



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”**



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Clusia minor* L EN CEPAS GRAM POSITIVAS Y GRAM
NEGATIVAS**

Trabajo de grado para optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Marbelis Alejandra Guillén Chacón

Marlín Adriana Guillén Chacón

Tutora:

Prof. Yndra Cordero de Rojas

Mérida, 2021

DEDICATORIA

Todo este esfuerzo está dedicado principalmente a Dios. Por darnos la vida y habernos permitido llegar hasta este momento tan importante de nuestra formación profesional.

A nuestro padre, Adolfo Guillén. Por ser nuestro héroe y ejemplo, por mostrarnos el camino recto que los hombres buenos siguen, y por dar todo por nosotras. Te amamos.

A nuestra madre, Marleny Chacón. Porque cuando todo falle, sabemos que podemos confiar en ti, por ser nuestro refugio, nuestro ángel, y darnos amor infinito. Te amamos.

Porque a ustedes debemos lo que somos y seremos siempre.

AGRADECIMIENTOS

Las palabras que buscamos no existen, pues nuestro agradecimiento hacia ustedes no tiene comparación...

A Dios todopoderoso. Por nuestra vida y salud, por todas las puertas que nos abrió, pero aún más, gracias por todas las que cerró para protegernos.

A nuestros padres, Adolfo y Marleny. Por ser los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por sus consejos, por detenernos cuando debían y empujarnos cuando teníamos miedo de seguir soñando. Ustedes son nuestro mejor ejemplo.

A nuestra tutora, Prof. Yndra Cordero de Rojas. Por ser nuestra guía en este proyecto tan importante. Mérito a su excelencia y dedicación. Este triunfo también es suyo, Dios le pague.

A nuestros amigos: Francheska, Maru, Eddyth, Claret, Macu, Chino, Canelones, Yessika y Génesis. Porque en nuestros corazones sólo puede haber agradecimiento hacia ustedes, por ser esos amigos y hermanos que nos acompañaron en este camino que elegimos para nuestras vidas y por enseñarnos que menos, es más. Muchas gracias por estar ahí, incluso sin pedírselo.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, en especial a las Profesoras Ysbelia Obregón, Alida Pérez, Rosa Aparicio, al Profesor Luis Rojas, y el señor Eduardo Palencia. Por toda su ayuda y los conocimientos brindados para la culminación de este trabajo. Dios los bendiga.

De igual manera, nuestros agradecimientos a la ilustre Universidad de Los Andes, casa magna de estudio. Por abrirnos sus puertas y enriquecernos en conocimientos, para alcanzar esta meta tan anhelada.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación e Importancia de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación	8
Alcances de la Investigación	8
Limitaciones de la Investigación	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
Trabajos Previos	10
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	16
Familia Clusiaceae	16
Descripción Botánica de la Familia Clusiaceae	16
Composición Química de la Familia Clusiaceae	17
Género <i>Clusia</i>	19
Descripción Botánica del Género <i>Clusia</i>	20
Composición Química y Actividad Biológica del Género <i>Clusia</i>	21
Especie <i>Clusia minor</i> L	23
Composición Química de <i>Clusia minor</i> L	25
Propiedades Biológicas de <i>Clusia minor</i> L	26

Productos Naturales	27
Clasificación de los Productos Naturales	27
Aceites Esenciales	28
Principales Componentes de los Aceites Esenciales	29
Terpenos	29
Monoterpenos	29
Sesquiterpenos	30
Compuestos Oxigenados	30
Aplicaciones y Usos de los Aceites Esenciales	30
Métodos de Extracción de Aceites Esenciales	32
Expresión (Método Mecánico)	32
Destilación con Vapor de Agua	32
Hidrodestilación	33
Extracción con Solventes Volátiles	33
Enfleurage	33
Extracción con Fluidos Supercríticos	34
Métodos de Identificación de Compuestos Químicos de los Aceites Esenciales	34
Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas	35
Índice de Kováts	35
Bacterias	36
Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	36
Bacterias Gram positivas	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	37
<i>Enterococcus faecalis</i>	38
Bacterias Gram negativas	39
<i>Escherichia coli</i>	39

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Antibióticos	41
Clasificación de los Antibióticos	42
Resistencia Bacteriana	42
Producción de Enzimas	43
Bombas de Expulsión o Eflujo	43
Cambios en la Permeabilidad de la Membrana	43
Alteración del Sitio de Acción	44
Actividad Antibacteriana	44
Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana	44
Métodos de Difusión	45
Métodos de Dilución	46
Bioautografía	47
Definición Operacional de Términos	48
Operacionalización de las Variables	49
Hipótesis	52
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	53
Tipo de Investigación	53
Diseño de Investigación	53
Población y Muestra	54
Unidad de Investigación	54
Selección del Tamaño de la Muestra	54
Sistema de Variables	55
Instrumento de Recolección de Datos	55
Procedimientos de la Investigación	56
Obtención del Aceite Esencial de <i>Clusia minor</i> L	56
Recolección y Preparación del Material Vegetal	56

Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial	56
Identificación de los Componentes Químicos del Aceite Esencial de <i>Clusia minor</i> L	57
Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)	57
Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Clusia minor</i> L por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer)	57
Bacterias Estudiadas	57
Preparación de Placas	58
Preparación de Pre-inóculos Bacterianos	58
Preparación de Inóculos Bacterianos	59
Inoculación de las Placas	59
Preparación de los Discos	59
Colocación de los Discos Impregnados	60
Pre-incubación e Incubación de las Placas	60
Lectura de las Placas	61
Diseño de Análisis	61
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	62
Resultados	62
Extracción y Obtención del Aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L	62
Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) del Aceite Esencial de <i>Clusia minor</i> L	63
Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Clusia minor</i> L	66
Discusiones	68
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
Conclusiones	73
Recomendaciones	74

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Clasificación taxonómica de <i>Clusia minor</i> L	25
2	Operacionalización de la variable dependiente	50
3	Operacionalización de la variable independiente	51
4	Cepas de referencia internacional ATCC	58
5	Discos de antibióticos comerciales usados como control positivo	60
6	Características físicas y organolépticas del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L	62
7	Composición química del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L	64
8	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L	67

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	α -mangostina	18
2	(+)-calanólido A	18
3	Morelloflavona	18
4	Gutiferona F	19
5	Propolona D	21
6	Isovitexina	22
7	Lupeol	22
8	β -elemeno	22
9	β -sitosterol	23
10	Especie vegetal <i>Clusia minor</i> L	24
11	α -amirina	25
12	β -amirina	26
13	Vitamina E	26
14	Monoterpenos	31
15	Sesquiterpenos	31
16	Compuestos oxigenados	32
17	Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas	37
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	38
19	<i>Enterococcus faecalis</i>	39
20	<i>Escherichia coli</i>	40
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40

22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
23	Extracción del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L mediante hidrodestilación	63
24	Espectro de masas del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L	64
25	<i>trans</i> -cariofileno	65
26	Germacreno-D	65
27	δ -cadineno	65
28	α -amorfeno	66
29	3-Hexeno-1-ol	66
30	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L frente a bacterias Gram positivas	68
31	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L frente a bacterias Gram negativas	68

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Productos Naturales



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Clusia minor* L EN CEPAS GRAM POSITIVAS Y GRAM
NEGATIVAS**

Trabajo de grado para optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

Autores:

Marbelis Alejandra Guillén Chacón
Marlín Adriana Guillén Chacón

Tutora:

Prof. Yndra Cordero de Rojas

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L y la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas. La planta fue recolectada en el sector La Mata, del Municipio Libertador del Estado Mérida, y posteriormente su aceite esencial fue obtenido mediante la técnica de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, obteniendo 0,7mL de aceite esencial puro y un rendimiento de 0,039%. Sus componentes fueron identificados y cuantificados a través de la técnica de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM), obteniendo como compuestos mayoritarios: *trans*-cariofileno (14,73%), Germacreno-D (13,41%), δ -cadineno (12,95%), α -amorfeno (10,38%) y 3-Hexeno-1-ol (8,49%). La actividad antibacteriana se evaluó contra cepas de referencia internacional ATCC, a través del método de difusión en disco (Kirby-Bauer). Los resultados obtenidos, mostraron halos de inhibición de crecimiento bacteriano de: 20 mm *Staphylococcus aureus* (actividad fuerte), 25 mm *Enterococcus faecalis* (actividad fuerte), 8 mm *Escherichia coli* (actividad leve), 11 mm *Klebsiella pneumoniae* (actividad moderada) y 12 mm *Pseudomonas aeruginosa* (actividad moderada).

Palabras clave: *Clusia minor* L, aceite esencial, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad para diversos fines, ya sea en el área de alimentos (condimento), en la cosmetología y en la medicina principalmente, enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades. Dentro de los compuestos producidos por ellas, destacan aquellos que tienen una determinada acción biológica sobre otros organismos vivos, la cual puede ser beneficiosa o perjudicial, cuya característica más resaltante, es su uso ilimitado en el desarrollo de múltiples drogas para el tratamiento de diversas afecciones (Sánchez, Castillo y García, 2016).

A pesar del avance de la tecnología médica, para el mejoramiento de los servicios asistenciales de salud, con arreglos a normas de sencillez, inocuidad, eficacia y disponibilidad a bajo costo, las plantas medicinales y aromáticas juegan un papel importante en el cuidado de la salud de las personas en el mundo, especialmente en países en desarrollo. Pues, hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas, usándolas, ya sea por ensayo o error, para el tratamiento de sus enfermedades y las de sus animales (Zambrana, 2005).

El uso excesivo e inadecuado de los antibióticos ha contribuido al aumento de la resistencia bacteriana, lo que es señalado como una amenaza según la OMS (2018). Actualmente, los profesionales de la salud, han estado trabajando con énfasis en medicamentos industrializados, introducidos gradualmente en la vida cotidiana de la sociedad. Sin embargo, las políticas de ciencia y salud, están tratando de restablecer el uso de las plantas medicinales. Pero, debido a que la utilización de la medicina tradicional sigue estando muy poco reglamentada, la OMS (2004) apoya su uso, sólo cuando ha sido demostrada su utilidad y riesgo mínimo para el paciente.

Los estudios sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales frente a diversos microorganismos son bastante relevantes, por ser éstos, una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenibles por diversos procesos (químicos o físicos) y que tienen aplicación en diferentes campos, además, los aceites esenciales obtenidos de plantas, han demostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo*, ser buena alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas patógenas causadas por bacterias, parásitos y hongos (Satalaya y cols, 2009). Es por esto que en la actualidad se han intensificado las investigaciones que involucran el uso de las plantas como método curativo.

Por consiguiente, la importancia de esta investigación se centró, en la utilización de las plantas medicinales como recurso terapéutico, lo cual ha sido bastante difundido en todo el mundo, por ser consideradas como terapia complementaria o alternativa en salud, y su uso ha sido creciente. Además, el desarrollo de resistencia microbiana a los medicamentos y la falta de antibióticos, focalizó el interés de los investigadores sobre la propiedad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, con la finalidad de proporcionar opciones terapéuticas factibles, considerando los altos costos de vida en la actualidad. Es importante recalcar que dicha investigación se llevó a cabo bajo el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), en medio de cultivo Müeller Hinton, lo que permitió determinar la actividad del aceite esencial frente a las diferentes cepas bacterianas utilizadas.

Este trabajo está estructurado por cinco capítulos, el Capítulo I esta titulado como El Problema, subtítulo, Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II está titulado como, Marco Teórico y subtítulo por los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos y la Hipótesis. El Capítulo III esta titulado como, Marco

Metodológico y subtitulado como, Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Unidad de Investigación, Selección del Tamaño de la Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV esta titulado como, Resultados y Discusiones. Y el Capítulo V, Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Puesto que, han salvado millones de vidas, y además han supuesto una revolución en la medicina. Han contribuido de forma muy significativa al progreso en campos como los trasplantes de órganos sólidos y de progenitores hematopoyéticos, la supervivencia de prematuros e inmunosuprimidos (naturales o por terapias farmacológicas), la cirugía de material protésico y los catéteres vasculares, donde las infecciones son especialmente prevalentes e importantes. Su mayor aporte, viene dado con el aumento de la esperanza de vida de la población (Alós, 2015).

Sin embargo, desde hace algunos años, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos, y esta es, la resistencia bacteriana, que se define como la aparición de cepas refractarias al efecto bacteriostático y/o bactericida de los antibióticos, que constituye, además, un problema mundial de salud pública, ya que afecta de manera dramática el tratamiento ambulatorio y hospitalario de las infecciones producidas por esos. Este fenómeno, que se incrementa de manera incesante, limita de forma progresiva las posibilidades de emplear antibióticos que en tiempos anteriores fueron activos, determinando un incremento en la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas, tanto en los países subdesarrollados como en los más avanzados (Oromí, 2000).

Tal es el caso de *Staphylococcus aureus*, si al poco tiempo de introducirse la penicilina en la práctica clínica, la gran mayoría de las cepas eran sensibles, actualmente, lo son menos del 5-10% (Alós, 2015). La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser natural, provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia de genes. Aunque para cada nueva forma de resistencia, fue posible que la industria farmacéutica proporcionara un nuevo antibiótico, actualmente se ha llegado a una situación en que no se comercializa ninguna nueva clase de antibióticos, es decir, ninguna capaz de atacar una nueva bacteria, aunque se van produciendo modificaciones estructurales en moléculas de las diversas familias de estos fármacos. A pesar de ello nuestra reserva de antibióticos no es suficiente, ya que se presentan cepas capaces de resistirlos todos (Oromí, 2000).

Al respecto, la OMS (2018), aseguró que la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, ya que la resistencia a los antibióticos puede afectar a cualquier persona, sea cual sea su edad o el país en el que viva, pues, aunque se trata un fenómeno natural, el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales está acelerando el proceso. Sobre todo, en los países que carecen de directrices terapéuticas normalizadas, el personal sanitario y veterinario, tienden a prescribirlos en exceso, y la población a consumirlos. Por lo tanto, esta organización recalca la necesidad de cambiar urgentemente la forma de prescribir y utilizar los antibióticos, pues, aunque se desarrollen nuevos medicamentos, si no se modifican los comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá representando una grave amenaza.

El uso terapéutico de las plantas medicinales, como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación, se aplica desde la antigüedad, para curar o aliviar las enfermedades. De hecho, gracias al aporte de la

ciencia, sus principios activos son en la actualidad, los protagonistas de la mayoría de los medicamentos de la industria farmacéutica. Sin embargo, no existe todavía la suficiente evidencia científica, que consolide a la medicina herbaria dentro de los sistemas de salud (Gallegos, 2016).

En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y dentro de esta, la medicina natural, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones, apreciada principalmente por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad (Gallegos, 2016). Lo cual llevó a plantear la presente investigación, dirigida a la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L.

De esta manera, se planteó el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L y la actividad antibacteriana, frente a cepas Gram positivas y Gram negativas?

Justificación e Importancia de la Investigación

La justificación de una investigación señala las razones por las cuales se realizó la investigación, en el contexto y bajo esas condiciones, las cuales sirvieron de fundamento para realizar el trabajo, tales como: necesidades, motivaciones, intereses, inquietudes, sugerencias, valores y potencialidades (Hurtado, 2006). Los autores de esta investigación identificaron necesidades tales como: la utilización de las plantas medicinales como recurso terapéutico, que ha sido bastante difundido en todo el mundo, por ser consideradas como terapia complementaria o alternativa en salud y su uso ha sido creciente. Con base en estos hechos, el estudio de las plantas como fuente de medicamentos ha sido propuesto por diversos autores (Akerele, 1993). Además, el desarrollo de resistencia microbiana a los medicamentos

es un fenómeno espontáneo, en consecuencia, es motivo para que los investigadores estudien la actividad antibacteriana del aceite esencial de especies del género *Clusia* (De Oliveira, Oliveira, Cortez, Pessoa, Melo y Figueredos, 2016). Las razones anteriores justificaron porque se decidió estudiar la propiedad antibacteriana de las plantas.

Al considerar los porque anteriores, los autores de esta investigación, también encontraron razones con categoría de potencialidad. Por eso, los métodos de evaluación antibacteriana, al permitir observar la susceptibilidad de los microorganismos frente a diversos antibióticos, proporcionan información, acerca de las posibles propiedades inhibitorias que ejercen sustancias obtenidas de plantas contra ciertos microorganismos (Lizcano y Vergara, 2008).

Los investigadores decidieron focalizar su interés sobre la propiedad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, por varias razones. Primero, la diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Segundo, la grave falta de antibióticos para combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos. Tercero, el aprovechamiento de las propiedades farmacológicas de las plantas. Cuarto, proporcionar opciones terapéuticas factibles, considerando los altos costos de vida en la actualidad.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L y la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos Específicos

Obtener el aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L, por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger.

Identificar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *Clusia minor* L, por el método de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).

Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, en correspondencia con el halo de inhibición, por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Los alcances de la investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que los autores se proponen. En tal sentido, esta investigación tuvo un alcance con el grado de elaboración confirmatoria, el cual requiere de una explicación previa a una serie de supuestos o hipótesis, que se desean confirmar (Hurtado, 2010). Dentro de esta perspectiva, el alcance en este trabajo fue, confirmar la relación entre la composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L, y la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Limitaciones de la Investigación

En esta investigación se consideraron las siguientes limitaciones: la disponibilidad de tiempo para su elaboración; los escasos recursos

materiales y financieros que limitaron su desarrollo; los problemas de transporte, internet, electricidad, y entre otras limitantes, los pocos estudios para la actividad antibacteriana de *Clusia minor* L.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Mangas y cols (2018), realizaron un trabajo titulado: Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) y propiedades bioactivas de extractos obtenidos de hojas de *Clusia minor* L. El alcance de esta investigación, consistió en analizar la composición química de los extractos de hojas de *Clusia minor* L y sus propiedades bioactivas. Los extractos, hexano, acetato de etilo, metanol y etanol, fueron obtenidos por maceración. La actividad antioxidante fue medida como la capacidad de eliminación de radicales DPPH, asimismo, el potencial citotóxico, se investigó mediante ensayo de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), frente a cuatro líneas celulares. Mientras que, la actividad antiinflamatoria, se evaluó a través de edema de oído, inducido por aceite de *Croton*, en ratones. El análisis cromatográfico de la fracción de acetato de etilo y metanol, permitió la identificación de 33 y 27 compuestos, respectivamente; destacando en ambos, la presencia de lupeol y vitamina E. Los autores concluyeron que, los extractos obtenidos de *Clusia minor* L mostraron propiedades antioxidantes, citotóxicas y antiinflamatorias, además, no se observó toxicidad aguda por vía oral, posterior a la exposición de los ratones a los cuatro extractos, por lo que sugieren el uso de esta especie como una nueva fuente de medicamentos naturales, para la prevención y el manejo de enfermedades humanas.

Rocha (2017), realizó un trabajo titulado: Producción de bioproductos con actividad antimicrobiana a partir del extracto de las hojas de *Platonia insignis* Mart (Clusiaceae). El alcance de esta investigación consistió en analizar el perfil fitoquímico, actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de *Platonia insignis* Mart y desarrollar formulaciones farmacéuticas con acción antimicrobiana. El extracto fue sometido a estudio fitoquímico y análisis por Cromatografía Líquida combinada con Espectrometría de Masas Precisa Multietapas (CL-EMn). La actividad antioxidante fue evaluada por inhibición del radical libre (DPPH), además de, la preparación de productos como: jabón, crema y solución tópica, y la evaluación de la actividad antimicrobiana, a través de la técnica de microdilución en caldo. Asimismo, la toxicidad fue evaluada por la técnica de hemólisis, y también, frente a *Artemia salina*, presentando en esta última, Dosis Letal 50 (DL50) de 42,6 µg/mL, siendo clasificado como altamente tóxico. Los autores llegaron a la conclusión, que el extracto obtenido de las hojas de *Platonia insignis* Mart, tiene actividad antioxidante, microbicida y baja toxicidad *in vitro*. Por otra parte, las formulaciones farmacéuticas, se mostraron potencialmente viables en el desarrollo de nuevos productos para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

De Oliveira y cols (2016) realizaron un trabajo titulado: Actividad moduladora de los extractos etanólicos de las hojas de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) en medicamentos antimicrobianos. El alcance de la investigación consistió, en examinar la actividad antimicrobiana del extracto de etanol de *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) contra las cepas estándar y multirresistentes, y la acción moduladora con aminoglucósidos, amikacina, neomicina y gentamicina. La determinación de la actividad antibacteriana se realizó a través de un ensayo de microdilución, utilizando una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 128 µg/mL. Los resultados mostraron que la

acción de los antibióticos fue sinérgicamente modulada por el extracto, contra las bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, y Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los autores llegaron a la conclusión que, el extracto de esta planta, puede ser utilizado como una fuente de productos naturales en la terapia antimicrobiana, y la lucha contra la resistencia bacteriana a múltiples fármacos.

Ehiabhi y cols (2016), realizaron un trabajo titulado: Constituyentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *Garcinia kola* Heckel (Clusiaceae) de Nigeria. El alcance de esta investigación consistió, en evaluar los componentes químicos y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Garcinia kola* Heckel. El aceite esencial fue obtenido mediante un proceso de hidrodestilación, usando la trampa de Clevenger, cuyo análisis se realizó por triplicado, mediante CG/EM. Por otra parte, la actividad antimicrobiana fue evaluada frente a cepas de referencia internacional ATCC, entre ellas, bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, y bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, además, *Candida albicans* y *Mycobacterium bovis* BCG, utilizando el método de microdilución en caldo en microplacas de 96 pocillos. Los autores llegaron a la conclusión que, el aceite esencial de *Garcinia kola* Heckel, estaba dominado por ácido citronélico (48,3%), seguido por dihidropseudoionona (5,12%) y α -ionona (4,38%). Además, mostró actividad antimicrobiana frente a las cepas probadas, lo cual apoya el uso de la hoja de esta especie vegetal, para el tratamiento de diversas afecciones.

Fernandes y cols (2016), realizaron un trabajo titulado: Aceites esenciales de flores masculinas y femeninas de *Clusia hilariana*. El alcance de esta investigación consistió, en evaluar la composición química de las sustancias volátiles del aceite esencial obtenido de las flores masculinas y femeninas de

Clusia hilariana mediante análisis de CG/EM y CG/FID (Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de llama). La extracción del aceite esencial fue realizada usando la trampa de Clevenger. Los resultados de esta investigación señalan, la identificación de 40 compuestos, de los cuales el componente principal encontrado en el aceite de ambas flores, fue E-cariofileno, que corresponde al 49,7% y 37,1%, respectivamente, de las composiciones relativas totales. Sin embargo, estos aceites esenciales diferían cuantitativa y cualitativamente.

Antecedentes Históricos

Clusia minor L, es una planta nativa de Centroamérica y Venezuela. Se distribuye principalmente 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 (Gil, Carmona y Rodríguez, 2006). Pertenece a la familia Clusiaceae y al género *Clusia*, el cual fue descrito por Carl Linnaeus en 1753, en su obra *Species Plantarum*, y recibió este nombre en honor al botánico francés Carolus Clusius, quien fue médico, micólogo y botánico, y quizá el científico y horticultor más influyente del siglo XVI (Vargas y Andrade, 2006).

El uso de la medicina natural se remonta a la época prehistórica, y es una de las formas más extendidas de medicina presente en todas las culturas conocidas. Si bien es cierto que la definición data de finales del siglo XIX, las raíces de la filosofía de la medicina natural son milenarias (Pascual, Pérez, Morales, Castellanos y González, 2014).

La medicina natural se basa en la sabiduría de muchos países, entre los cuales está la India (Yajur-veda), China (Taoísmo) y Grecia (Hipócratas). En la Biblia se describen aproximadamente 200 plantas de uso medicinal y

además sus aplicaciones. El papiro de Ebers, escrito hace unos 3500 años, describe enfermedades e indicaciones para solucionarlas, mediante el empleo de especies vegetales (Marinoff, 2006).

Durante los siglos XII y XIII la Escuela Árabe (célebre por sus renombrados médicos), así como la de Salerno en Italia, prescribían numerosas drogas vegetales de las cuales muchas son utilizadas en la actualidad. En el siglo XV eran conocidas las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia, lavanda, entre otras. Un siglo después, más de sesenta nuevas esencias se añadían a éstas. En 1511 se publicó en Barcelona la “Concordia Pharmacopolarum” que es la primera farmacopea territorial del mundo. En la Edad Media los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria Farmacia. En el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica. Nace la farmacoquímica; en 1811 se aísla la morfina a partir del opio (Marinoff, 2006).

En la actualidad, existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos, muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones; en lo que se destaca, el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos, adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad (Marinoff, 2006).

Desde la antigüedad, el ser humano ha utilizado compuestos orgánicos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como el extracto de algunas plantas y hongos de algunos quesos. En el siglo XIX, el prestigioso francés Louis Pasteur, descubrió que algunas bacterias saprofitas podían destruir la bacteria del ántrax. En 1900, el bacteriólogo alemán Rudolf Von Emmerich aisló una sustancia que podía destruir los microbios causantes del cólera y la difteria en un tubo de ensayo, pero no pudo aplicarlo en el tratamiento de las enfermedades. La actividad antibacteriana tiene vinculación con el descubrimiento de los antibióticos, que según la historia se remonta al año 1928, cuando Alexander Fleming descubrió casualmente la penicilina, en una placa de Petri contaminada por hongos, dando inicio a una nueva era de la medicina. Este compuesto natural producido por el hongo *Penicillium* demostró ser tóxico para las bacterias, pero seguro para el ser humano. El uso de la penicilina durante la Segunda Guerra Mundial permitió salvar cientos de miles de vidas (Acuña, 2003).

Tras el descubrimiento de la penicilina, se inició una búsqueda intensa de otros compuestos naturales o sintéticos, que pudieran utilizarse para tratar agentes patógenos. Esa búsqueda ha sido más difícil con algunos microorganismos que con otros. Las células bacterianas difieren de las células humanas en muchos aspectos fundamentales, de modo que, ofrecen más oportunidades de desarrollar nuevos fármacos. En cambio, los hongos, los parásitos y los virus comparten con las células humanas muchas vías metabólicas y estructuras, lo que ofrecen a los investigadores menos dianas terapéuticas y conllevan más riesgo de toxicidad para los pacientes. Además, la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia, que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (OMS, 2015).

Bases Teóricas

Familia Clusiaceae

La familia Clusiaceae, está compuesta por plantas tropicales, y constituida, por alrededor de 30 géneros y 1150 especies. Es endémica de América del Sur e incluye árboles, arbustos, lianas y hierbas de interés económico para la producción de frutas comestibles, madera dura, derivados químicos de interés farmacéutico e industrial. Varias especies de esta familia se utilizan con fines medicinales en todo el mundo, como para el tratamiento del cáncer, procesos inflamatorios, infecciones, así como purgantes y también en el control de la obesidad (Oliveira, Carvalho y Sarmento, 2012). Los géneros con mayor número de especies son *Neonate*, *Caraip*, *Mahurea*, *Calophyllum*, *Vismia*, *Hypericum*, *Marila*, *Clusiella*, *Symphonia*, *Lorostemon*, *Moronobea*, *Platonia*, *Garcinia*, *Tovomitá*, *Chrysochlamys* y *Clusia* (Montemayor, 2013).

Descripción Botánica de la Familia Clusiaceae

Clusiaceae, es una familia de árboles o arbustos, terrestres, a veces epífitos o escandentes, con látex transparente, blanco, amarillo, o de otros colores intensos. Tallos erectos o decumbentes, resinosos, glabros o con pelos uni o multicelulares, uniseriados. Hojas opuestas, simples, ocasionalmente verticiladas, enteras, glandulosas, a veces estipuladas o con glándulas pequeñas en la base del pecíolo, nervación lateral, paralela, en ocasiones unidas al final formando un nervio submarginal, pecíolo entero o acanalado, con o sin alas. Inflorescencia terminal o axilar, cimosa, fasciculada, en ocasiones reducida a una flor solitaria. Flores bisexuales o

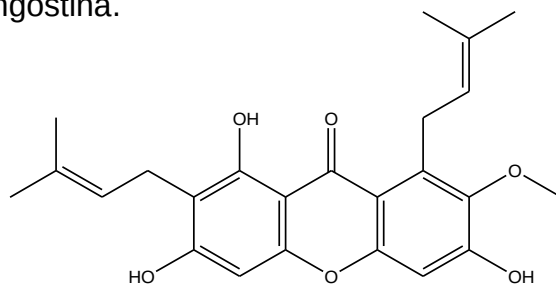
unisexuales, actinomorfas, brácteas y bractéolas presentes o ausentes; sépalos de 3-4, libres, unidos, a veces fasciculados, opuestos a los pétalos, ocasionalmente desiguales; pétalos de 4-5, libres, decusados, imbricados o convolutos, blancos, amarillos o rojos. El fruto puede estar representado por una baya, una drupa o una cápsula septicida, con semillas ariladas o no, en ocasiones aladas, sin endospermo, embrión recto o curvado, aceitoso (Martínez, Castillo y Nicolalde, 2015).

Composición Química de la Familia Clusiaceae

Las cuatro clases principales de compuestos que se encuentran en la familia Clusiaceae, con potenciales biológicos prometedores, son las xantonas, cumarinas, biflavonoides y benzofenonas, producidas por las plantas principalmente como mecanismo de defensa. Razón por la cual, diversos autores han focalizado los estudios químico-farmacológicos sobre especies de esta familia (Oliveira, Carvalho y Sarmento, 2012).

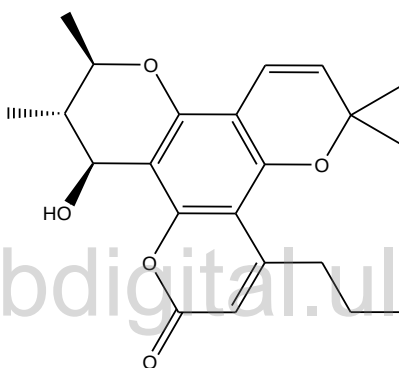
En la familia Clusiaceae se ha reportado la presencia de xantonas como α -mangostina (**figura 1**), β -mangostina y gartanina, con actividad analgésica y antiinflamatoria (Reanmongkol y Wattanapiromsakul, 2008); cumarinas como mameisina y mameigina, con actividad citotóxica, antifúngica, antibacteriana, entre otras (Scio, 2004), así como también (+)-calanólido A (**figura 2**), el cual es un potente inhibidor de la transcriptasa reversa del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) (Reyes y Huerta, 2009); biflavonoides como amentoflavona y moreloflavona (**figura 3**), con actividad analgésica, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, entre otras (Oliveira, Carvalho y Sarmento, 2012); benzofenonas como guttiferona B, guttiferona F (**figura 4**) y vismiafenona D, entre las que destaca su actividad antiviral (Reyes y Huerta, 2009).

Figura 1: α -mangostina.



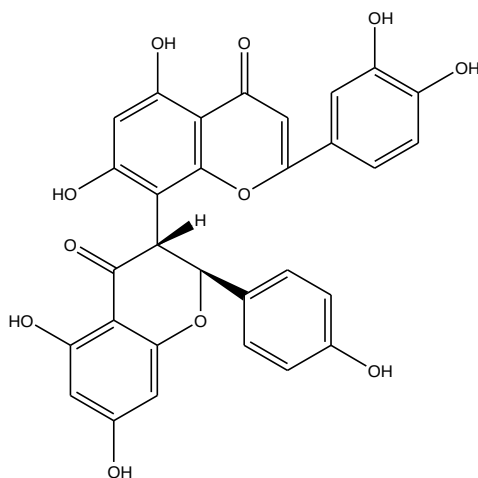
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 2: (+)-calanólido A.



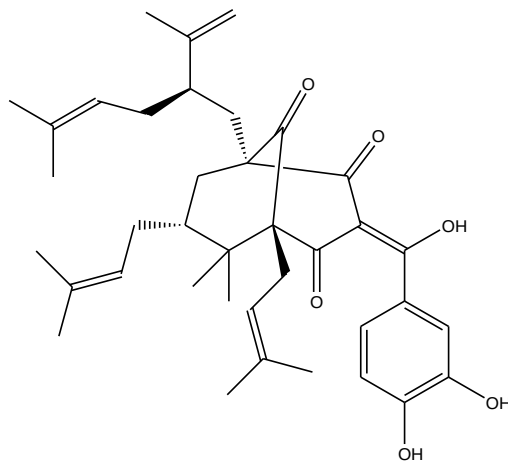
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 3: Morelloflavona.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 4: Guttiferona F.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Género *Clusia*

El género *Clusia* fue descrito por Carl Linnaeus en el año 1753, 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, desde el sur de Brasil hasta la Florida en los Estados Unidos, por lo que tienen distintos nombres comunes, entre ellos, memelita, memela, rattan mexicano, copey o copeicillo y chunup (Vargas y Andrade, 2006).

Las casi 300 especies, descritas hasta ahora, habitan en comunidades vegetales contrastantes, desde bosque mesófilo de montaña, selva baja y dunas costeras. Se distribuyen desde el nivel del mar, hasta los 3500 msnm de altitud. Se consideran especies colonizadoras por la capacidad que tienen de establecerse en suelos pobres en materia orgánica y en suelos muy salinos; por lo tanto, es un género con alta plasticidad (Montemayor, 2013).

Descripción Botánica del Género *Clusia*

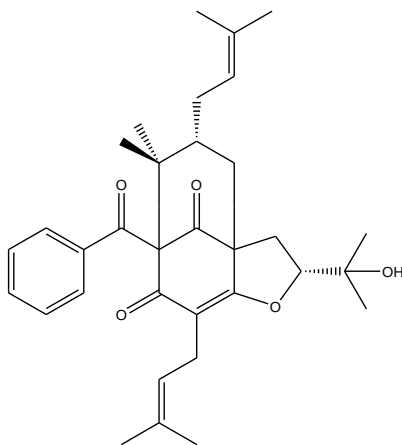
El género *Clusia* se caracteriza por ser árboles o arbustos sin espinas, generalmente epífitos, la sabia amarilla con textura viscosa y resinosa que se torna negra cuando se seca; dioicas o polígamodioicas. Las hojas son opuestas, enteras y sin estípulas, generalmente coriáceas con nervaduras laterales paralelas. Las inflorescencias ternadas, rara vez presenta una sola flor, articulada en los nodos. Las flores pueden ser pequeñas o grandes casi siempre unisexuales y rara vez perfectas. Las brácteas son numerosas y decusadas dispuestas por debajo de la flor, con 4 a 6 sépalos redondeados. Los pétalos pueden estar libres o connados, que difieren en forma y número, regularmente están acompañados de estaminodios cubiertos de una resina viscosa. Las flores femeninas, contienen estaminodios vestigiales. El ovario tiene entre 4 a 15 cavidades con un estigma sésil o subsésil; los óvulos son anátropos y numerosos. La fruta o drupa tiene paredes delgadas con múltiples dehiscencias (Montemayor, 2013).

En los bosques templados, la mayoría de las especies son hemiepífitas. En etapas tempranas del desarrollo, son verdaderas epífitas hasta que desarrollan raíces adventicias que les permiten anclarse al suelo. Posteriormente, son capaces de rodear al árbol donde crecieron causando la muerte de éste. Las formas arbustivas también son comunes en el género; la mayoría de las especies son dioicas, con crecimiento secundario y son polinizadas por insectos generalistas. Una característica casi exclusiva del género es la secreción de látex o resina que ofrecen como recompensa a sus polinizadores (Montemayor, 2013).

Composición Química y Actividad Biológica del Género *Clusia*

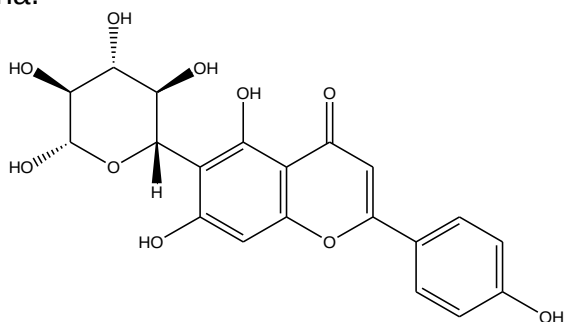
Estudios fitoquímicos de plantas de este género revelan la presencia, fundamentalmente, de benzofenonas preniladas tales como propolona D (**figura 5**), hiperibona B y garcinielliptona-I (Mangas, Bello, Cuesta, Piccinelli y Rastrelli, 2008). Aunque también se hace referencia a otros metabolitos dentro de los cuales se encuentran los flavonoides como vitexina, isovitexina (**figura 6**) y orientina con actividad antioxidante (Ferreira, Carvalho, Riger, Castro, Da Silva y Carvalho, 2016); terpenos como los triterpenos: lupeol (**figura 7**) y α -amirina con acción citotóxica y sesquiterpenos: cariofileno y β -elemeno (**figura 8**) con efecto antimutagénico y antitumoral; esteroides como β -sitosterol (**figura 9**) y estigmasterol con función antimicótica, antibacteriana, antihiperlipoproteínémica y antiinflamatoria. Las especies de este género muestran una gran versatilidad en cuanto a actividades biológicas, lo que hace de ellas una fuente interesante de compuestos activos que pueden ser usados con diversos fines (Mangas, Montes, Bello y Nival, 2008).

Figura 5: Propolona D.



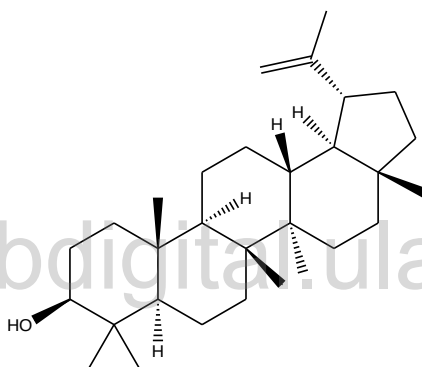
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 6: Isovitexina.



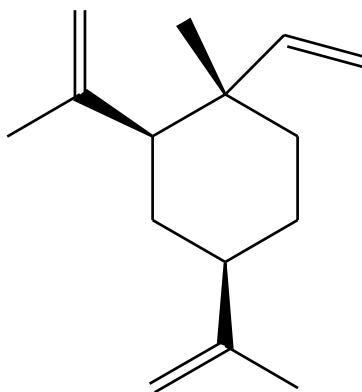
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 7: Lupeol.



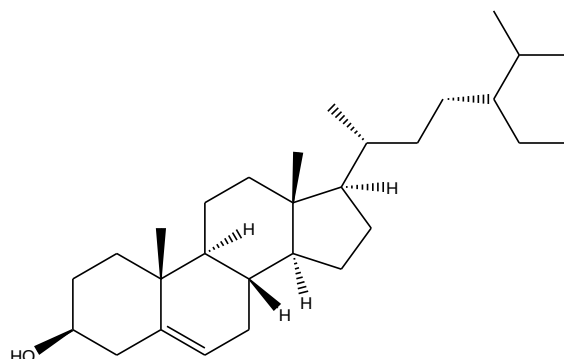
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 8: β -elemeno.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 9: β -sitosterol.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Especie *Clusia minor* L

Las plantas de la especie *Clusia minor* L (**figura 10**), suelen ser árboles o arbustos, hermafroditas, perennifolios, terrestres o epífitos, de 0,5-15 m de alto, epidermis rojiza caediza; tallo erecto o decumbente, glabro, látex transparente o blanco, cambiando a anaranjado al contacto con el aire; ramas delgadas, glabras. Poseen hojas verdes, haz brillante, envés opaco, lámina obovado-elíptica, membranáceas, glabras, ápice obtuso, base cuneada, nervios laterales ascendentes en ángulo agudo, prominentes en seco en ambas superficies, pecíolo no alado, acanalado (Martínez, Castillo y Nicolalde, 2015).

Posee, además, inflorescencia terminal o lateral, con 3-16 flores, brácteas opuestas, triangulares, coriáceas, escamosas y bractéolas opuestas, triangulares, ovadas, escamosas; cáliz con 4 sépalos, libres, blancos, orbiculares, desiguales, coriáceos y ápice verde, subtendido por dos brácteas orbiculares. El fruto, se caracteriza por ser una cápsula, verde a rojiza cuando madura, globosa a ovoide, ocasionalmente con vesículas negras en la superficie, subtendida por el cáliz persistente. Además, posee alrededor de 10-14 semillas en cada lóculo, oblongo-alargadas,

transversalmente obtriangulares, a veces escasamente recurvadas, rodeadas por un arilo anaranjado (Martínez, Castillo y Nicolalde, 2015).

Figura 10: Especie vegetal *Clusia minor* L.



Fuente: Recuperado de:

<https://stricollections.org/portal/taxa/index.php?taxon=63284&clid=65>

Su distribución está circunscrita a: México (Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz), Centroamérica (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá), Las Antillas (Cuba, Haití, Puerto Rico, República Dominicana, Trinidad y Tobago), Sudamérica (Bolivia, Colombia, Ecuador, Guyana, Guayana Francesa, Perú, Surinam y Venezuela) (Martínez, Castillo y Nicolalde, 2015).

La especie *Clusia minor* L, se ha clasificado taxonómicamente y al respecto, la Universidad Nacional de Colombia (2012) señala (**tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Clusia minor* L.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Theales
Familia	Clusiaceae
Subfamilia	Clusioideae
Género	<i>Clusia</i>
Especie	<i>Clusia minor</i> L

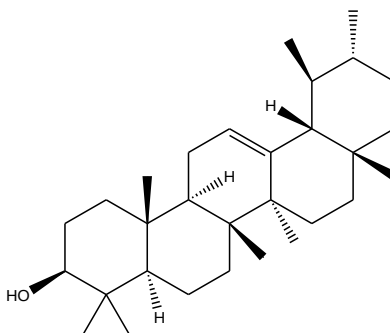
Fuente: Tomado y modificado de Universidad Nacional de Colombia, 2012.

Composición Química de *Clusia minor* L

www.bdigital.ula.ve

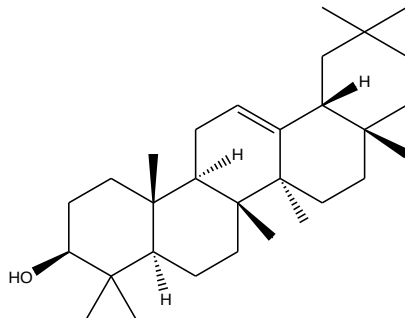
A pesar de su potencial como fuente fitoquímica bioactiva, existen relativamente pocos informes sobre las caracterizaciones fitoquímicas y farmacológicas de *Clusia minor* L. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de esteroides como β -sitosterol (**figura 9**), triterpenos como α -amirina (**figura 11**) y β -amirina (**figura 12**), y la vitamina E (**figura 13**) (Mangas y cols, 2019).

Figura 11: α -amirina.



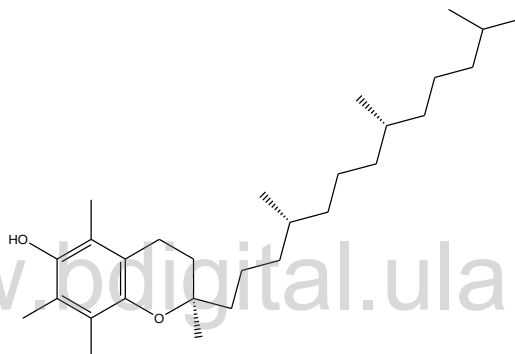
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 12: β -amirina.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 13: Vitamina E.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Propiedades Biológicas de *Clusia minor* L

Clusia minor L, ha sido usada tradicionalmente para tratar algunos trastornos que incluyen dolor e inflamación, como son las llagas y verrugas, probablemente debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Mangas y cols, 2018). Además, es considerada una planta ornamental, melífera. Destaca su uso apícola, fundamentalmente, sobre todo en la producción de propóleo con fines antimicrobianos. Sin embargo, su uso inadecuado puede ocasionar: irritación del tracto gastrointestinal, náuseas, vómitos, diarrea, desequilibrio, cólicos y taquicardia (Gil, Carmona y Rodríguez, 2006).

Productos Naturales

Los productos naturales, también llamados metabolitos secundarios, son compuestos de bajo peso molecular, sintetizados por seres vivos, generalmente plantas, y que tienen una acción biológica determinada, por lo tanto, no cumplen funciones esenciales en ellas (Albornoz, 1997). Su distribución se encuentra restringida en el reino vegetal, pues son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada. Estos compuestos no sólo tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, sino que también, una síntesis activa de estos compuestos se induce, cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados); el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos); la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes, entre las diferentes especies de plantas, y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

Se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, y presentan propiedades biológicas, así como también, funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Sierra, Barros, Gómez, Mejía y Suárez, 2018).

Clasificación de los Productos Naturales

La clasificación de los productos naturales, puede hacerse de acuerdo a su estructura, bioformación, fuente de producción y acción biológica. En todos estos casos es inevitable la superposición, por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales, es difícil ubicarlas en un

determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos. Aparentemente el criterio más acertado, es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual, en su esquema básico, engloba la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa, 1991).

Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. En la actualidad se conocen diferentes tipos de metabolitos secundarios, entre los cuales tenemos: ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, antibióticos, lignanos y cumarinas, esteroides y terpenos. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Kuklinski, 2000).

Aceites Esenciales

Son mezclas de varias sustancias químicas. Se encuentran localizadas en células y órganos particulares, o se producen mediante reacciones químicas, en un determinado momento. Se caracterizan por estar constituidos por compuestos volátiles con aspecto aceitoso, tales como: terpenos, sesquiterpenos, sus derivados oxigenados, y a veces, compuestos aromáticos. Son solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales, e insolubles en agua, sin embargo, al agitarlos con ella, le transfiere parcialmente su olor (Albornoz, 2001). Los aceites esenciales de diversas plantas, proporcionan una fuente excelente de propiedades naturales, cuyo

ingrediente activo puede tener un efecto sobre una plaga, hongo o sobre una bacteria (Gutiérrez, 2015).

Principales Componentes de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos químicos, que pueden ser clasificados en tres grupos principales: monoterpenos (**figura 14**), sesquiterpenos (**figura 15**) y compuestos oxigenados (**figura 16**).

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen. Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos, constituyentes de los aceites esenciales (Ávalos y Pérez, 2009).

Monoterpenos

Son los principales componentes de los aceites esenciales de los vegetales, y los fitoquímicos inhibidores de crecimiento, más abundantes que han sido identificados en las plantas superiores. Casi todos tienen una estructura de 10 átomos de carbono, los cuales derivan a partir de dos unidades de isopreno (Ávalos y Pérez, 2009). Presentan gran variabilidad de

hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban gran cantidad de isómeros, no sólo funcionales sino también de posición y geométricos. Están considerados como una de las más grandes familias de productos naturales (Palá, 2002).

Sesquiterpenos

Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por tanto tres unidades de isopreno. Aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en los aceites esenciales, al igual que los monoterpenos, pero con mayor frecuencia que éstos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*. Este grupo presenta gran variabilidad natural pudiendo encontrar hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos (Palá, 2002).

Compuestos Oxigenados

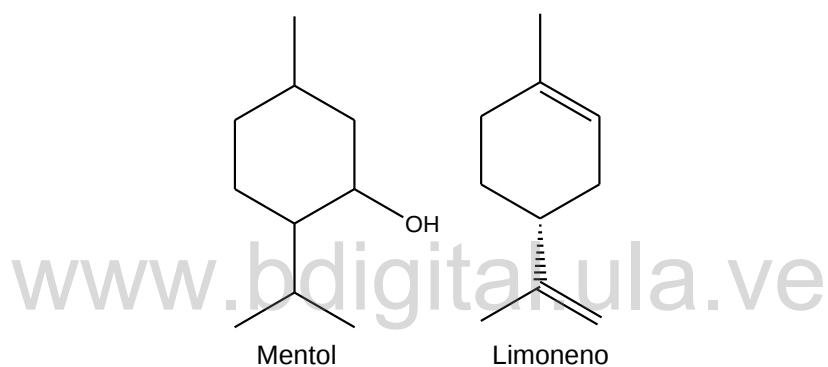
Los compuestos orgánicos oxigenados poseen en su grupo funcional uno o varios átomos de oxígeno. Estos compuestos son numerosos, puesto que, el oxígeno permite una gran variedad de enlaces y posibilidades de combinación. Los principales compuestos oxigenados son los alcoholes, los aldehídos, las cetonas y los ácidos orgánicos (Badami, Corzo y González, 2017).

Aplicaciones y Usos de los Aceites Esenciales

La química de productos naturales, a lo largo de los años, ha reportado usos y aplicaciones específicas para cada uno de los aceites esenciales aislados a partir de especies vegetales, que, además, cubren un amplio espectro de actividades y efectos farmacológicos. Al respecto, diversos

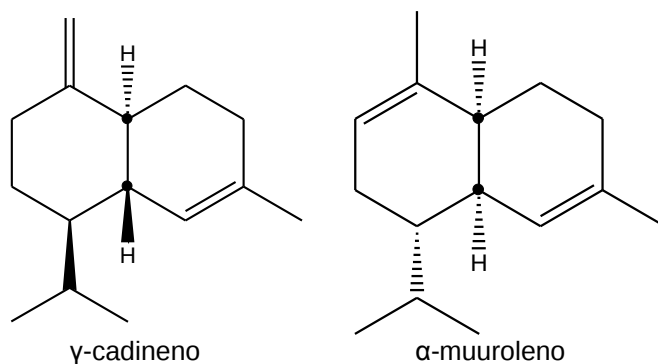
autores han demostrado la presencia de efectos antibacterianos (Albado, Saez y Grabiell, 2001), antifúngicos (Pino y cols, 2007), antioxidantes (Puertas, Mosquera y Rojano, 2016), antiinflamatorios (Santana, Miranda, Gutiérrez, García, Orellana y Orellana, 2009), antiparasitarios (Monzote, Sariego, Montalvo, Garrido, Scull y Abreu, 2004), entre otros, en aceites de origen vegetal.

Figura 14: Monoterpenos



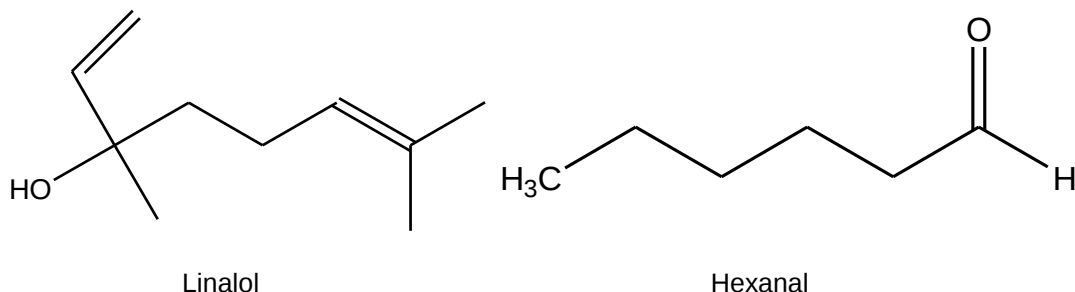
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 15: Sesquiterpenos.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 16: Compuestos oxigenados.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Métodos de Extracción de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, hidrodestilación, extracción con solventes volátiles, enfleurage, extracción con fluidos supercríticos, entre otros.

Expresión (Método Mecánico)

Según Claus y Tyler (1965), es una técnica que se emplea a ciertos aceites esenciales, que no pueden ser destilados sin que se descompongan. Consiste en exprimir las cáscaras de los frutos y obtener la esencia desprendida; se emplea principalmente con los cítricos y se obtiene la esencia sin ninguna modificación química.

Destilación con Vapor de Agua

Es el proceso más común para extraer aceites esenciales, más no es aplicable a flores ni a materiales que se apelmazan. En esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado gaseoso, 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 (Sierra y cols, 2018).

Hidrodestilación

Consiste en sumergir el material vegetal (intacto u ocasionalmente triturado) en agua en ebullición, donde las gotitas de esencia son arrastradas hacia la trampa de Clevenger, donde se condensan y se separan por diferencia de densidad. La característica principal de este proceso, es el contacto directo del agua y el material del cual se extraerá el aceite esencial (Cerpa, 2007).

Extracción con Solventes Volátiles

En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos, tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias, tales como, grasas y ceras; obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias, y, además, por el riesgo de explosión e incendio, característico de muchos disolventes orgánicos volátiles (Peredo, Palou y López, 2009).

Enfleurage

La extracción con grasa en frío o enfleurage, es un método antiguo de obtención de aceites esenciales. Se basa en el hecho de que las grasas absorben sustancias aromáticas con facilidad. Este procedimiento se utiliza

para flores, cuyo contenido en aceite esencial es tan bajo que se queda en el agua de destilación, o bien, que tienen un aceite esencial sensible al calor y también, para otras flores como el nardo o el jazmín que siguen produciendo aceite esencial después de la recolección (Sierra y cols, 2018).

Extracción con Fluidos Supercríticos

Consiste en utilizar como material de arrastre, sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. El material vegetal se corta en trozos pequeños, se licua y se empaca en una cámara de acero inoxidable por donde se hace circular un líquido supercrítico. Los aceites esenciales se solubilizan y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene un aceite puro (Peredo, Palou y López, 2009).

Métodos de Identificación de Compuestos Químicos de los Aceites Esenciales

La determinación de los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, implica la utilización de diversos métodos, por lo general cromatográficos, cuyo principio básico es la distribución desigual entre dos fases (móvil y estacionaria) de un determinado compuesto, como son: cromatografía de capa fina o de gases. Y los métodos espectrométricos, principalmente espectrometría de masas (Marcano y Hasegawa, 2002). En este trabajo de investigación, se empleó una combinación de estos métodos, denominado: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

Es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las mismas, entre las fases, móvil y estacionaria, que conforman el sistema. Una vez separadas, las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas, para su identificación preliminar. La identificación definitiva, así como la cuantificación de cada sustancia debe hacerse mediante el empleo de sustancias de referencia. Esta técnica permite obtener, no solo el cromatograma de una mezcla compleja, sino, además, proporciona el espectro de masas de cada componente de la mezcla. Este procedimiento ha permitido la identificación de cientos de componentes que están presentes en sistemas naturales biológicos, tal es el caso, de sustancias responsables del olor y sabor en los alimentos, la identificación de contaminantes en el agua o la de metabolitos secundarios (Romero, Fernández, Plaza, Garrido y Martínez, 2007).

Índice de Kováts

El índice de retención de Kováts 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. El método aprovecha la relación lineal entre los valores del logaritmo del tiempo de retención, $\log(t_r')$, y el número de átomos de carbono en una molécula. El valor del índice de Kováts suele representarse por "I" en las expresiones matemáticas. Su aplicación se limita a los compuestos orgánicos. El cálculo de este índice de retención, permite corroborar la

exactitud de la identificación de una molécula determinada (Hernández, Lami, Pino y Martínez, 2015).

Bacterias

Son los organismos más abundantes y pequeños del planeta, su tamaño es de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general); se caracterizan por ser microorganismos procariotas unicelulares, por tener diversas formas incluyendo esferas, bastones y espirales, y por ser 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 la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Al respecto, Marcano (2008) señala que:

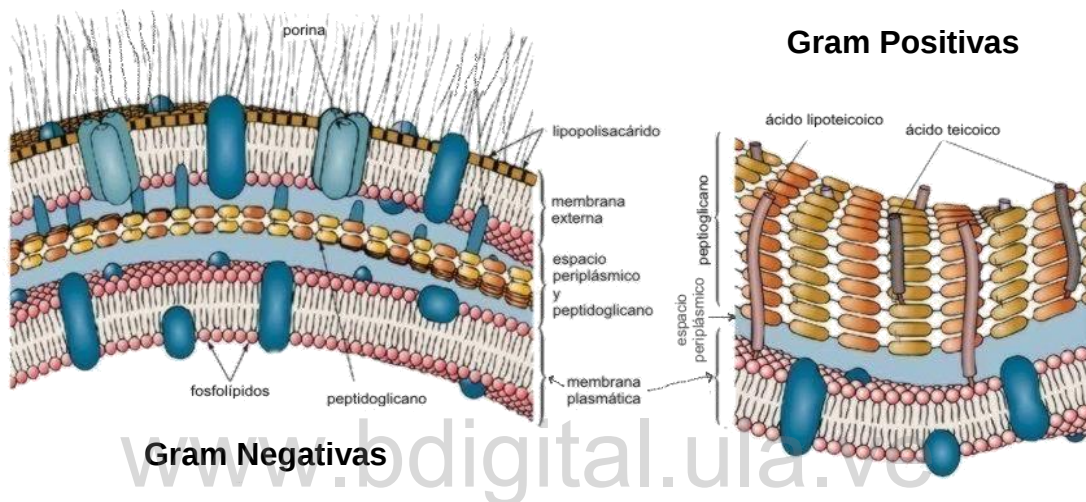
“Aunque la mayoría de las personas asocie a estos organismos unicelulares con enfermedades, sólo el 1% las produce. El resto cumple diversas funciones, entre las que encontramos, por ejemplo, procesos simbióticos con el ser humano como la síntesis de vitaminas y fermentación de carbohidratos complejos indigeribles, reciclaje de elementos a nivel biogeoquímico, producción de sustancias químicas en la industria y biorremediación (párr. 1)”.

Bacterias Gram positivas y Gram negativas

La clasificación de las bacterias radica en su pared celular (**figura 17**), donde se pueden diferenciar por un método tradicionalmente empleado como lo es la coloración de Gram. Las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglicano, y le permiten teñirse al Gram, de color violeta. Por otra parte, las bacterias Gram negativas tienen una pared celular relativamente fina, que consiste en unas pocas capas de peptidoglicano, rodeado por una segunda membrana lipídica

(membrana externa), que es rica en lipopolisacáridos y lipoproteínas, tiñéndose al Gram de color fucsia o rosado (Win, Allen, Janda, Koneman y Schreckenberger, 2001).

Figura 17: Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.



Fuente: Tomado y modificado de Arellano, Cardona y Zuñiga, 2017.

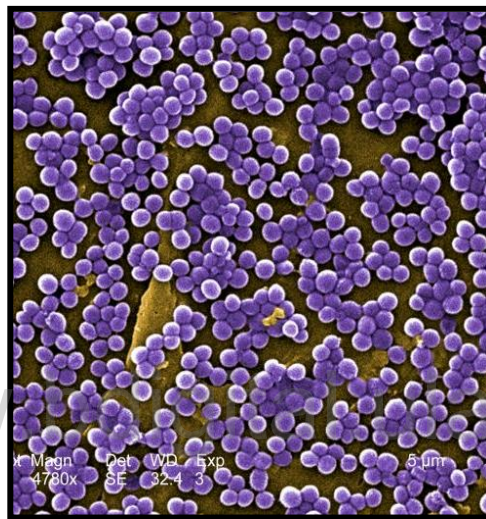
Bacterias Gram Positivas

Staphylococcus aureus

Es un coco Gram positivo esférico, que se organiza formando agrupaciones similares a racimos de uvas irregulares (**figura 18**). Productor de catalasa y coagulasa, fermenta el manitol y produce hemólisis de los glóbulos rojos. Es el principal agente causal de infecciones de la piel, tejidos blandos, huesos, articulaciones, pulmones, corazón y riñones. Está involucrado en procesos infecciosos de origen nosocomial y de la comunidad, ya sea por la producción de toxinas como: intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico. O por

la inducción de la inflamación piogénica, como: carbuncos, impétigo, foliculitis, forúnculos e infección de heridas. Otras como: artritis séptica, bacteremia, empiema, endocarditis, osteomielitis y neumonía (Levinson, 2006).

Figura 18: *Staphylococcus aureus*.

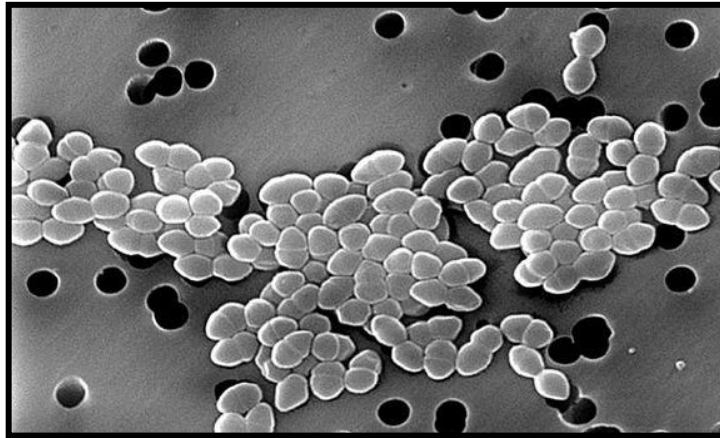


Fuente: Tomado y modificado de Laynez y Castellanos, 2019.

Enterococcus faecalis

Es un coco Gram positivo, que típicamente se dispone en parejas y cadenas cortas (**figura 19**). Es miembro de la flora normal del tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos, muy resistente y capaz de crecer en solución salina hipertónica y en bilis. Es un importante patógeno involucrado en infecciones urinarias, biliares y cardiovasculares. Su capacidad de desarrollar enfermedades, potencialmente mortales, en pacientes hospitalizados, se ha convertido en un grave problema. Siendo más susceptibles, aquellos pacientes que reciben antibióticoterapia de amplio espectro (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Figura 19: *Enterococcus faecalis*.



Fuente: Tomado y modificado de Superbacterias, la nueva amenaza infecciosa, 2018.

Bacterias Gram Negativas

Escherichia coli

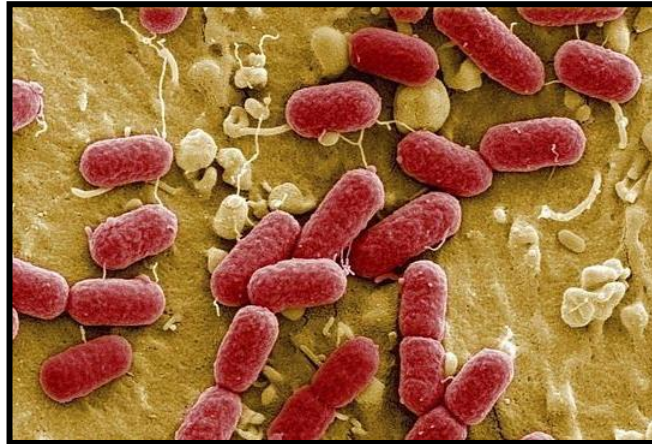
Es un bacilo Gram negativo, asociado a la microbiota habitual del intestino en humanos, portándose como patógeno oportunista, cuando los intestinos se perforan y accede a la cavidad peritoneal (**figura 20**). Es el agente causal más común de gastroenteritis, infecciones del aparato urinario y de sepsis por bacilos Gram negativos. Y una de las dos causas más importantes de meningitis neonatal. Es el agente más comúnmente asociado con la diarrea del viajero y las infecciones de origen nosocomiales (Levinson, 2006).

Klebsiella pneumoniae

Es el bacilo Gram negativo de mayor relevancia clínica dentro del género *Klebsiella* (**figura 21**). Se caracteriza por ser un patógeno primario muy virulento, asociado principalmente a infecciones del aparato urinario y

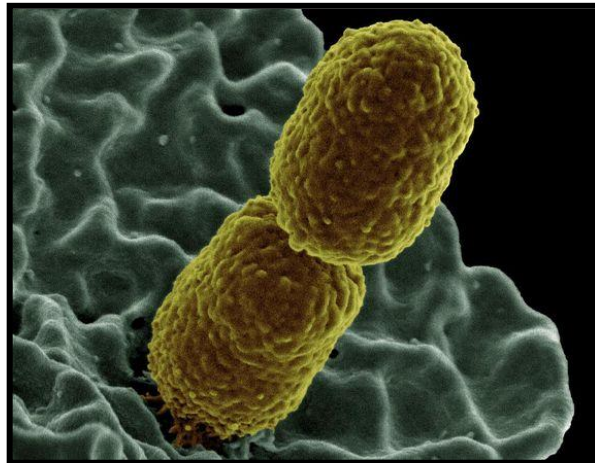
neumonía. Sin embargo, puede causar bacteriemia y diseminación secundaria a otras áreas, como meninges (Levinson, 2006).

Figura 20: *Escherichia coli*.



Fuente: Tomado y modificado de Miller, 2011.

Figura 21: *Klebsiella pneumoniae*.

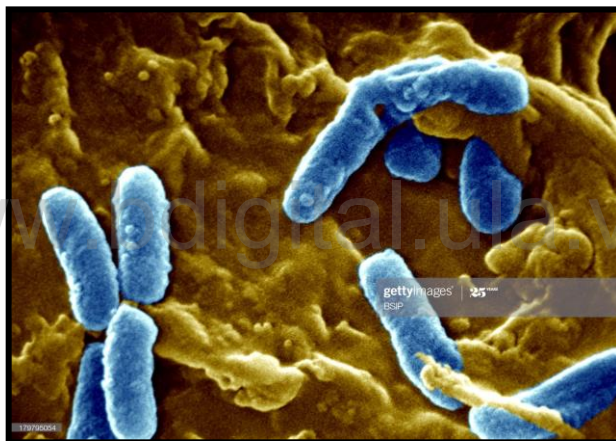


Fuente: Tomado y modificado de Superbacterias, la nueva amenaza infecciosa, 2018.

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo, productor de citocromo oxidasa (**figura 22**). Patógeno oportunista de plantas, vegetales y humanos. Capaz de crecer en casi todos los entornos, siendo uno de los patógenos nosocomiales globalmente dominantes. Tiene muchos factores estructurales, toxinas y enzimas que potencian su virulencia, confiriéndole resistencia a la mayor parte de los antibióticos de uso habitual (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009)

Figura 22: *Pseudomonas aeruginosa*.



Fuente: Recuperado de: <https://www.gettyimages.es/fotos/pseudomonas-aeruginosa?mediatype=photography&phrase=pseudomonas%20aeruginosa&sort=mostpopular>

Antibióticos

Son metabolitos secundarios capaces de inhibir, a bajas concentraciones, el crecimiento de microorganismos, a través de un mecanismo antimetabólico. De acuerdo a su taxonomía, los antibióticos pueden agruparse en: de origen microbiano, que son muy conocidos y entre ellos se incluyen las penicilinas, tetraciclinas, estreptomicinas, entre otros,

proveniente mayormente de hongos microscópicos; y los obtenidos a partir de plantas superiores (Albornoz, 1997).

Clasificación de los Antibióticos

De acuerdo a su origen y composición química, los antibióticos se pueden dividir en varias familias. Aunque cada fármaco posee características propias en cuanto a farmacología y espectro de acción antimicrobiana (amplia o reducida), resulta esquemático agruparlos para tener una visión general respecto a su utilidad clínica, como son: β -lactámicos, glucopéptidos, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, quinolonas, entre otros. Además, los antibióticos se pueden dividir en bacteriostáticos y bactericidas, según, si inhiben el crecimiento bacteriano o si tienen una acción directa en su eliminación. Esto no implica necesariamente que un grupo sea mejor que el otro, pero sí adquieren mayor relevancia en algunas infecciones graves intracerebrales y en el caso de pacientes con endocarditis infecciosa o inmunodeprimidos graves (Alvo, Téllez, Sedano y Fica, 2016).

Existen distintos mecanismos de acción antibiótica, que permite clasificar los antibióticos en cinco grupos, entre ellos tenemos los que inhiben la síntesis de: pared celular, proteínas, ácidos nucleicos e inhibidores de la síntesis de cofactores metabólicos, y los que alteran la integridad de la membrana plasmática (Alvo y cols, 2016).

Resistencia Bacteriana

El uso excesivo e inadecuado de los antibióticos, como, por ejemplo, cuando se toman dosis insuficientes o no se finalizan los tratamientos prescritos, el consumo de medicamentos de mala calidad, así como las

prescripciones erróneas, han contribuido al aumento de la resistencia bacteriana. Este fenómeno se produce de manera espontánea, cuando las bacterias sufren cambios al verse expuestas a los agentes antibacterianos, y como consecuencia, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo cual incrementa el riesgo de propagación a otras personas, y pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de diversas infecciones (OMS, 2017).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia, entre los que destacan:

Producción de Enzimas

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico, haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos, son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Tafur, Torres y Villegas, 2008).

Bombas de Expulsión o Eflujo

Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Tafur, Torres y Villegas, 2008).

Cambios en la Permeabilidad de la Membrana

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios

en las porinas. Lo que puede llevar a que la membrana externa no permita el paso de los agentes antimicrobianos al espacio periplásmico (Tafur, Torres y Villegas, 2008).

Alteración del Sitio de Acción

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos, a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (Tafur, Torres y Villegas, 2008).

Actividad Antibacteriana

www.bdigital.ula.ve

Es el proceso mediante el cual se combaten los microorganismos, o se evita su aparición. La actividad de una sustancia antibacteriana, se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado, y se basa en la medición de un atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo. Se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos, y puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión, cuando es evaluado frente a un microorganismo (Pedraza y Castellano, 2009).

Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana

Actualmente, diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias frente a agentes

antimicrobianos, pero éstos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Asimismo, han sido clasificados en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía; un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Ramírez y Marin, 2009).

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. Sin embargo, lo que generalmente se propone, es usar los métodos de difusión (en disco o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares. Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Müeller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Sin embargo, algunos investigadores utilizan el agar nutritivo (Ramírez y Marin, 2009).

Métodos de Difusión

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que, sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer, Kirby, Sherris y Turck (1966), (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo, fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, por sus siglas en inglés, de Estados Unidos. Se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana, y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar, con

un medio de cultivo adecuado, y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar, sobre la cual se deposita un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo, impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez y Marin, 2009).

En el caso de evaluar varias sustancias, los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. Posteriormente, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas, luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las placas a 4°C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación (Ramírez y Marin, 2009).

Métodos de Dilución

El método de dilución, en agar o en caldo, como test de susceptibilidad microbiana, es utilizado para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia, que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo, después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, respectivamente (Ramírez y Marin, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución), que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. Por otra parte, en el método de dilución en agar, las placas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego

se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las placas; la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Ramírez y Marin, 2009).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica, en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además, permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramírez y Marin, 2009).

Bioautografía

Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es adsorbido dentro de una placa de Cromatografía de Capa Fina (CCF). El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de CCF, seleccionar la fase móvil que dé mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de Petri, previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium (Ramírez y Marin, 2009).

Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de CCF después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Asimismo, este tipo de ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un

fraccionamiento bioguiado, realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales (Ramírez y Marin, 2009).

Definición Operacional de Términos

Bioactividad: se refiere a cualquier efecto que ejerce la muestra sobre los seres vivos, o bien, la capacidad que tienen las sustancias de interactuar químicamente con los tejidos del organismo, promoviendo así la buena salud (Marcano y Hasegawa, 2002).

Taxonomía: es una ciencia que procura identificar, delimitar, nombrar y clasificar las especies (Llosa, 2003).

Toxicidad: es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él (Peña, 2005).

Bactericida: se entiende por bactericida, toda sustancia, capaz de provocar una acción letal sobre las bacterias, es decir, que genera su muerte (Calvo y Martínez, 2009).

Bacteriostático: es la capacidad que tienen ciertas sustancias, de sólo inhibir transitoriamente, el crecimiento bacteriano, sin causar la muerte del microorganismo (Calvo y Martínez, 2009).

Antioxidantes: son compuestos químicos que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres (Ramírez y cols, 2012).

Radicales Libres: son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células y producen la oxidación de sus diferentes partes, alteraciones en el ADN y cambios diversos que aceleran el envejecimiento del cuerpo (Ramírez y cols, 2012).

Porinas: son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa de la pared celular de las bacterias, que regulan la entrada de algunos elementos (Tafur, Torres y Villegas, 2008).

Operacionalización de las Variables

Arias (2012), las variables se operacionalizan para transformar los conceptos abstractos en empíricos y de esta manera poderlos medir. Por consiguiente, estas se observan en las **tablas 2 y 3**.

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Variable	Tipo	Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L en cepas Gram positivas y Gram negativas.	Dependiente Cuantitativa	La actividad antibacteriana, se define como la habilidad específica de ciertas sustancias que forman un compuesto, de lograr su efecto planeado. Y se basa, en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo. Se determina por el método analítico más adecuado (Pedraza y Castellanos, 2009).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: -Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)	Cepas Gram negativas: - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Cepas Gram positivas: - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-Sensible -Sensibilidad Intermedia -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas Gram positivas y Gram negativas

Fuente: Guillén, Guillén y Cordero, 2020.

Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente: Composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L.

Variable	Tipo	Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L	Independiente Cuantitativa Discreta	Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, terpenoides. Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes (Cerpa, 2007).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
-Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). -Índice de Kováts (IK).	-Características organolépticas -Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales. -Espectros de masas.	-Color, olor, sabor y densidad. -Tiempo de retención y abundancia obtenida de los diferentes compuestos presentes en el aceite esencial de <i>Clusia minor</i> L. -Comparación de los espectros de masas con la base de datos Nist 05, Wiley 6ta edición y cálculos de los Índices de Kováts (IK).

Fuente: Guillén, Guillén y Cordero, 2020.

Hipótesis

En vista de los reportes sobre los componentes presentes en el género *Clusia*, es de esperar que los compuestos encontrados en el aceite esencial las hojas de *Clusia minor* L, presenten actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), un tipo particular de investigación se deriva del objetivo, pues se relaciona con la profundidad y el tipo de resultado, y mantiene concordancia con el logro general de la investigación. Cada tipo de investigación tiene características y procesos propios. Pueden ser de tipo exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. La presente investigación fue de tipo confirmatoria, la cual busca verificar hipótesis derivadas de teorías e indagar acerca de la posible relación causa–efecto entre la composición del aceite esencial de *Clusia minor* L y la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Diseño de Investigación

Arias (2012), refiere que: “El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En atención al diseño, la investigación se clasifica en: documental, de campo y experimental” (p. 27). Adicionalmente, Hurtado (2015) señala que el diseño de investigación en relación con el procedimiento. Específicamente, se refiere a la amplitud de la información, la perspectiva temporal y la fuente de información. En consecuencia, la pregunta de investigación será respondida de la manera más idónea posible.

De acuerdo con lo antes expuesto, esta investigación posee un diseño de campo, experimental y de laboratorio, ya que la especie vegetal fue recolectada en su hábitat natural y tratada en un ambiente creado como el del Laboratorio A Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA). Donde el aceite esencial se sometió a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos, para observar los efectos y reacciones que se producen en la determinación de la actividad antibacteriana, frente a cepas Gram positivas y Gram negativas. Entre otras estrategias, la recolección de datos fue transeccional y contemporánea, así como, la característica multivariable de la amplitud de la información.

Población y Muestra

www.bdigital.ula.ve
Unidad de Investigación

Según Palella y Martins (2012), “la población es el conjunto de elementos que se quiere conocer o investigar alguna de sus características”. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población. La unidad de investigación estuvo representada, por la planta *Clusia minor* L, recolectada en el sector La Mata, del Municipio Libertador, del Estado Mérida.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral estuvo representada por 1.796,52 g de hojas frescas de *Clusia minor* L. La muestra utilizada, fue no probabilística, a lo que Fernández, Hernández y Baptista (2014), señalan que: “... la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con

las características de la investigación o los propósitos del investigador” (p. 176).

Sistema de Variables

Existen diferentes tipos de variables, entre ellas, la dependiente y la independiente. En tal sentido, la variable dependiente es la que refleja los resultados del estudio en una investigación, o bien, es la variable resultante de la investigación. Por otra parte, la variable independiente, representa los tratamientos o condiciones que el investigador controla para probar sus efectos sobre algún resultado (Salkind, 1999). Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación fueron las siguientes: Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L en cepas Gram positivas y Gram negativas, y la variable independiente (VI): Composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L.

Instrumento de Recolección de Datos

La recolección de datos se emplea con el fin de obtener información que permita verificar las hipótesis, o responder las interrogantes formuladas. Todo en correspondencia con el problema, los objetivos y el diseño de investigación. Cualquier recurso, dispositivo o formato (en papel o digital), que sea utilizado para obtener, registrar o almacenar información, es considerado un instrumento de recolección de datos (Arias, 2012). Al respecto, Hurtado (2015) señala que:

“Si se trata de eventos poco estudiados, puede ser necesario que el investigador elabore sus propios instrumentos, y éstos pueden ser listas de cotejo, escalas o cuestionarios, entre otros. En algunas áreas del conocimiento se requiere de instrumentos de medición mecánicos o electrónicos, dependiendo del evento estudiado (p. 161)”.

Existen diferentes tipos de instrumentos de recolección de datos. Esta investigación se enfocó en las listas de cotejo, las cuales son un instrumento propio de la técnica de observación. Consisten, en una lista de compuestos encontrados en el aceite esencial de *Clusia minor* L, así como la presencia o ausencia del halo de inhibición, como característica de la actividad antibacteriana, expresado en milímetros (mm).

Procedimientos de la Investigación

Obtención del Aceite Esencial de *Clusia minor* L

Recolección y Preparación del Material Vegetal

El material vegetal utilizado de *Clusia minor* L, fue recolectado en su hábitat natural, en el sector La Mata, Municipio Libertador, del Estado Mérida; e identificada botánicamente por la Ingeniero Ana Mildred Torres, de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Núcleo Mérida, de la Universidad de Los Andes (ULA). Aproximadamente 1.796,52 g de la planta, fueron deshojados y licuados para el posterior procesamiento en el equipo de hidrodestilación.

Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial

La obtención del aceite esencial se realizó a partir de material fresco, del cual se tomaron las hojas. Éstas, fueron licuadas y sometidas a extracción por hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger, durante 3 horas, aproximadamente. Así, el aceite extraído fue arrastrado junto con el vapor de agua hacia el condensador y la trampa de Clevenger, ubicada al final del refrigerante. El aceite una vez recolectado, fue almacenado a una temperatura de 4-6 °C, en un frasco hermético y resguardado de la luz. Y

tratado con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), para eliminar cualquier residuo de agua, y asegurar de esta manera su pureza.

Identificación de los Componentes Químicos del Aceite Esencial de

Clusia minor L

Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

El análisis por CG/EM, se realizó en un equipo marca Hewlett Packard 6890, equipado con columna de fenilmetil-polixilosano de 30 metros de largo y 0,25 mm de diámetro (HP-5), y un detector de masas Hewlett Packard MSD 5973. El programa de temperatura usado en el procesamiento, fue el siguiente: 60 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta alcanzar 260 °C con un Split de 100:1. El inyector se mantuvo a 260 °C y el detector a 280 °C. El volumen de aceite puro utilizado, fue de 0,1 µL. La identificación de los componentes se estableció utilizando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición y el cálculo del Índice de Kováts (IK).

Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de

Clusia minor L **por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer)**

La determinación de la actividad antibacteriana, se realizó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), originalmente descrito por Bauer y cols (1966), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

Bacterias Estudiadas

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias Gram positivas y tres a las bacterias

Gram negativas, de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), las cuales fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA), a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (tabla 4).

Tabla 4. Cepas de referencia internacional ATCC.

Bacterias Gram positivas (ATCC).	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
Bacterias Gram negativas (ATCC).	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Fuente: Elaborado por Cordero y Obregón, 2019.

Preparación de Placas

En las placas de Petri, se colocó el medio de cultivo, aproximadamente 20 mL de Agar Müeller Hinton (Merck ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de Pre-Inóculos Bacterianos

Las cepas a ensayar se incubaron en agar BHI (Agar Cerebro Corazón), a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya

que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003). Una vez obtenidas las cepas bacterianas, frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano.

Preparación de los Inóculos Bacterianos

El inóculo bacteriano se preparó con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera, una pequeña cantidad de colonias, a partir de las cepas frescas y purificadas, para luego ser suspendidas en tubos 13x100, previamente estéril, que contenían 5mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85%, hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán N° 0,5 equivalente a 10^{6-8} UFC/mL.

Inoculación de las Placas

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos (bacterias en estudio), previamente preparados en solución de NaCl al 0,85%, utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los Discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), por 24 horas. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 μ L de la muestra en estudio (aceite esencial puro). También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (**tabla 5**).

Tabla 5. Discos de antibióticos comerciales usados como control positivo.

Bacterias (ATCC).	Antibióticos comerciales
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	E (15 µg)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AMP (10µg)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	PIP (100 µg)
<i>Klebsiella pneumoneae</i> ATCC 23357	PIP (100 µg)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	PIP (100 µg)

Leyenda: E: Eritromicina ®. AMP: Ampicilina ®. PIP: Piperacilina ®.

Fuente: Elaborado por Cordero y Obregón, 2019.

Colocación de los Discos Impregnados

En las placas de Petri, con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa en estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de aceite esencial puro de *Clusia minor* L, y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo correspondiente a cada una de las cepas en estudio (**tabla 5**); usando una pinza metálica previamente esterilizada.

Pre-incubación e Incubación de las Placas

Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inóculados, éstas se dejaron en la nevera a temperatura

de 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a temperatura de 37 °C en posición invertida, en atmósfera aeróbica (incubación).

Lectura de las Placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas, por un lapso de tiempo de 24 horas, fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm).

Diseño de Análisis

Los resultados de esta investigación fueron analizados desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo. Se recolectaron y analizaron datos, con el fin de contestar preguntas de investigación y probar la hipótesis establecida previamente. El objetivo fue, relacionar el crecimiento de las cepas en estudio, contra la acción antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, así como la identificación de los componentes químicos presentes en el aceite esencial de esta especie, y que pudieran ser responsables de dicha actividad. Tal como lo propone Palella y Martins (2006), los datos fueron medidos numéricamente con el fin de ser analizados a través de operaciones matemáticas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Extracción y Obtención del Aceite Esencial de *Clusia minor* L

Clusia minor L, fue recolectada en el sector La Mata, del Municipio Libertador, del Estado Mérida. Fue sometida a un proceso de extracción por hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger (**figura 23**), con la finalidad de obtener su aceite esencial. A partir de 1.796,52 g de hojas frescas de la planta, se obtuvieron 0,7 mL de aceite esencial, con las características siguientes (**tabla 6**):

Tabla 6. Características físicas y organolépticas del aceite esencial de *Clusia minor* L.

Características	<i>Clusia minor</i> L
Aspecto	Transparente
Color	Ligeramente amarillo
Olor	Característico
Peso de las hojas	1.796,52 g
Volumen del aceite	0,7mL
Rendimiento del aceite	0,039%

Fuente: Elaborado por Guillén y Guillén, 2020

Figura 23: Extracción del aceite esencial de *Clusia minor* L mediante hidrodestilación.

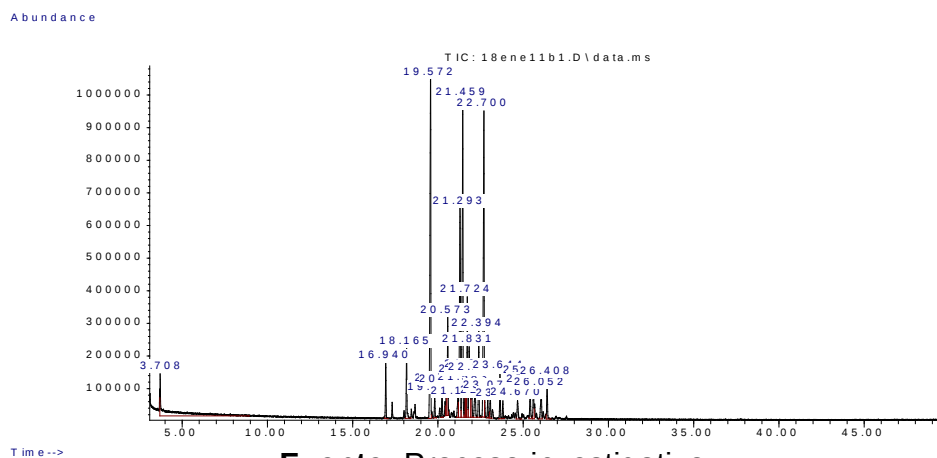


Fuente: Proceso investigativo

Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) del Aceite Esencial de *Clusia minor* L

El análisis químico del aceite esencial de *Clusia minor* L, se realizó por medio de un equipo de CG/EM (**figura 24**), el cual permitió conocer la composición química y abundancia relativa de los principales componentes, identificándose exitosamente el 85,86% de la muestra, representado por 16 compuestos (**tabla 7**). El componente mayoritario del aceite esencial resulto ser *trans*-cariofileno (**figura 25**) (14,73%), seguido de Germacreno-D (**figura 26**) (13,41%), δ -cadineno (**figura 27**) (12,95%), α -amorfeno (**figura 28**) (10,38%) y 3-Hexeno-1-ol (**figura 29**) (8,49%). Los compuestos identificados fueron clasificados como sesquiterpenos (77,37%) y compuestos oxigenados (8,49%).

Figura 24: Espectro de masas del aceite esencial de *Clusia minor* L.



Fuente: Proceso investigativo

Tabla 7. Composición química del aceite esencial de *Clusia minor* L.

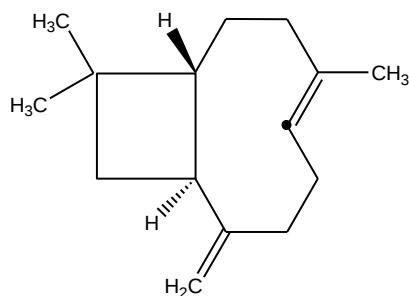
Nº de Pico	TR	% Área	Nombre del Compuesto	IKtab	IKcal
1	3,71	8,49	3-Hexeno-1-ol	850	856
2	16,94	1,79	δ-elemeneno	1335	1336
3	18,16	2,54	α-copaeno	1374	1373
4	19,57	14,73	<i>trans</i> -cariofileno	1417	1415
5	19,81	0,8	α-gurjunene	1409	1423
6	20,23	1,08	β-gurjunene	1432	1439
7	20,57	3,29	α-humuleno	1452	1451
8	21,29	10,38	α-amorfeno	1483	1476
9	21,46	13,41	Germacreno-D	1484	1481
10	21,58	1,1	β-selineno	1489	1485
11	21,72	4,28	α-selineno	1498	1490
12	21,83	4,23	<i>cis</i> -β-guaieno	1490	1494
13	21,98	1,82	α-muuroleno	1500	1499
14	22,19	1,95	β-curcumeno	1522	1506
15	22,39	3,02	γ-cadineno	1513	1512
16	22,7	12,95	δ-cadineno	1522	1522

Leyenda: TR: Tiempo de retención. **IKtab:** Índice de Kováts tabulado.

IKcal: Índice de Kováts calculado.

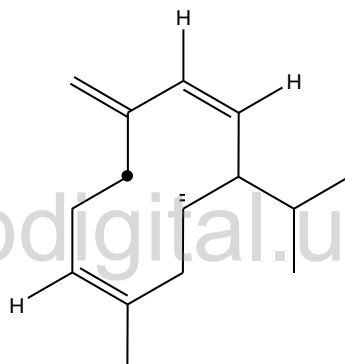
Fuente: Elaborado por Guillén, Guillén y Rojas, 2020.

Figura 25: *trans*-cariofileno.



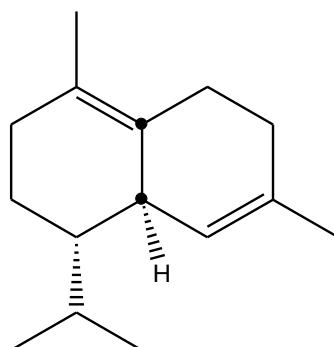
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 26: Germacreno-D.



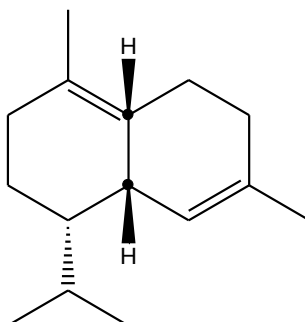
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 27: δ -cadineno.



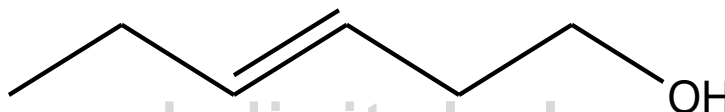
Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 28: α -amorfenol.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem.

Figura 29: 3-Hexeno-1-ol.



Fuente: Elaboración propia a partir de PubChem

Determinación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Clusia minor* L

El estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, se realizó por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer), utilizando cepas de referencia internacional ATCC. De esta manera, la actividad biológica del aceite esencial, fue probada frente a dos bacterias Gram positivas (**figura 30**) y tres Gram negativas (**figura 31**), mostrando efecto inhibitorio sobre los microorganismos probados (**tabla 8**). Los controles positivos se emplearon según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), el cuál indica el tipo de antibiótico a usar para cada una de las especies estudiadas (**tabla 8**). Tras el

ensayo, se obtuvieron halos de inhibición superiores al tamaño del disco (6mm) e inferiores a los controles positivos.

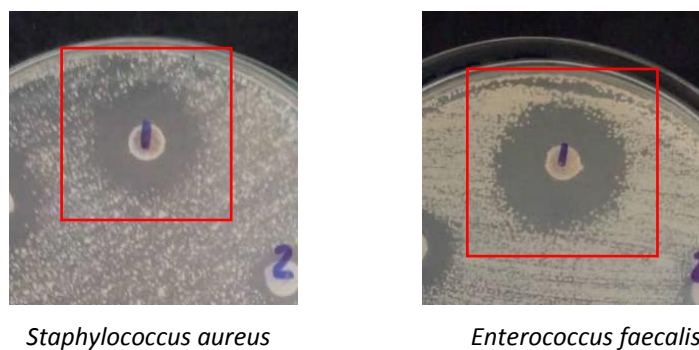
Tabla 8. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L.

Bacterias (ATCC)	Halo de inhibición (mm)			
	A.E de <i>Clusia minor</i> L	Antibióticos comerciales (Control positivo)		
		E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20 mm	32 mm	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	25 mm	-	32 mm	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8 mm	-	-	27 mm
<i>Klebsiella pneumoneae</i> ATCC 23357	11 mm	-	-	27 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12 mm	-	-	27 mm

Leyenda: mm: milímetros. **E:** Eritromicina ®. **AMP:** Ampicilina ®. **PIP:** Piperacilina ®.

Fuente: Elaborado por Cordero y Obregón, 2020.

Figura 30: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L frente a bacterias Gram positivas.



Fuente: Proceso investigativo.

Figura 31: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L frente a bacterias Gram negativas.



Fuente: Proceso investigativo.

Discusiones

La obtención del aceite esencial de *Clusia minor* L, se llevó a cabo por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, además, fue realizado, un análisis de su composición química mediante Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). Encontrando como

compuestos mayoritarios, sesquiterpenos, y en menor proporción, compuestos oxigenados. Así mismo se realizó un screening antibacteriano el cual permitió conocer la actividad de dicho aceite esencial.

Fernandes y cols (2016), tras su investigación, revelaron características organolépticas del aceite esencial de *Clusia hilariana*, similares a las encontradas en el aceite esencial de la presente investigación, tales como: color claro, ligeramente amarillo, rendimiento de 0,04% y 0,06% para cada una de las muestras estudiadas, siendo 0,039% para el aceite esencial de *Clusia minor* L. Además de, la presencia de *trans*-cariofileno como compuesto mayoritario, concordando de esta manera con los hallazgos de la presente investigación. De igual forma se encontró similitud, respecto a la presencia de otros compuestos como: δ -cadineno, α -selineno, α -humuleno, γ -cadineno, α -copaeno, α -muuroleno, β -selineno y β -gurjuneno.

La actividad antibacteriana se refiere a la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, o aún de destruirlos. En esta investigación, dicha actividad fue evaluada por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer). En este sentido, es importante mencionar, que debido a los pocos estudios sobre la actividad antibacteriana de la especie *Clusia minor* L, los resultados fueron comparados con otros estudios, basándose en la presencia de los compuestos mayoritarios.

En tal sentido, Ricón, Castaño y Ríos (2012), indicaron la presencia de compuestos mayoritarios como *trans*-cariofileno, germacreno-D y óxido de cariofileno, en aceites esenciales de flores y hojas de *Acmella ciliata* Kunth, coincidiendo con los encontrados en la especie estudiada *Clusia minor* L, a excepción del óxido de cariofileno. Los mismos autores demostraron que el aceite presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, en concordancia con la presente investigación, donde el aceite esencial de *Clusia minor* L, mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, Aparicio, Rojas, Usubillaga y Lucena (2018), en su investigación sobre *Ruilopezia marcescens* (s.f. Blake) Cuatrec., identificaron como principales compuestos del aceite esencial de esta planta, el germacreno-D, α -pineno, *p*-cimeno y α -felandreno, coincidiendo con la presente investigación, solo en el primero de ellos. Del mismo modo, estos autores, evaluaron la actividad antibacteriana de dicho aceite frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, inhibiendo el crecimiento bacteriano de dichas cepas, pero no el de *Enterococcus faecalis*. Coincidiendo con los resultados de la presente investigación, excepto en el caso de *Enterococcus faecalis*, frente al cual, el aceite esencial de *Clusia minor* L mostró su mayor efecto.

A su vez, Da silva y cols (2020), señalaron la presencia de *trans*-cariofileno, germacreno-D, α -humuleno, β -elemeno y δ -cadineno, como compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Hymenaea rubriflora*, correlacionando con la presente investigación, cuyos componentes principales están representados por *trans*-cariofileno, germacreno-D y δ -cadineno. Además, los autores revelan que el aceite esencial presentó actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Coincidiendo con la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, difiriendo con respecto a *Bacillus subtilis*, puesto que este microorganismo no fue ensayado.

De Armas, Rodríguez y Salazar (2013), en su estudio sobre el extracto crudo del tallo, hojas y flores de *Melochia villosa*, demostraron que, a una concentración de 40.000 ppm, la actividad antibacteriana es leve, si el diámetro de los halos de inhibición es de 6-9 mm, moderada de 10-13 mm y actividad fuerte >13 mm. A partir de ello, se puede orientar a una

clasificación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L, basada en el halo de inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas probadas. De esta manera se concluye que la actividad antibacteriana de dicho aceite fue: fuerte para *Staphylococcus aureus* (20 mm), fuerte para *Enterococcus faecalis* (25 mm), leve para *Escherichia coli* (8 mm), moderada para *Klebsiella pneumoniae* (11 mm) y moderada para *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm).

En cuanto a los mecanismos de acción de los aceites esenciales Chouhan, Sharma y Guleria (2017), refiere que varían de acuerdo al tipo y composición del aceite esencial y la cepa del microorganismo utilizado. Asimismo, señala que en comparación con las bacterias Gram negativas, las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los aceites esenciales, lo cual puede atribuirse al hecho de que las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa rígida, rica en lipopolisacáridos (LPS) y más compleja, lo que limita la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de ella, mientras que esta membrana extracompleja está ausente en las bacterias Gram positivas que, en cambio, están rodeadas por una pared gruesa de peptidoglicano no lo suficientemente densa para resistir pequeñas moléculas antimicrobianas, lo que facilita el acceso a la membrana celular. Además, las bacterias Gram positivas pueden facilitar la infiltración de compuestos hidrófobos del aceite esencial, debido a los extremos lipófilos del ácido lipoteicoico presente en la membrana celular. Basado en ello, se confirman los resultados obtenidos en la presente investigación, donde se observó una mayor sensibilidad de las bacterias Gram positivas, respecto a las Gram negativas.

Algunos autores han reportado la presencia de 3-Hexeno-1-ol en la composición de los aceites esenciales de diversas especies vegetales, este compuesto desempeña un papel importante en la mediación del

comportamiento de los herbívoros y sus enemigos naturales, y en la comunicación planta-planta para evitar nuevos ataques, todo esto en conjunto con otros componentes presentes en las especies vegetales. Por lo tanto, su uso es sugerido, principalmente, para el desarrollo de nuevas estrategias de control de insectos (Wei y Kang, 2011; Villalobos, Ramírez, Rojas, Santiago, Carmona y Avendaño, 2014; Andrade, Sampaio, Nogueira, Ribeiro, Bittrich y Amaral, 2006).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

De las hojas frescas de *Clusia minor* L, se obtuvieron 0,7 mL de aceite esencial puro, con un rendimiento del 0,039%.

Lográndose identificar 85,86% del total de compuestos del aceite esencial, constituido por sesquiterpenos (77,37%) y compuestos oxigenados (8,49%).

Se identificaron un total de 16 compuestos, encontrando como componentes mayoritarios: *trans*-cariofileno (14,73%), *γ*-germacreno-D (13,41%), δ -cadineno (12,95%), α -amorfeno (10,38%) y 3-Hexeno-1-ol (8,49%).

El aceite esencial obtenido de las hojas de *Clusia minor* L, mostró actividad antibacteriana frente a: *Staphylococcus aureus* (20 mm), *Enterococcus faecalis* (25 mm), *Escherichia coli* (8 mm), *Klebsiella pneumoniae* (11 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm).

El ensayo de la actividad antibacteriana mostró mayor efecto sobre las cepas Gram positivas, respecto a las Gram negativas. Siendo *Enterococcus faecalis*, el microorganismo más sensible.

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de *Clusia minor* L, abren la posibilidad de que esta planta pueda ser incluida como base en la formulación de fármacos.

Este es el primer reporte de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L.

Recomendaciones

Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L frente a microorganismos multirresistentes, causantes de enfermedades nosocomiales.

Probar otras actividades biológicas al aceite esencial de *Clusia minor* L, tales como: actividad antifúngica, antiinflamatoria, antiparasitaria, antioxidante, entre otras.

Investigar la composición química y actividad antibacteriana de las hojas de *Clusia minor* L, recolectada de otras localidades del país.

Realizar determinaciones de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Acuña, G. (2003). Evolución de la terapia con agentes antimicrobianos: qué fue, qué es y será. *Revista Chilena de Infectología*, 20 (1). Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003020100001
- Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud*, 14 (390-395). Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/47707/WHF_1993_14_4_p390-395_spa.pdf
- Albado, E., Saez, G. y Grabiell, A. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12 (1). Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2001000100004&script=sci_arttext
- Albornoz, A. (1997). *Medicina Tradicional Herbaria*. Caracas-Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A. División de fitoterapia y productos naturales.
- Albornoz, A. (2001). *Medicina Tradicional Herbaria*. Caracas-Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A. División de fitoterapia y productos naturales.
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33 (10). Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X14003413>

- Alvo, A., Téllez, V., Sedano, C. y Fica, A. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 76 (1). Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162016000100019
- Andrade, M., Sampaio, T., Nogueira, P., Ribeiro, A., Bittrich, V. y Amaral, M. (2006). Compuestos volátiles de las hojas, flores y frutos de *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). *Diario de sabores y fragancias*, 22 (1). Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.1751>
- Anon. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 1.
- Aparicio, R., Rojas, L., Usubillaga, A. y Lucena, M. (2018). Caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec. *Revista Facultad de Farmacia*, 81 (1/2). Recuperado de: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1007841>
- Arellano, J., Cardona, L. y Zuñiga, Y. (2017). Tinción de Gram y su importancia en la clasificación de bacterias para el tratamiento de patologías relacionadas. *Ciencia en blog*. Recuperado de: <http://cienciaenunitolima.blogspot.com/2017/08/blog-post.html>
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de Investigacion Introducción a la Metodología Científica*. Caracas-Venezuela: Editorial Episteme, C.A.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2 (3). Recuperado de: https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

- Badami, P., Corzo, A. y González, E. (2017). *Guía teórico práctica de problemas y ejercicios de química orgánica*. Santiago del Estero-Argentina: Segunda edición. Archivo digital.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493.
- Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismo de acción de los antibióticos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 27 (1). Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000177>
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización* (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid.
- Chouhan, S., Sharma, K. y Guleria, S. (2017). Actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales: estado actual y perspectivas futuras. *Medicamentos*, 4 (3). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5622393/>
- Claus, E. y Tyler, V. (1965). *Farmacognosia*. Quinta edición. Buenos Aires, Argentina. El ateneo Editorial. 164-210pag.
- Da Silva, G., Oliveira, B., Dias, C., Ferraz, D., Veras, D., Brayner, F., De Oliveira, J., Da Silva, M. y Dos Santos, M. (2020). Composición química, actividad antimicrobiana y efectos sinérgicos con antibióticos convencionales bajo aislamientos clínicos por aceite esencial de *Hymenaea rubriflora* Ducke (Fabaceae). *Investigación de Productos Naturales*, 1 (5). Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32081039-chemical-composition-antimicrobial-activity-and-synergistic-effects-with-conventional-antibiotics-under-clinical-isolates-by-essential-oil-of-hymenaea-rubriflora-ducke-fabaceae/>

- De Armas, H., Rodríguez, F., y Salazar, J. (2013). *Estudio fitoquímico preliminar y bioactividad de la planta Melochia villosa proveniente del estado Amazonas, Venezuela*. (Tesis de pregrado). Universidad de Oriente, Venezuela.
- De Oliveira, A., Oliveira, A., Cortez, L., Pessoa, M., Melo, H., y Figueredos, M. (2016). Actividad moduladora de los extractos de etanol de hojas de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) en medicamentos antimicrobianos. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21 (1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000100001
- Ehiabhi, S., Ismail, C., Oladosu, P., Egharevba, H., Ugbabe, G., Ibrahim, J. y Folashade, O. (2016). Constituyentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *Garcinia kola* Heckel (Clusiaceae) de Nigeria. *Sciencedomain international*, 13 (4). Recuperado de: <http://www.journalcsij.com/index.php/CSIJ/article/view/7385/13159>
- Fernandes, C., Cruz, R., Amaral, R., Carvalho, J., Santos, M., Tietbohl, L. y Rocha, L. (2016). Aceites esenciales de flores masculinas y femeninas de *Clusia hilariana*. *Química de compuestos naturales*, 52 (6). Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10600-016-1877-z>
- Fernández, C., Hernández, R. y Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación*. México: Editorial Mc Graw Hill.
- Ferreira, R., Carvalho, A., Riger, C., Castro, R., Da Silva, T. y Carvalho, M. (2016). Componentes químicos y actividad antioxidante *in vivo* de flavonoides aislados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). *Nueva Química*, 39 (9). Recuperado de:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000901093

- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud en la población de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77 (4). Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002
- Gil, R., Carmona, J. y Rodríguez, M. (2006). Estudio etnobotánico de especies tóxicas, ornamentales y medicinales de uso popular, presentes en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruíz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. *Boletín Antropológico*, 24 (68). Recuperado de: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/18567/articulo5.pdf?sequence=2>
- Gutiérrez, L. (2015). *Estado del arte del efecto antifúngico de extractos vegetales para el control de Fusarium oxysporum* (Monografía). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- Hernández, R., Lami, L., Pino, J. y Martínez, Y. (2015). Caracterización de extractivos en alcohol-benceno solubles en acetona del bagazo de la caña de azúcar mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. *Revista Centro Azúcar*, 1 (42). Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/caz/v42n1/caz05115.pdf>
- Hurtado, J. (2006). *Metodología de la Investigación Holística*. Caracas. Cuarta Edición. Fundación Sypal.
- Hurtado, J. (2010). *Guía para la Comprensión Holística de la Ciencia*. Caracas. Tercera Edición. Fundación Sypal.
- Hurtado, J. (2015). *El Proyecto de Investigación*. Caracas-Venezuela: Ediciones Quirón.

- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona-España: Ediciones Omega.
- Layne, J. y Castellano, J. (2019). *Staphylococcus aureus* meticilino resistente: del ambiente hospitalario a la comunidad. *Revista de Medicina Interna*, 23 (1). Recuperado de: <http://revista.asomigua.org/2014/09/14/staphylococcus-aureus-meticilino-resistente-del-ambiente-hospitalario-a-la-comunidad/>
- Levinson, W. (2006). *Microbiología e Inmunología médicas*. Madrid-España. Editorial McGraw-Hill.
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fipatógenos* (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana, Bogota D.C., Colombia.
- Llosa, Z. (2003). *Zoología general*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. Pág. 04
- Mangas, R., Bello, A., Cuesta, O., Piccinelli, A. y Rastrelli, L. (2008). Derivados de benzofenonas polipreniladas de frutas de *Clusia minor*. *Revista Latinoamericana de Farmacia*, 27 (5). Recuperado de: http://latamjpharm.org/trabajos/27/5/LAJOP_27_5_2_3_L95SQTD57A.pdf
- Mangas, R., Montes, R., Bello, A. y Nival, A. (2008). Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del Extracto Apolar de las Hojas de *Clusia minor* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27 (5). Recuperado de:

http://www.latamjpharm.org/trabajos/27/5/LAJOP_27_5_1_16_7K7XO SG1WA.pdf

- Mangas, R., Montes, R., Herrera, M., Bello, A., Hernández, I., Menéndez, R., Paz, M. y Rodeiro, I. (2018). Análisis GC/MS y propiedades bioactivas de extractos obtenidos de hojas de *Clusia minor* L. *Sociedad Química de México*, 62 (4). Recuperado de: <https://www.jmcs.org.mx/index.php/jmcs/article/view/544/551>
- Mangas, R., Reynaldo, G., Dalla, M., Aver, K., Piovesan, L., Bello, A., Rodeiro, I., Malheiros, A., Souza, M. y Menéndez, R. (2019). Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas y efectos antinociceptivos del extracto etanólico de las hojas de *Clusia minor* L. *Revista de investigación de farmacia y farmacognosia*, 7 (1). Recuperado de: <http://jppres.com/jppres/gcms-analysis-and-antinociception-of-clusia-minor/>
- Marcano, D. (2008). El Lado Positivo de las Bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39 (2). Recuperado de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200009
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas-Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Consejo de desarrollo científico y humanístico.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas-Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Consejo de desarrollo científico y humanístico.
- Marinoff, M. (2006). Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 53 (755). Recuperado de: <https://wouzi.com/document/2006-e-053-pdf-edami9f>

- Martínez, J., Castillo, G. y Nicolalde, F. (2015). *Flora de Veracruz*. México, D.F: Instituto de Ecología A.C.
- Miller, T. (2011). Nuevas pistas sobre la fuerza mortal de la cepa de *Escherichia coli* de Alemania. *PBS News Hours*. Recuperado de: <https://www.pbs.org/newshour/health/new-clues-to-deadly-strength-of-germany-e-coli-strain>
- Montemayor, A. (2013). *Metabolitos secundarios de especies de Clusia y su actividad sobre la enzima transcriptasa reversa y proteasa del VIH-1* (Tesis). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Monzote, L., Sariago, I., Montalvo, A., Garrido, N., Scull, R. y Abreu, J. (2004). Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56 (3). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000300014
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona-España: Editorial Elsevier.
- Oliveira, R., Carvalho, M. y Sarmento, T. (2012). Ocurrencia de biflavonoides en Clusiaceae: aspectos químicos y farmacológicos. *Nueva Química*, 35 (11). Recuperado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012001100035
- OMS. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. [Base de datos en línea]. Recuperado de: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- OMS. (2015). Los microorganismos y los antimicrobianos. [Base de datos en línea]. Recuperado de: https://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/

- OMS. (2017). Resistencia a los Antimicrobianos. [Base de datos en línea]. Recuperado de: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
- OMS. (2018). Resistencia a los antibióticos. [Base de datos en línea]. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina integral*, 36 (10). Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-10022180>
- Palá, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "Eryngium" L, en la Península Ibérica* (Tesis). Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España.
- Palella, S. y Martins, F. (2006). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas-Venezuela: FEDUPEL.
- Palella, S. y Martins, F. (2012). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas-Venezuela: FEDUPEL.
- Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I. y González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *Medisan*, 18 (10). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014001000019
- Pedraza, P. y Castellanos, H. (2009). *Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro* (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.
- Peña, C. (2005). Tipos de toxicidad y escalas de valoración. *Oncología*, 28 (2). Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352005000200004

- Peredo, H., Palou, E. y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 1 (3). Recuperado de: [https://udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Pino, N., Bueno, J., Zapata, B., Stashenko, E., Mesa, A., Montiel, J. y Martínez, C. (2007). Actividad in vitro anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia *Piperaceae*. *Scientia et Technica*, 1 (33). Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4813768>
- Puertas, M., Mosquera, N. y Rojano, B. (2016). Estudio de la capacidad antioxidante in vitro de *Phaseolus vulgaris* L (Frijol). Mediante extracción asistida por microondas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21 (1). Recuperado de: scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000100005
- Ramírez, J., García, C., Vizcaíno, J., Cárdenas, J., Gutiérrez, F., Mariel, H. y Villagrán, S. (2012). ¿Qué son y para qué sirven los antioxidantes?. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 25 (2). Recuperado de: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/antioxidantes/>
- Ramírez, L. y Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Redalyc*, 15 (42). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Reanmongkol, W. y Wattanapiromsakul, C. (2008). Evaluación de las actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias de los extractos del pericarpio de *Garcinia mangostana* Linn. (Clusiaceae) en animales de experimentación. *Songklanakarin Journal of Science and*

- Technology*, 30 (6). Recuperado de:
https://www.researchgate.net/publication/26593833_Evaluation_of_the_analgesic_antipyretic_and_anti-inflammatory_activities_of_the_extracts_from_the_pericarp_of_Garcinia_mangostana_Linn_in_experimental_animals
- Reyes, R. y Huerta, M. (2009). Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia*, 34 (6). Recuperado de:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000600005
- Rincón, C., Castaño, J. y Ríos, E. (2012). Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17 (2). Recuperado de:
<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v17n2/pla05212.pdf>
- Rocha, E. (2017). *Producción de bioproductos con actividad antimicrobiana a partir del extracto de las hojas de Platonía insignis Mart. (Bacuri)* (Maestría en Biotecnología). Universidad Federal de Tocantins, Gurupi.
- Romero, R., Fernández, J., Plaza, P., Garrido, A. y Martínez, J. (2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española de Salud Pública*, 81 (5). Recuperado de:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272007000500004
- Salkind, N. (1999). *Métodos de Investigación*. México: Prentice Hall.
- Santana, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T. y Orellana, A. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de

- Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14 (3). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962009000300007&script=sci_arttext&tlng=pt
- Sánchez, E., Castillo, S. y García, P. (2016). *Investigación en Plantas de Importancia Médica*. Barcelona-España: Ediciones OmniaScience.
- Satalaya, J., Rojas, J., Ríos, B., Grandez, M., Rengifo, E., Ruíz, G., Gutiérrez, D., Giménez, A. y Flores, N. (2009). Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. *Biofarbo*, 17 (2). Recuperado de: <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v17n2/v17n2a04.pdf>
- Scio, E. (2004). Cumarinas encontradas en el género *Kielmeyera* (Clusiaceae). *Revista Brasileña de Farmacia*, 85 (1). Recuperado de: http://rbfarma.org.br/files/pag_27a31.pdf
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3). Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejías, A. y Suárez, D. (2018). *Productos Naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Bogotá D.C-Colombia: Fundación Universitaria Agraria de Colombia: UNIAGRARIA
- Superbacterias, la nueva amenaza infecciosa. (2018). OpenMind BBVA, Ciencia-Biociencias. [Base de datos en línea]. Recuperado de: <https://www.bbvaopenmind.com/ciencia/biociencias/superbacterias-la-nueva-amenaza-infecciosa/>
- Tafur, J., Torres, J. y Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones Médicas, CIDEM*, 12 (3). Recuperado de: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua->

cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf

Universidad Nacional de Colombia. (2012). *Clusia minor* L, Clusiaceae. [Base de datos en línea]. Recuperado de: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/602267/>

Vargas, J. y Andrade, J. (2006). *Clusia* en México, la historia de un exilio. *Redalyc*, 1 (83). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408307.pdf>

Villalobos, D., Ramírez, I., Rojas, L., Santiago, B., Carmona, J. y Avendaño, M. (2014). Composición del aceite esencial y caracterización físicoquímica de las hojas de *Stachytarpheta mutabilis* (Jacq.) Vahl. *Avances en Química*, 9 (1). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/933/93330767006.pdf>

Wei, J. y Kang, L. (2011). Roles de (Z)-3-Hexenol en las interacciones planta-insecto. *Señalización y comportamiento de las plantas*, 6 (3). Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/49967118_Roles_of_Z-3-hexenol_in_plant-insect_interactions

Win, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E. y Schreckenberger, P. (2001). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color*. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Zambrana, T. (2005). Beneficios de la fitoterapia. *Revista cubana de plantas medicinales*, 10 (2). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200001