

Artículo original

Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clusia minor* L.

Chemical composition and antibacterial activity of *Clusia minor* L. essential oil.

Cordero Yndra^{1*}, Pérez-Colmenares Alida², Obregón-Díaz Ysbelia², †Rojas-Fermín Luis², Aparicio-Zambrano Rosa², Hernández-Mejías Johanna¹, Palencia Miguel Eduardo¹, Salazar-Vivas Emilio³.

¹Departamento de Bioanálisis Clínico. Catedra de Bioquímica General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, C.P. 5101, Venezuela. ²Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal. Instituto de Investigaciones, “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, Venezuela. ³Instituto de Investigaciones, “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, Venezuela.

Recibido: 12 de septiembre de 2024–Aceptado: 15 de noviembre de 2024

RESUMEN

El aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L., recolectada en el Estado Mérida-Venezuela, fue obtenido mediante la técnica de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger y su composición química se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se obtuvo un rendimiento de 0,047%, los componentes mayoritarios fueron identificados como β -cariofileno (14,73%), germacreno-*D* (13,41%), δ -cadineno (12,95%), α -amorfenol (10,38%) y 3-hexeno-1-ol (8,49%). La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar con disco frente a cepas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional. Los resultados evidencian que el aceite esencial puro de *C. minor* fue activo frente a todas las cepas bacterianas evaluadas con halos de inhibición de 20 mm (*Staphylococcus aureus*), 25 mm (*Enterococcus faecalis*), 8 mm (*Escherichia coli*), 11 mm (*Klebsiella pneumoniae*) y 12 mm (*Pseudomonas aeruginosa*). La concentración inhibitoria mínima fue de 125 μ g/mL para *S. aureus* y *E. faecalis* mientras que para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* fue de 250 μ g/mL.

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

PALABRAS CLAVE

Clusiaceae, *Clusia minor* L, aceite esencial, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

The essential oil from the leaves of *Clusia minor* L., collected in the State of Mérida-Venezuela, was obtained by the hydrodistillation technique using the Clevenger trap and its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. A yield of 0.047% was obtained, the majority components were identified as β -caryophyllene (14.73%), germacrene-*D* (13.41%), δ -cadinene (12.95%), α -amorphene (10.38%) and 3-hexene-1-ol (8.49%). The antibacterial activity was evaluated by the disc agar diffusion method against Gram-positive and Gram-negative strains of international reference. The results show that the pure essential oil of *C. minor* was active against all the bacterial strains evaluated with inhibition halos of 20 mm

(*Staphylococcus aureus*), 25 mm (*Enterococcus faecalis*), 8 mm (*Escherichia coli*), 11 mm (*Klebsiella pneumoniae*) and 12 mm (*Pseudomonas aeruginosa*). The minimum inhibitory concentration was 125 µg/mL for *S. aureus* and *E. faecalis* while for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* it was 250 µg/mL. This is the first report on the chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Clusia minor* L.

KEY WORDS

Clusiaceae, *Clusia minor* L, essential oil, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

La familia Clusiaceae reporta alrededor de 30 géneros y 1150 especies, es endémica de América del Sur e incluye árboles, arbustos, hierbas y lianas de interés medicinal, diversas especies han sido usadas para el tratamiento del cáncer, procesos inflamatorios, infecciones y obesidad [1]. Los géneros con mayor número de especies son *Neonate*, *Caraip*, *Mahurea*, *Calophyllum*, *Vismia*, *Hypericum*, *Marila*, *Clusiella*, *Symphonia*, *Lorostemon*, *Moronobea*, *Platonía*, *Garcinia*, *Tovomita*, *Chrysochlamys* y *Clusia* [2]. El género *Clusia* comprende alrededor de 321 especies agrupadas en varias secciones taxonómicas, se caracterizan por ser plantas leñosas terrestres y hemiepífitas, se distribuyen a lo largo del Neotrópico en una amplia gama de hábitats, desde bosques de tierras bajas hasta bosques montañosos, así como páramos de gran elevación [3]. Las infusiones de las hojas de especies de *Clusia* son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades reumáticas, como purgante y para curar heridas [4]. Estudios previos de varias especies de este género revelan la presencia de benzofenonas preniladas, flavonoides, terpenos y esteroides. De igual modo, se ha reportado versatilidad en cuanto a actividades biológicas, lo que hace de este género una fuente interesante de compuestos activos que pueden ser usados con diversos fines [5-8].

La especie *Clusia minor* L. es un arbusto silvestre con escasos estudios fitoquímicos, se ha identificado en el extracto de hexano de las hojas metabolitos secundarios como esteroides (sitosterol, estigmasterol), triterpenos (lupeol, α -amirina, friedelina, epifriedelinol) y compuestos volátiles (β -selineno, β -maalieno, espatulenol, δ -cadineno y γ -cadineno) [9]. El látex y las hojas de esta especie son empleados en la medicina tradicional para el tratamiento de verrugas [10]. En la presente investigación se determinó la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Las hojas de *Clusia minor* L. se recolectaron en el sector La Mata, Municipio Libertador, del Estado Mérida. Una muestra testigo fue depositada e identificada como *Clusia minor* L. por el Dr. Pablo Meléndez en el Herbario MERF “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Voucher YC01).

Extracción y análisis del aceite esencial: Las hojas frescas de *C. minor* (2549,0 g) se licuaron y se sometieron a un proceso de extracción mediante la técnica de hidrodestilación durante 3 horas, empleando la trampa de Clevenger. El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM), se realizó en un equipo marca Hewlett Packard 6890, acondicionado con una 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. 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) [11,12].

Actividad antibacteriana: La actividad antibacteriana del aceite esencial puro fue evaluada por el método de difusión en agar con discos [13] frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); y Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) proporcionadas por el Departamento de

Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. El ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Müller-Hinton a 37°C. El inóculo bacteriano fue ajustado con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL). Cada inóculo se diseminó sobre la superficie de una placa que contenía agar Müller-Hinton y luego se colocaron los discos (6 mm diámetro) previamente impregnados con el aceite esencial puro, el control negativo (dimetilsulfóxido) y el disco estándar de los antibióticos de referencia (Eritromicina®, Ampicilina® y Piperacilina®) como control positivo para cada una de las bacterias. El medio de cultivo inoculado se sometió a preincubación durante 18 horas, posteriormente se incubaron las placas por 24 horas y se realizó la lectura de los halos de inhibición alrededor del disco y se expresó en mm. Los ensayos se realizaron por duplicado. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se

determinó frente a aquellos microorganismos que mostraron sensibilidad, preparando diluciones del AE en el rango de concentración de 10000 µg/mL a 125 µg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del aceite esencial: El rendimiento del aceite esencial (AE) calculado en base al peso del material fresco fue de 0,047% (1,2 mL), el análisis por CG/EM (Figura 1) permitió identificar 28 compuestos, que se clasificaron en sesquiterpenos hidrocarbonados (84,31%), sesquiterpenos oxigenados (7,18%) e hidrocarburos oxigenados (8,49%), lo cual representó la identificación del 99,98% del total del aceite obtenido (Tabla 1), siendo los componentes mayoritarios el β -cariofileno (14,73%), germacreno-D (13,41%), δ -cadineno (12,95%), α -amorfeno (10,38%) y 3-hexeno-1-ol (8,49%).

TABLA 1

Composición química del aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L.

N° Pico	Nombre del Compuesto	T.R (min)	% Área	IKtab	IKcal
1	3-hexeno-1-ol	3,71	8,49	850	856
2	δ -elemeno	16,94	1,79	1335	1336
3	α -copaeno	18,16	2,54	1374	1373
4	β-cariofileno	19,57	14,73	1417	1415
5	γ -elemeno	19,81	0,80	1436	1429
6	aromadendreno	20,23	1,08	1441	1443
7	α -humuleno	20,49	1,28	1452	1454
8	allo-aromadendreno	20,57	3,29	1460	1455
9	δ -muuruleno	21,18	0,93	1479	1474
10	α-amorfeno	21,29	10,38	1483	1478
11	germacreno-D	21,46	13,41	1484	1481
12	β -selineno	21,58	1,10	1490	1487
13	<i>trans</i> muurola-4(14),5-dieno	21,65	1,61	1493	1489
14	α -selineno	21,72	4,28	1498	1491
15	<i>cis</i> - β -guaieno	21,83	4,23	1490	1494
16	α -muuroleno	21,98	1,82	1500	1499
17	β -curcumeno	22,19	1,95	1522	1506
18	γ -cadineno	22,39	3,02	1513	1512
19	δ-cadineno	22,70	12,95	1522	1522
20	<i>trans</i> cadina-1,4-dieno	22,92	0,64	1534	1533
21	selina-3,7(11)-dieno	23,07	0,85	1546	1538
22	germacreno-B	23,64	1,63	1561	1558
23	cariofilenol	23,81	0,55	1572	1563
24	rosifolio	24,67	0,92	1600	1592
25	junenol	25,41	1,60	1619	1618
26	1-epi-cubenol	25,61	1,24	1628	1626
27	α -muurolol	26,05	1,39	1646	1642
28	α -cadinol	26,41	1,48	1654	1655

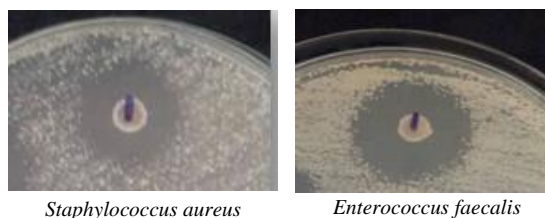
T.R: Tiempo de retención de los componentes (min: minutos). % Área: área relativa. IKtab: Índice de Kováts tabulado tomado de la bibliografía (Adams, 2007). IKcal: Índice de Kováts calculado con la temperatura programada en la columna HP-5MS.

TABLA 2

Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L.

Bacterias (ATCC)	Halo de inhibición (mm)				
	AE <i>Clusia minor</i>	Antibióticos comerciales (Control positivo)			CIM ($\mu\text{g/mL}$)
		E (15 μg)	AMP (10 μg)	PIP (100 μg)	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	32	-	-	125
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	25	-	32	-	125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	-	-	27	250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	11	-	-	27	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	-	-	27	250

AE: aceite esencial. mm: milímetros. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima. E: Eritromicina® 15 μg . AMP: Ampicilina® 10 μg . PIP: Piperacilina® 100 μg .

Fig. 2. Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L frente a bacterias Gram positivas (Fuente: Propia)Fig. 3. Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L frente a bacterias Gram negativas (Fuente: Propia)

Sin embargo, no hay evidencia que concluya que las bacterias Gram positivas siempre son las más sensibles, diversos autores postulan que los componentes individuales de los AE exhiben diferentes grados de actividad contra los microorganismos y se sabe que la composición química de los AE de una especie de planta particular puede variar según el origen geográfico y período de recolección. Es por tanto posible que la variación en la composición entre AE de una misma especie es suficiente para causar variabilidad en el grado de susceptibilidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas [16].

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del AE de *Clusia minor* L obtenidos en el presente estudio pueden atribuirse al

sinergismo de los componentes mayoritarios, los sesquiterpenos hidrocarbonados que representan un 84,31% del total del aceite, en relación al mecanismo de acción de los AE como agentes antibacterianos, se debe considerar que debido a la composición química de los mismos no presentan un mecanismo específico, en este caso se presume que podría estar dirigido a inhibir la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram positivas, facilitando de este modo la penetración de las sustancias hidrófobas. De acuerdo con la literatura consultada, este es el primer reporte sobre actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las hojas de *Clusia minor* L.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de las hojas de *Clusia minor* L. está constituido por sesquiterpenos hidrocarbonados (84,31%), sesquiterpenos oxigenados (7,18%) e hidrocarburos oxigenados (8,49%), los componentes mayoritarios están representados por el β -cariofileno (14,73%), germacreno-*D* (13,41%), δ -cadineno (12,95%), α -amorfenol (10,38%) y 3-hexeno-1-ol (8,49%). El aceite esencial puro presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* con una concentración inhibitoria mínima que estuvo entre 125-250 $\mu\text{g/mL}$. Este es el primer estudio sobre la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de esta planta, constituyendo un aporte que permite incentivar futuras investigaciones sobre los aspectos fitoquímicos, toxicológicos y farmacológicos de especies del género *Clusia*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal y al Laboratorio de Actinomicetos ambos pertenecientes al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, así como, el Dr. Pablo Meléndez en el Herbario MERF “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, y al Cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Oliveira R, Carvalho M, Sarmento T. Ocurrencia de biflavonoides en Clusiaceae: aspectos químicos y farmacológicos. *Quim Nova*. 2012; 35 (11): 2271-2277.
- [2] Montemayor A. Metabolitos secundarios de especies de *Clusia* y su actividad sobre la enzima transcriptasa reversa y proteasa del VIH-1 [Tesis pregrado]. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 2013.
- [3] Luján M, Leverett A, y Winter K. Forty years of research into Crassulacean acid metabolism in the genus *Clusia*: anatomy, ecophysiology and evolution. *Ann Bot*, 2023; 132(4): 739-752.
- [4] De Alcántara A, Brasil C, Silva L, Nakamura M, de Souza M, de Macêdo A. Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nitida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. *Flora: Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants.*, 2013; 208(3): 165-173.
- [5] Da Silva M, Paiva S. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. *An Acad Bras Cienc*, 2012; 84, 609-616.
- [6] Ribeiro P, Ferraz C, Guedes M, Martins D, Cruz, F. New biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. *Fitoterapia*, 2011; 82(8): 1237-1240.
- [7] Silva E M, Araújo, R M, Freire-Filha L G, Silveira E R, Lopes N P, Paula J E D, Espindola L S. Clusiexanthone and tocotrienol series from *Clusia pernambucensis* and their antileishmanial activity. *J Braz Chem Soc*, 2013; 24: 1314-1324
- [8] Dos Santos I, Silva M, Ferraz C, y Ribeiro P. Flavonoids, biphenyls and xanthenes from the genus *Clusia*: chemistry, biological activities and chemophenetics relevance. *Nat Prod Res*. 2024; 18: 1-14.
- [9] Mangas R, Montes P, Bello A, Nival V A. Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. *Lat Am J Pharm*, 2008; 27(5): 747-51.
- [10] Gutiérrez Y, González J. Plantas medicinales y productos naturales. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. 2019; 5(1): 181.
- [11] Adams, R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois (USA). 2007; p 1-809.
- [12] Kováts, E. Retentions indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone.

- Helv Chim Acta. XLI. 2008; 1915-1930.
- [13] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. 30th. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. [Página Web] 2020 [acceso: 5 de noviembre de 2020]. Disponible en: https://www.clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf
- [14] Nogueira P, Bittrich V, Shepherd G, Lopes A Marsaioli A. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochemistry*. 2001; 56(5), 443-452.
- [15] Dahham S, Tabana Y, Iqbal M, Ahamed M, Ezzat M, Majid A, Majid A. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 2015; 20(7):11808-11829.
- [16] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J Food Microbiol*, 2004; 94(3): 223-253
- [17] Fernández F, López J, Ponce L Machado C. Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit.*, 2003; 32(1): 44-48. [2] Agencia Europea del Medio Ambiente (AEMA). Señales de la AEMA 2020. Hacia una contaminación cero en Europa. 2020. [Acceso el 07 de agosto 2023]. Disponible en: <https://www.eea.europa.eu/es/publications/senales-de-la-aema-20203>.
- Cordero Yndra Elena:** Dra. En Ciencias Aplicadas. MSc. En Biología y Salud. Farmacéutico. Profesora Titular adscrita al Departamento de Bioanálisis Clínico. Correo: yndracpdero@gmail.com. **ORCID ID:** 0000-0001-7015-2796
- Pérez Colmenares Alida Alejandra:** Dra. En Química Aplicada. MSc. En Química de Medicamentos, Farmacéutico. Profesora Asociado adscrita al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Correo: alidaperez@gmail.com. **ORCID ID:** 0000-0001-8910-4663
- Obregón Díaz Ysbelia Miyeli:** Dra. En Química de Medicamentos. Farmacéutico. Profesora Agregado adscrita al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Correo: ysbeliaobregon@gmail.com. **ORCID ID:** 0000-0001-6152-6696
- Rojas Fermín Luis Beltrán:** Dr. En Química Orgánica. MSc. En Química de Medicamentos. Farmacéutico. Profesor Titular adscrito al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” **Orcid ID:** 0000-0003-4508-1927.
- Aparicio Zambrano Rosa Lizbeth:** MSc. En Química de Medicamentos, Dra. En Química Aplicada. Farmacéutico. Investigador en Ciencias Básicas, Naturales y Aplicadas. Correo: apariciorosa12@gmail.com. **ORCID ID:** 0000-0002-5020-0954
- Hernández Mejías Johanna Carolina:** Dra. En Química Aplicada. Farmacéutico. Profesora Asistente de Bioquímica General del Departamento de Bioanálisis Clínico. Correo: hjohannacarolina@gmail.com. **ORCID ID:** 0009-0001-0725-2484
- Palencia Miguel Eduardo:** Supervisor de Laboratorio de Bioquímica General. Farmacéutico. Correo: palenciaeduardo13@gmail.com. **ORCID ID:** 0009-0005-2923-2125
- Salazar Vivas José Emilio:** Técnico Medio, Auxiliar de laboratorio. Laboratorio de Actinomicetos, Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Correo: joseemiliosalazarv@gmail.com. **ORCID ID:** 0000-0001-8077-7386