

**ESTUDIO FITOQUÍMICO, ANTIBACTERIANO, ANTIFÚNGICO Y DETERMINACIÓN DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS POR CG-EM DEL LÁTEX DE LA  
ESPECIE DIOICA *Clusia multiflora* Kunth (CLUSIACEAE)**

**Deisy Katherine Lobatón**

**Andrea Márquez Peña**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DEL MEDIO  
AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES  
PROYECTO CURRICULAR INGENIERÍA FORESTAL  
BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA  
2022**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO, ANTIBACTERIANO, ANTIFÚNGICO Y DETERMINACIÓN DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS POR CG-EM DEL LÁTEX DE LA  
ESPECIE DIOICA *Clusia multiflora* Kunth (CLUSIACEAE)**

**Deisy Katherine Lobatón - 20142010071**

**Andrea Márquez Peña - 20171710003**

**Trabajo de grado en modalidad de investigación-innovación como requisito para optar por el título  
de Ingenieros Forestales**

**DIRECTOR**

**ANTONIO JOSÉ GUZMÁN AVENDAÑO  
MSc. Ciencias Biológicas/Fitoquímica**

**Profesor Asociado**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DEL MEDIO  
AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES  
PROYECTO CURRICULAR INGENIERÍA FORESTAL  
Bogotá, D.C., Colombia  
2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

Inicialmente agradecemos a nuestras familias por su apoyo incondicional en todo el proceso de formación académica.

Al profesor Antonio Guzmán, por sus aportes profesionales y constancia para lograr el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y todos los profesores que nos permitieron crecer académica y personalmente.

Al semillero de Investigación Química de los Productos Forestales, a la Fundación Universitaria Juan N. Corpas, y especialmente a Luz Andrea García Caicedo, por su asesoramiento en este proyecto de Investigación.

## RESUMEN

*Clusia multiflora* es una especie dioica originaria de Colombia. Tradicionalmente su exudado ha sido utilizado en el proceso de tinturación de lanas, y medicinalmente como purgante, antiinflamatorio y cicatrizante (DAMA, 2000). En estudios anteriores (Lokvam & Braddock, 1999; Lokvam *et al.* 2000), se ha encontrado actividad antibacteriana en los extractos etanólicos del látex de ambos sexos de las especies del género *Clusia*, sin embargo, no se reportan trabajos de este tipo para *C. multiflora*. En este estudio, la actividad antibacteriana y antifúngica presente en el extracto etanólico del látex de la especie dioica *C. multiflora*, fueron investigadas. La metodología se realizó en cuatro fases, la primera, a través de pruebas fitoquímicas preliminares las cuales arrojaron la presencia de los metabolitos secundarios taninos, flavonoides y quinonas, principalmente, en los extractos etanólicos de ambos individuos. La segunda fase consistió en la aplicación del método propuesto por Kirby–Bauer modificado, de difusión en agar por perforación en placa contra las bacterias Gram (+) *Bacillus subtilis* y Gram (-) *Escherichia coli*. La tercera fase fue llevada a cabo con la técnica de difusión en pozo en medio Sabouraud Glucosa Agar, contra el hongo *Fusarium oxysporum*. Y finalmente, se determinaron los metabolitos secundarios mayoritarios por medio de la Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Se determinó que los extractos etanólicos de ambos sexos de *C. multiflora* presentan actividad contra la bacteria Gram (+) *B. subtilis* y, por el contrario, no presentan actividad contra la bacteria Gram (-) *E. coli*, a su vez ambos sexos de *C. multiflora* presentan actividad contra el hongo *Fusarium oxysporum*. Se encontraron las Quinonas como metabolito secundario mayoritario, específicamente Clusianonas (7-epi-clusianona y 18,19-dihidroxi-clusianona), según lo encontrado por la CG-EM. Los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura para las especies pertenecientes a la familia CLUSIACEAE.

### Palabras clave

Actividad antibacteriana, actividad antifúngica, *Clusia multiflora*, fitoquímica, látex, metabolitos secundarios.

## **Abstract**

*Clusia multiflora* is a dioecious species native to Colombia. Traditionally its exudate has been used in the process of wool dyeing, and medicinally as purgative, anti-inflammatory and healing (DAMA, 2000). In previous studies (Lokvam & Braddock, 1999, Lokvam et al., 2000), antibacterial activity has been found in the ethanolic extracts of the latex of both sexes of the species of the genus *Clusia*, however, no work of this type is reported for *C. multiflora*. In this study, the antibacterial and antifungal activity present in the ethanolic extract of the latex of the species *C. multiflora*, were investigated. The methodology was carried out in four phases, the first through preliminary phytochemical tests which showed the presence of the secondary metabolites tannins, flavonoids and quinones in the ethanolic extracts of both individuals. The second phase consisted in the application of the method proposed by Kirby–Bauer modified, of diffusion in agar by perforation in plate against the bacteria Gram (+) *Bacillus subtilis* and Gram (-) *Escherichia coli*. The third phase was carried out with the well diffusion technique in Sabouraud Glucose Agar medium, against the fungus *Fusarium oxysporum*, and finally, the main secondary metabolites were determined with the technique Gas Chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

It was determined that the ethanolic extracts of both sexes of *C. multiflora* have activity against the Gram (+) bacterium *B. subtilis* and, on the contrary, do not present activity against the Gram (-) bacterium *E. coli*. Both sexes of *C. multiflora* show activity against the fungus *Fusarium oxysporum*. And Quinones were found as the main secondary metabolite, specifically Clusianones (7-epi-clusianona y 18,19-dihidroxi-clusianona), as found by CG-EM. The results coincide with those reported in the literature for the species belonging to the CLUSIACEAE family.

## **Key words**

*Antibacterial activity, antifungal activity, Clusia multiflora, phytochemistry, latex, secondary metabolites.*

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. GENERAL.....	11
3.2. ESPECÍFICOS.....	11
4. ESTADO DEL ARTE.....	12
4.1. FAMILIA CLUSIACEAE.....	12
4.1.1. Características de la familia.....	12
4.1.2. Características de <i>Clusia multiflora</i> .....	12
4.1.2.1. Descripción botánica.....	12
4.1.2.2. Especie dioica .....	13
4.1.2.3. Distribución geográfica.....	13
4.1.2.4. Fitoquímica .....	14
4.1.2.5. Usos.....	14
4.2. GENERALIDADES METABOLITOS SECUNDARIOS.....	15
4.2.1. Metabolismo secundario.....	15
4.2.2. Metabolito secundario .....	16
4.2.3. Importancia de los metabolitos secundarios.....	16
4.3. EXTRACTOS.....	17
4.3.1. Características de los extractos.....	17
4.3.2. Métodos de extracción .....	17
4.4. COMPUESTOS ACTIVOS EN EL ÁMBITO MEDICINAL E INDUSTRIAL.....	17
4.4.1. Fenoles.....	17
4.4.2. Cumarinas .....	18
4.4.3. Alcaloides .....	19
4.4.4. Terpenoides .....	19
4.4.5. Flavonoides .....	20
4.4.6. Quinonas.....	22
4.4.6.1. Clusianonas.....	23
4.4.7. Taninos.....	24
4.4.8. Cardiotónicos.....	25

4.5.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	26
4.5.1.	Actividad antifúngica.....	26
4.5.1.1.	<i>Fusarium oxysporum</i> :.....	26
4.5.2.	Actividad antibacteriana .....	27
4.5.2.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	27
4.5.2.2.	<i>Bacillus subtilis</i> .....	27
5.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
5.1.	LOCALIZACIÓN DE LOS INDIVIDUOS DE <i>Clusia multiflora</i> Kunth .....	28
5.2.	RECOLECCIÓN DEL LÁTEX .....	29
5.3.	ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	29
5.4.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	30
5.4.1.	Actividad antifúngica.....	30
5.4.1.1.	Determinación de la actividad antifúngica .....	30
5.4.2.	Evaluación antibacteriana.....	31
5.4.2.1.	Determinación de la actividad antibacteriana.....	31
5.5.	EVALUACIÓN CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	31
5.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
6.1.	ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	32
6.2.	PRUEBA ANTIFÚNGICA.....	34
6.3.	PRUEBA ANTIBACTERIANA .....	36
7.	APORTE AL CONOCIMIENTO DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Clusia multiflora</i> .....	43
8.	CONCLUSIONES.....	45
9.	RECOMENDACIONES.....	45
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Individuo de <i>Clusia multiflora</i> .....	12
<b>Figura 2.</b> a. Flor del individuo femenino b. Flor del individuo masculino de <i>C. multiflora</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Distribución de <i>Clusia multiflora</i> en Colombia.....	14
<b>Figura 4.</b> Estructura química del fenol.....	18
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la cumarina.....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura química del alcaloide Anhalonina. (Derivado de la Tirosina).....	19
<b>Figura 7.</b> Estructura química del isopreno (2-metil-1,3-butadieno).....	20
<b>Figura 8.</b> Estructura química de los flavonoides.....	21
<b>Figura 9.</b> Nomenclatura de los flavonoides.....	21
<b>Figura 11.</b> Nomenclatura de las quinonas.....	23
<b>Figura 13.</b> Estructura de la Clusianona.....	24
<b>Figura 15.</b> Estructura de a) <i>Ácido gálico</i> . b) <i>Ácido elágico</i> .....	24
<b>Figura 16.</b> Estructura química de un tanino hidrolizable, pentagalol-glucosa.....	24
<b>Figura 17.</b> Unidades constituyentes de los taninos condensados a. <i>Flavan-3-ol</i> . b. <i>Epicatecol</i> .....	25
<b>Figura 19.</b> a. Digitoxina y b. Digoxina.....	26
<b>Figura 21.</b> Resultados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos de <i>Clusia multiflora</i> .....	33
<b>Figura 22.</b> Diagrama del halo de inhibición para <i>F. oxysporum</i> .....	35
<b>Figura 23.</b> Diagrama de caja de los diámetros de inhibición de los individuos femeninos y masculinos de la especie <i>Clusia multiflora</i> .....	36
<b>Figura 24.</b> Diagrama del halo de inhibición para <i>B. subtilis</i> .....	38
<b>Figura 25.</b> Diagrama del halo de inhibición para <i>E. coli</i> .....	38
<b>Figura 26.</b> Diagrama de caja para los individuos de <i>C. multiflora</i> . a. <i>B. subtilis</i> y b. <i>E. coli</i> .....	40
<b>Figura 27.</b> Diagrama de la determinación de metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo femenino de <i>C. multiflora</i> .....	41
<b>Figura 28.</b> Diagrama de la determinación de metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo masculino de <i>C. multiflora</i> .....	42
<b>Figura 29.</b> a. 7-epi-clusianona. b. 18,19-dihidroxi-clusianona.....	42



## 1. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con una gran diversidad florística, y por ende se ha constituido en una fuente de conocimiento desde siempre, en principio por las comunidades quienes tenían sistemas tradicionales de saberes sobre el aprovechamiento, uso, manejo y propiedades de las plantas, y poco a poco por los investigadores, quienes se han dedicado a estudiar la interacción de las culturas con el medio natural. Así entonces, como resultado de dicha investigación una de las aplicaciones se da en la industria farmacéutica, donde muchos de los extractos de diferentes plantas utilizados tradicionalmente dieron paso a la medicina moderna. Sin embargo, en la actualidad y debido a las modificaciones antrópicas al medio natural, gran parte del conocimiento y la manera de transmitirlo, se ha ido perdiendo. Por esta razón, la investigación en países tan diversos como Colombia, es clave para la utilización de las especies como estrategia de conservación, y su aprovechamiento en beneficio de la sociedad.

En la actualidad existe información limitada en cuanto a los componentes y propiedades químicas de una gran cantidad de plantas de uso común (Mattos, 2019). El conocimiento de la composición química de diferentes órganos vegetales proporciona información valiosa para aclarar la funcionalidad de los metabolitos secundarios y sus diferentes usos potenciales en la industria. Así mismo, existe una necesidad creciente para controlar infecciones bacterianas, razón por la cual se recurre a la fitoquímica y fitofarmacología con el fin de encontrar nuevas moléculas o compuestos que permitan el avance en este campo (Ávila *et al.* 2006).

Una de las familias utilizadas en la etnobotánica por sus propiedades medicinales es la familia CLUSIACEAE, la cual se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo (Gustafsson, 2009). A nivel mundial, en muchos estudios se reporta la actividad antibacteriana y antifúngica presente en el látex de diferentes especies del género *Clusia* (Lokvam & Braddock, 1999; Lokvam *et al.* 2000; Mosquera *et al.*, 2009), sin embargo, en Colombia sólo se encuentran unos pocos estudios fitoquímicos sobre órganos como los primordios foliares (Bonilla, 2002) o su sistemática (Medellín, 2015).

Este trabajo de grado se basa en estudiar la fitoquímica preliminar y la determinación de los metabolitos secundarios mayoritarios por CG-EM del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie forestal *C. multiflora* y su potencial antibacterial y antifúngico, para demostrar la capacidad inhibitoria que ejercen estas sustancias obtenidas de estas plantas contra los microorganismos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y el hongo *Fusarium oxysporum*. Además, se realiza la identificación de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes responsables de su actividad.

## 2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Colombia es un país con un especial potencial etnobotánico, ya que sus bosques ocupan más de la mitad del territorio, la flora de este país es de las más ricas del mundo, y el 99% de su territorio son áreas rurales (IGAC, 2015). Por estas razones, el reconocimiento y estudio de los recursos naturales, la flora en especial para este documento, representa una gran oportunidad de descubrir diferentes usos en favor de la conservación de las especies y su uso sostenible.

Una de las familias presentes en todo el mundo, y que ha tenido reconocimiento por su actividad medicinal es la familia CLUSIACEAE. Diferentes géneros pertenecientes a esta familia, han presentado actividad antibacteriana y cicatrizante (Lokvam & Braddock, 1999; Lokvam *et al.* 2000) sin embargo, en Colombia sólo se encuentran unos pocos estudios acerca de su fitoquímica y actividad antifúngica (Bonilla, 2002; Mosquera *et al.*, 2009) o su sistemática (Medellín, 2015).

En los estudios mencionados anteriormente (Lokvam & Braddock, 1999; Lokvam *et al.* 2000), los autores encontraron que existen diferencias en la actividad antibacteriana que presentan los individuos femeninos y masculinos de la misma especie perteneciente al género *Clusia*. Esta condición permite evitar la autopolinización y puede llevar a una evolución independiente en las funciones de los individuos masculinos y femeninos (Nicotra 1998; Meagher *et al.*, 1982).

El género *Clusia* comprende alrededor de 300 a 400 especies de distribución neotropical, especialmente en América Central y del Sur (Ferraz *et al.* 2021). En Colombia, la especie *Clusia multiflora* ha sido utilizada tradicionalmente como purgante, antiinflamatorio y cicatrizante (DAMA, 2000), pero no se encuentran estudios que sustenten dicha actividad.

Con base en lo anterior y en aras de aportar información sobre la especie *C. multiflora*, se evaluó la actividad antibacteriana contra las bacterias Gram (+) *Bacillus subtilis* y Gram (-) *Escherichia coli*, su actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y se realizó la determinación de los metabolitos secundarios mayoritarios de los individuos femeninos y masculinos de la especie *C. multiflora* por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GENERAL

Realizar el estudio fitoquímico preliminar, la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* y el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, y determinar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos etanólicos del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie vegetal *Clusia multiflora* por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Establecer de manera cualitativa los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie *C. multiflora* por medio de un análisis fitoquímico preliminar.
- 3.2.2. Determinar la actividad antibacteriana a partir del protocolo Kirby–Bauer modificado de los extractos etanólicos del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie *C. multiflora* frente a las bacterias Gram (+) *Bacillus subtilis* y Gram (-) *Escherichia coli*.
- 3.2.3. Determinar la actividad antifúngica a partir del método de difusión en pozo de los extractos etanólicos del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie *C. multiflora* frente al hongo *Fusarium oxysporum*.
- 3.2.4. Identificar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos etanólicos del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie *C. multiflora* por medio de la técnica de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- 3.2.5. Contribuir al conocimiento de la especie nativa *Clusia multiflora*.

## 4. ESTADO DEL ARTE

### 4.1. FAMILIA CLUSIACEAE

#### 4.1.1. Características de la familia

La familia CLUSIACEAE se encuentra distribuida principalmente en las regiones tropicales del mundo, siendo *Clusia* uno de los géneros más representativos de esta familia, el cual comprende alrededor de 300 a 400 especies de distribución neotropical, especialmente en América Central y del Sur (Ferraz *et al.*, 2021). Las especies de este género producen una gran cantidad de látex y resinas florales ricas en benzofenonas polipreniladas (Porto *et al.*, 2000). Además, en estas especies se han encontrado xantonas, biflavonoides y triterpenoides (Ferreira *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2012: Tomado de Ferreira *et al.*, 2014). Las plantas pertenecientes a este género son conocidas por sus múltiples actividades biológicas, tales como actividades antibacterianas, antioxidantes, antitumorales, antimicrobianas y antiinflamatorias (Gustafson *et al.*, 1992, Cruz *et al.*, 2004). La propagación es por semillas o estacas. Exige suelos profundos y ácidos, es resistente a las heladas y vientos fuertes. Tiene una buena regeneración natural (Bonilla, 2002; Carvajal, *et al.* 2014).

#### 4.1.2. Características de *Clusia multiflora*

##### 4.1.2.1. Descripción botánica

Es un árbol que alcanza los 25 m de altura y 70 cm de diámetro en su tronco, con látex de color amarillo verdoso, corteza de color gris lenticelada, copa globosa; su follaje es de color verde oscuro. Hojas que miden 15 cm de largo, opuestas, carnosas, de consistencia rígida, borde entero, anchas, sin estípulas. Flores masculinas de color blanco amarillento con numerosos estambres, femeninas con cáliz de color verde, pétalos color blanco y están dispuestas sobre ejes cortos y gruesos. Especie dioica, frutos pequeños, capsulares dehiscentes, de color verde, maduros de color amarillo con varias semillas. Semillas pequeñas, brillantes con arilo color rojo anaranjado. (Carvajal, *et al.* 2014).



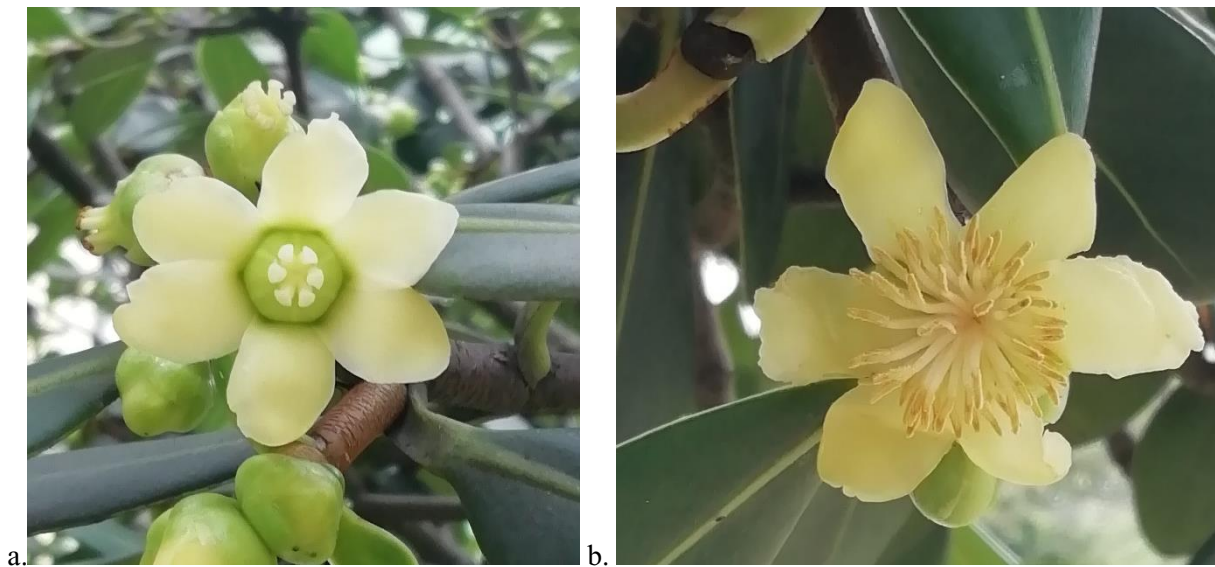
**Figura 1.** Individuo de *Clusia multiflora*.

**Fuente:** Elaboración propia

#### 4.1.2.2. Especie dioica

La condición dioica es mucho menos frecuente en las plantas que en los animales, de acuerdo con Roskov *et al.* (2014) sólo alrededor del 6% de las especies de angiospermas son dioicas. Esta condición les permite a las plantas evitar la autopolinización y puede llevar a una evolución independiente en las funciones de los individuos masculinos y femeninos (Nicotra 1998; Meagher *et al.*, 1982).

De acuerdo con Fairbairn (2016) en la mayoría de las plantas dioicas, solo las estructuras reproductivas distinguen los sexos. Estos consisten en órganos reproductivos primarios (p. ej., los estambres y pistilos de las flores de las angiospermas) más los tejidos somáticos circundantes, a menudo formados a partir de tallos u hojas modificados (p. ej., el cáliz y la corola de las angiospermas). En la Figura 2 se observan las diferencias entre la flor del individuo femenino y el individuo masculino de *Clusia multiflora*.

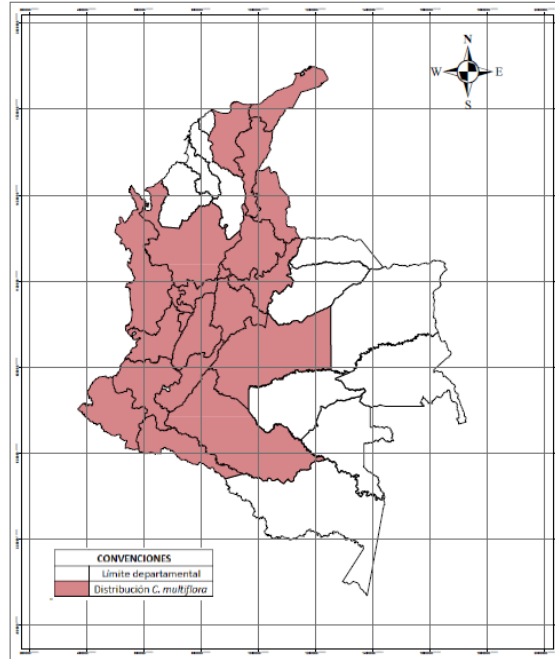


**Figura 2.** a. Flor del individuo femenino de *C. multiflora*. b. Flor del individuo masculino de *C. multiflora*.

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.1.2.3. Distribución geográfica

En Colombia, *C. multiflora* se encuentra entre los 1400 y 3500 msnm, en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Santander, Putumayo y Antioquia. Se encuentra en bosques de roble, áreas abiertas y subpáramos en bosque muy húmedo premontano (bmh-PM), bosque húmedo premontano (bh-PM), bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB) y bosque húmedo montano bajo (bh-MB) (Corantioquia, 2003).



**Figura 3.** Distribución de *Clusia multiflora* en Colombia.  
**Fuente:** Hammel, 2010. Modificación propia.

#### 4.1.2.4. Fitoquímica

Con base al extracto de petróleo de los frutos secos de *C. multiflora*, Arias (1985) aisló varios compuestos por cromatografía de columna, obteniendo como resultados la presencia del compuesto Friedelina, un segundo compuesto correspondió a una benzofenona poliprenilada, Arias, aisló un triterpeno tetracíclico cuya identificación corresponde a uno de los epímeros en C 20: eufol o tirocalol, y comprobó la existencia de un compuesto cetónico alifático (Citado en Bonilla, 2002).

González y colaboradores (1995), aislaron las benzofenonas Clusiacitran A, Clusiacitran B, Clusiacyclol A, Clusiacyclol B. Así mismo, según Mosquera *et al.* (2009), el extracto etanólico de *C. multiflora* presenta un porcentaje de inhibición entre el 89% y 96% en la germinación de los tubos de ascosporas del hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

#### 4.1.2.5. Usos

Tradicionalmente, su látex ha sido utilizado medicinalmente como purgante, antiinflamatorio y cicatrizante (DAMA, 2000), las flores de *C. multiflora* se emplean en infusión a la dosis de 20 g en 300 g de agua para combatir los resfriados. Según Hernández (1992), el cocimiento de la corteza se usa en baños locales contra el reumatismo, la resina extraída de este árbol fue muy empleada por las tribus indígenas americanas a la manera de incienso para perfumar sus templos (Citado en Corantioquia, 2003).

## 4.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

La fitoquímica, comprende el estudio de las propiedades y estructuras químicas de los productos naturales de una especie vegetal. A partir de un análisis fitoquímico preliminar o marcha fitoquímica se determina la ausencia o presencia de los metabolitos secundarios en una planta, entre estos se encuentran quinonas, alcaloides, cumarinas, fenoles, terpenoides, flavonoides, taninos, cardiotónicos, entre otros. (Carvajal, *et al.* 2009). Este análisis consiste en una serie de pasos en los que se incluye la selección del material vegetal, obtención de extractos y e identificación de principales metabolitos secundarios presentes a partir de técnicas de coloración y precipitación siguiendo diversas metodologías. El análisis fitoquímico preliminar ha probado ser eficaz para reconocer las propiedades biológicas a partir de la identificación de los metabolitos secundarios. (Croteau *et al.* 2000).

## 4.3. GENERALIDADES METABOLITOS SECUNDARIOS

Cuando se habla de metabolismo se hace referencia a un conjunto de procesos químicos que se llevan a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas, las cuales dan como resultado la formación de diferentes componentes orgánicos esenciales. Debido a la gran complejidad de dichos procesos se vió la necesidad de dividir el metabolismo en dos grandes grupos; el metabolismo primario y el metabolismo secundario. En principio, esta división se basó en que los productos del metabolismo primario, o metabolitos primarios se presentan con mayor abundancia en la naturaleza que los productos del metabolismo secundario o metabolitos secundarios, sin embargo, con el tiempo se incluyeron otro tipo de criterios como que los metabolitos primarios no se sintetizan como una respuesta al ambiente, tienen funciones bien definidas dentro del organismo que los contiene, incluye compuestos entre los que se encuentran aminoácidos, bases nitrogenadas, azúcares esenciales, ácidos grasos y polímeros naturales. Por otro lado, con la mejora de las técnicas analíticas, como la cromatografía, se pudo reconocer que los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de los metabolitos primarios, y no siempre tienen una función específica (Lurá de Calafell *et al.*, 1997).

### 4.3.1. Metabolismo secundario

La biosíntesis y descomposición de grasas, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos son esenciales para que todos los organismos puedan vivir, crecer y reproducirse, esto se denomina metabolismo primario, y los compuestos involucrados en estas vías se denominan metabolitos primarios. En contraste, existe también un área del metabolismo relacionada con los compuestos que tienen una distribución mucho más limitada en la naturaleza, denominado metabolismo secundario, es un conjunto de reacciones bioquímicas que se obtienen a partir del metabolismo primario (Dewick, 2009). Las rutas más importantes empleadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios son: (1) La ruta del acetato-malonato, precursor de ácidos grasos, poliacetilenos, eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), compuestos aromáticos y alifáticos, flavonoides, entre otros.(2) La ruta del Mevalonato que da lugar a la familia de terpenos, como los esteroides y carotenoides, (3) la ruta del ácido shikímico o su anión shikimato, que forma compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles (Dewick, 2009; Claramunt, 2013).

Es de especial importancia señalar que los metabolitos secundarios se pueden sintetizar mediante la combinación de varios bloques de construcción del mismo tipo, o mediante el uso de una mezcla de diferentes bloques de construcción (Dewick, 2009).

#### **4.3.2. Metabolito secundario**

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos orgánicos sintetizados principalmente por bacterias, hongos y plantas. (Mosunova *et al.*, 2021), específicamente en especies vegetales, no se encuentran en todos los grupos taxonómicos (Martín, 2018), sino en determinada familia, género o especie (Kariñho, 2018). Los MS son derivados del metabolismo primario de las plantas (Augustin *et al.*, 2011) y aunque no son esenciales para la misma, juegan un papel ecológico muy importante, ya que proporcionan defensa contra los depredadores, como atrayentes volátiles hacia la misma u otra especie, o como colorantes para atraer o advertir a otras especies (Dwick, 2009), así mismo, contrarrestan las condiciones medioambientales adversas como sequía, salinidad y temperatura (Thakur, *et al.* 2019) Los metabolitos secundarios incluyen aceites volátiles, flavonoides, alcaloides, glucósidos, taninos, saponinas, entre otros, y se han explotado con éxito como fuentes vitales de aditivos alimentarios, sabores y productos farmacéuticos de importancia industrial (Thakur, *et al.* 2019; Goossens *et al.*, 2003).

#### **4.3.3. Importancia de los metabolitos secundarios**

Como se dijo anteriormente, se desconocen las funciones que desempeñan la mayor parte de los metabolitos secundarios en el organismo que los produce. A través del tiempo y con el desarrollo de las ciencias, se ha ido descubriendo el papel de algunos de dichos productos y, tal es el avance en este campo, que muchos de los productos naturales aislados e identificados serán reconocidos en el futuro como actores principales de importantes funciones biológicas y farmacológicas.

A los metabolitos secundarios se les ha atribuido una gran variedad de funciones, aunque muchas de éstas no se han determinado con certeza. Se destacan (Galbis, 2000):

- Hormonas vegetales
- Protectores contra depredadores y patógenos
- Sustancias alelopáticas
- Atrayentes de polinizadores y simbioses
- Protectores contra el estrés

De acuerdo con Bourgaud *et al.*, (2001) los metabolitos secundarios han sido generalmente asociados con propiedades antibióticas, antifúngicas y antivirales, y, por lo tanto, juegan un rol muy importante en la protección de las plantas frente a patógenos (fitoalexinas), y también pueden actuar como anti-germinativos o compuestos tóxicos para otras plantas (alelopatía). Además, constituyen importantes compuestos absorbentes de UV, evitando así daños graves en las hojas por la luz (Li *et al.*, 1993). La acción de los metabolitos secundarios en las plantas no sólo afecta a otras plantas, sino que también actúan sobre animales como insectos (produciendo sustancias que desincentivan el consumo) o incluso bovinos para los que forrajes como el trébol o la alfalfa puede expresar propiedades estrogénicas e interferir con la fertilidad de los mismos (Torsell *et al.*, (1997) y Harborne *et al.*, (1999): Tomado de Bourgaud *et al.*, (2001)).



## **4.4. EXTRACTOS**

Un extracto vegetal es una mezcla constituida de diversos compuestos químicos, la cual es obtenida a partir de procesos físicos, químicos y/o microbiológicos (Caldas, 2012). De una misma planta se pueden obtener varios extractos con acción farmacológica diferente, es decir, varios extractos con principios activos diferentes. De acuerdo con Sharapin *et al.* (2000), un principio activo (PA) es la sustancia responsable del efecto farmacológico que se le atribuye a una planta.

### **4.4.1. Características de los extractos**

Vergara & Lizcano (2008) presentan una serie de características de los extractos, entre las cuales se presentan características como color, olor y textura. Se menciona que el color de cada extracto depende de su composición, y de igual manera ocurre con el olor, una característica general de un extracto mal preparado, es aquel con olor similar a caramelo o confitura cruda, o con aspecto cortado o heterogéneo.

La conservación de los extractos es otra parte importante, dependiendo de su composición y preparación estos pueden descomponerse fácilmente al aire o humedad, por esta razón cualquier extracto debe estar protegido de la luz solar directa, en envases bien cerrados y en un ambiente seco (Barreto, 1997).

### **4.4.2. Métodos de extracción**

Los métodos extractivos para metabolitos secundarios se pueden realizar de acuerdo a la planta. La extracción se basa en la separación de los componentes de tejidos vegetales mediante el uso de solvente polar o apolar. Son utilizadas diferentes técnicas como maceración, percolación, infusión, digestión, decocción, extracción alcohólica acuosa por fermentación, entre otros (Handa *et al.*, 2008).

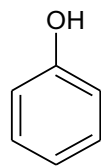
Para el caso de verificar la actividad biológica, el material vegetal debe extraerse en agua o utilizando una solución disotónica (0,9% NaCl). Los disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad se utilizan a menudo para la extracción. El alcohol generalmente recupera la mayoría de los metabolitos secundarios de manera más eficiente (Arévalo *et al.*, 1996).

## **4.5. COMPUESTOS ACTIVOS EN EL ÁMBITO MEDICINAL E INDUSTRIAL**

Las plantas sintetizan muchos metabolitos secundarios, que ayudan a las plantas a sobrevivir y reproducirse, además de ello, tienen una gran importancia biológica, ecológica y medicinal y pueden ser aprovechados por su inmenso potencial farmacológico y beneficios para la salud. Algunos metabolitos secundarios son fenoles, cumarinas, alcaloides, quinonas, taninos, entre otros (Goossens *et al.*, 2003, Dwick, 2009; Debnath *et al.*, 2018 Thakur, *et al.* 2019).

### **4.5.1. Fenoles**

Las plantas sintetizan algunos productos secundarios que consisten en un grupo fenol que se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH) (Ver Figura 4). El anillo aromático juega un papel importante en las propiedades antioxidantes. (Peñarrieta *et al.*, 2014) Según Watts (2006) son la porción significativa del esquema de defensa en plantas de plagas herbívoras (citado en Saddique *et al.*, 2018)



**Figura 4.** Estructura química del fenol

**Fuente:** Saddique *et al.* (2018).

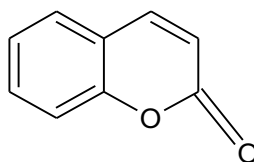
La biosíntesis de los compuestos fenólicos puede darse a través de dos vías básicas: la vía del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de las plantas y la vía del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias (Martin, 2017).

Los fenoles se han determinado en diversos tejidos vegetales, de las familias CUCURBITACEAE, POACEAE, MYRTACEAE, MELIACEAE, MALVACEAE entre otras y son capaces de inhibir procesos oxidativos asociados con alteraciones de la salud (Cala *et al.*, 2007; Arámbula, *et al.*, 2010) Así mismo, los fenoles son un amplio grupo de compuestos con funciones importantes en la defensa contra insectos, herbívoros y hongos (Andersen, *et al.*, 2006), juegan una función metabólica importante en las plantas, en el crecimiento y la reproducción, son los responsables del color y de características sensoriales de las plantas y alimentos, por ejemplo, la astringencia de frutas y hortalizas (Peñarrieta *et al.*, 2014).

#### 4.5.2. Cumarinas

Las cumarinas son un grupo amplio de activos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos entre los vegetales. (Claramunt *et al.* 2013). Pertenece a la familia de las benzopironas

En cuanto a su estructura, las cumarinas contienen un anillo aromático unido a un heterociclo oxigenado derivado de la  $\alpha$ -pirona. (Ver Figura 5). La simple estructura de estos compuestos y la facilidad de modificación química, hace posible la conversión en otros tipos de antioxidantes. (Franco *et al.* 2021). La biosíntesis de las cumarinas se da a través de la vía del ácido shikímico (Saddique *et al.* 2018)



**Figura 5.** Estructura química de la cumarina.

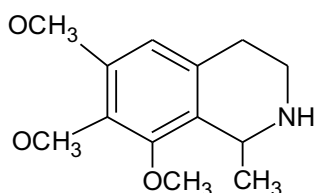
**Fuente:** Saddique *et al.* (2018).

Las cumarinas se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en diferentes partes de las flores, tallos, hojas y frutos de las familias de plantas Umbelliferae, Rutaceae Fabaceae, Rubiaceae, Asteraceae, Apocinaceae, Compositae, Orquidaceae, Rutaceae y Labiatae (Sun *et al.*, 2020). En términos de efectos medicinales, las cumarinas poseen efectos antihipertensivos, antiinflamatorios, analgésicos y

anticancerígenos. (Duan *et al.* 2008). Así mismo, se ha encontrado el uso de cumarinas como pesticida natural para detener el crecimiento de hongos (Saddique *et al.* 2018).

#### 4.5.3. Alcaloides

Los alcaloides se consideran uno de los grupos más grandes y diversos de metabolitos secundarios que se derivan total o parcialmente de aminoácidos como ornitina, lisina, tirosina y triptófano. (Tadeusz, 2007; Claramunt *et al.* 2013). Contienen uno o más átomos de nitrógeno, normalmente primarios, secundarios, o aminas terciarias, y esto generalmente confiere basicidad a alcaloide, facilitando el aislamiento y la purificación, ya que se pueden formar sales solubles en agua en presencia de ácidos minerales. (Dewick, 2009). En la biosíntesis de los alcaloides intervienen diferentes tipos de reacciones como oxidación, reducción, deshidratación, descarboxilación o condensación aldólica y aminoácidos (Claramunt *et al.* 2013).



**Figura 6.** Estructura química del alcaloide Anhalonina. (Derivado de la Tirosina)

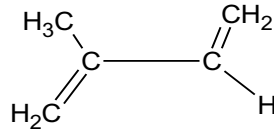
**Fuente:** Gershenzon, *et al.* 1991

Según Croteau *et al.* (2000), este grupo de metabolitos son producidos en casi el 20% de las especies de plantas vasculares. (Citado en Saddique *et al.*, 2018), pero también se encuentran en menor medida en microorganismos y animales. (Dewick, 2009). En las plantas, se encuentran principalmente en las familias Ranunculaceae, Leguminosae, Papaveraceae, Menispermaceae y Loganiaceae (Debnath, 2018).

Sus actividades biológicas más importantes están implicadas en las interacciones entre la planta y el medio ambiente, incluida la defensa de la planta contra patógenos y animales herbívoros, así como sus amplios usos como venenos, drogas psicoactivas y recreativas y medicinal como antihipertensivos, citotóxicos, antiinflamatorios, vaso relajantes, antiparasitarios, antimicrobianos, analgésicos opioides, antifertilidad, antidiabéticos (Chakraborty *et al.* 2021; Dey *et al.* 2017). Sin embargo, muchos alcaloides son extremadamente tóxicos para los seres vivos (Dey *et al.*, 2017).

#### 4.5.4. Terpenoides

Los terpenoides son la clase más grande y diversa de compuestos orgánicos que se encuentran en las plantas. (Gershenzon, *et al.* 1991). Se derivan del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), y se pueden encontrar en las plantas en forma de aceites esenciales, también en animales, bacterias y hongos (Claramunt *et al.* 2013). Son sintetizados por la vía del ácido mevalonato (Gershenzon, *et al.* 1991).



**Figura 7.** Estructura química del isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

**Fuente:** Gershenzon *et al.* (1991).

Los terpenos se clasifican de la siguiente manera (Saddique *et al.* 2018)

- Monoterpenos ( $C_{10}$ ): Muchos productos químicos secretados por las plantas son importantes mediadores de la toxicidad de los insectos. Por ejemplo, las hojas y las flores de las especies de crisantemo producen los piretroides (ésteres monoterpenos), que son usadas como plaguicidas para plagas como las polillas y son un elemento generalizado en los plaguicidas viables debido al bajo riesgo de envenenamiento para los mamíferos.
- Sesquiterpenos ( $C_{15}$ ): Son bien conocidos por su papel en la defensa de las plantas como agentes antiherbívoros. Se componen de un anillo de lactona de cinco miembros y sirven como un fuerte repelente de alimentación para varios insectos herbívoros
- Diterpenos ( $C_{20}$ ): Son terpenos de 20 carbonos, que se encuentran en plantas, animales y hongos.
- Las plantas leguminosas producen ácido abiético, que es un diterpeno. Se encuentra en resinas secretadas de canales de resina del tronco del árbol, el phorbol, producido en plantas de la familia Euphorbiaceae, actúa como irritaciones epiteliales y toxinas internas para insectos plaga y mamíferos
- Los sesterterpenos ( $C_{25}$ ) contienen 5 unidades de isopreno y son los menos numerosos en la naturaleza. Se han aislado de esponjas marinas, hongos y de algunos insectos. (Claramunt *et al.* 2013).
- Los triterpenos ( $C_{30}$ ) contienen 6 unidades de isopreno en su esqueleto y constituyen un grupo muy amplio de compuestos naturales. Un ejemplo es el Limnoid, que es un triterpeno en cítricos, y actúa como un compuesto nocivo contra las plagas en plantas de la familia Rutaceae.

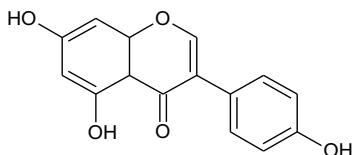
Estos metabolitos se encuentran ampliamente distribuidos en angiospermas que se encuentran comúnmente en las familias Caryophyllaceae, Leguminosaceae, Sapindaceae, Liliaceae, Dioscoreaceae. (Gershenzon, 1991).

Muchos terpenoides tienen funciones ecológicas importantes que sirven como defensas contra herbívoros y patógenos, como atrayentes para polinizadores y animales que dispersan frutas o como agentes alelopáticos. (Gershenzon, *et al.* 1991; Saddique *et al.* 2018). En cuanto a usos industriales, es utilizado como aromas y fragancias en la manufactura de alimentos y perfumería, algunos tienen propiedades farmacológicas (Claramunt *et al.* 2013).

#### 4.5.5. Flavonoides

Es un grupo muy extenso de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano, se distribuyen ampliamente en diversas plantas vasculares, en forma de glicósidos. (Cartaya, *et al.* 2001). Los flavonoides contienen un esqueleto hidrocarbonado del tipo  $C_6-C_3-C_6$ , constituido por dos anillos de

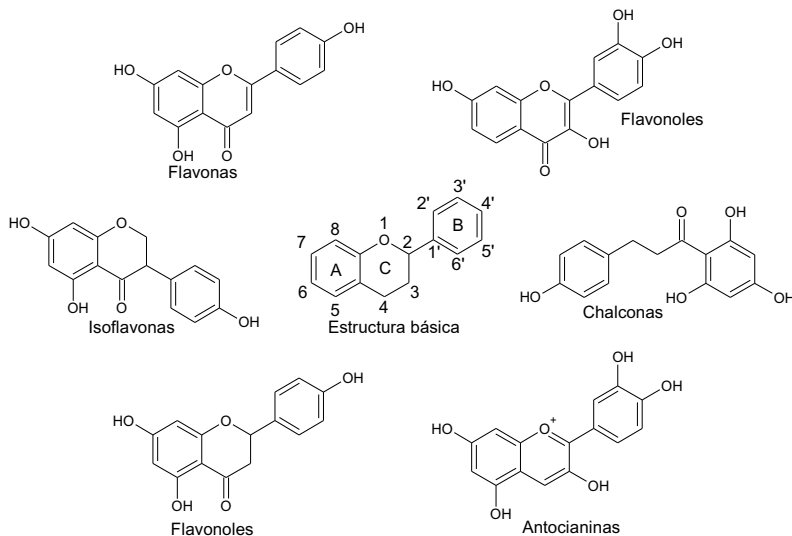
benceno (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico de pirano (C) (Figura 8), es derivado de la ruta del ácido shikímico. (Pérez, 2003; Claramunt *et al.* 2013). Los flavonoides se pueden clasificar según el carbono del anillo C al que está unido el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C.



**Figura 8.** Estructura química de los flavonoides.

**Fuente:** Claramunt *et al.* (2013).

Los flavonoides en los que el anillo B está enlazado en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas, aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 4 se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavonas, flavonoles, flavonas, flavonoles, flavonoides o catequinas, antocianinas y chalconas (Figura 9) (Panche *et al.*, 2016).



**Figura 9.** 10 Nomenclatura de los flavonoides.

**Fuente:** Panche *et al.* (2016).

Los flavonoides son los más característicos y se encuentran universalmente tanto en gimnospermas como angiospermas en familias como Myrtaceae, Podocarpaceae, Rosaceae, Fabaceae, Fagaceae, Sapindaceae, Smilacaceae, entre otras. (Harborne, 1991).

Estos metabolitos tienen una gran cantidad de compuestos medicinalmente activos, muchos de los cuales se estudian por su potencial actividad antiviral, como agentes antiinflamatorios, tratamiento de enfermedades hepáticas. (Badshah, 2021; Harborne, 1991). Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes debido al elevado número de grupos hidroxilo y la capacidad de unirse a proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas (Pérez, 2003). En cuanto a su papel ecológico, estos MS permiten un papel de defensa de las plantas frente a agentes agresores externos (Cartaya, *et al.* 2001), así mismo, por sus llamativos colores, permite la polinización y la dispersión de frutos y semillas (Harborne, 1991).

#### 4.5.6. Quinonas

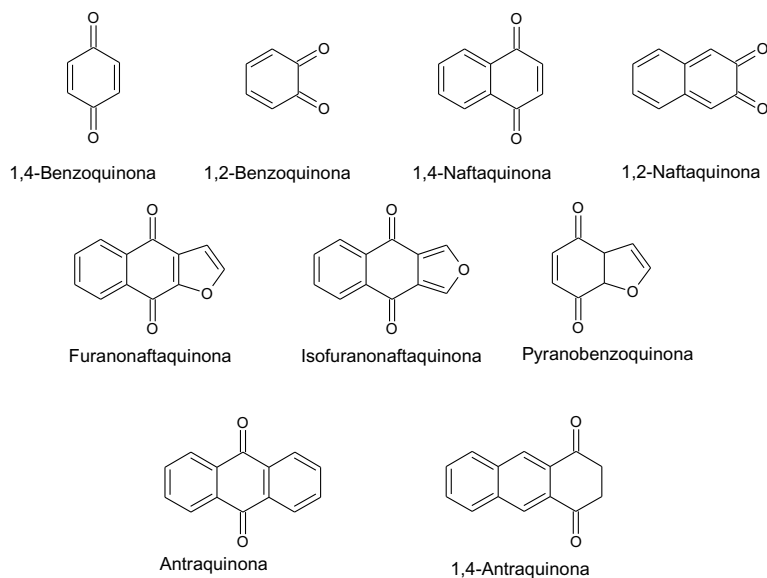
Las quinonas son metabolitos electrofílicos que componen las plantas con propiedades dietéticas como las uvas, manzanas, entre otros.

En cuanto a su síntesis, las quinonas naturales se obtienen a través de las rutas del shikimato o policétido que están ausentes en los animales. En los mamíferos, las quinonas se pueden formar mediante el metabolismo de sustancias endógenas, xenobióticos y fármacos. Generalmente, las quinonas reciben el nombre del sistema original del que se derivan (por ejemplo, benzoquinonas de benceno, naftoquinonas de naftaleno, antraquinonas de antraceno) (Scott & Kalgutkar, 2010).

Generalmente las quinonas se derivan de la oxidación de hidroquinonas e incluyen benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y poliquinonas, se encuentran divididas como se ve a continuación (Eyong *et al.*, 2013):

- Benzoquinonas: Son grupos de compuestos que contienen dos grupos carbonilo en un sistema de anillo aromático hexacíclico saturado (anillo de benceno), generalmente en posiciones orto o para (monocíclico).
- Naftoquinonas: se encuentran en cierta medida en los hongos y son extremadamente comunes en las plantas superiores; contienen el núcleo de naftaleno con dos grupos carbonilo en un núcleo, generalmente en la posición orto o para (bicíclica).
- Antraquinonas: estos son metabolitos fúngicos comunes y también se encuentran en plantas superiores. Son compuestos que contienen el núcleo de antraceno con dos grupos carbonilo, generalmente en el anillo B en posiciones para (tricíclico).
- Poliquinonas: son dímeros de los diferentes tipos de quinonas. Algunas poliquinonas son de origen mixto. El acoplamiento oxidativo intermolecular o intramolecular puede ocurrir con la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno.

Para su nomenclatura se da preferencia a las funciones carbonilo, y a cada una se le da el número más pequeño posible. Esta numeración se aplica principalmente a las benzo y naftoquinonas. En las antraquinonas, los dos anillos laterales (A y C) se numeran primero, seguidos de los grupos carbonilo de quinoides. Sin embargo, en presencia de un sistema de anillo de furano o pirano, estos sistemas se enumeran en primer lugar, con preferencia para el átomo de oxígeno (Figura 11)



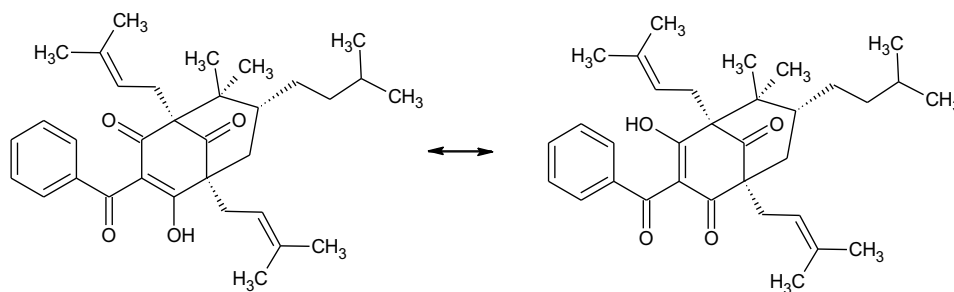
**Figura 11.** Nomenclatura de las quinonas.

**Fuente:** Eyong *et al.* (2013).

Las quinonas exhiben numerosas actividades biológicas entre las que se encuentran neurológicas, antibacterianas, antiplasmodiales, antioxidantes, tripanocidas, antitumorales y anti-VIH, y se ha demostrado que estas actividades están relacionadas con las propiedades redox de sus funciones carbonilo. Las quinonas isoprenoides, por ejemplo, las ubiquinonas, son metabolitos esenciales que participan en el transporte de electrones en los sistemas vivos. Las quinonas, en general, y las naftoquinonas, en particular, son bien conocidas por sus actividades antibacterianas y antifúngicas, como ejemplo, el lapachol. La actividad antifúngica y antibacteriana de algunas naftoquinonas aisladas de *Newbouldia laevis* se han documentado contra los hongos *Candida albicans*, *Cladosporium cucumerinum* y las bacterias *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. A pesar de la fuerte bioactividad, el uso médico de las naftoquinonas es limitado, ya que, debido a sus mecanismos de acción es probable que los compuestos sean tóxicos para los organismos vivos.

#### 4.5.6.1. Clusianonas

Las Clusianonas son un derivado de la benzofenona poliisoprenilada con un sistema biciclo-[3.3.1]-nonano-2,4,9-triona (Figura 13). Se ha aislado de las raíces de *Clusia congestiflora* Cuatrec., los frutos de *Clusia sandiensis* Engl. y las resinas florales de *Clusia spiritusanctensis* G. Mariz & B. Weinberg. En 2005, se aisló de *Clusia torresii* Standl. con un estudio extenso sobre los datos espectroscópicos, y también la evaluación de la actividad anti-VIH de la clusianona junto con otras benzofenonas. El estudio mostró actividad anti-VIH de estas sustancias y clasificó la clusianona como un inhibidor de la infección por el virus VIH-1, al obstaculizar la interacción gp120-sCD4 a muy baja concentración. También se mostró una citotoxicidad aumentada (Anholeti *et al.*, 2012). En un estudio realizado con *Clusia fluminensis* las clusianonas aisladas mostraron una reducción significativa de la supervivencia de las larvas de *Aedes aegypti* (Mosco del dengue) (Duprat *et al.*, 2017).



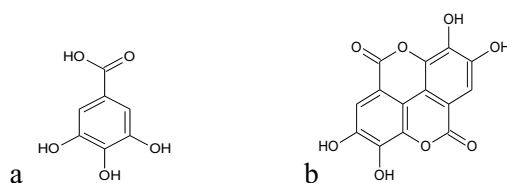
**Figura 13.** 14Estructura de la Clusianona.

**Fuente:** Duprat *et al.*, (2017).

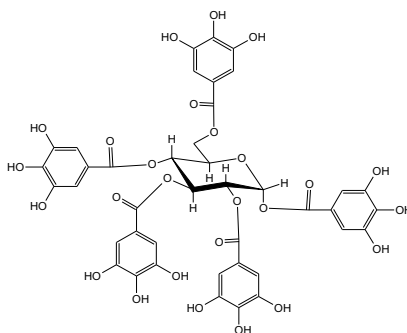
#### 4.5.7. Taninos

Los taninos se definen generalmente como sustancias fenólicas complejas astringentes solubles de origen vegetal que se utilizan en el curtido de pieles de animales o en la precipitación de proteínas. Químicamente, son compuestos fenilpropanoides a menudo condensados en polímeros de longitud variable (Swanson, 2003). Los términos taninos "hidrolizables" y "condensados" se utilizan para distinguir entre las dos clases importantes de taninos vegetales, a saber, los taninos derivados del ácido gálico y los derivados del flavan-3,4-diol, respectivamente (Sierra *et al.*, 2018).

- **Taninos hidrolizables:** Son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares (generalmente glucosa). Presentan un tamaño menor a los taninos condensados y, como se dijo anteriormente, se hidrolizan más fácilmente. Los taninos hidrolizables (Figura 15), como por ejemplo los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación del ácido gálico o elágico, respectivamente (Figura 16).



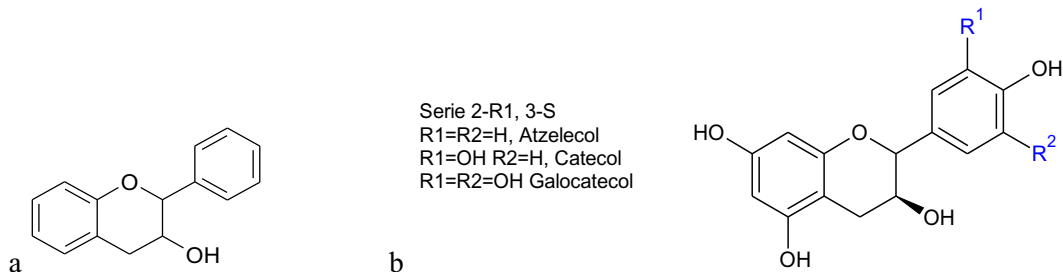
**Figura 15.** Estructura de a) Ácido gálico. b) Ácido elágico.



**Figura 16.** Estructura química de un tanino hidrolizable, pentagaloiil–glucosa.



- **Taninos condensados:** También llamados taninos basados en flavanoles, o proantocianidinas. Son polímeros flavánicos constituidos por unidades flavan-3-oles ligados entre sí por enlaces C-C, 4→8 ó 4→6 (Figura 17) y proceden de biosíntesis mixta.



**Figura 1718.** Unidades constituyentes de los taninos condensados a. Flavan-3-ol. b. Epicatecol.

**Fuente:** Marcano & Masahisa (2002).

Los taninos y los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas y juegan un papel destacado en las estrategias de defensa general de las plantas, además de contribuir a la calidad de los alimentos.

En la naturaleza, los taninos se encuentran ampliamente distribuidos en muchas familias de plantas superiores, dependiendo de su origen su química varía ampliamente. Se pueden encontrar altas concentraciones de taninos en casi todas las partes de la planta (corteza, madera, hojas, frutos, raíces y semillas). Con frecuencia, una mayor producción de taninos puede estar asociada con alguna enfermedad de la planta, por ende, se cree que el papel biológico en la planta de muchos taninos está relacionado con la protección contra infecciones, insectos o herbivoría animal (Haslam, 1989).

Entre los usos de estos metabolitos están el curtido, conocido durante milenios (mediterráneo desde ca. 1500 aC), pasando por usos medicinales hasta usos en la industria alimentaria. En medicina, especialmente en la curación natural asiática (japonesa y china), los extractos de plantas que contienen taninos se utilizan como astringentes, contra la diarrea, como diuréticos, contra los tumores de estómago y duodenales, y como antiinflamatorios, antisépticos y hemostáticos. Como los taninos pueden precipitar metales pesados y alcaloides (excepto la morfina), pueden usarse en intoxicaciones con estas sustancias. También está quedando claro que los taninos a menudo son los principios activos de los medicamentos a base de plantas (Khanbabaee & van Ree, 2001).

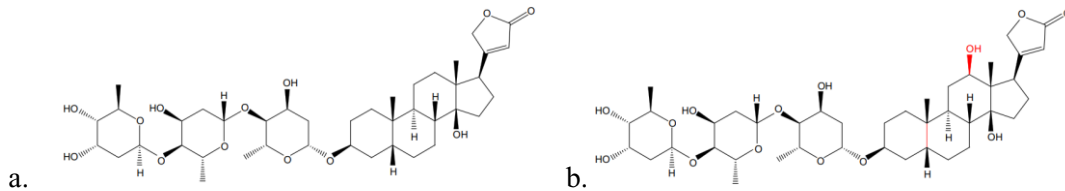
#### 4.5.8. Cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son una clase de compuestos orgánicos que aumentan la fuerza de salida del corazón y aumentan su tasa de contracciones. Son glicósidos esteroidales selectivos y fármacos importantes para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y trastornos del ritmo cardíaco (Fu *et al.*, 2019).

La estructura básica de los glicósidos cardiotónicos está compuesta por un núcleo de esteroide y un anillo de lactona conjugado insaturado unido a la posición C17. Los monosacáridos comunes que se encuentran en estos metabolitos son la glucosa, la ramnosa y el 6-desoxi monosacárido. Los cuatro anillos del núcleo del

glicósido cardiotónico se fusionan de manera diferente que el esterol, en el que el anillo B / C es *trans*, y el anillo C / D y el anillo A / B son en su mayoría *cis*.

Su clasificación depende del tipo de anillo de lactona insaturado unido a la posición C17 del glicósido cardiotónico. Puede ser de dos tipos: tipo A (un anillo de lactona insaturada de cinco miembros) y tipo B (un anillo de lactona insaturada de seis miembros). En la Figura 19 se observan la digitoxina y digoxina, glicósidos cardiotónicos aislados de las hojas de *Digitalis tomentosa* y *D. purpurea*.



**Figura 1920.** a. Digitoxina y b. Digoxina.

**Fuente:** Fu *et al.*, 2019.

En cuanto a su distribución, los cardiotónicos se encuentran principalmente en las hojas de plantas de las familias Scrofulariaceae, Apocynaceae, Liliaceae, Ranunculaceae y Moraceae. Los bufanólidos se han encontrado también en ranas del género *Bufus*, y en las alas de mariposas monarca. Han sido considerados de interés por su potencial anticancerígeno (Martínez, 2002).

## 4.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 4.6.1. Actividad antifúngica

Los hongos se adaptan fácilmente a una gran variedad de sustratos de los cuales obtienen el carbono, nitrógeno y la energía necesaria para sobrevivir y propagarse. Dicha capacidad de adaptación dificulta su control, en caso de ser patógenos. Estos organismos pueden causar enfermedades muy graves en humanos (Davicino *et al.*, 2007)

#### 4.6.1.1. *Fusarium oxysporum*

Los hongos de este género tienen una distribución cosmopolita y para algunos, se considera el hongo más importante desde el punto de vista agrícola. Este género tiene una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas, el ser humano y en los animales. Este hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido, atacar a un gran número de plantas, y producen tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas (Arbeláez, 2000).

Las especies de *Fusarium*, pueden crecer exitosamente en una variedad de sustratos, ya que son tolerantes a diferentes condiciones ambientales y tienen altos niveles de diversidad genética y genotípica intraespecífica. No se conocen bien los orígenes de esta diversidad ni los mecanismos que la mantienen. Las cepas de *Fusarium oxysporum*, no tienen una etapa sexual conocida (Kerenyi, *et al.*, 2004). Se conoce que, en las plantas herbáceas y leñosas, el hongo se transmite por el suelo y germina a partir de clamidosporas en presencia de plantas hospedantes para penetrar en las raicillas lesionadas y no lesionadas y luego colonizar la xilema. (Jacobs *et al.*, 2004).

## 4.6.2. Actividad antibacteriana

### 4.6.2.1. *Escherichia coli*

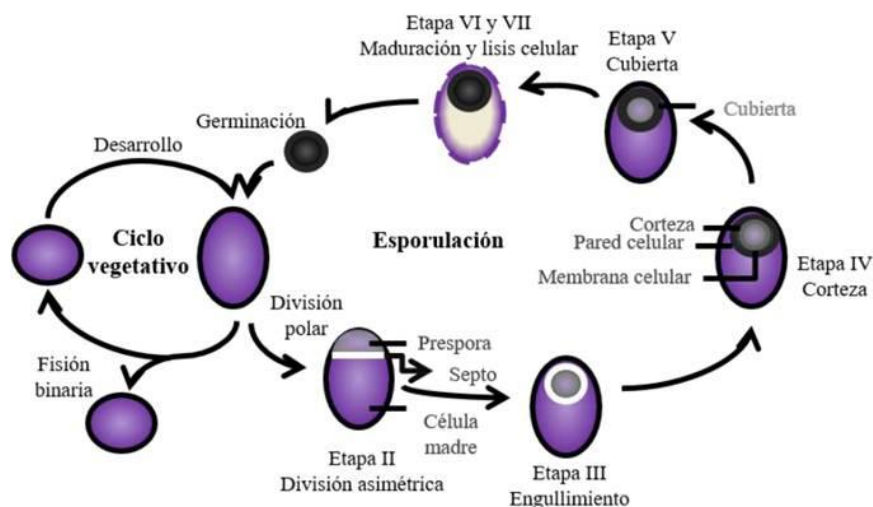
*Escherichia coli* representa un grupo muy grande de bacterias Gram (-) de amplia distribución. Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en patotipos en función del factor de virulencia, y generalmente se encuentran asociados a diarrea seis patotipos, conocidos colectivamente como *E. coli* diarreogénica. Esta bacteria normalmente se encuentra en el tracto intestinal de animales, particularmente en el ganado y fue reportada por primera vez como un patógeno gastrointestinal en 1982 (Riley *et al.*, 1983). Desde entonces, ha sido reconocida a nivel mundial como un problema de salud pública provocando diarrea, colitis hemorrágica y HUS (Torres *et al.*, 2016).

Las cepas controladas de bacterias *E. coli* son ampliamente utilizadas para pruebas en laboratorio, esto se debe a su rápida capacidad de reproducción y no presentan dificultad para ser cultivadas en el laboratorio. Entre los principales usos para estas bacterias, se encuentra el de insertar un determinado gen en el medio de cultivo, y por *transformación* este gen es absorbido y replicado en los descendientes de *E. coli*, y así investigar su respuesta frente a diferentes antibióticos (Clark & Maaløe, 1967).

### 4.6.2.2. *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* son un grupo de bacterias Gram (+), reportado en 1872 por Cohn, como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor. Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo *Firmicutes*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales* y Familia *Bacillaceae*. El género incluye más de 336 especies, ampliamente distribuidas a nivel mundial ya que forman endosporas, característica que les permite tener una mayor resistencia en diversos hábitats, tanto acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas (Villareal *et al.*, 2018).

En cuanto a su reproducción, las bacterias del género *Bacillus* presentan esporas que se desarrollan por efecto del estrés, y estas son viables hasta que las condiciones del ambiente permitan la reactivación de procesos metabólicos y la generación de una célula (Figura 22).



**Figura 21.** Ciclo de reproducción del género *Bacillus*.  
**Fuente:** Villareal *et al.* (2018).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. LOCALIZACIÓN DE LOS INDIVIDUOS DE *Clusia multiflora* Kunth

El látex de los individuos femeninos (F) y masculinos (M) de *C. multiflora* fue obtenido en la ciudad de Bogotá, en las localidades de Kennedy, Engativá, Tunjuelito y Rafael Uribe Uribe, como se observa en la Tabla 1 presentada a continuación.

**Tabla 1.** Localización de los individuos de *C. multiflora* en la ciudad de Bogotá

Individuo	Sexo	Localización		
		Latitud	Longitud	Localidad
1	M	4,612	-74,156	Kennedy
2	F	4,612	-74,156	Kennedy
3	M	4,605	-74,147	Kennedy
4	F	4,628	-74,145	Kennedy
5	M	4,578	-74,129	Tunjuelito
6	F	4,626	-74,147	Kennedy
7	M	4,626	-74,147	Kennedy
8	F	4,660	-74,107	Engativá
9	M	4,660	-74,107	Engativá
10	F	4,636	-74,139	Kennedy
11	M	4,634	-74,143	Kennedy
12	F	4,634	-74,143	Kennedy
13	M	4,634	-74,143	Kennedy
14	F	4,624	-74,139	Kennedy

<b>15</b>	M	4,528	-74,120	Rafael Uribe Uribe
<b>16</b>	F	4,528	-74,121	Rafael Uribe Uribe

**Fuente:** Elaboración propia

## 5.2. RECOLECCIÓN DEL LÁTEX

Con ayuda de un escalpelo, se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm en el tronco de cada árbol y se obtuvo aproximadamente 0,6 ml de látex, este fue depositado directamente en un vial de vidrio, el cual contenía 1ml de etanol (EtOH) al 95%. El procedimiento se realizó 3 veces para cada individuo. Luego se guardaron las muestras en la sombra a temperatura ambiente por una semana para asegurar la extracción total.

## 5.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Se realizaron las pruebas fitoquímicas preliminares, a partir de los protocolos de Sanabria (1999) y Domínguez (1973) con algunas modificaciones. En las pruebas se identifica presencia o ausencia de los metabolitos secundarios presentes en el exudado de la planta, a partir del uso de reactivos específicos (Ver Tabla 2), y se comparan con un patrón positivo, estableciendo el resultado con los criterios cualitativos (Ver Tabla 3). Cada prueba se realizó por triplicado.

**Tabla 2.** Reactivos específicos para cada metabolito secundario y patrones positivos

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Prueba / Reactivo</b>	<b>Controles positivos</b>
Taninos	Cloruro férrico	Cambio a coloración negro o verde
	Acetato de plomo	Formación de turbidez o precipitado blando
Flavonoides	Shinoda	Cambio a coloración rojiza
	Antocianinas	
Quinonas	Comportamiento ante ácido y donador de electrones	Cambio a coloración amarilla
Cardiotónicos	Baljet	Cambio a coloración naranja-roja
Cumarinas	Erlich	Cambio a coloración naranja
	Valser	Formación de precipitado
Alcaloides	Mayer	Formación de precipitado blanco
	Dragendorff	Formación de precipitado marrón
	Wagner	Formación de precipitado café

**Tabla 3.** Criterios cualitativos de evaluación frente a patrones positivos

<b>Criterio</b>	<b>Nomenclatura</b>
Cambio similar a la muestra control positiva.	+++
Cambio significativo con relación a la muestra control positiva	++
Cambio leve con relación a la muestra control positiva.	+
No hay cambio con relación a la muestra control positiva.	-

**Fuente:** Elaboración propia

## **5.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

### **5.4.1. Actividad antifúngica**

Para la realización de la prueba se implementó el método de difusión en pozo, con la cepa del hongo *Fusarium oxysporum*, obtenidas del banco de microbiología de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas, la cual fue cultivada previamente. Como medio de cultivo se utilizó agar Sabouraud glucosa, el antimicótico empleado fue la Griseofulvina y el control negativo Dimetilsulfóxido. Se prepararon cuatro muestras por separado: el control de crecimiento, que fue utilizado como referencia para determinar la actividad de los demás, el control negativo y el individuo femenino y masculino de *C. multiflora*. Cada control fue vertido en cajas Petri de 60 mm de diámetro, y una vez solidificado se inoculó con una rodaja del tamaño de un sacabocado de la cepa de *Fusarium oxysporum*, en el centro de la caja Petri, este procedimiento se realizó por triplicado para cada individuo.

#### **5.4.1.1. Determinación de la actividad antifúngica**

La incubación se llevó a cabo a 25°C por 6 días, durante los cuales se tomaron los valores de halos de crecimiento a los dos, cuatro y seis días (promediando el largo y ancho de cada halo), y se compararon con el valor obtenido en el control de crecimiento. Finalmente, el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Dc - Dm}{Dc} * 100$$

Donde;

Dc = Diámetro en mm del control de crecimiento

Dm = Diámetro en mm de la muestra

#### **5.4.2. Evaluación antibacteriana**

Para la realización de la prueba se utilizó el protocolo Kirby–Bauer modificado de difusión en agar por perforación en placa, con cepas Gram (+), *Bacillus subtilis* y Gram (-), *Escherichia coli*, obtenidas del banco de microbiología de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas, las cuales fueron previamente cultivadas de 6 – 10 horas en caldo nutritivo. Como medio de cultivo se utilizó agar Mueller– Hinton. Se realizaron cuatro perforaciones por caja con ayuda de un sacabocado. La inoculación de las cajas se llevó a cabo depositando los extractos del caldo, en las perforaciones realizadas anteriormente, para que se difundieran en el medio con anterioridad. Luego de esto, se selló cada una de las cuatro perforaciones con unas pequeñas cantidades de agar en el fondo de las cajas. Y se colocó en cada pozo una de las siguientes sustancias: control positivo (Sulfacetamida), control negativo (dimetilsulfoxido), y extracto de un individuo femenino y otro masculino. La prueba se realizó por triplicado.

##### **5.4.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana**

La actividad antimicrobiana se determinó realizando la medición del diámetro del halo de inhibición. Se considera que un microorganismo es sensible a un antimicrobiano cuando este último presenta un halo de inhibición con un diámetro en promedio de 15 mm o mayor, se considera indeterminado cuando presenta un halo de 13 – 14 mm de diámetro, y resistente cuando el halo es menor o igual a 12 mm.

#### **5.5. EVALUACIÓN CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG – EM) es una combinación de dos técnicas analíticas que se usa con el fin de formar un único método para analizar mezclas de productos químicos orgánicos. La cromatografía de gases separa los componentes de una mezcla y la espectrometría de masas caracteriza cada uno de los componentes individualmente. La combinación de las dos técnicas permite evaluaciones tanto cualitativas como cuantitativas de una muestra que contiene varios compuestos orgánicos. Los usos de la CG – EM son numerosos, incluida la investigación química, geológica, medioambiental y forense (Medeiros, 2018). Se llevaron a cabo los análisis de los extractos de ambas especies en el laboratorio de química Productos Naturales de la Pontificia Universidad Javeriana, con el equipo Agilent 5973inert.

#### **5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el software R, más específicamente el test no paramétrico de Wilcoxon. Dicho test permite contrastar dos muestras y determinar si existen diferencias significativas entre ellas, esto con el fin de comprobar si existen diferencias entre la actividad antimicrobiana y los metabolitos mayoritarios del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie *Clusia multiflora*. Los resultados se representan mediante un diagrama de cajas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas al exudado de la especie *Clusia multiflora*.

### 6.1. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Las pruebas fitoquímicas fueron realizadas por triplicado, este análisis arrojó resultados positivos para los metabolitos secundarios (MS) taninos, flavonoides, quinonas, y en menor medida alcaloides y glicósidos cardiotónicos, como se observa en la Tabla 4 y Figura 22.

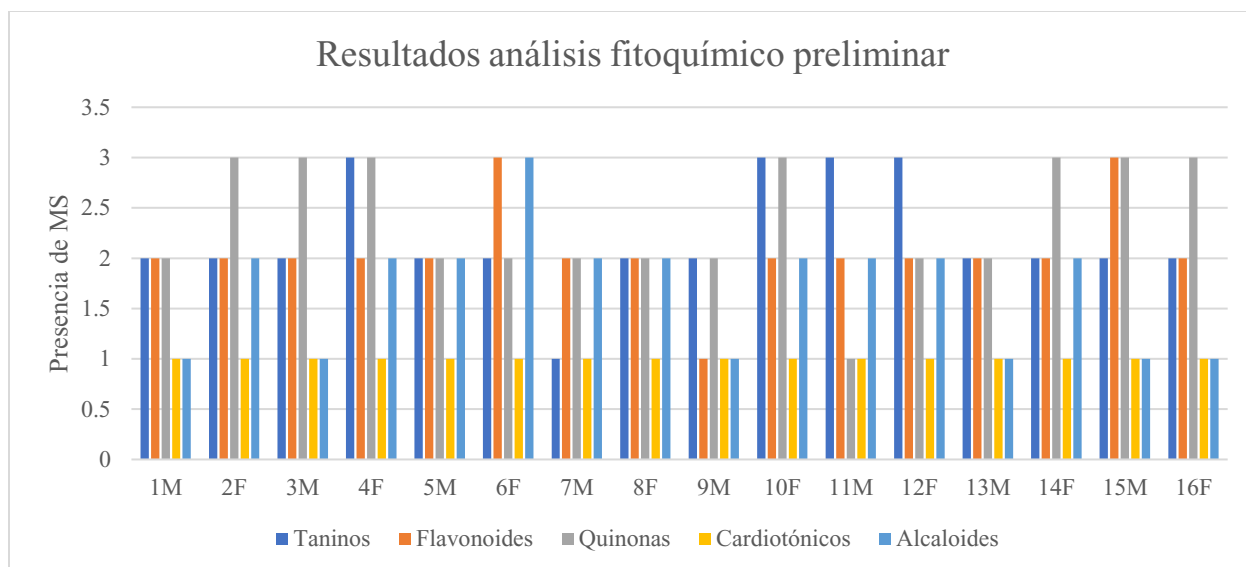
**Tabla 4.** Resultados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos de *Clusia multiflora*

Individuos	Metabolitos secundarios				
	Taninos	Flavonoides	Quinonas	Cardiotónicos	Alcaloides
1 – M	++	++	++	+	+
2 – F	++	++	+++	+	++
3 – M	++	++	+++	+	+
4 – F	+++	++	+++	+	++
5 – M	++	++	++	+	++
6 – F	++	+++	++	+	+++
7 – M	+	++	++	+	++
8 – F	++	++	++	+	++
9 – M	++	+	++	+	+
10 – F	+++	++	+++	+	++
11 – M	+++	++	+	+	++
12 – F	+++	++	++	+	++
13 – M	++	++	++	+	+
14 – F	++	++	+++	+	++
15 – M	++	+++	+++	+	+
16 – F	++	++	+++	+	+

**M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino

**Fuente:** Elaboración propia





**Figura 22.** Resultados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos de *Clusia multiflora*.

**M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino

**Fuente:** Elaboración propia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 4, en el análisis fitoquímico preliminar de los extractos, se evidenció que la especie posee un alto contenido de taninos, flavonoides, quinonas, y en menor medida, glicósidos cardiotónicos y alcaloides, en los exudados de ambos individuos. Sin embargo, es de recalcar, que se encuentra mayor presencia de quinonas y taninos en los individuos femeninos.

De acuerdo con lo reportado en la literatura se puede confirmar la presencia de dichos metabolitos en diferentes especies de la familia CLUSIACEAE y más específicamente del género *Clusia*, como en el caso de *C. lanceolata*, *C. fluminensis*, *C. columnaris*, *C. criuva* y *C. multiflora* (Mattos, *et al.* 2019; Andrade *et al.* 1998; da Silva *et al.* 2017; Mosquera *et al.*, 2009). La presencia de estos MS se relaciona directamente con la actividad antibacteriana y antifúngica como reportan Puupponen *et al.* (2001) & Steenkamp, *et al.* (2005).

Los flavonoides penetran fácilmente la membrana celular de las bacterias, se combinan y desnaturalizan las proteínas, actuando como veneno desde adentro de la bacteria. (Soto *et al.* 2015). Así mismo, se ha evidenciado que en su mayoría los flavonoides poseen actividades insecticidas y antifúngicas comprobadas. (Steenkamp, *et al.* 2005). Este es el caso de muchos flavonoides de naturaleza lipofílica (flavonas, flavanonas, entre otros) que presentan una actividad antifúngica muy considerable y que constituyen verdaderas barreras frente a la penetración de los hongos patógenos. (Cartaya *et al.* 2001). También se ha demostrado el efecto de algunos flavonoides en la inhibición de infecciones de origen viral en las plantas (Salah, 1995: citado en Cartaya *et al.* 2001)

Por otro lado, *C. multiflora*, expone un criterio positivo en las quinonas, en los resultados obtenidos se evidenció que es de los componentes más frecuentes para este género, en concordancia, según la revisión fitoquímica en estudios para otras especies del género *Clusia*, han encontrado la presencia de quinonas y sus extractos se han utilizado como insecticidas potenciales (Rosado *et al.*, 2019). Las quinonas se unen con

adhesinas superficiales expuestas, polipéptidos de la pared celular, enzimas unidos a la membrana y forma complejos que inactivan las enzimas, siendo estos MS importantes para la actividad antifúngica y antimicrobiana. (García *et al.* 2016).

Con respecto a los taninos, según González (1996), estos MS actúan como un mecanismo protector en las plantas contra insectos y hongos en descomposición, al formar complejos con proteínas (estructurales y catalíticas), almidón, sustancias pépticas y celulosa, lo cual inactiva o reduce significativamente el ataque enzimático de bacterias. De igual forma, según literatura reportada, se les puede atribuir a los taninos, un comportamiento antifúngico de los extractos de plantas de la familia CLUSIACEAE, sobre el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*, en su fase de reproducción asexual. (Mosquera *et al.*, 2009).

Por otra parte, para *C. multiflora*, se encontró contenido de alcaloides y cardiotónicos. Estos resultados se compararon con resultados reportados por Abegunde *et al.*, (2020) y Junqueira *et al.*, (2020), quienes encontraron Alcaloides y glicósidos cardiotónicos los cuales aún no han sido descritos en la literatura. Dichos metabolitos presentes en esta familia permiten que tengan usos medicinales importantes como citotóxicos, anti inflamatorios, vaso relajantes, antimicrobianos, o con potencial anticancerígeno, en el caso de los glicósidos cardiotónicos.

Conforme a los resultados encontrados, es de recalcar que los taninos, flavonoides y quinonas dan un primer indicativo de la actividad antibacteriana y antifúngico de los extractos etanólicos del látex de *C. multiflora*, dado que, se han realizado pocos estudios sobre la composición química del látex de especies del género *Clusia*, que no incluyen la especie analizada en esta investigación.

## 6.2. PRUEBA ANTIFÚNGICA

Los extractos etanólicos del látex de los individuos masculino y femenino de *C. multiflora* probados frente a *Fusarium oxysporum* arrojaron un porcentaje de inhibición mayor al 60%, siendo los individuos femeninos quienes presentaron mayor actividad con un 75,02% sobre los masculinos con un 67,12%, en promedio. Por lo anterior se puede asumir que la especie estudiada presenta una moderada actividad antifúngica frente al hongo *F. oxysporum*, de acuerdo con Márquez *et al.*, (2007). En la Tabla 5 y Figura 23, se presentan los resultados del ensayo.

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas antifúngicas.

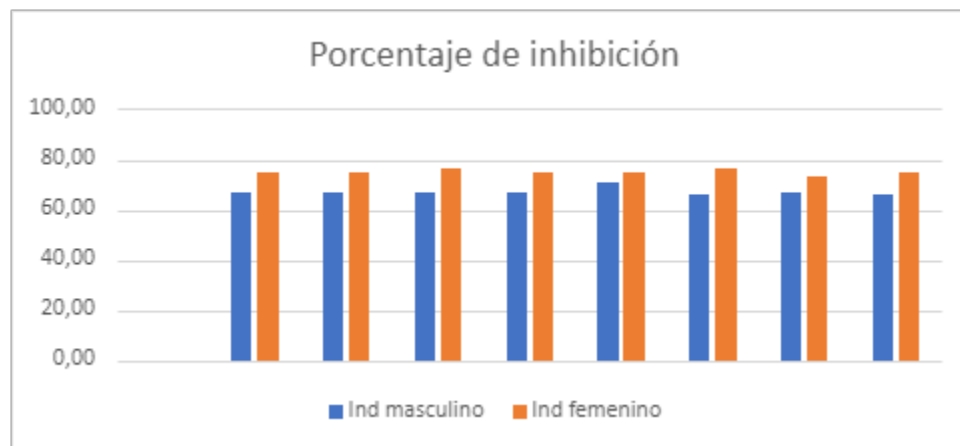
Individuo	Sexo	Diámetro del halo de crecimiento (mm)				% In
		<i>Fusarium oxysporum</i>				
		1	2	3	Pr	
T	T	60	60	60	60,00	0,00
1	M	20,0	20,0	20,0	20,00	66,67
2	F	15,0	15,0	15,0	15,00	75,00
3	M	20,0	20,0	20,0	20,00	66,67
4	F	15,0	10,0	20,0	15,00	75,00
5	M	20,3	19,0	20,0	19,75	67,08

6	F	12,5	12,5	17,5	14,17	76,39
7	M	20,8	17,3	22,0	20,00	66,67
8	F	16,3	15,0	14,8	15,33	74,44
9	M	16,8	18,3	17,5	17,50	70,83
10	F	15,0	14,5	15,5	15,00	75,00
11	M	20,0	20,8	20,3	20,33	66,11
12	F	13,3	15,0	14,8	14,33	76,11
13	M	19,3	20,8	20,3	20,08	66,53
14	F	15,8	16,8	15,8	16,08	73,19
15	M	20,3	20,3	20,0	20,17	66,39
16	F	12,5	16,3	16,3	15,00	75,00

**T:** Testigo. **M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino

**Pr:** Promedio. **%In:** Porcentaje de inhibición. **%Cr:** Porcentaje de crecimiento.

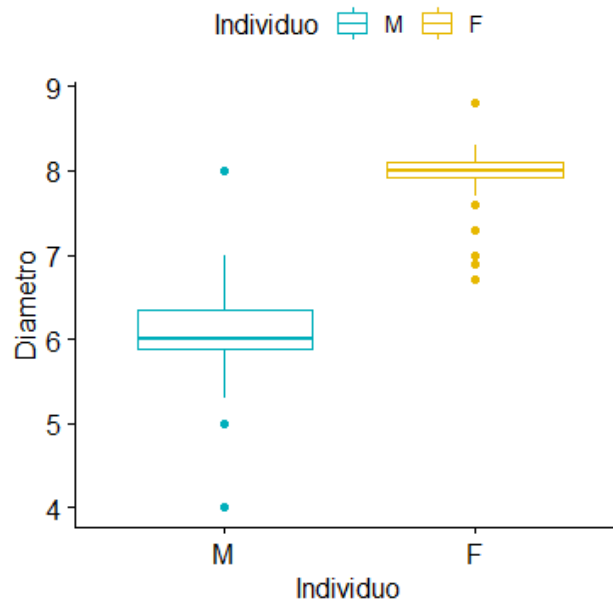
**Fuente:** Elaboración propia.



**Figura 23.** Diagrama del porcentaje inhibición para *F. oxysporum*

**Fuente:** Elaboración propia.

En la Figura 24, se presenta el diagrama de caja generado a partir de la aplicación del test no paramétrico de Wilcoxon. Dicho test arrojó un p-valor de 0.012 lo cual es menor al nivel de significancia 0.05, por lo tanto, se puede concluir que hay diferencias significativas entre los diámetros del halo de inhibición de los individuos femeninos y masculinos de la especie *Clusia multiflora* contra el hongo *F. oxysporum*.



**Figura 24.** Diagrama de caja de los diámetros de inhibición de los individuos femeninos y masculinos de la especie *Clusia multiflora*. **M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino  
**Fuente:** Elaboración propia.

En la literatura reportada no se encuentran estudios sobre la actividad antifúngica de alguna especie de la familia CLUSIACEAE frente a *Fusarium oxysporum*, sin embargo, se reporta que la especie *C. multiflora*, presenta un porcentaje de inhibición de entre el 89% y 96% en la germinación de los tubos de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* (Mosquera *et al.*, 2009).

El efecto inhibitor de los dos extractos sobre el crecimiento de *F. oxysporum* se puede deber a la presencia de algunos de los metabolitos, como los flavonoides, que son un grupo de compuestos con una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo polinizadores antibacterianos, antivirales y atrayentes, antioxidantes y agentes antifúngicos (Maneemegalai & Naveen, 2010). Por lo tanto, es de especial importancia el efecto inhibitor del extracto de los individuos de *C. multiflora*, puesto que puede servir como parte de un control biológico a este fitopatógeno que ataca a una gran cantidad de plantas.

Las sustancias antifúngicas inhiben el crecimiento de los hongos de diferentes maneras dependiendo de su lugar de actuación (membrana celular, pared celular o núcleo de la célula), lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico. Por ejemplo, el polieno se une al ergosterol, esterol predominante en las células del hongo, y afectar la permeabilidad de la membrana celular, causando la pérdida de proteína, glúcidos, entre otros, y llevar las células a la muerte. Otros compuestos conocidos como antifúngicos son los azoles y alilaminas, estos interrumpen la síntesis del ergosterol en diferentes etapas, provocando la acumulación de esteroides tóxicos al interior de la célula, afectando la permeabilidad e inhibiendo el crecimiento. Finalmente, los lipopéptidos afectan la pared celular del hongo, inhibiendo la síntesis de los glucanos, lo cual causa que la pared celular se debilite y sea incapaz de soportar el estrés osmótico (Gregori, 2005).

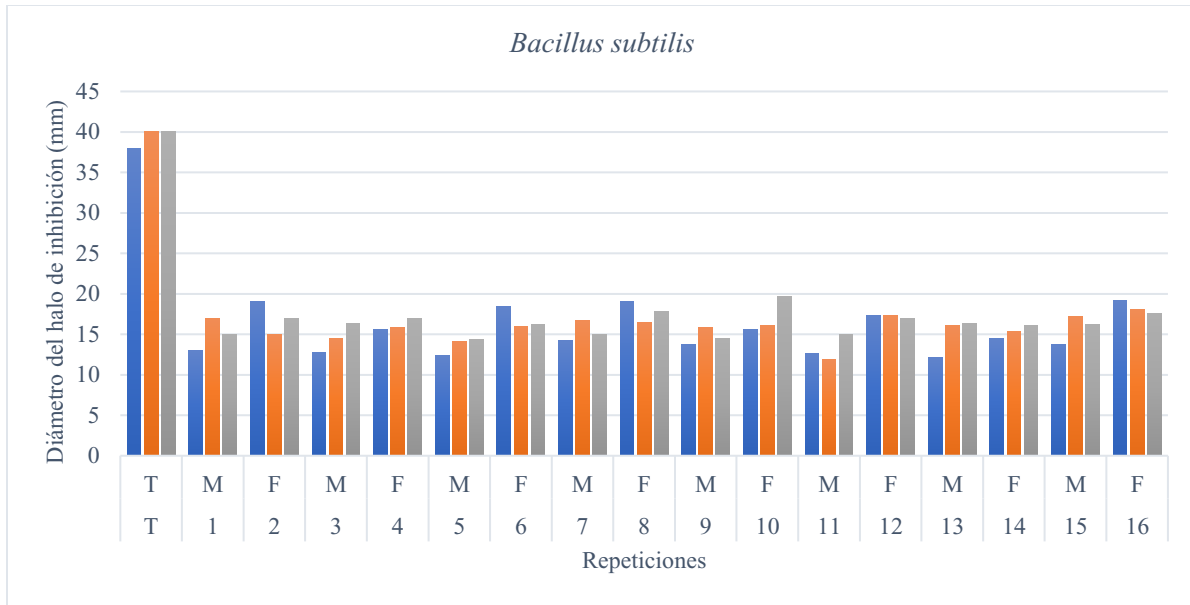
### 6.3. PRUEBA ANTIBACTERIANA

En los ensayos de susceptibilidad antibacteriana por difusión en agar los resultados para los extractos etanólicos de ambos individuos presentaron un halo de inhibición significativo en las bacterias Gram (+) *B. subtilis*. En cuanto a la bacteria Gram (-) *E. coli*, los extractos de ambos individuos presentaron actividad inhibitoria nula (Tabla 6, Figuras 24 y 25).

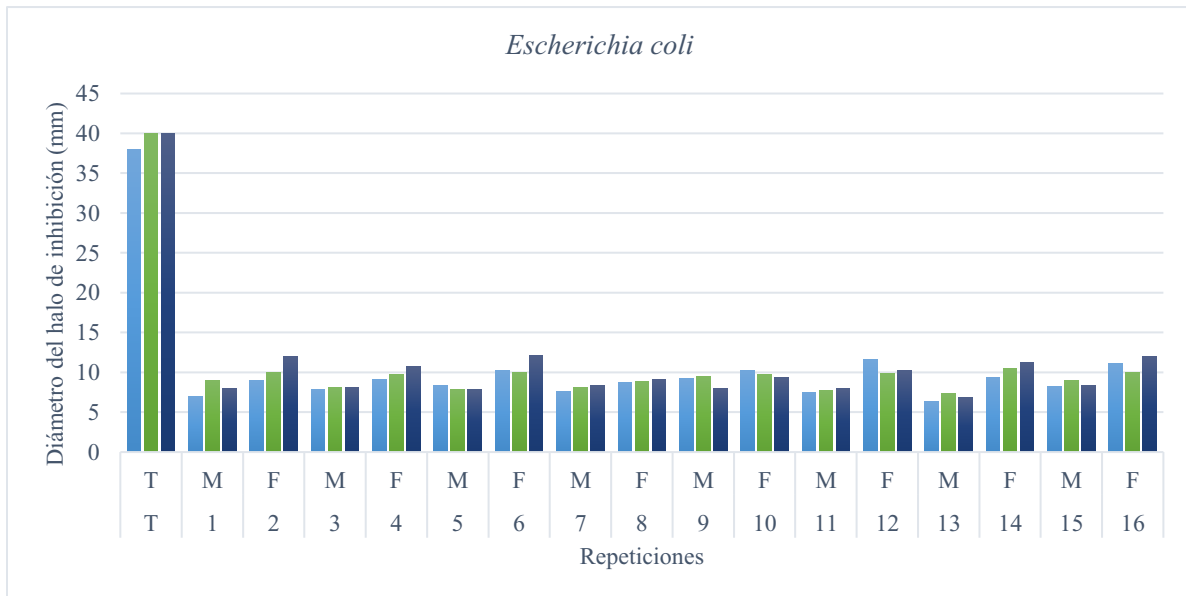
**Tabla 6.** Resultados de las pruebas antibacterianas

Individuo	Sexo	Diámetro del halo de inhibición (mm)							
		<i>Bacillus subtilis</i>				<i>Escherichia coli</i>			
		1	2	3	Prom	1	2	3	Prom
<b>T</b>	-	38	40	40	39,33	38	40	40	39,33
<b>1</b>	M	13,0	17,0	15,0	15,00	7,0	9,0	8,0	8,00
<b>2</b>	F	19,0	15,0	17,0	17,00	9,0	10,0	12,0	10,33
<b>3</b>	M	12,7	14,5	16,3	14,50	7,9	8,1	8,1	8,03
<b>4</b>	F	15,6	15,8	17,0	16,13	9,1	9,7	10,7	9,83
<b>5</b>	M	12,4	14,1	14,3	13,60	8,3	7,8	7,8	7,97
<b>6</b>	F	18,4	16,0	16,2	16,87	10,2	10,0	12,1	10,77
<b>7</b>	M	14,2	16,7	15,0	15,30	7,6	8,1	8,3	8,00
<b>8</b>	F	19,0	16,4	17,8	17,73	8,7	8,8	9,1	8,87
<b>9</b>	M	13,7	15,8	14,5	14,67	9,2	9,5	8,0	8,90
<b>10</b>	F	15,6	16,1	19,7	17,13	10,2	9,7	9,3	9,73
<b>11</b>	M	12,6	11,9	15,0	13,17	7,5	7,7	8,0	7,73
<b>12</b>	F	17,3	17,3	17,0	17,20	11,6	9,8	10,2	10,53
<b>13</b>	M	12,1	16,1	16,3	14,83	6,3	7,4	6,8	6,83
<b>14</b>	F	14,5	15,4	16,1	15,33	9,3	10,5	11,3	10,37
<b>15</b>	M	13,7	17,2	16,2	15,70	8,2	9,0	8,4	8,53
<b>16</b>	F	19,2	18,1	17,6	18,30	11,1	10,0	12,0	11,03

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 25.** Diagrama del halo de inhibición para *B. subtilis*  
**T:** Testigo. **M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino  
**Fuente:** Elaboración propia.



**Figura 26.** Diagrama del halo de inhibición para *E. coli*  
**T:** Testigo. **M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino  
**Fuente:** Elaboración propia.

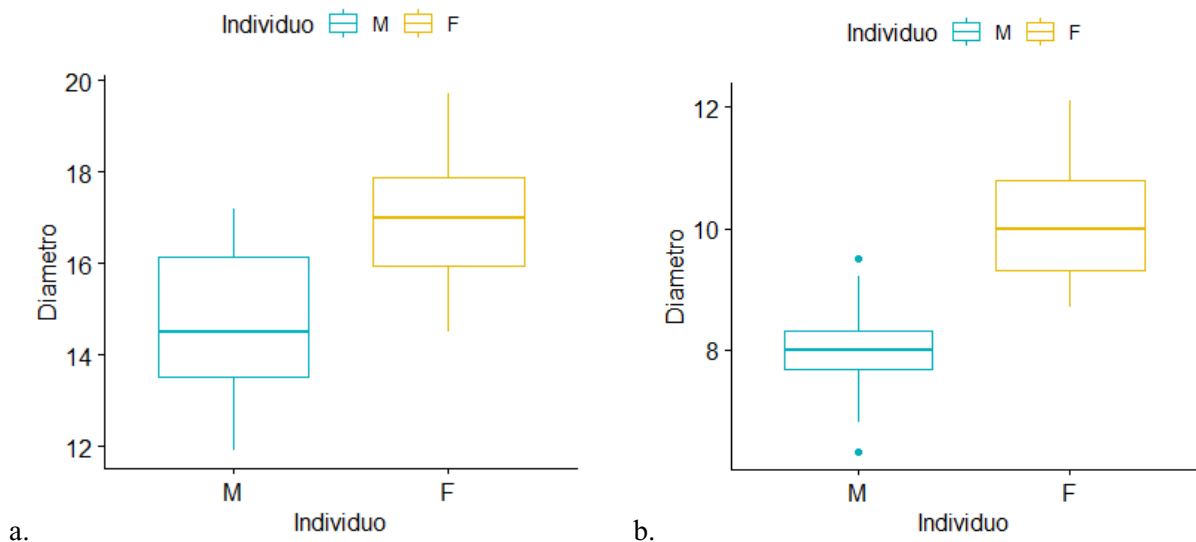
El uso de Sulfacetamida como control positivo permite evidenciar la acción tanto en bacterias Gram (+) como en Gram (-), ya que las sulfonamidas son activas contra un amplio espectro de las bacterias mencionadas anteriormente. Este antibiótico pertenece al grupo de las sulfonamidas, las cuales tienen efecto bacteriostático, es decir, que no producen la muerte de la bacteria, pero impiden su reproducción (Rondón, 2016).

La aplicación del método de difusión en agar por perforación en placa permitió determinar que los extractos etanólicos de *C. multiflora* presentan actividad contra la bacteria Gram (+) *B. subtilis*. Por el contrario, no presentan actividad contra la bacteria Gram (-) *E. coli*. Este resultado concuerda con los reportados para otras especies del mismo género (Ribeiro *et al.*, 2011; Lokvam & Braddock, 1999; Cuesta *et al.* 2005; Negi *et al.*, 2008). Se puede asumir entonces, que posiblemente las especies del género *Clusia*, como regla general, presentan actividad contra las bacterias Gram (+) pero no Gram (-).

En el caso de la bacteria Gram (+) *Bacillus subtilis*, se observaron halos de inhibición de interés en ambos extractos, principalmente en el individuo femenino. En concordancia a un estudio reportado para el género *Garcinia*, se obtuvo que dicha bacteria era susceptible a los extractos de *Garcinia cowa* y *Garcinia pedunculata*. (Negi *et al.*, 2008). La bacteria *B. subtilis*, se utiliza como indicador de esterilidad (Lorenzana *et al.*, 2003), por lo que se puede decir que el látex de *C. multiflora* tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano.

La composición de la pared celular en las Bacterias Gram (-) consta de dos capas, una membrana externa y una capa de peptidoglicano. La capa principal de las Gram (-) es la membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de algunas sustancias. Su estructura básica es una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos (capa interna), lipopolisacáridos y proteínas (capa externa). De estos componentes, los lipopolisacáridos son característicos de las bacterias Gram (-) y sólo se encuentran en la membrana externa. Los antibióticos hidrófilos atraviesan la membrana celular a través de canales acuosos compuestos por porinas. Las bacterias con deficiencia de dichos canales pueden ser resistentes (Soto, 2003). Por otra parte, las bacterias Gram (+) contienen una capa externa de peptidoglicano, que es una barrera de permeabilidad ineficaz, por lo cual tiene una mayor sensibilidad que las bacterias Gram (-) (Scherrer & Gerhardt, 1971: Citado en Negi *et al.*, 2008).

En la Figura 27 se presentan los diagramas de cajas generados a partir de la aplicación del test no paramétrico de Wilcoxon. Dicho test arrojó un p-valor de 0.032 con la bacteria *B. subtilis* y 0.024 con *E. coli* lo cual es menor al nivel de significancia 0.05, por lo tanto, se puede concluir que hay diferencias significativas entre los diámetros del halo de inhibición de los individuos femeninos y masculinos de la especie *Clusia multiflora* frente a las bacterias analizadas.



**Figura 27.** Diagrama de caja para los individuos de *C. multiflora*. a. *B. subtilis* y b. *E. coli*.  
**M:** Individuo masculino. **F:** Individuo Femenino  
**Fuente:** Elaboración propia.

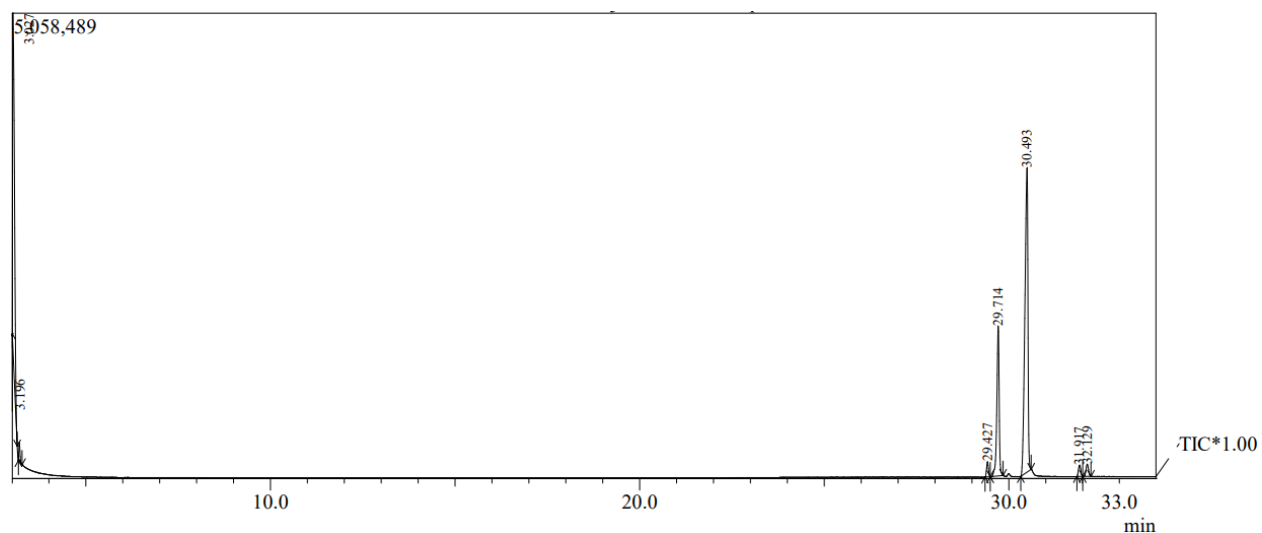
De acuerdo con los diagramas de caja presentados en la Figura 27 se puede observar que el individuo femenino presenta, por poco, diámetros de inhibición más altos que el individuo masculino. Esto concuerda con lo reportado por Lokvam & Braddock (1999) en donde *C. grandiflora* presentó diámetros del halo de inhibición del individuo femenino, de hasta dos veces más grande que el diámetro del halo de inhibición del individuo masculino.

En el presente estudio, se encontró que el extracto del látex de *C. multiflora* tiene un efecto inhibitorio contra la bacteria Gram (+) probada. Según Davidson (1997), esto tiene un impacto significativo ya que la mayoría de los antimicrobianos alimentarios aprobados son más efectivos contra las bacterias Gram (+) y es de especial importancia en la industria alimentaria, ya que su posible uso podría reemplazar los conservantes sintéticos por conservantes naturales (Negi *et al.*, 2008).

#### 6.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la determinación de los metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo femenino *C. multiflora* se observaron 7 señales, de las cuales se presentaron principalmente dos entre los minutos 29-30 minutos (Figura 28). La señal 1 corresponde a 7-epi-clusianona con un área de 17.34% y el pico 2 a 18,19-dihidroxi-clusianona con un área de 51.42%, con índices de coincidencia de 88 y 90%, de acuerdo a la biblioteca interna del equipo Wiley/Nist.



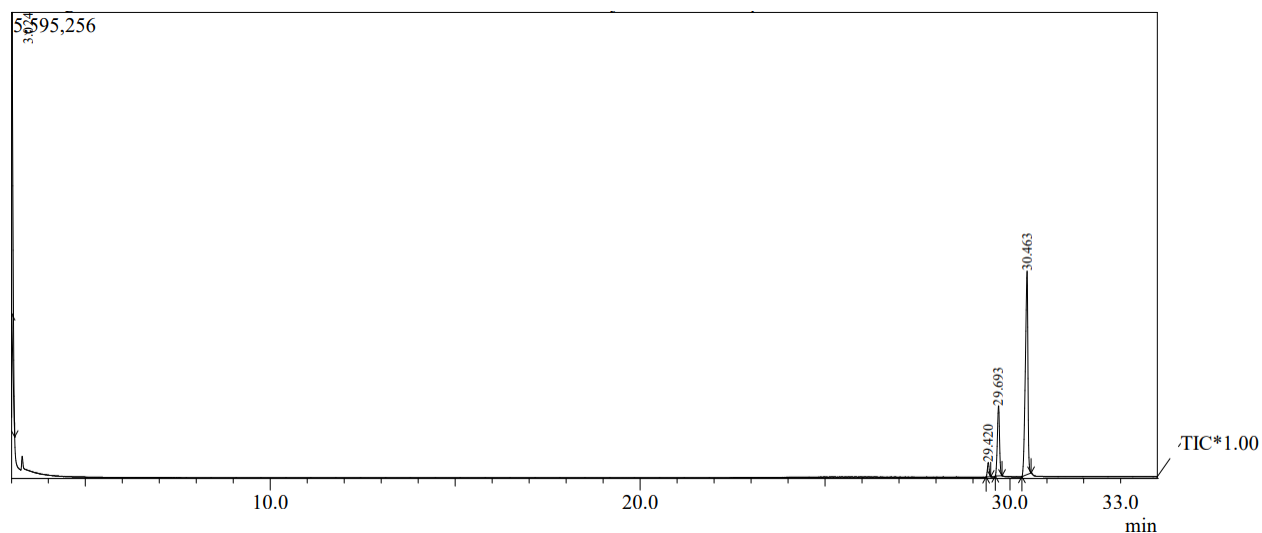


**Figura 28.** Diagrama CG-EM de la determinación de metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo femenino de *C. multiflora*.

**Tabla 7.** Resultados de la determinación de metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo femenino de *C. multiflora*.

Pico	Tiempo de retención	Tiempo inicial	Tiempo final	Área	Área (%)	Nombre
1	3.027	3.008	3.139	12481712	25.92	Triclorometano
2	3.196	3.172	3.270	419865	1.04	Triclorometano
3	29.427	29.362	29.501	571953	1.42	Lup-20(29)-en-
4	29.714	29.501	29.844	6975466	17.34	7-epi-clusianona
5	30.493	30.326	30.603	18619723	51.42	18,19-dihidroxiclusianona
6	31.917	31.845	32.008	546744	1.36	Lup-20(29)-en
7	32.129	32.008	32.229	603911	1.50	Lup-20(29)-en
<b>Total</b>				40219374	100.00	

Para la determinación de los metabolitos secundarios del individuo masculino de *C. multiflora* se observaron 4 señales, de las cuales principalmente dos entre los minutos 29-30 minutos (Figura 29). La señal 1 corresponde a 7-epi-clusianona con un área de 14.96% y la señal 2 a 18,19-dihidroxi-clusianona con un área de 46.30%, con índices de coincidencia de 87 y 91% de acuerdo a la biblioteca interna del equipo Wiley/Nist.

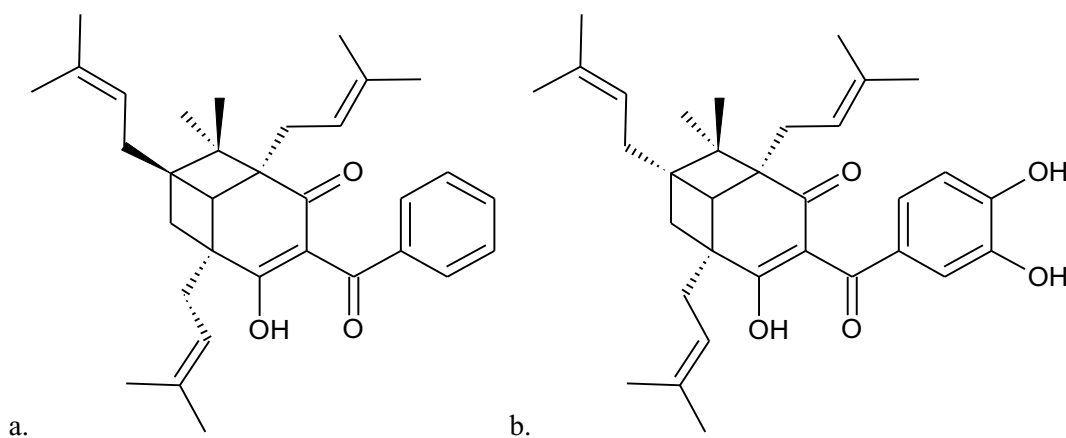


**Figura 29.** Diagrama CG-EM de la determinación de metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo masculino de *C. multiflora*.

**Tabla 8.** Resultados de la determinación de metabolitos secundarios mayoritarios para el individuo masculino de *C. multiflora*.

Pico	Tiempo de retención	Tiempo inicial	Tiempo final	Área	Área (%)	Nombre
1	3.024	3.008	3.090	7026669	36.26	Triclorometano
2	29.420	29.362	29.485	560157	2.48	Lup-20(29)-en-
3	29.693	29.607	29.787	3375577	14.96	7-epi-clusianona
4	30.463	30.326	30.571	11605472	46.30	18,19-dihidroxiclusianona
<b>Total</b>				22567875	100.00	

Como se pudo observar, ambos individuos presentan como metabolitos secundarios mayoritarios las clusianonas 7-epi-clusianona y 18,19-dihidroxiclusianona (Figura 30), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Singh & Bodiwala (2010), de los frutos de *C. torresii* en Costa Rica, y que junto a otros metabolitos probaron tener actividad anti-VIH y anticancerígena, es decir, presenta altos grados de citotoxicidad (Piccinelli *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2007).



**Figura 30.** a. 7-epi-clusianona. b. 18,19-dihidroxi-clusianona

Fuente: Ahmad *et al.* (2007).

## 7. APORTE AL CONOCIMIENTO DE LA ESPECIE VEGETAL *Clusia multiflora*

La vegetación natural del mundo está desapareciendo o deteriorándose a un ritmo alarmante. Muchas sociedades que están en contacto directo con la naturaleza y utilizan productos naturales para satisfacer sus necesidades están experimentando un rápido cambio cultural, social y económico. Estos grupos humanos tenían profundos conocimientos sobre las plantas locales que también ahora están a punto de perderse. Por ello, el estudio del uso de las plantas, ofrece enormes posibilidades para descubrir nuevos productos derivados de plantas que sean útiles para los humanos. Es por esto, que documentar las especies de plantas nativas es crucial, ya que recopila información esencial para la conservación y el manejo estratégico de los ecosistemas (OMS, *et al.* 1993).

*C. multiflora* es una de las especies nativas de la región andina, que poco han sido estudiadas en cuanto a sus componentes y propiedades químicas, partiendo de esto, se expone en esta investigación lo valiosa que es la planta en cuanto a los usos ancestrales que ha tenido en diferentes comunidades, y rescatar el saber tradicional, como lo son su uso medicinal para cicatrizante, purgante y antiinflamatorio (DAMA, 2000), su uso artesanal, pues sus raíces aéreas son utilizadas como materia prima para la elaboración de canastos (Linares, 2008) y su uso ecológico, dado que es un inductor preclimático en procesos de restauración ecológica, utilizada para la estabilización de taludes y protección de cuencas hidrográficas (Corantioquia, 2013).

Por otro lado, en cuanto al estudio realizado en el presente documento, a partir del análisis fitoquímico se obtuvo como resultado que *C. multiflora* es una planta valiosa pues contiene metabolitos secundarios importantes como los taninos, flavonoides, quinonas, terpenos, los cuales le confieren numerosas actividades biológicas, como lo son actividades antibacterianas, antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas (Gershenzon, *et al.*, 1991; Cartaya *et al.*, 2001)

Con respecto al análisis realizado a los extractos etanólicos del látex de los individuos femeninos y masculinos de la especie *C. multiflora*, se detectó un efecto inhibitorio de los dos extractos frente al crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum*, este un aporte a la investigación puesto que puede servir como control biológico a este fitopatógeno que ataca a una gran cantidad de especies vegetales en plantaciones forestales, viveros y cultivos agrícolas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana, se encontró que el extracto etanólico mostró efectos inhibitorios muy interesantes sobre el crecimiento de la bacteria *B. subtilis*, por lo cual uno de los usos potenciales es como antimicrobiano alimentario, de tal manera su posible uso podría reemplazar los conservantes sintéticos por conservantes naturales, este efecto inhibitorio puede atribuirse a la presencia de xantonas (Negi *et al.*, 2008). Esto se propone dado que la seguridad alimentaria microbiana siempre ha sido una gran preocupación para los consumidores, las agencias reguladoras y la industria alimentaria en todo el mundo. Una de las estrategias de conservación al inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables es utilizar reactivos químicos con efectos antibacterianos. Sin embargo, la demanda actual de los consumidores de alimentos frescos son

productos con menos aditivos sintéticos, pero con alta seguridad y vida útil, lo que promueve la fabricación de alimentos con el uso de fuentes alternativas de conservantes naturales seguros, eficaces y aceptables, que pueden ser encontrados en extractos de plantas (Beuchat & Golden, 1989; Davidson, 1997; Sofos, Beuchat, Davidson, & Johnson, 1998: citado en Negi *et al.*, 2008).

Por otra parte, según los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de fenoles, teniendo en cuenta que son un amplio grupo de compuestos con funciones importantes en la defensa contra insectos, herbívoros y hongos (Andersen *et al.*, 2006), se propone el uso del extracto de la planta *C. multiflora* como insecticida, considerando que el papel de algunos compuestos fenólicos tiene como modo de acción toxicidad, inhibición del crecimiento y reducción de la digestibilidad contra patógenos y herbívoros (Barbehenn *et al.*, 2011). En diferentes estudios realizados para el género, se evidencia que, por la presencia de estos metabolitos secundarios, los insectos presentan mortalidad en diferentes etapas de desarrollo, incluidas malformaciones corporales, rango de período de muda y toxicidad a insectos. Es así reportado en el estudio realizado por Rosado *et al.*, (2009), donde se investigó el extracto de tallo del individuo masculino de *C. hilariana*, sobre el desarrollo de *Dysdercus peruvianus*, obteniendo como resultado que dicho extracto impidió que la mayoría de los insectos lleguen a la etapa adulta, esto se desencadenó incluso en las dosis más bajas, lo que sugiere que estas fracciones contienen una alta concentración de componentes activos. Así mismo, en la investigación de Duprat *et al.*, (2017) de los extractos de *C. fluminensis*, arrojaron el retraso del desarrollo de las larvas de *Dysdercus peruvianus* y *Oncopeltus fasciatus*.

Con el uso del extracto del látex de *C. multiflora* como insecticida se convertiría en un recurso importante para manejar las plagas de insectos que, según Weiss *et al.*, (2004) siguen siendo la principal causa de la pérdida económica de varias plantaciones forestales y cultivos en el mundo (Citado en Rosado *et al.*, 2019). De igual forma, se estarían identificando nuevas alternativas para reemplazar los plaguicidas sintéticos y que traiga consigo menores impactos en el medio ambiente y la salud humana.

Por último, es importante mencionar que esta investigación es un aporte a la academia, ya que se participará en el XIV Congreso Colombiano de Fitoquímica que será realizado del 21 al 24 de junio de 2022, en la Universidad de Sucre, con el fin de dar a conocer la fitoquímica y actividad biológica de plantas medicinales, como lo es el caso de la especie *C. multiflora*.

## 8. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de la especie vegetal *Clusia multiflora* posee metabolitos secundarios taninos, flavonoides y quinonas, los cuales fueron identificados por medio de diferentes pruebas de coloración y precipitación en un análisis fitoquímico preliminar.
- Los resultados encontrados de taninos, flavonoides y quinonas dan un primer indicativo de la actividad antibacteriana y antifúngico de los extractos etanólicos del látex de *C. multiflora*, dado que, se han realizado pocos estudios sobre la composición química del látex de especies del género *Clusia*, que no incluyen la especie analizada en esta investigación.
- La especie vegetal dioica *C. multiflora* presenta actividad antibacteriana contra las bacterias Gram (+) *B. subtilis*. De acuerdo con los resultados obtenidos, y con la comparación con la literatura, se puede decir que la mayoría de las especies vegetales de género *Clusia* presentan actividad antibacteriana contra las bacterias Gram (+). El individuo femenino presenta, por poco, diámetros de inhibición más altos que el individuo masculino.
- En el presente estudio, se encontró que el extracto del látex de *C. multiflora* tiene un efecto inhibidor contra la bacteria Gram (+) probada y según literatura reportada puede ser de especial importancia en la industria alimentaria, ya que su posible uso podría reemplazar los conservantes sintéticos por conservantes naturales.
- Los extractos etanólicos del látex de los individuos masculino y femenino de *C. multiflora* probados frente a *Fusarium oxysporum* presentaron actividad antifúngica, impidiendo la reproducción y el crecimiento del hongo.
- La Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) permitió la identificación de dos clusianonas, 7-epi-clusianona y 18,19-dihidroxi-clusianona, con el individuo femenino presentando mayores tiempos de retención que el individuo masculino, y que, de acuerdo con la literatura, estas clusianonas presentan altos grados de citotoxicidad, por lo cual tienen uso potencial contra el VIH y cáncer.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el fraccionamiento de los extractos etanólicos con el fin de obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la que tiene efecto el extracto etanólico de la especie dioica *C. multiflora*.
- Realizar aislamiento y caracterización de los principios antibacterianos del extracto de la especie *C. multiflora*
- Se recomienda comprobar si el extracto de la especie tiene margen para el posible uso como alimento biopreservativo.
- Se recomienda realizar estudios con el fin de determinar si extracto de la especie *C. multiflora* puede contribuir al desarrollo de sustancias biodegradables y más selectivas para uso forestal y agrícola con el propósito de controlar plagas mediante programas de manejo sostenible de plagas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abegunde, M., Akinyele, A. & Ayodele-Oduola, R. (2020). Chemical analysis and antibacterial activities of *Calotropis procera* and *Clusia rosea* leaves extracts. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 12(01), 025-030. doi: 10.30574/gscbps.2020.12.1.0175

Ahmad NM, Rodeschini V, Simpkins NS, Ward SE, Blake AJ. (2007) Synthesis of polyprenylated acylphloroglucinols using bridgehead lithiation: the total synthesis of racemic clusianone and a formal synthesis of racemic garsubellin A. The Journal of Organic Chemistry, 72, 4803–4815.

Andrade, M., Almeida, E., Conserva, E. (1998). Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. Phytochemistry. Volume 47, Issue 7Pages 1431-1433. doi:10.1016/S0031-9422(97)00746-2

Anholeti da Silva, M. C., Heringer, A. P., Figueiredo, M. R., & de Paiva, S. R. (2012). Separation of clusianone from *Clusia fluminensis* planch. and Triana (CLUSIACEAE) by highspeed counter-current chromatography (HSCCC). Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35(16), 2313–2321. doi:10.1080/10826076.2011.631261

Ávila, L., Baquero, E., Viña, A. & Murillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Vitae. 3(1), 55-60.

Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Revista agronomía colombiana. Universidad Nacional de Colombia.

Arévalo, M., Enciso, A. (1996). Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de Espeletias encontradas en el páramo de Guasca. Carrera de Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado.

Andersen, O. M., & Markham, K. R. (Eds.) (2006). Flavonoid's chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press.

Arámbula, J., Ibarra, B., González, R., Muñoz, O., Hernández, H. (2010). Variación estacional de compuestos fenólicos foliares en *Quercus sideroxyla* en diferentes tipos de suelo. Madera y bosques. Vol.16 no.3 Xalapa, México.

Augustin, J., Kuzina, V., Andersen, S. & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry. 72(6):435-457. DOI: 10.1016/j.phytochem.

Badshah, S., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B., Hamid, E., Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. Biomedicine & Pharmacotherapy Volume 140. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111596

Barreto, J. (1997). Efectos Antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel. Carrera de bacteriología. Facultad de Ciencias básicas. Pontificia Universidad Javeriana.

Bonilla, A. (2002). Caracterización de los pigmentos antocianos en los primordios foliares de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora* de un bosque andino. Pontificia Universidad Javeriana. Fac. Ciencias. Bogotá, Colombia.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S, Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161 (2001) 839–851.

Cala, M., Vásquez, Á. Martínez, J., Stashenko, E. (2007). Caracterización de compuestos fenólicos por electroforesis capilar de la especie *Phyllanthus Acuminatus* (euphorbiaceae) y estudio de su actividad antioxidante. *Scientia Et Technica*, vol. XIII, núm. 33, pp. 173-175. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Caldas, A., (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. Universidad de Cuenca.

Calvo, J., Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Volumen 27 (1), págs. 44-52. doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001

Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, vol. 22, núm. 2. Págs. 5-14. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba

Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff). *Revista Colombia Forestal* Vol. 12: 161-170

Carvajal, L., Ariza, W., Caro, L., Valero, N, (2014). Especies forestales representativas del suroriente de Boyacá. Árboles de corpochivor - Corporación Autónoma Regional de Chivor –CORPOCHIVOR, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia.

Claramunt, M., Farrán, M., Lópe, C., Pérez, M., Gutiérrez, D. (2013). *Química Bioorgánica y Productos Naturales*. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid

Chakraborty, S., Kumar, P., Sanyal, R., Bhagwan, A., Arvind D., Patil, M., Dey, A. (2021). Unravelling the regulatory role of miRNAs in secondary metabolite production in medicinal crops. *Plant Gene* Volume 27. doi: 10.1016/j.plgene.2021.100303.

Clark, D. J., & Maaløe, O. (1967). DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 23(1), 99–112. doi:10.1016/s0022-2836(67)80070-6

Corantioquia. (2003). Compendio de 151 especies de flora nativa de uso tradicional o potencial en el área de la jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia. CORANTIOQUIA.

Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). En B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (1250-1318).

Cruz, F., Teixeira, J. (2004). Polyprenylated benzophenones with a tricyclo [4.3.1.13,8] undecane skeleton from *Clusia obdeltifolia*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol.15. pp. 504-508

Cuesta, O. Fernández, M., Márquez, I., Rosado, A., Piccinelli, A. & Rastrelli, L. (2005). Nuevas benzofenonas preniladas en propóleos cubanos. *Revista Cubana de Química*. Vol.17(3).

Da Silva, Da Nóbregabrano, A., Lessa, B., Anholeti, M., Lobão, A., Valverde, A., de Paiva, S., Joffily, A. (2017). *Clusia criuva* Cambess. (CLUSIACEAE): caracterización anatómica, prospección química y actividad antioxidante. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Vol. 89 (3). DOI:10.1590/0001-3765201720160286

DAMA (2000). Protocolo distrital de restauración ecológica. Guía para la restauración de ecosistemas nativos en las áreas rurales de Santa Fe de Bogotá. Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente Alcaldía Mayor Santa Fe de Bogotá. Fundación Bachaqueros Estación Biológica Colombia. Págs. 288.

Davicino, R., Mattar, M., Casali, Y., Correa, S., Pettenati, E. & Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. peru biol.* v.14 n.2 Lima.

Debnath, B., Somraj, W., Das, M., Goswami, S., Kumar, M., Maiti, D., Manna, K. (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials today CHEMISTRY*. Volume 9, Pages 56-72. doi: 10.1016/j.mtchem.2018.05.001

Dewick, P. (2009). *Medicinal natural products. A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition. University of Nottingham, UK

Dey A. Mukherjee A, Chaudhury M. (2017). Alkaloids from Apocynaceae: Origin, Pharmacotherapeutic Properties, and Structure-Activity Studies. *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 52, Elsevier pp. 373-488. DOI: 10.1016/B978-0-444-63931-8.00010-2

Duan, Z., Cheng, J., Li, X. (2008). Research Status of Coumarins in Medicinal Plants of Umbelliferae and Their Pharmacological Effects. *China Pharmacy* (19), 223–226.

Duprat, R., Anholeti, M., de Sousaa, B., Pacheco, J., Figueiredo, M., Kaplan, M., Guerra, M., Santos, M., Gonzalez, M., Ratcliffe, N., Mello C., Paivad, S., Feder, D., (2017). Laboratory evaluation of *Clusia fluminensis* extracts and their isolated compounds against *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* Volume 27, Issue 1, Pages 59-66.

Eyong, K. O., Kuete, V., & Efferth, T. (2013). Quinones and Benzophenones from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*, 351–391. doi:10.1016/b978-0-12-405927-6.00010-2

Fairbairn, D. J. (2016). Sexual Dimorphism. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 105–113. doi:10.1016/b978-0-12-800049-6.00157-8

Faizal, A., & Geelen, D. (2013). Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 877–893. doi:10.1007/s11101-013-9322-4

Ferraz, C., Silva, M., Pereira, D., Caldas, B., Mattos, R., Oliveira, V., Andrade, E., Soares, A., da Silva, F., Cruz, F., Ribeiro, P. (2021). Polyprenylated benzophenone derivatives from *Clusia burle-marxii* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. Volume 94. doi: org/10.1016/j.bse.2020.104218

Ferreira, R., Carvalho, A., da Silva, T., Castro, R., da Silva, T., Carvalho, M. (2014). Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* Volume 24, Pages 617-625. doi: 10.1016/j.bjp.2014.11.005

Franco, D., Pereira, T., Vitorio, F., Nadur, N., Lacerda, N., Kümmerle, A. (2021). A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 239897-000 Seropédica. doi.org/10.21577/0100-4042.20170654– RJ, Brasil.



Frollini, E., Silva, C.G., Ramires, E.C. (2013). Phenolic resins as a matrix material in advanced fiber-reinforced polymer (FRP) composites, en: *Advanced Fibre-Reinforced Polymer (FRP) Composites for Structural Applications*. Elsevier, São Paulo, Brasil, pp. 7–43. doi:10.1533/9780857098641.1.7

Fu, J., Wu, Z., & Zhang, L. (2019). Clinical applications of the naturally occurring or synthetic glycosylated low molecular weight drugs. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.03.005

Galbis, J.A., (2000). Panorama actual de la química farmacéutica. Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.

García, D., Rivas, C., & Leos, C. (2016). Actividad antifúngica. Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 101-128.

Gershenson, J., Croteau. R. (1991). Chapter 5. Terpenoids. En (eds). Rosenthal G., Berenbaum, M. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites 2nd Edition*. Elsevier. Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-597183-6.50008-5

Goossens, A., Häkkinen, S., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A., Söderlund, H., Zabeau, M., Inze, D., Oksman-Caldentey, K. (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *PNAS* 100 (14) 8595-8600. DOI: 10.1073/pnas.1032967100

Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar. *Rev Cubana Farm* 2005; 39(2).

Gustafson, J., Blunt, M., Munro, R., Fuller, T., Mekee, J., Cardelina, G., Memahon, J., Gragg, M. (1992). The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron*, 48, pp. doi: 10093-10102

Gustafsson, MHG (2009). Neotropical CLUSIACEAE. In: Milliken, W., Klitgrd, B. & Baracat, A. (2009 onwards), *Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics*.

Hammel, B. (2010). *Clusia multiflora* Kunth. En Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). 2015. *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>

Handa, S. (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. En Handa, S., Khanuja, S., Longo, G., & Rakesh, D. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (21-54). Trieste: ICS UNIDO.

Harborne, J. (1991). Chapter 11 - Flavonoid Pigments. En (eds). Rosenthal G., Berenbaum, M. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites 2nd Edition*. Elsevier. Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-597183-6.50016-4

Haslam, E. (1989) *Plant Polyphenols – Vegetable Tannins Revisited – Chemistry and Pharmacology of Natural Products*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 165.

IGAC (2015). Tan solo el 0,3 por ciento de todo el territorio colombiano corresponde a áreas urbanas: IGAC. Tomado de: <https://igac.gov.co/es/noticias/tan-solo-el-03-por-ciento-de-todo-el-territorio-colombiano-corresponde-areas-urbanas-igac>

Jacobs, K., Wingfield, M., Gibbs, J. (2004). Pathology/ Vascular Wilt Diseases., Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-145160-7/00065-X>

Junqueira, M., Mattos, K., Palavecino, L., Pinto, L., Alves, B., Quintella, A., Castro, H., Carvalho, R., Franca, C., Joffily, A., Leda, A., Ribeiro, S. (2020). Anatomical, Histochemical and Biological Studies of *Clusia grandiflora* Splitg. (CLUSIACEAE). Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.63 (1). doi: 10.1590/1678-4324-2020190674

Kariño, E. (2018). Plant-herbivore interactions and secondary metabolites of plants: Ecological and evolutionary perspectives. Botanical Sciences. Vol. 96. (1). México. doi: 10.17129/botsci.1860.

Kerenyi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., Hornok, L. (2004). Mating Type Sequences in Asexually Reproducing Fusarium Species. Applied and Environmental Microbiology 70(8): 4419–4423. doi:

Khanbabaee, K., van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. The Royal Society of Chemistry. Nat. Prod. Rep, 18, 641–649.

Li, J., Ou-Lee, T., Raba, R., Amundson, R., Last, R. (1993) Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation, Plant Cell 171–179. doi: 10.1105/tpc.5.2.171

Lorenzana, L., Cardona, A., Cáceres, A. (2003). Actividad biocida de seis plantas de uso medicinal en el municipio de Tacana, San Marcos, Guatemala. Escuela de química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos Guatemala.

Lokvam, J. & Braddock, J. (1999). Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia grandiflora* (CLUSIACEAE). Springer-Verlag. Oecologia 119(1), 534-540.

Lokvam, J., Braddock, J., Reichardt, P. & Clausen, T. (2000). Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). Elsevier. Phytochemistry 55(1), 29-34.

Lurá de Calafell, M.C., González, A.M., Basílico, J.C., Sarsotti, P.V., Gómez, R.G., Freyre, L.B., (1997). Introducción al estudio de la micología [WWW Document]. Cent. Publicaciones, Univ. Nac. del Litoral.

Maneemegalai, S., T. Naveen. (2010). Evaluation of antibacterial activity of flower extracts of *Cassia auriculata* L. Ethnobotanical Leaflets 14:182-92

Mattos, K., Nunes, B., Joffily, A., Ribeiro, S., Franca, C. (2019). Revealing the development of secretory structures in the leaves of *Clusia fluminensis* and *Clusia lanceolata* (CLUSIACEAE). Flora Volume 256, Pages 69-78. doi: 10.1016/j.flora.2019.05.002

Márquez, R., De la Rosa, C., Mercado, A. (2007). Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (ULTIMORRIAL). Scientia Et Technica, Vol. XIII, núm. 33, pp. 155-159. Universidad Tecnológica de Pereira Pereira, Colombia

Martin, D. (2017). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. Vol. 9, Núm. 1. DOI: 10.22490/21456453.1968.

- Martínez, A. (2002). Esteroides cardiotónicos. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Meagher, T. & Antonovics, J. (1982). The population biology of *Chamaelirium luteum*, a dioecious member of the lily family: life history studies. *Ecology* 63(1), pags. 1690-1700
- Medeiros, P. M. (2018). Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). *Encyclopedia of Geochemistry*, 530–535. doi:10.1007/978-3-319-39312-4\_159.
- Medellín, D. (2015). Sistemática del género *Garcinia* (CLUSIACEAE): revisión taxonómica para Colombia y filogenia de las especies Neotropicales. Universidad Nacional de Colombia. Fac. de Ciencias, Dept. de Biología. Bogotá, Colombia.
- Mosunova, o., Navarro, J., Collemare, J. (2021). The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. *Encyclopedia of Mycology Volume 2*, Pages 458-476. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21072-8
- Mosquera, O., Echeverry, L., Niño, J. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica*, vol. XV, núm. 41, pp. 232-236. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Negi, P., Jayaprakasha, G., Jena, B. (2008). Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against food borne pathogens and spoilage bacteria. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 41, Issue 10. Pages 1857-1861. doi: 10.1016/j.lwt.2008.02.009
- Nicotra, A. (1998) Sex ratio variation and spatial distribution of *Siparuna grandiflora*, a tropical dioecious shrub. *Oecologia* 115(1),102-113
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, Vol 5. doi:10.1017/jns.2016.41.
- Peñarrieta, J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J., Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. *Revista Boliviana de Química*. Vol. 31, núm. 2.
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. Volumen 22. (1). Ciudad de la Habana
- Porto, A., Machado, S., Oliveira, C., Bittrich, V., Amaral, M., Marsaioli, A. (2000). Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry*, 55 pp. 755-768. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00292-2
- Puupponen, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, A., Hopia, A. & Oksman, M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 494-507
- Ribeiro, P., Ferraz, C., Guedes, M., Martins, D. & Cruz, F. (2011). A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. *Fitoterapia* 82 (2011) 1237–1240. doi: 10.1016/j.fitote.2011.08.012.

- Riley, L., Remis, R., Helgerson D. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 308:681-685. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198303243081203>
- Rondón, V. (2016). Perfil de resistencia antimicrobiana de bacterias gram- negativas aisladas de la superficie ocular en el mundo a partir del 2010, base de datos. Universidad del Valle. Fac. de ciencias de la salud. Bogotá, Colombia.
- Rosado, H., Anhoteli, M., Guerra, M., dos Santos-Malle, J., Figueiredo, M., Mello, C., González, M., Paiva, S. & Feder, D. (2019). Effects of semi-purified fractions from stems of *Clusia hilariana* on the development of *Dysdercus peruvianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.07.005>
- Roskov, Y., Kunze, T., Orrell, T. (Eds.), 2014. *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2014 Annual Checklist*. Leiden: Naturalis. Available at: [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2014](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2014)
- Saddique, M., Kamran, M., Shahbaz, M. (2018). Differential responses of plants to biotic stress and the role of metabolites. En Parvaiz, A., Abass, M., Pratap, V., Kumar, D., Alam, P., Nasser, M. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. Pages 69-87. DOI: doi:10.1016/B978-0-12-812689-9.00004-2
- Scott O, R., & Kalgutkar, A. S. (2010). Reactive Electrophiles and Metabolic Activation. *Comprehensive Toxicology*, 309–347. doi:10.1016/b978-0-08-046884-6.00115-9.
- Sharapin, N., Machado, L., Souza, E., Rocha, E., Valverde, E., Lopes, J.M., (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, 1a ed. Quebecor-Impreandes, Bogotá, Colombia.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A. & Suárez, D. (2018). *Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia – UNIAGRARIA. Bogotá D.C – Colombia.
- Singh, I. P., & Bodiwala, H. S. (2010). Recent advances in anti-HIV natural products. *Natural Product Reports*, 27(12), 1781. doi:10.1039/c0np00025f.
- Soto, L. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev. Cubana Med. Milit.* 32(1), 44-48.
- Steenkamp, V. Fernández, A., Van Rensburg, C. (2005). Screening of Venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany*.
- Sun, Y. OrcID, Wei, A., Binh G. (2020). Phytochemistry, Ethnopharmacology, Pharmacokinetics and Toxicology of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson. *International Journal Molecular Science* 21(3), 1006; doi:10.3390/ijms21031006
- Swanson, B. G. (2003). Tannins and polyphenols. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), Academic Press pp 5729 – 5733: doi: 10.1016/B0-12-227055-X/01178-0.
- Tadeusz, A. (2007). *Alkaloids-secrets of Life: Alkaloids Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Thakur M., Bhattacharya S.,Khosla PK,Puri S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants., 12 pp. 1-12. doi: 10.1016/j.jarmap.2018.11.004

Torres, V., Manjarrez, C., Acosta, C., Guerrero, V., Parra, R., Noriega, L., Ávila, L. (2016). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y plantas comestibles. ¿Se han desarrollado mecanismos de internalización bacteriana? Rev. mex. fitopatol vol.34 no.1 Texcoco. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-4>

Vergara, J., Lizcano, A. (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 Fitopatógenos. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Villareal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Rev. mex. fitopatol vol.36 no.1 Texcoco. doi: 10.18781/r.mex.fit.1706-5.