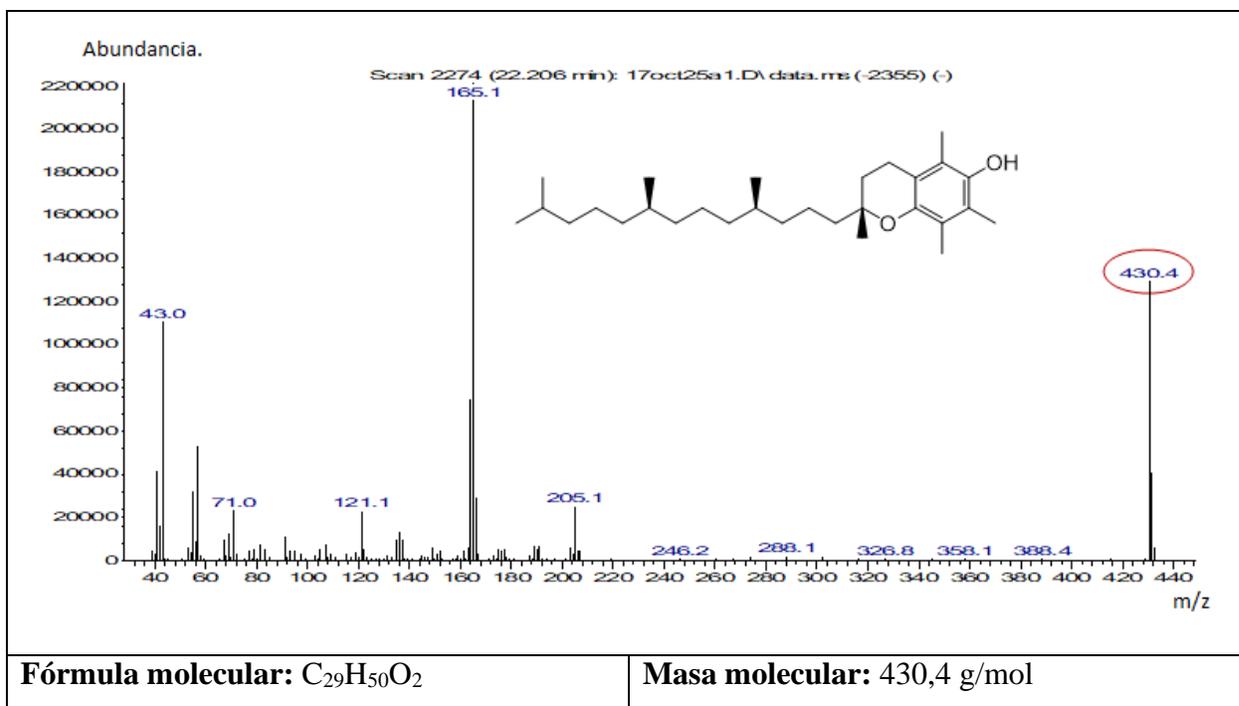


Figura 25: Espectro de masas de α -tocoferol (vitamina E) (3C).

8.1.3. FRACCIÓN 1A.

En el cromatograma de gases de la fracción 1A (figura 26) se puede observar a los 19,95 minutos una señal de gran intensidad perteneciente al compuesto mayoritario (87,35 % de la fracción) acompañado a los 9,98 minutos de una señal de baja intensidad (12,65 %).

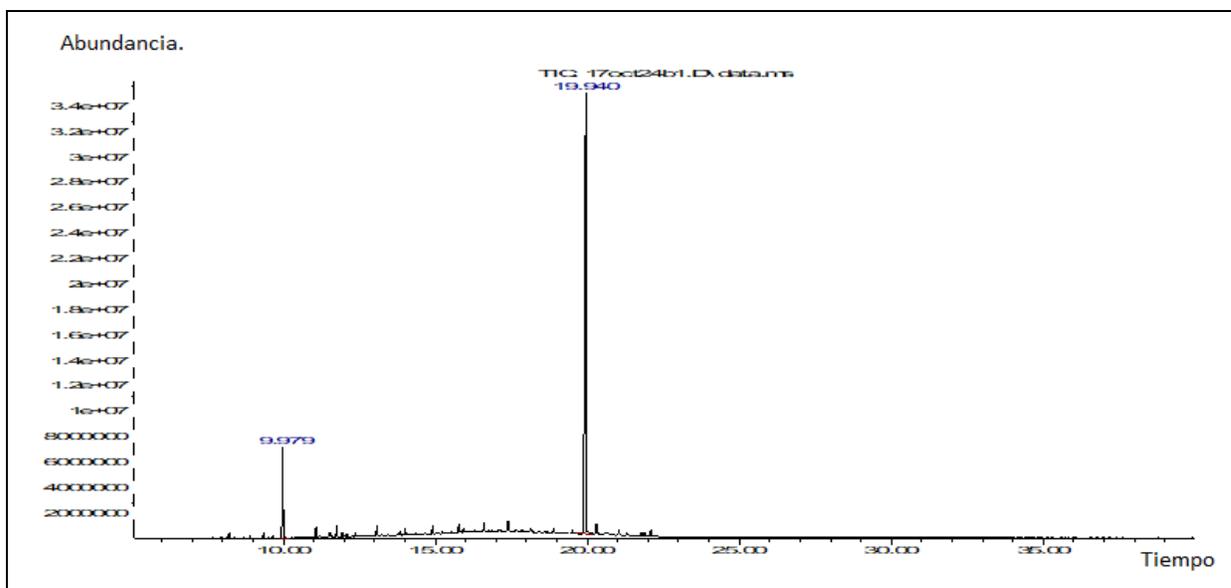


Figura 26: Cromatograma de gases de la muestra 1A.

La separación mediante cromatografía en columna y de capa fina preparativa del extracto en hexano de las hojas de *Clusia minor* L, usando una mezcla de hexano-benceno y benceno como eluyentes, condujo a la obtención del triterpeno escualeno (tabla # 13, figura 26), cuya caracterización se llevó a cabo mediante sus datos de CG/EM, RMN y por comparación con datos descritos anteriormente. En el espectro de ^1H (figura 29 y tabla # 14) se observaron señales entre 5,32 y 5,21 ppm correspondientes a los protones vinílicos (3 y 22) **, (7 y 18) ** y (11 y 14) **, un conjunto de señales múltiples entre 2,18-2,09 ppm que corresponden a los protones 5, 9, 12, 13, 16, 20, (4 y 21) *z, (8 y 17) *z. A 1,67 ppm señales simple de los metilos 1, 24, 25 y 30 finalmente las señales entre 1,56 y 1,60 ppm para los metilos (26, 29) *x y (27 y 28) *x.

En el espectro RMN- ^{13}C (figura 30, 31 y tabla # 14), se observa un total de 14 carbonos, asignados de la siguiente manera: C10*, =C<, δ = 135,16 ppm; C6*, =C<, 134,95 ppm; C2, >C<, δ =131,07 ppm; C3**,C7** y C11**, =CH-, δ : 124,95; 124,87 y 124,83 ppm respectivamente; (C(5, 9, 16, 20), C(12 y 13), C(4 y 21)*z y C(8 y 17)*z, -CH₂-, δ : 40,20; 29,78; 27,57 y 27,23 ppm respectivamente; C(1 y 24), C(25 y 30), C(26 y 29) *x y C(27 y 28)*x; -CH₃; δ : 25,82; 17,71; 16,15; 16,05 ppm respectivamente. El cromatograma (figura 26) se aprecia el pico correspondiente al compuesto 1A con un tiempo de retención de 19,94 minutos, en su espectro de masa (figura 32) se observó el ion molecular 410,4 m/z (M⁺). Con los datos obtenidos se construye la estructura (figura 28) que tiene como fórmula molecular C₃₀H₅₀.

Tabla # 14: Datos de los espectros RMN-¹³C y RMN-¹H.

Asignación C	Tipo de carbono	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	C	H
(10 y 15)*	=C<	135,16	–	1	–
(6 y 19)*	=C<	134,95	–	1	–
2 y 23	>C<	131,07	–	1	–
(3 y 22)**	=CH–	124,95	5,32-5,21	1	1
(7 y 18)**	=CH–	124,87		1	1
(11 y 14)**	=CH–	124,83		1	1
5, 9, 16 y 20	–CH ₂ –	40,20	2,18-2,09	1	2
12 y 13	–CH ₂ –	29,78		1	2
(4 y 21)*z	–CH ₂ –	27,57		1	2
(8 y 17)*z	–CH ₂ –	27,23		1	2
1 y 24	–CH ₃	25,82	1,67	1	3
25 y 30	–CH ₃	17,71		1	3
26 y 29*x	–CH ₃	16,15	1,56*x	1	3
27 y 28*x	–CH ₃	16,05	1,60*x	1	3
Total				14	23

Tabla # 15: Datos de los espectros RMN-¹³C y RMN-¹H reportados en la literatura.

Asignación C	Tipo de carbono	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	C	H
(10 y 15)*	=C<	136,0	–	4	–
(6 y 19)*			–		–
2 y 23	>C<	131,0	–	2	–
(3 y 22)**	=CH–	124,0	5,10-5,15	6	6
(7 y 18)**	=CH–				
(11 y 14)**	=CH–				
5, 9, 16 y 20	–CH ₂ –	39,7	1,97-2,09	4	8
12 y 13	–CH ₂ –	28,5		2	4

Tabla # 15: ... continuación.

(4 y 21)*z	-CH ₂ -	27,0		4	8
(8 y 17)*z	-CH ₂ -				
1 y 24	-CH ₃	25,0	1,68	2	6
25 y 30	-CH ₃	17,5	1,60	2	6
26 y 29*x	-CH ₃	16,0	-	4	12
27 y 28*x	-CH ₃		-		
Total				30	50

En el espectro RMN-¹³C se logran identificar 14 carbonos (figuras 30 y 31) faltando por identificar una señal de un carbono secundario (-CH₂-) para completar el número de carbonos que son simétricos para el escualeno. El análisis de la señal ampliada a δ= 40,20 muestra que esta corresponde a dos señales (C5 y C9) que se solapan; esta coincidencia fortuita es debida al solvente en que fue realizado el espectro.

Debido a que aparecen solo 15 carbonos en el espectro de RMN-¹³C debemos suponer que la estructura molecular del compuesto es simétrica lo que limita las posibles combinaciones estereoquímicas a solo cuatro de los 16 posibles compuestos (figura 27).

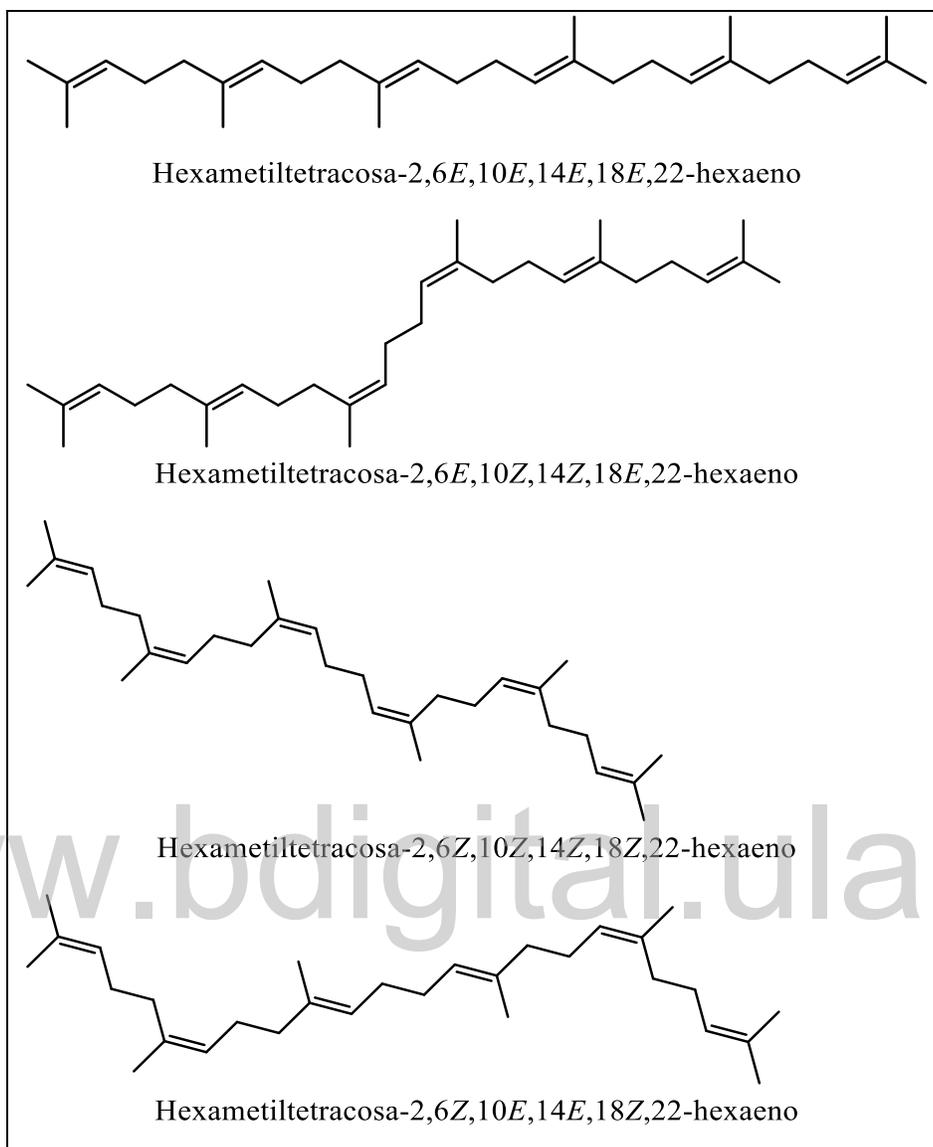
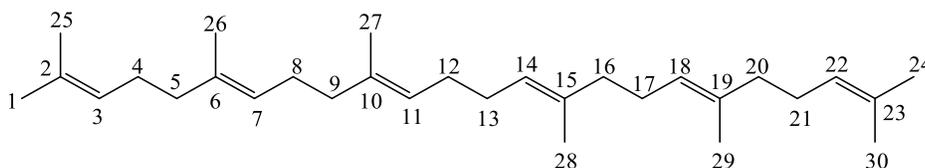


Figura 27. Posibles estructuras del compuesto aislado.

La simulación de las estructuras planteadas anteriormente con el programa Chem Draw Bio-Plus señala a los desplazamientos químicos de los carbonos con mayor certeza para la estructura de estereoquímica toda *E* de la figura 27. Así mismo, la búsqueda de la bibliografía para el compuesto seleccionado indica la similitud con los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C (figuras 29, 30 y 31) (tabla # 14 y 15) confirmando que es el compuesto reportado. Las diferencias entre los dos espectros (reportado y experimental) se explican ya que el espectro experimental se realizó en benceno causando variación en los desplazamientos químicos de los hidrógenos.



(6*E*, 10*E*, 14*E*, 18*E*)-2,6,10,15,19,23-Hexametiltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaeno.

Figura 28: Estructura del isómero todo *trans* del escualeno (compuesto 1A).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, los triterpenos son compuestos químicos que atraen mucha atención debido a sus actividades biológicas. Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal formando parte de los diferentes órganos de las plantas (frutos, raíces, látex, semillas, hojas y partes aéreas en general). En el género *Clusia* se han identificado triterpenoides como α y β -amirinas, friedelina, aplotaxeno, ácido oleanólico, α y β -friedelinol y el (17 α , 20R)-dammara 12, 24-dien-3 β -ol que constituye el primer terpenoide obtenido naturalmente con un esqueleto de este tipo. En el extracto (hexano) estudiado en el presente trabajo, se identificó el escualeno con un porcentaje de 87,35 % (Marín y col, 2008).

El escualeno es un intermediario clave en la biosíntesis de otros compuestos tetracíclicos o pentacíclicos, tal es el caso del lanosterol (triterpeno precursor a su vez de otros esteroides en animales y hongos). (Cabrera, 2006).

Estudios han demostrado que la aplicación tópica de escualeno ayuda a inhibir la síntesis de compuestos cancerígenos en la piel, así como sustancias promotoras de tumores; inhibe la formación de lesiones en el colon; se ha sugerido que reduce el nivel de colesterol en el plasma e hígado, además disminuye la proliferación de células malignas en los pulmones de los ratones. Es importante mencionar que el escualeno también es utilizado en la preparación de cosméticos debido a su papel fotoprotector, se usa normalmente como agente hidratante o emoliente, también se emplea como fijador de perfume y como lubricante para discos de computadoras debido a su termo-estabilidad (Cabrera, 2006).

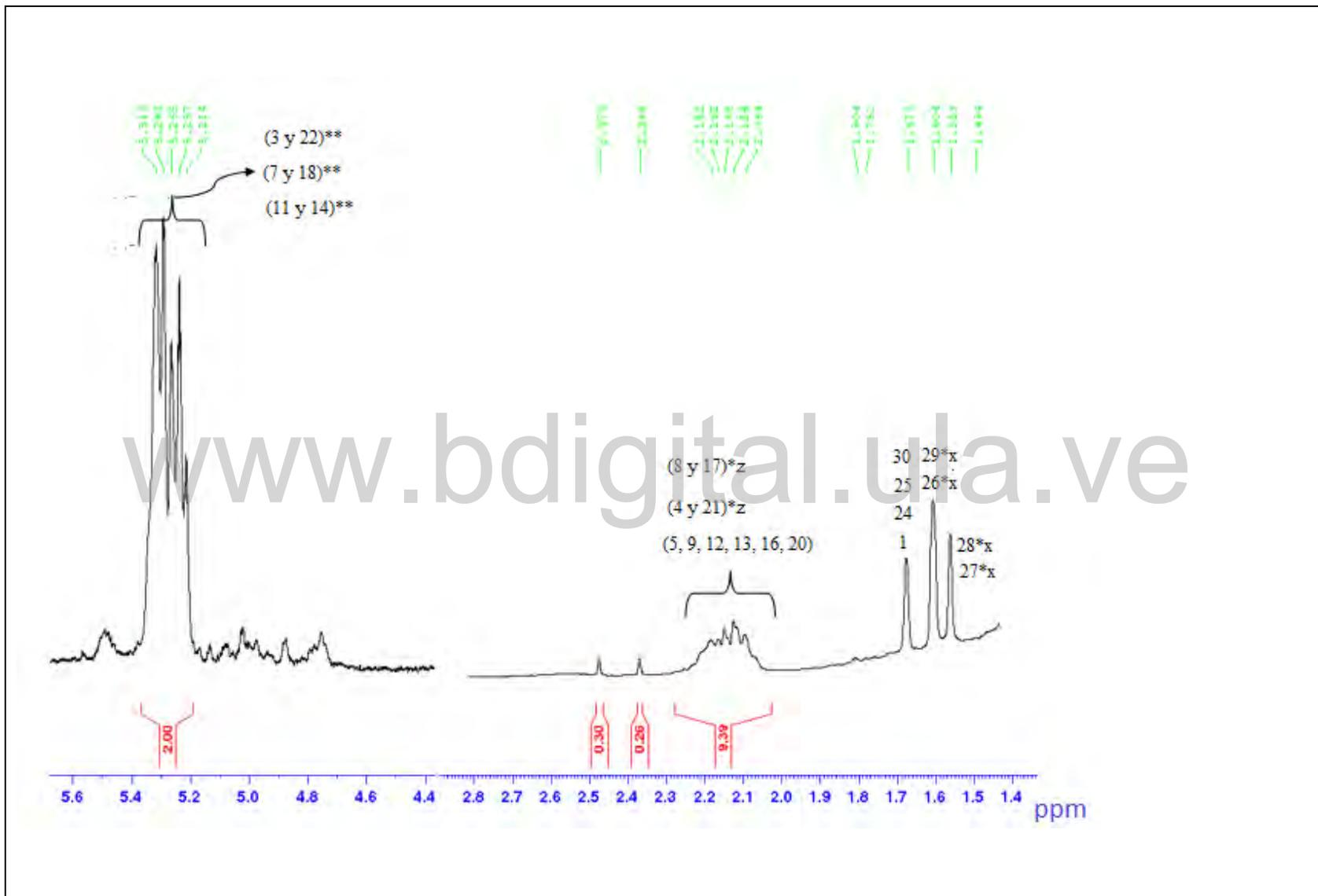


Figura 29: Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) de escualeno.

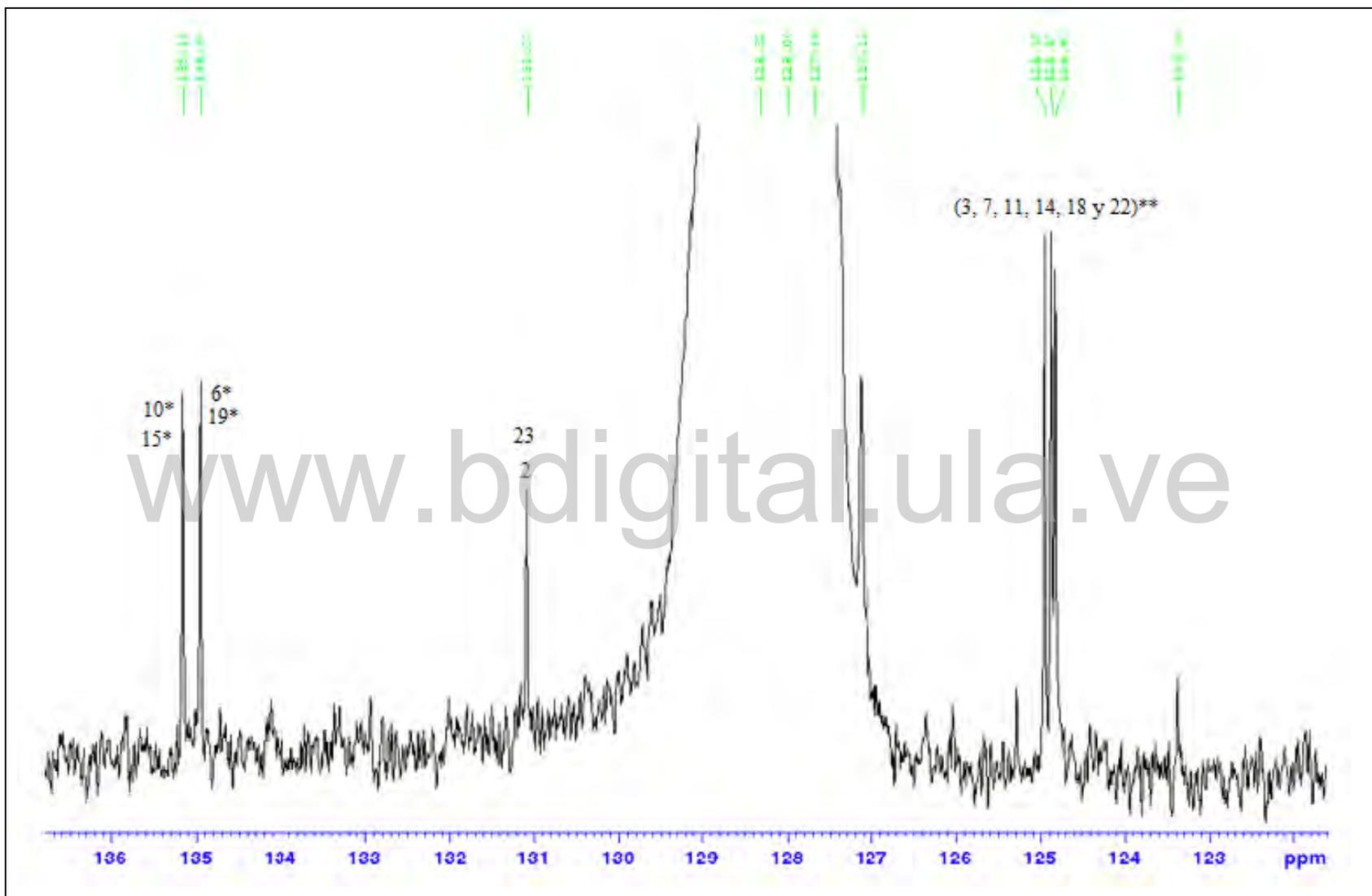


Figura 30: Espectro resonancia magnética nuclear carbono 13 (RMN- ^{13}C) de escualeno (ampliación 1).

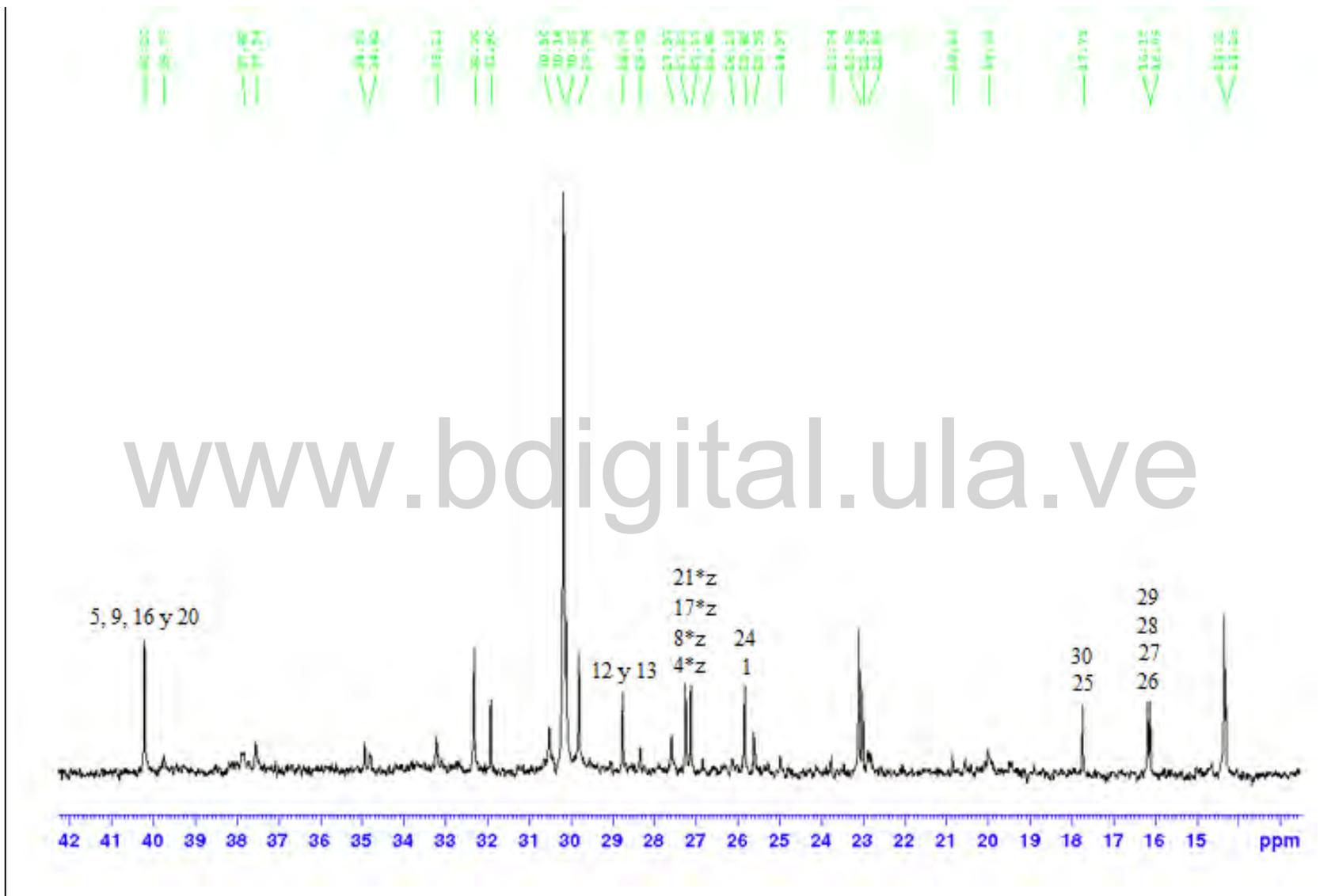


Figura 31: Espectro resonancia magnética nuclear carbono 13 (RMN-¹³C) del escualeno (ampliación 2).

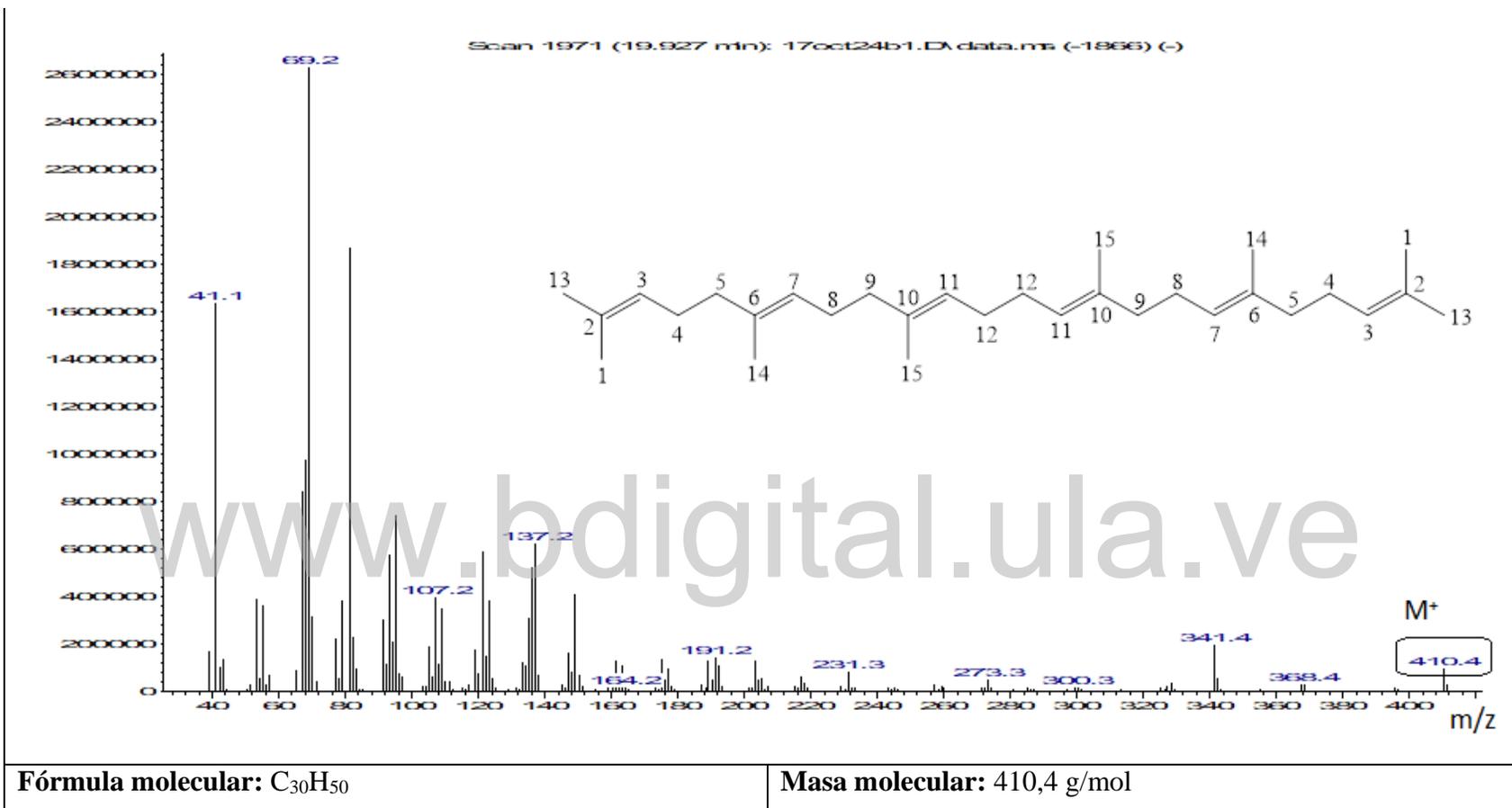


Figura 32: Espectro de masas de escualeno.

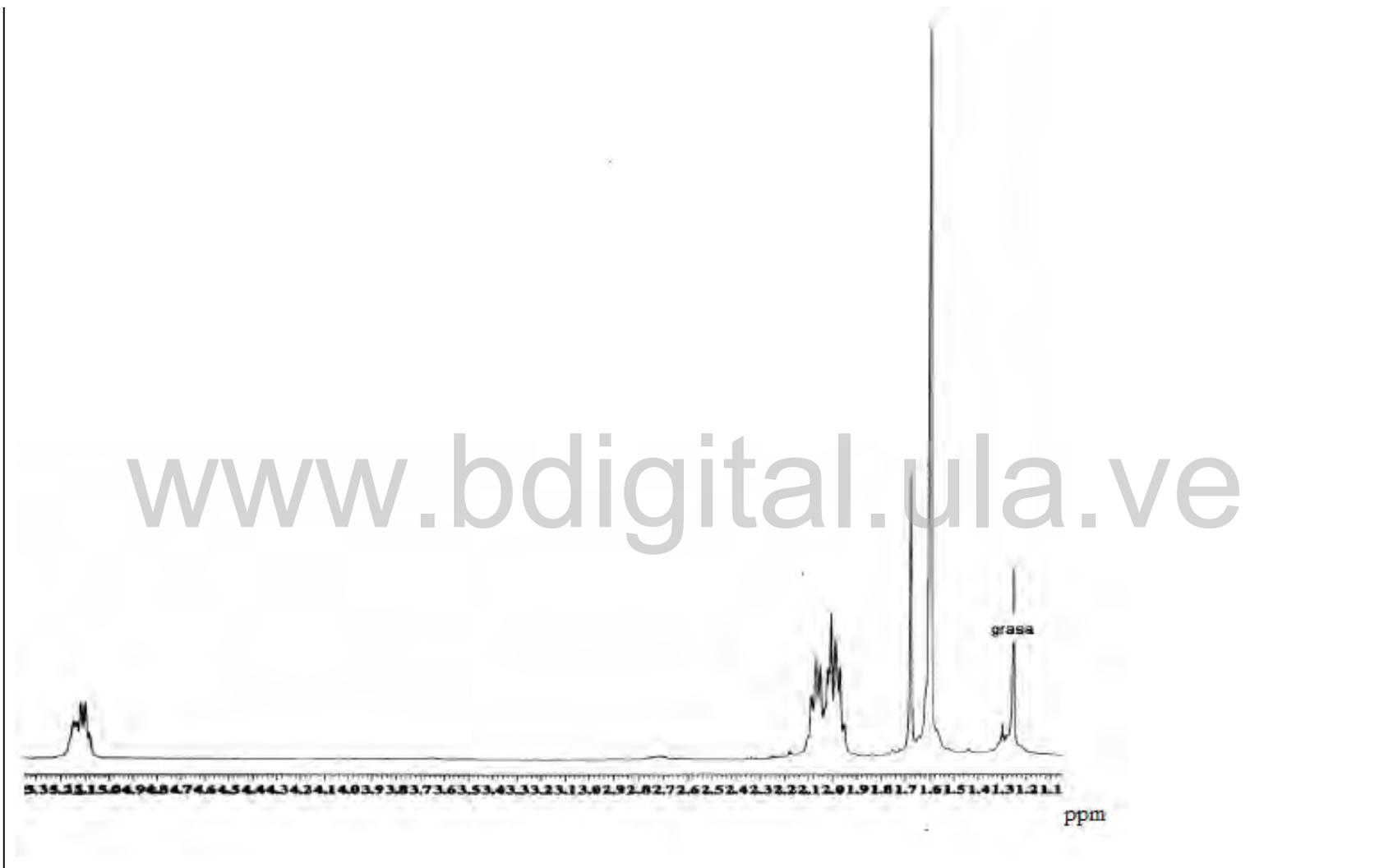


Figura 33. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) de escualeno reportado. (Cabrera, 2006)

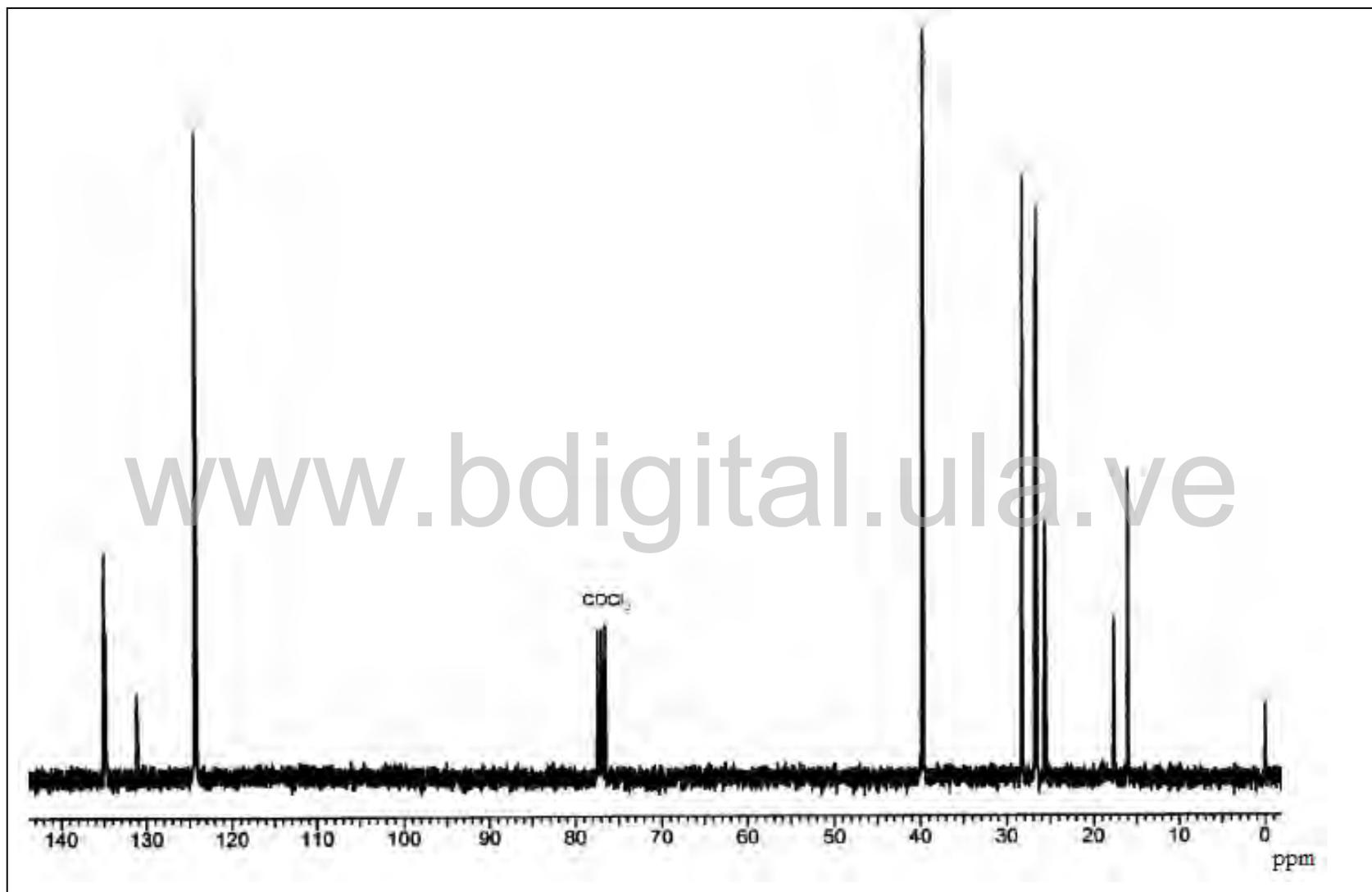


Figura 34. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ^{13}C) de escualeno reportado (Cabrera, 2006).

9. CONCLUSIONES.

- ✓ Mediante el uso de la hidrodestilación utilizando una trampa de Clevenger se obtuvo el aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L. con un porcentaje de rendimiento del 0,13 %. Se caracterizó mediante el análisis de CG/EM, reportando 24 compuestos; fueron identificados por tres bases de datos del equipo. Identificándose como mayoritarios el β -cariofileno (25,34 %), germacreno-D (13,61 %) y δ -cadineno (12,52 %) y α -copaeno (8,78 %).
- ✓ El aceite esencial presentó inhibición del crecimiento frente a dos bacterias Gram negativas y a una bacteria Gram positiva. Se consideró como moderadamente activo frente a *P. aeruginosa* con una CIM de 250 ppm y como activo frente a *K. pneumoniae* y *E. faecalis* con una CIM de 62,5 ppm para ambas bacterias. Con estos últimos dos valores no se descarta el uso del aceite esencial como posible agente antibacteriano.
- ✓ Del extracto en hexano de las hojas de *Clusia minor* L. se logró la identificación mediante el análisis por CG/EM de 13 compuestos discriminados en: un triterpeno, un sesquiterpeno y 11 lípidos.
- ✓ Se aisló y elucidó la estructura (mediante el uso de RMN ^1H y ^{13}C y CG/EM) del (6*E*,10*E*,14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosano-2,6,10,14,18,22-hexaeno (*trans*-escualeno).

10. RECOMENDACIONES.

- ✓ Realizar diluciones adicionales del aceite con el fin de conocer la CIM real frente a las bacterias ensayadas.
- ✓ Completar el estudio fitoquímico de las fracciones restantes del extracto en hexano de las hojas de *Clusia minor* L.
- ✓ Continuar la investigación de los extractos en diclorometano, *n*-butanol y fase acuosa de las hojas de *Clusia minor* L.

www.bdigital.ula.ve

11. BIBLIOGRAFÍA.

Adams R.P., (2007). **Identificación de compuestos de aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas.** 4th Edición. Illinois (USA).

Arango, A.M.; Sánchez, J.B.; Galvis, L.B. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. **Rev. Esp. Quimioterap.**, **17(4)**: 325-331.

Araque, M.; Sánchez, K.; Velasco, E.; Vizcaya, L. (1999). **Manual Práctico de Bacteriología.** Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. 16-18 pp.

Bailón-Moscato, N.; Romero-Benavides, J.C.; Sordo, M.; Villacís, J.; Silva, R.; Celi, L.; Martínez-Vázquez, M.; Ostrosky-Wenman, P. (2016). Phytochemical study and evolution of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia minor* L. leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **26**: 4-49.

Bonicatto, M.M.; Marasas, M.E.; Sarandón, S. J. (2007). El valor medicinal de la biodiversidad vegetal en agroecosistemas tradicionales de Berisso, Arg. **Revista Brasileira de Agroecología**, **2(2)**: 1319-1322.

Brooks, G.; Carroll, K.; Butel, J.; Morse, S.; Mietzner, T. (2010). **Microbiología médica. 25^a edición.** McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. México, D.F. 21-22 pp.

Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia. 2^{da} Edición.** Acribia S.A. Zaragoza. 1099 p.

Cabrera, C. (2006). **Estudio químico de las hojas y tallos de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* (Benth.) Barneby.** Tesis de Grado. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca- Hidalgo. 16-22 pp.

Celi, L. (2009). **Evaluación del efecto genotóxico del extracto hexánico y los metabolitos secundarios de *Clusia latipes* mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos.** Tesis de Grado. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. 40-41 pp.

Compagnone, R.S.; Suarez, A.C.; Leitao, S.G.; Delle Monache, F. (2008). Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18(1)**: 6-10.

Domingo, D.; López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. **Rev. Esp. Quimioterap.**, **16(4)**: 385-393.

Duddeck, H.; Dietrich, W.; Tóth, G. (1998). **Elucidación estructural mediante RMN. 3^{era} Edición.** Springer-Verlag Ibérica. Madrid. 15-16 pp.

- Gasparotto, A.; Brenzan, M.; Piloto, I.; Cortez, D.; Nakamura, C.; Filho, B.; Ferreira, A. (2005). Estudio fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Colophyllum Brasiliense* (Clusiaceae). **Química Nova**, **28(4)**: 575.
- Gertsch, J.; Leonti, M.; Raduner, S.; Racz, I.; Chen, J. Z.; Xie, X.; Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **105(26)**: 9099-9104.
- Gonzalez, J.G.; Olivares, E.M.; Delle Monache, F. (1995). Citrans and cyclools from *Clusia multiflora*. **Phytochemistry**, **38(2)**: 485-489.
- Gustafson, K.; Blunt, J.; Munro, M.; Fuller, R.; McKee, T.; Cardellina, J.; Boyd, M. (1992). The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, **48(46)**: 10093-10102.
- Gutiérrez, M.; Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. **Boletín Intexter.**, **122**: 35-41.
- Hokche, O.; Berry, P.; Huber, O. (2008). Catálogo de la flora vascular de Venezuela. **Fundación Instituto Botánico de Venezuela**. **859**. Caracas. 510 p.
- López, M.; Triana, J.; Pérez, F.; Torres, M. (2005). **Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas**. Universidad de las Palmas de Gran Canarias-España. 24-34 pp.
- Marín, R.; Porto, R.; Alarcón, A.; Lavín, A. (2008). Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. **Lat. Am. J. Pharm**, **27(5)**: 747-749 pp.
- Martín-Arangón, S.A. (1994). **Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad**. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España. 192 p.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. **J. Nat. Prod.**, **59(1)**: 1-34.
- Martínez, E.; Moreno-Murillo, B.; Delle Monache, F. (1996). Fukugetina y fukogisida, biflavonoides de *Clusia guaviarensis* Cuatr. (Clusiaceae). **Revista Colombiana de Química**. **25(1, 2)**: 15-21.
- Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tuñón, M. (2002). Los flavonoides propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, **17(6)**: 271-278.
- Mesa-Vanegas, A.M.; Pabon, A.L.; Blair-Trujillo, S. (2011). Actividad antiplasmodial *in vitro* de *Calophyllum inophyllum*. **Química Viva**, **2**: 128.
- Montemayor, A. (2013). **Metabolitos secundarios de especies *Clusia* y su actividad sobre la enzima transcriptasa reversa y proteasa del VIH-1**. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 60 p.

Novais, C.S. (2016). **Estudio fitoquímico de especies de *Clusia* presentes en el encerrado del fruto con potencial de actividad biológica.** Tesis Doctoral. Instituto de Química. Universidad Federal de Goiás. Brazil. 180 p.

Núñez, E. (2008). Extracción con equipos soxhlet. **Descarga libre de textos de laboratorio químico.** 1-2 pp.

www.cenunez.com.ar. (Consultada, mayo de 2017).

Olivares, E.; Gonzalez, J.; Delle Monache, F. (1994). Benzophenones from *Clusia ellipticifolia*. **Phytochemistry**, **36(2)**: 473-475 pp.

Oliveira, R.; Camara, C.; de Agra, M.; Silva, T. (2012). Biflavonoids from the unripe fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidant activity. **Natural Product Communications**, **7(12)**: 1597-1600.

Paredes, R. (2017). **Caracterización química y actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Mangifera indica* L. de los Estados Mérida, Barinas y Portuguesa.** Tesis de Grado. Facultad de Farmacia y Bionálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. 113 p.

Peredo, H.; Palou, E.; López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, **3(1)**: 24-32 pp.

Pérez, M., Mota, M. (2000). Morfología y estructura bacteriana. **Revista en Internet**, **3(2)**: 23-24.

Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D. (1999). **Microbiología. 4^{ta} edición.** McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid. 455-457 pp.

Preto, J.; Cechinel-Filho, V.; Noldin, V.; Sartori, M.; Isaias, D.; Bella, A. (2004). Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, **59(9-10)**: 658-660.

Reyes, R.; Huerta, M. (2009). Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. **Interciencia**, **34(6)**: 387-390.

Salas, A. (2006). Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro. **10° Verano de la Ciencia de la Región Centro.** México. <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/10VeranoRegionCentro/34UAZAlonsoTorresIbarraMartinez.pdf>. (Consultada 9/11/2017).

Stashenko, E.; Martínez, R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. **Scientia Chromatographica**, **2(1)**: 29-47.

Stevens P.F. (2007) Clusiaceae-Guttiferae. In: Kubitzki K. (eds) **Flowering Plants. Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants, vol. 9.** Springer, Berlin, 255 pp.

Thomas, C. (1978). **Flora of Barro Colorado Island**. Stanford University Press. Stanford California U.S.A. 12-17 pp.

Vargas, G.; Andrade, L. (2006). *Clusia* en México, la historia de un exilio. **Ciencias**, (083): 38-40.

Velasco, J.; Rojas, J.; Salazar, P.; Rodríguez, M.; Díaz, T.; Morales, A. (2007) Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. **Natural Product Communications**, 2(1): 85-88.

Wade, L.G. 2004. **Química orgánica. 5ª edición**. Pearson Educación S.A. Madrid. 624 y 1161 p.

Walter, S. (2001). **Microbiología. 1ª Edición**. Mc Graw–Hill Interamericana, México, 112-132 pp.

www.bdigital.ula.ve

12. GLOSARIO.

- ✓ **Arbusto:** planta leñosa, de menos de cinco metros de altura, sin un tronco preponderante, porque se ramifican a partir de la base.
- ✓ **Base lipídica:** membrana delgada formada por dos capas de moléculas de lípidos. Estas membranas son láminas planas que forman una barrera continua y delimitan las células. Es la barrera que mantiene a iones, proteínas y otras moléculas compartimentadas e impide su libre difusión.
- ✓ **Eluyente:** Disolvente utilizado en técnicas de cromatografía para extraer un componente que se quiere separar de otra fase
- ✓ **Especie:** cada uno de los grupos en que se dividen los géneros y que se componen de individuos que, además de los caracteres genéricos, tienen en común otros caracteres por los cuales se asemejan entre sí u se distinguen de las demás especies. La especie se subdivide a veces en variedades o razas.
- ✓ **Familia:** unidad sistemática o taxonómica situada entre el orden y el género, o entre la superfamilia y la subfamilia si estuvieran descritas.
- ✓ **Farmacología:** ciencia que se encarga del estudio de los medicamentos, en forma mucho más general “estudia todas las facetas de la interacción de sustancias químicas con los sistemas biológicos”. la farmacología comprende el conocimiento de la historia, fuente, propiedades físicas y químicas, componentes, efectos bioquímicos y fisiológicos, mecanismos de acción, absorción, distribución, biotransformación, excreción, usos terapéuticos y efectos adversos de tales sustancias, a las cuales, en conjunto, se les conoce como fármacos o drogas.
- ✓ **Fitoalexinas:** son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides, de bajo peso molecular, que se sintetizan en los vegetales después de una infección microbiana.
- ✓ **Fitoanticipina:** son de bajo peso molecular y están estructuralmente presentes en todas las etapas del desarrollo de las plantas o se producen durante un ataque microbiano o patógeno.
- ✓ **Fitopatógenos:** microorganismo que genera enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, utilizan los nutrientes de las células de las plantas para su crecimiento.

- ✓ **Fitoquímica:** rama de la química que estudia la interacción entre las radiaciones luminosas y las moléculas, así como los cambios físicos y químicos que resultan de ella.
- ✓ **Género:** taxón que agrupa a especies que comparten ciertos caracteres.
- ✓ **Látex:** jugo propio de muchos vegetales, que circulan por los vasos laticíferos, tienen una composición muy compleja y de él se obtienen sustancias diversas como el caucho, la gutapercha, otros. El de ciertas plantas es venenoso, como el del manzanillo.
- ✓ **Liposolubles:** sustancias que se pueden disolver en grasas o aceites, y solventes orgánicos no polares.
- ✓ **Micóticos:** término que se usa en la medicina para hacer referencia a los hongos. Su etimología proviene de la palabra micosis, que significa infección por moho o microorganismos.
- ✓ **Polisacáridos:** son glúcidos formados por la unión de muchos monosacáridos mediante enlaces *O*-glicosídicos con pérdida de una molécula de agua por cada enlace. Son carbohidratos que se pueden hidrolizar dando muchas unidades de monosacáridos

www.bdigital.ula.ve