



Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*

Mojica Sepúlveda R. D.<sup>1</sup>; Cajiao Pedraza A. M.<sup>2</sup>; Yáñez Rueda X.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de investigación Productos Verdes (GPV). Universidad de Pamplona, Sede de Villa del Rosario, Autopista Internacional, Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia. E-Mail: [rudarymojica@gmail.com](mailto:rudarymojica@gmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Universidad de Pamplona, Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

## Resumen

El aceite esencial (AE) de hojas de *Calycolpus moritzianus*, recolectado en las veredas de Pamplonita, Chinácota, Toledo, Salazar y Ocaña del departamento de Norte de Santander-Colombia fue obtenido por Arrastre con Vapor y analizado por Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas. Se identificaron 32 componentes, los cuales representaron el 98.7 % del total de constituyentes. Los componentes mayoritarios fueron el Limoneno ( $30.73 \pm 11.13\%$ ) y el Eucaliptol ( $28.04 \pm 10.81\%$ ), seguidos del  $\alpha$ -Pineneno ( $6.80 \pm 1.85\%$ ),  $\beta$ -Cariofileno ( $6.73 \pm 2.13\%$ ), Guaiol ( $3.46 \pm 1.80\%$ ),  $\alpha$ -Terpineol ( $3.24 \pm 1.26\%$ ), Oxido de Cariofileno ( $2.99 \pm 3.04\%$ ),  $\alpha$ -Copaeno ( $1.39 \pm 0.62\%$ ) y Germacreno-B ( $0.76 \pm 0.60\%$ ). El aceite esencial fue efectivo contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Proteus mirabilis* ATCC 4307, encontrándose como Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI)  $39 \mu\text{g/mL}$ ,  $106 \mu\text{g/mL}$ ,  $836.4 \mu\text{g/mL}$  y  $892.2 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. El análisis del coeficiente de actividad antibacteriana de los componentes mayoritarios, demostró que el  $\alpha$ -Copaeno fue el más influyente en dicha actividad.

**Palabras Clave:** *Calycolpus moritzianus*, Aceite esencial, Composición química, Actividad antibacteriana,  $\alpha$ -Copaeno.

## Correlation between major volatile compounds of essential oil *Calycolpus moritzianus* and your antibacterial activity

### Abstract

The essential oil of the leaves of *Calycolpus moritzianus*, collected on the sidewalks of Pamplonita Chinácota, Toledo, Salazar and Ocaña in the department of Norte de Santander, Colombia, was obtained by steam distillation and analyzed by Gas Chromatography High Resolution (GCHR) coupled Mass Spectrometry. Thirty two components were identified representing the 98.7% of the total of the constituents. The main components were limonene ( $30.73 \pm 11.13\%$ ) and eucalyptol ( $28.04 \pm 10.81\%$ ), followed by  $\alpha$ -Pinene ( $1.85\% \pm 6.80$ ),  $\beta$ -Caryophyllene ( $6.73\% \pm 2.13$ ), Guaiol ( $1.80\% \pm 3.46$ ),  $\alpha$ -Terpineol ( $3.24 \pm 1.26\%$ ), Caryophyllene oxide ( $2.99 \pm 3.04\%$ ),  $\alpha$ -Copaene ( $1.39 \pm 0.62\%$ ) and Germacreno-B ( $0.76 \pm 0.60\%$ ).

The essential oil was effective against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Proteus mirabilis* ATCC 4307, found as the minimum inhibitory concentrations (MIC)  $39 \mu\text{g/mL}$ ,  $106 \mu\text{g/mL}$ ,  $836.4 \mu\text{g/mL}$  and  $892.2 \mu\text{g/mL}$  respectively. The analysis of antibacterial activity coefficient of the main components showed that the  $\alpha$ -Copaene was the most influential in that activity.

**Key words:** *Calycolpus moritzianus*, Essential Oil, Chemical composition, Antibacterial activity,  $\alpha$ -Copaene.

Para citar este artículo: Mojica Sepúlveda RD, Cajiao Pedraza AM, Yáñez Rueda X. Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*. Bistua. 2011;9(2):9-14

+Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de separatas: Mojica Sepúlveda R. D, Grupo de investigación Productos Verdes (GPV). Universidad de Pamplona, Sede de Villa del Rosario: [rudarymojica@gmail.com](mailto:rudarymojica@gmail.com)

Recibido: Enero 22 2010

Aceptado: Abril 26 2011

10

## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua (AV), que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. Se consideran mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos. En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla (Perez, 1996; Martínez, 2003; Latinpharma, 2003).

Diferentes especies de plantas, entre ellas, varias pertenecientes a la familia de las Mirtáceas, han demostrado su potencial farmacológico por las propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antibacterianas y antioxidantes de sus Aceites Esenciales (Díaz, et al. 2008; Cronquis, 1981).

En Mérida (Venezuela) un reciente estudio del AE de *Calycolpus moritzianus* (O. Berg), reportó como componentes mayoritarios:  $\beta$ -Cariofileno (21.9%),  $\alpha$ -Pino (10.9%), Viridiflor (9.7%)  $\alpha$ -Selineno (6.1%) y  $\alpha$ -Copaeno (6.3%). Además, a este AE le determinaron la actividad antibacteriana por el método microdilución en caldo, frente a varias bacterias, entre ellas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, cuyas CMI fueron de 60  $\mu\text{g/mL}$  y 180  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (Díaz, et al. 2008).

Un estudio en Sur África de los AEs de algunas especies nativas como *Callistemon citrinus* y *C. viminalis* presentaron entre sus componentes mayoritarios el Eucaliptol (61.2% y 83.2%) y  $\alpha$ -Pino (13.4% y 6.4%) respectivamente y la actividad antibacteriana de estos AEs se analizó frente a diferentes microorganismos entre los cuales se encontraba *S. aureus* determinando halos de inhibición de 23 mm y 26.3 mm para cada AE respectivamente (Opeoluwa, et al. 2009). Algunas especies utilizadas y estudiadas en la República Democrática del Congo, entre ellas 10 pertenecientes al género *Eucaliptus*, reportó el aislamiento e identificación de los principios activos de los AEs, los cuales se correlacionaron con la actividad antibacteriana. Dentro de los analitos más sobresalientes en la composición química de estas plantas se encuentran el Terpinen-4-ol, el Eucaliptol, el Limoneno, el  $\alpha$ -Terpineol,  $\gamma$ -Terpineno, el  $\alpha$ -Copaeno, el  $\beta$ -Cariofileno, el Guaiol, el Viridiflor y

el  $\alpha$ -Terpineol, entre otros (Castañeda, et al. 2007; Cox, et al. 2001; Magassouba, et al. 2007).

El objetivo de la presente investigación fue estudiar la correlación existente entre la composición química del AE obtenido de *C. moritzianus* y su actividad antibacteriana frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Proteus mirabilis* ATCC 43071.

## MATERIALES y METODOS

### Área de estudio, recolección y procesamiento del material vegetal

La especie fue recolectada en los municipios de Pamplonita, Chinácota, Toledo, Salazar y Ocaña del departamento Norte de Santander, al oriente de Colombia y fue identificada por el botánico Luis Roberto Sánchez, director del Herbario Regional Catatumbo-Sarare de la Universidad de Pamplona, en el cual se depositaron ejemplares de la especie, con los números de colección: 10328, 10484, 10488, 11094 y 11149.

Las hojas recolectadas se sometieron a secado, guardándolas en sitio aireado y a la sombra por 15 días. La extracción del aceite esencial se realizó por el método de Arrastre con Vapor (AV) (Yañez, et al. 2002), pasando una corriente de vapor de agua (100-105 °C), durante 2 horas, en un recipiente con 300 g de hojas y 2.5 L de agua. El AE se recogió en el Dean Stark. Se separó el AE, se midió en bureta, se secó con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y se almacenó en frasco ámbar a 4°C. Una vez obtenido el AE se calculó el rendimiento midiendo el volumen obtenido para cada 100 g de hojas tanto Hoja Fresca (HF) como para Hoja Seca (HS) provenientes de cada municipio.

Para el análisis de los componentes mayoritarios del AE se empleó un Cromatógrafo de Gases HP 6890A en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation (Versión D, 02.00.275), columna capilar HP-5MS de 30 m x 0.25 mm, D.I. 0.25  $\mu\text{m}$ , df; con una fase estacionaria de 5% fenilpoli (metilsiloxano). El gas de arrastre fue Helio (Aga-Fano, 99.995%) con presión de entrada en la cabeza de la columna de 75 kPa y velocidad de flujo de 1 mL/min, velocidad lineal de 36 cm/seg., temperatura inicial 50°C, durante 4 min hasta una temperatura final de 250°C (rampa 5) pasando por cuatro rampas de calentamiento: Rampa 1, aumentando 2°C/min hasta 90°C manteniendo esta temperatura durante 3 min, Rampa 2: aumentando 4°C/min hasta 166°C, Rampa 3: aumentando 1°C/min

hasta 170°C Rampa 4: aumentando 2°C/min hasta 186°C. La temperatura de la cámara de ionización, línea de transferencia y del cuadrupolo se mantuvo a 150°C, 280°C y 230°C, respectivamente. Energía de la fuente de electrones de 70 eV y temperatura del inyector 250°C. La identificación de los compuestos se hizo mediante el cálculo de los índices de Kováts (IK) a partir de una serie homóloga de hidrocarburos (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>) y por comparación de los espectros de masas con los de la librería NIST – 2005 (Adams, 2005).

### Cepas de microorganismos

La actividad antibacteriana fue determinada por los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo (CLSI-(NCCLS). 2007; Hasselmann, 2003; Abujheisha, 2005). Se utilizaron cepas de interés clínico *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Proteus mirabilis* ATCC 43071. Las pruebas fueron realizadas por triplicado y la estandarización del método se realizó utilizando antibióticos reconocidos: Ampicilina (10µg), Gentamicina (10µg), Cloranfenicol (30µg), Sulfametronidazol (25µg), Vancomicina (30µg), Penicilina (10µg) y Eritromicina (15µg).

### Tratamiento estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software MATLAB versión 2008, con el cual se realizaron las gráficas, cálculos numéricos de los componentes más influyentes en la actividad de los microorganismos y el Análisis de Componentes Principales (PCA).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los componentes mayoritarios del aceite esencial de la especie *C. moritzianus* determinados por CGAR para los cinco municipios se encontraron en los siguientes rangos: Limoneno (30.73±11.13 %), Eucaliptol (28.04±10.81 %), α-Pineno (6.80±1.85 %), β-Cariofileno (6.73±2.13 %), Guaiol (3.46±1.80), α-Terpineol (3.24±1.26 %), Oxido de Cariofileno (2.99±3.04), α-Copaeno (1.39±0.62) y Germacreno-B (0.76±0.60 %). La composición química del aceite esencial entre un municipio y otro varía en cuanto a la concentración relativa de cada analito, pero no en los componentes presentes; los componentes que poseen una mayor variación en su porcentaje entre un municipio y son el Germacreno-B y el Oxido de Cariofileno. En la Figura 1, se muestra la gráfica comparativa de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial.

Bistua 2011 Vol 9(2):9-14. Mojica Sepúlveda RD et al. Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*

Al determinar la actividad antibacteriana del aceite se midieron los halos de inhibición, frente al microorganismo. Los halos de inhibición se muestran en la Tabla 1, observándose que los de mayor tamaño se obtienen con el microorganismo *B. subtilis*, y con el tratamiento hoja seca, para todos los municipios.

Los resultados de la prueba de microdilución en caldo se muestran en la Tabla 2, allí se observan las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), las cuales permiten concluir que frente a *B. subtilis* ATCC 6633, se obtuvo el mejor valor, de 39 µg/mL, para el aceite extraído de hoja seca de muestras provenientes de los municipios de Chinácota y Pamplonita.

El análisis numérico de los halos de inhibición y los componentes mayoritarios proporcionó los coeficientes de actividad mostrados en la Tabla 3, en la que se puede observar que los componentes que más influyeron en la actividad antibacteriana fueron α-Copaeno frente a *S. aureus* y *E. faecalis*; y α-Terpineol frente a *B. subtilis*, con coeficientes de 7.4851 y 16.7356 y 9.9326 respectivamente.

Finalmente, los componentes mayoritarios a los cuales se les atribuyó la mayor influencia sobre la inhibición frente a los microorganismos estudiados fueron el α-Coapeno, el α-Terpineol y el α-Pineno, los cuales poseen los valores de varianza más altos. En la Figura 2, se muestra el análisis de componentes principales (PCA), de los coeficientes de actividad en función de cada microorganismo, concluyendo que el que posee el valor más alto de varianza (porque se encuentra más alejado) es el α-Copaeno.

## CONCLUSIONES-

Los mayores porcentajes de rendimiento de Aceite Esencial (AE) extraído de hojas de *Calycolpus moritzianus*, por el método de AV, fueron el municipio de Pamplonita, en el caso de Hojas Secas (HS) de (1.48 %) y para el municipio de Chinácota, en el caso de Hojas Frescas (HF) de (0.87 %).

En cuanto a la composición química cualitativa del AE, de los cinco municipios estudiados (Chinácota, Pamplonita, Salazar, Ocaña y Toledo) se puede concluir que es el mismo quimiotipo, por cuanto los componentes que aparecen en cada uno de los perfiles cromatográficos coinciden entre sí, observándose solamente variaciones en su concentración relativa, así: el α-Pineno (6.80±1.85 %), Limoneno (30.73±11.13 %), Eucaliptol (28.04±10.81 %), α-Terpineol

12

( $3.24 \pm 1.26$  %),  $\alpha$ -Copaeno ( $1.39 \pm 0.62$ ),  $\beta$ -Cariofileno ( $6.73 \pm 2.13$  %), Germacreno-B ( $0.76 \pm 0.60$  %), Oxido de Cariofileno ( $2.99 \pm 3.04$ ) y Guaíol ( $3.46 \pm 1.80$ ). Se destacan el AE del municipio de Chinácota con un 36.33% de Eucaliptol y el municipio de Salazar con un 41.9% de Limoneno.

El AE del municipio de Chinácota fue el que presentó mayor actividad antibacteriana, con concentraciones mínimas inhibitorias de 39  $\mu\text{g/mL}$ , 100.4  $\mu\text{g/mL}$  y 106  $\mu\text{g/mL}$  para *B. subtilis* ATCC 6633, *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 25923 y halos de inhibición máximos de 25 mm, 12 mm y 8 mm respectivamente.

*B. subtilis* ATCC 6633 es influenciado principalmente por  $\alpha$ -Terpineol, con porcentaje de influencia 39.1 %, mientras que *S. aureus* ATCC 25923 es influenciado principalmente por  $\alpha$ -Copaeno, con porcentaje de influencia 48.2 %, y *E. faecalis* ATCC 29212 es influenciado principalmente por  $\alpha$ -Copaeno, con porcentaje de influencia 48.3 %.

El AE obtenido de *C. moritzianus* por el método de AV, no presenta actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 y sólo en los municipios de Chinácota y Salazar presentó actividad frente a *P. mirabilis* ATCC 43071.

En general, el componente que más influye en la actividad antibacteriana es el  $\alpha$ -Copaeno con un porcentaje de  $34\% \pm 28$  %, seguido del  $\alpha$ -terpineol con porcentaje  $21\% \pm 18$  %.

#### AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS-SENA Código 112134119361, contrato 226-2006 y la UNIVERSIDAD DE PAMPLONA por la financiación del Proyecto de Investigación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abujheisha, K. (2005). Determinación de la carga crítica como nuevo método alternativo al estándar de difusión en agar para establecer la sensibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos. Memoria de Tesis Doctoral en Microbiología. Editorial de la Universidad de Granada, D.L.: Gr 1746.

Adams, R. (2005). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. USA: Allured Publishing Corporation: Carol Stream Illinois. 469 p.

Castañeda, M.L., et al. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas de Colombia. *Scientia Technica*, 33, 165-166.

CLSI-(NCCLS), (2007). Antimicrobial Susceptibility testing. M100-S17; Vol. 26, 8 No 1. M2-A9 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition. (2000), This

Bistua 2011 Vol 9(2):9-14. Mojica Sepúlveda RD et al. Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*

standard contains the current CLSI-recommended methods for disk susceptibility testing, criteria for quality control testing, and updated tables for interpretive zone diameters.

CLSI - (NCCLS), (2007). Antimicrobial Susceptibility testing. M100-S17; Vol. 26, No 1. M7-A7 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. (2006). This standard addresses reference methods for the determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) of aerobic bacteria by broth macrodilution, broth microdilution, and agar dilution.

Cox, S., et al. (2001). Determining the antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules* 6, 87-91.

Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden. 7, 639-643.

Díaz, T., et al. (2008). Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) Burret from Mérida, Venezuela. *Natural Products Communications* 3 No. 6, 937-940.

Hasselmann, C. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Vol. 9, No 8.

Latinpharma. (2003) Estudio de oferta y demanda del Sector de Productos Naturales. Centro de Comercio Internacional, Proexport. Bogotá, Colombia.

Magassouba, F., et al. (2007) Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 44-53.

Martínez, A. (2003) Aceites esenciales. Universidad de Medellín. Colombia.

Opeoluwa, O., et al. (2009) Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. *Molecules* 14, p.1990-1998.

Pérez, A. (1996). Plantas útiles en Colombia. Bogotá: Camacho Roldán. 444p.

Yáñez, X., et al. (2002) Chemical composition of the essential oil of *Psidium caudatum* Mc Vaugh. *Molecules* 7, 712-716.

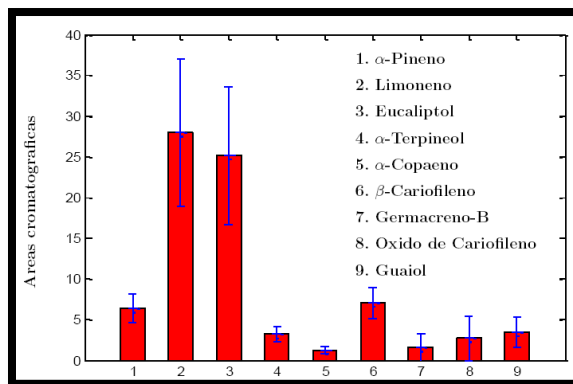


Figura 1

Microorganismo		Hoja fresca			hoja seca		
		100 %	50 %	25 %	100 %	50 %	25 %
<b>Chinacota</b>							
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacteriostático				2		
	Bactericida	2			8		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático						
	Bactericida						
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriostático	9	6		12	4	
	Bactericida				9		
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteriostático	12	8	4	25	10	8
	Bacteriostático				14	9	
<b>Salazar</b>							
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacteriostático				1		
	Bactericida						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático				6		
	Bactericida						
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriostático	4			10	8	
	Bactericida				6		
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteriostático	10	7		12	10	9
	Bactericida				8	6	
<b>Pamplonita</b>							
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacteriostático	1			6	4	
	Bactericida						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático	9	7		10	4	
	Bactericida						
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriostático	10	8	4	20	10	8
	Bactericida				10	6	
<b>Toledo</b>							
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacteriostático	1			4		
	Bactericida						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático	8	6		11		
	Bactericida				6		
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriostático	10	6	4	16	10	6
	Bactericida				10	8	
<b>Ocaña</b>							
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacteriostático	2			4	2	
	Bactericida						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático	6			13	9	
	Bactericida				5		
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriostático	10	8		16	10	9
	Bactericida				8	5	

Tabla 1

Tabla 2

Microorganismo	Chinacota µg/mL	Salazar µg/mL	Pamplonita µg/mL	Toledo µg/mL	Ocaña µg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	892.2	892.2	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	836.4	892.2	106	83.6	106
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	106	106	100.4	106	100
	39	44.6	39	44.6	44.6

Tabla 3

No	Compuesto Microorganismo	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>
1	α-Pineno	2.2102	5.1035	0.9098
2	Limoneno	0.5331	0.7256	1.0192
3	Eucaliptol	0.1223	0.5736	0.2199
4	α-Terpineol	2.2776	9.9326	3.0728
5	α-Copaeno	7.4851	1.6016	16.7356
6	β-Cariofileno	0.0305	1.6461	2.0051
7	Germacreno-B	0.6410	1.9942	4.5223
8	Oxido de Cariofileno	1.2030	1.6589	3.3048
9	Guaiol	1.0375	2.1711	2.8577

14

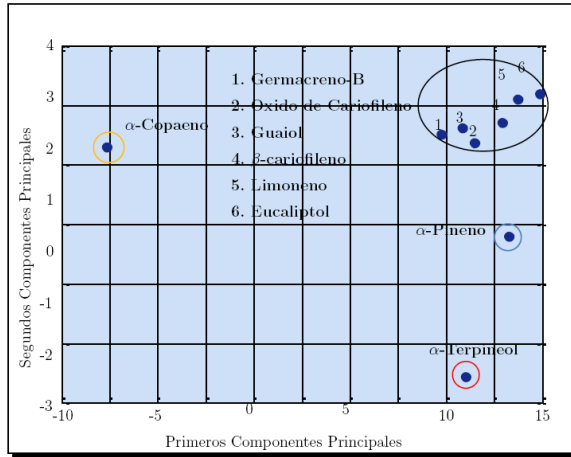


Figura 2