

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**



Proyecto Final de Investigación previo a la obtención del Título de Licenciado en Ciencias
de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
ACEITES ESENCIALES DE DOS ESPECIES DE LA FAMILIA PIPERACEAE
RECOLECTADAS EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS – ECUADOR, DURANTE
EL PERÍODO ABRIL - AGOSTO DEL 2016”**

AUTORES

Guayanlema Chávez José David

Vargas Córdova Carlos Andrés

TUTORA

Dra. Liliana Araujo Baptista PhD.

Riobamba – Ecuador

2017

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del Proyecto de Investigación de título: "Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies de la familia Piperaceae recolectadas en la provincia del Guayas – Ecuador, durante el período abril - agosto del 2016", presentado por Guayanlema Chávez José David y Vargas Córdova Carlos Andrés dirigido por la Dra. Liliana Araujo Baptista PhD, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Dra. Patricia Miño


.....
Presidente del Tribunal



.....
Firma

Dra. Liliana Araujo

.....
Miembro del Tribunal



.....
Firma

Licda. Gisnella Cedeño

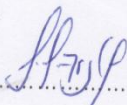
.....
Miembro del Tribunal



.....
Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Liliana Araujo Baptista docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del proyecto de tesis con el tema: "Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies de la familia Piperaceae recolectadas en la provincia del Guayas – Ecuador, durante el período abril - agosto del 2016", propuesto por los Señores, Guayanlema Chávez José David y Vargas Córdova Carlos Andrés, egresados de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentran aptos para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a los interesados hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



.....
Dra. Liliana Araujo Baptista PhD.

DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Nosotros, Guayanlema Chávez José David portador de la cedula N⁰ 060423635-6 y Vargas Córdova Carlos Andrés portador de la cedula N⁰ 050357341-2; somos responsables de todo el contenido de este trabajo investigativo, los derechos de autoría pertenecen a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Guayanlema José

AUTOR

060423635-6



Vargas Carlos

AUTOR

050357341-2

DEDICATORIA

Dedico este Proyecto de Investigación a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, siendo mi apoyo en todo momento depositado su entera confianza en cada reto que se me presentaba, sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad, es por ello que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

Guayanlema Chávez José David.

DEDICATORIA

El Proyecto de Investigación es dedicado a cada miembro de mi familia. Gracias a su apoyo, consejos de enseñanzas de vida, valores como el amor, la humildad, la perseverancia de vivir la vida haciendo lo que te dicen que no puedes con el fin de lograr vencer la inseguridad, los desánimos, que se han presentado en mi vida. Es así que logre cumplir los objetivos que he soñado de terminar la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico.

Vargas Córdova Carlos Andrés.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por darme las bendiciones necesarias para llegar a concluir mi carrera con éxito, segundo a mi madre Martha Chávez y a mi padre José Guayanlema y a mis abuelitos quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mi en todo momento y no dudaron de mis habilidades. Este Proyecto de Investigación es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo trabajo. Por esto agradezco a nuestra Tutora Dra. Liliana Araujo a mis docentes a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanza. Finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa Universidad, la cual abrió sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Guayanlema Chávez José David.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por haberme brindado la oportunidad de estar cumpliendo una meta, un objetivo en mi vida que es el de terminar mi Carrera Profesional. Deseo agradecerle a mi Familia a mi madre a mi padre gracias por el apoyo, la solidaridad, el cariño, el amor. Agradezco a los Docentes de la Universidad Nacional de Chimborazo por enseñarnos sus conocimientos enfocados en la Carrera también consejos de vida. Decir un Dios le pague a nuestra Tutora Dra. Liliana Araujo por su paciencia en todo el desarrollo del Trabajo de Investigación, gracias por su tiempo y sus conocimientos.

Vargas Córdova Carlos Andrés.

INDICE

Portada.....	I
Revisión del Tribunal.....	II
Declaración del Tutor.....	III
Autoría de Investigación.....	IV
Dedicatoria.....	V
Agradecimientos.....	VII
Índices.....	IX
Resumen.....	XIII
Abstract.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	2
1.1. Planteamiento del Problema.....	2
1.2. Formulación del Problema.....	2
1.3. Justificación de la Investigación.....	3
1.4. Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo General.....	4
1.4.2 Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2. Estado del Arte Relacionado a la Temática.....	5
2.1. Antecedentes Históricos.....	5
2.2. Importancia de las Plantas Medicinales.....	5
2.3. Familia Piperaceae.....	5
2.3.1 Genero <i>Piper</i>	6
2.3.2 Importancia Económica y Medicinal del Género <i>Piper</i>	6
2.3.3 Composición Química.....	6
2.3.4 <i>Piper tuberculatum</i>	7
2.3.5 <i>Piper amalago</i>	7
2.4 Aceites Esenciales.....	7
2.4.1 Localización de los Aceites Esenciales.....	7
2.4.2 Componentes de los Aceites Esenciales.....	8
2.4.3 Obtención de los Aceites Esenciales.....	8
2.4.4 Análisis de los Aceites Esenciales.....	10
2.4.5 Importancia de los Aceites Esenciales.....	10
2.4.6 Actividad Farmacológica de los Aceites Esenciales.....	11
2.5 Estructura Bacteriana.....	11
2.5.1 Microorganismos Patógenos.....	12
2.5.2 Mecanismos de Acción de los Antimicrobianos.....	12
2.5.3 Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	14
CAPÍTULO III.....	15
3. Material y Métodos.....	15
3.1 Material Biológico.....	15
3.1.1 Especies Vegetales.....	15
3.1.2 Cepas Bacterianas.....	15
3.2 Medios de Cultivo.....	15
3.3 Metodología.....	16
3.3.1 Extracción y Aislamiento de los Aceites Esenciales de <i>P.</i>	16

<i>tuberculatum</i> y <i>P. amalago</i>	17
3.3.2 Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales <i>P. tuberculatum</i> y <i>P. amalago</i>	17
3.3.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana.....	17
3.3.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	17
3.4 Resultados y Discusión.....	20
CAPÍTULO	29
IV	
4 Conclusiones y Recomendaciones.....	29
4.1 Conclusiones.....	29
4.2	29
Recomendaciones.....	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de <i>Piper</i>	6
Tabla 2: Diferencias entre las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	11
Tabla 3: Material que será utilizado en el Análisis Microbiológico.....	15
Tabla 4: Componentes Caldo Nutritivo.....	15
Tabla 5: Componentes Agar nutritivo.....	16
Tabla 6: Componentes Agar Infusión Cerebro Corazón.....	16
Tabla 7: Componentes mayoritarios del <i>Piper tuberculatum</i>	22
Tabla 8: Componentes mayoritarios del <i>Piper amalago</i>	23
Tabla 9: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del <i>P. tuberculatum</i> y <i>P. amalago</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> : ATTC 6538P.....	24
Tabla 10: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del <i>P. tuberculatum</i> y <i>amalago</i> frente a <i>Escherichia coli</i> : ATTC 25922.....	26
Tabla 11: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del <i>P. tuberculatum</i> y <i>amalago</i> frente a <i>Enterococcus faecalis</i> : ATTC 29212.....	27

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Especie Vegetal <i>Piper</i>	6
Gráfico 2: Estructura Bacteriana.....	11
Gráfico 3: Mecanismos de Acción de los Antibióticos.....	13
Gráfico 4: Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	14
Gráfico 5: Concentración Mínima Bactericida – Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de <i>P. amalago</i> y <i>P. tuberculatum</i> frente a <i>Staphylococcus Aureus</i>	25
Gráfico 6: Concentracion Minima Bactericida – Concentracion Minima Inhibitoria de los aceites esenciales de <i>P. amalago</i> y <i>P. tuberculatum</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	26
Gráfico 7: Concentracion Minima Bactericida – Concentracion Minima Inhibitoria de los aceites esenciales de <i>P. amalago</i> y <i>P. tuberculatum</i> frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	27

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies vegetales *Piper tuberculatum* y *P. amalago* frente a cepas bacterianas de interés clínico: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Las especies vegetales *P. tuberculatum* y *P. amalago* forman parte de la familia Piperaceae y del Género *Piper*. El aceite esencial fue obtenido de las hojas de las especies vegetales, mediante hidrodestilación y fue analizado usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. El rendimiento de los aceites esenciales de *P. tuberculatum* y *P. amalago* calculado sobre la base del peso seco fue de 0,4% y 0,1%, respectivamente. El principal componente del aceite esencial de *P. tuberculatum* fue el dilapiol (32,32%) y el de *P. amalago* fue el Sabineno, (20,42%). La prueba de actividad antibacteriana se realizó *in vitro*, y la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se determinaron mediante el método de microdilución en caldo. Ambos aceites mostraron actividad moderada frente a *S. aureus*, obteniéndose CMIs para *P. tuberculatum* y *P. amalago* de 400 µg/mL y 200 µg/mL, respectivamente. El aceite de *P. tuberculatum* mostró una escasa actividad frente a *E. faecalis* ya que la CMI fue de 3200 µg/mL, sin embargo, el aceite de *P. amalago* resultó ser moderadamente activo frente a esta cepa bacteriana (CMI 200 µg/mL). Finalmente, *E. coli* resultó ser más sensible al efecto inhibitorio del aceite esencial de *P. amalago* que mostró una CMI de 100 µg/mL, ya que el de *P. tuberculatum* arrojó una CMI de 400 µg/mL. Estos aceites esenciales pueden ser fuentes naturales bactericidas frente a otras cepas Gram negativas o Gram positivas.

Palabras claves: Aceite esencial, *Piper amalago*, *P. tuberculatum*, actividad biológica, antibacteriana.

Abstract

The research work is based on determining the antibacterial activity of essential oils of two plant species *Piper tuberculatum* and *P. amalago* against bacterial strains of clinical interest: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. The plant species *P. tuberculatum* and *P. amalago* are part of the Piperaceae family and the *Piper* genus. The essential oil was obtained from the leaves of the plant species by hydrodistillation and was analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The main component of the essential oil of *P. tuberculatum* was dilapiol (32.32%) and the main component of *P. amalago* was Sabineno, with one (20.42%). The antibacterial activity test was performed in vitro, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (BMC) were determined by the broth microdilution method. The essential oil of *P. tuberculatum* showed the following results of antibacterial activity against *S. aureus* (MIC: 400 µg / mL) and (CMB: 400 µg / mL) against *E. coli* (MIC: 400 µg / mL) and (CMB: 800 µg / mL) and against *E. faecalis* (MIC: 3200 µg / mL) and (CMB: 3200 µg / mL). The essential oil of *P. amalago* showed the following results of antibacterial activity against *S. aureus* (CMB: 400 µg / mL) and (MIC: 200 µg / mL) against *E. coli* (CMB: 200 µg / mL) and (MIC: 100 µg / mL) and against *E. faecalis* (CMB: 800 µg / mL) and (CMB: 200 µg / mL). These essential oils may be a natural source bactericidal against other Gram negative or Gram positive strains.

Keywords: Essential oil, *Piper amalago*, *P. tuberculatum*, biological activity, antibacterial.

Isabel Escudero

Reviewed by: Escudero, Isabel
LANGUAGE CENTER TEACHER



INTRODUCCIÓN

El presente proyecto investigativo, se basa fundamentalmente en la determinación de actividades antibacterianas de los aceites esenciales de dos especies vegetales *P. amalago* y *P. tuberculatum* que fueron recolectadas en la Provincia del Guayas – Ecuador, durante el periodo abril - agosto del 2016.

Varios estudios científicos han dado a conocer, que desde la antigüedad nuestros antepasados se han encargado de estudiar el presente y futuro de las plantas medicinales y las propiedades biológicas potenciales que presentan. ⁽¹⁾

Investigaciones llevadas a cabo en especies del género *Piper* han arrojado resultados que demuestran que estas plantas producen en su metabolismo, sustancias como vitaminas y antibióticos, así como también, poseen la capacidad de almacenar varios minerales, por lo que, los estudios científicos se centran básicamente en la determinación de la actividad biológica de sus extractos, aceites esenciales y productos puros de estas especies vegetales. ⁽²⁾

Por otra parte, las plantas del género *Piper* han sido objeto de numerosos estudios los cuales muestran que los componentes químicos de los aceites esenciales han sido reconocidos por sus propiedades antimicrobianas. Análisis fitoquímicos realizados a *Piper tuberculatum* y *amalago*, determinaron que estas especies presentan principios activos o sustancias bioactivas que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa sobre el organismo vivo. ⁽³⁾ Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida.

El propósito del proyecto investigativo es determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies vegetales *Piper amalago* y *Piper tuberculatum*, frente a ciertas cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. El desarrollo del proyecto se explicara detalladamente a partir de capítulos.

CAPITULO I

1.1. Planteamiento del problema:

La resistencia bacteriana a nivel mundial ha constituido un grave problema para la salud pública. La resistencia a las fluoroquinolonas, una de las clases de fármacos antibacterianos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias por *Escherichia coli*, está muy extendida. Se calcula que las personas infectadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir de un 64% mayor que las infectadas por cepas no resistentes. La resistencia también aumenta el costo de la atención sanitaria, pues alarga las estancias en el hospital y requiere más cuidados intensivos. La Organización Panamericana de la Salud, que actúa como Oficina Regional de la OMS para las Américas, revelaron datos del informe que muestran, que en América hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas. En algunos entornos, hasta un 90% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina. ⁽⁴⁾ En Ecuador el estudio más reciente documentado, se realizó en el año 2007 en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vozandes de Quito, donde se realizó una evaluación de la frecuencia de resistencias bacterianas en los urocultivos de pacientes hospitalizados en el servicio de ginecología. Como principal germen aislado se encontró *E. coli*, la misma que mostró resistencia a la ampicilina en un 65%, ampicilina + sulbactam 18,7% y gentamicina 11,3%. ⁽⁵⁾

1.2. Formulación del problema:

¿Presentarán actividad antibacteriana los aceites esenciales de las especies vegetales *Piper tuberculatum* y *Piper amalago*, de la familia Piperaceae recolectadas en la provincia del Guayas – Ecuador, durante el periodo abril - agosto del 2016 frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*?

1.3. Justificación

Actualmente las plantas medicinales son utilizadas en muchos hogares Ecuatorianos abarcando todas las clases sociales, sin embargo éstas no siempre tienen el poder terapéutico que se cree. Por lo que se requiere realizar investigaciones y confirmaciones de la actividad farmacológica, que se les ha atribuido a las especies vegetales de *P. Tuberculatum* y *amalago* a través de estudios y ensayos científicos. Las enfermedades causadas por microorganismos son de alta incidencia en nuestro país, principalmente las IVU con un 95% de incidencia de *Escherichia coli*, gastroenteritis bacteriana con un 85% de incidencia de *Enterococcus faecalis*, etc. Esto ha llevado al uso y abuso de antibióticos en nuestro medio provocando que cada día aparezcan nuevas cepas resistentes que pueden ocasionar epidemias difíciles de controlar en el futuro. Por lo tanto, es vital para la salud comunitaria que se busque de forma continua nuevas sustancias antibióticas con el fin de contrarrestar estas nuevas especies bacterianas resistentes. Por lo antes expuesto, esta investigación se realizó con el fin de analizar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las especies vegetales *Piper amalago* y *P. tuberculatum* de la familia Piperaceae, frente a las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*. Es por ello que se realizó el estudio antibacteriano de los aceites esenciales de *P. tuberculatum* y *amalago*, investigando la composición química y determinando cuál de sus principios activos podrían estar implicados en esta actividad, los cuales podrían ser fuentes de elaboración de nuevos fármacos contra diversas enfermedades infecciosas presentes en el ser humano.

1.4. Objetivos:

Objetivo General:

- Determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies vegetales *Piper amalago* y *Piper tuberculatum* recolectadas en la provincia del Guayas – Ecuador, durante el periodo abril - agosto del 2016 frente a ciertas cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos Específicos:

- Identificar las especies vegetales a cargo del especialista Biólogo, Xavier Cornejo con el correspondiente número de colección de cada especie vegetal depositadas en el herbario GUAY, de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil - Ecuador.
- Extraer los aceites esenciales de las especies vegetales mediante la técnica de hidrodestilación, realizado por la Dra. María Eugenia Rondón, Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Evaluar la composición química de los aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplada a masas, realizado por el Dr. Luis Rojas PhD. Docente de Investigación de la Universidad de Los Andes Facultad de Farmacia y Bioanálisis; Instituto de Investigación; Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal Mérida – Venezuela.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Piper amalago* y *Piper tuberculatum*, frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC: 6538P, *Enterococcus faecalis* ATCC: 29212 y *Escherichia coli* ATCC: 25922.
- Determinar concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites esenciales de *Piper amalago* y *Piper tuberculatum* frente a las cepas evaluadas.

CAPITULO II

2. Estado del Arte Relacionado a la Temática:

2.1 Antecedentes Históricos

A través de los siglos y basados en un conocimiento empírico, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en las preparaciones tradicionales o en fármacos. Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas, hoy en día se ha convertido en un hecho científico universal.

La fitoterapia (Fito=planta; terapia=curación) es considerada la medicina más ancestral por excelencia. En la India, China y el medio Oriente comenzaron desde entonces a desarrollar sus materias médicas. Algunos de los primeros escritos descubiertos recopilan la información sobre el poder curativo de las plantas. Es así que históricamente, las plantas medicinales siempre han estado ligadas con el bienestar de la humanidad. ⁽⁶⁾

2.2 Importancia de las Plantas Medicinales:

Las consideraciones que defienden el uso de las plantas medicinales y sus extractos o derivados en terapéutica, pueden afianzarse en las siguientes premisas:

- Trabajan en la reactivación de funciones o procesos orgánicos alterados.
- Estimulan las defensas de los organismos, no las remplazan ni las fuerzan a actuar.
- Ajustan el flujo armónico de la energía vital.
- Refuerzan el funcionamiento óptimo de órganos y tejidos en funciones nutritivas y regenerativas.
- Pueden contribuir en la remineralización, en los casos necesarios.
- Eliminan toxinas o sustancias indeseables (depuración y limpieza) favoreciendo la circulación sanguínea.⁽⁷⁾

2.3 Familia Piperaceae:

Las especies pertenecientes a esta familia frecuentemente son hierbas aromáticas, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Presentan hojas alternas, enteras a menudo lobuladas en la

base, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta. El tipo de reproducción es por polinización (son plantas hermafroditas).

2.3.1 Genero *Piper*:

Es uno de los géneros de plantas, más importantes de los bosques neotropicales y subtropicales. Son las más extensas e importantes de la familia y cuenta con aproximadamente 1300 especies en el neotrópico y se estima en 700 especies en los trópicos del Viejo Mundo.

El género *Piper*, tiene interés por su amplia utilización en la medicina tradicional de varios países, presentando una gran complejidad, tanto desde el punto de vista botánico, como químico. Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuye la propiedad analgésica, antirreumática, diurética, carminativa, estimulante, digestiva, antiulcerosa, dermatológica, antidiarreico, antihelmíntica, antiflogística y bactericida. ⁽⁸⁾

2.3.2 Importancia Económica y Medicinal del Género *Piper*:

El género *Piper* han demostrado que poseen una serie de actividades importantes para la salud y economía, tal es el caso de la presencia de moléculas con actividad antioxidante, importante para la conservación de alimentos, otras como la piperina con actividad inhibidora de acetilcolinesterasa, otras como la piplartina (*Piper tuberculatum*) con actividad antifúngica, aminas preniladas con propiedad antiparasitaria. ⁽⁹⁾

Tabla 1 Taxonomía de *Piper*; Gráfico 1: Especie vegetal *Piper*

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Piperales
Familia: Piperaceae
Género: *Piper*
Especie: *Piper tuberculatum*, amalago



Fuente: Planta Piper.
http://es.123rf.com/photo_22780143_joven-hoja-de-la-planta-piper-en-el-jardin-botanico.html

2.3.3 Composición Química:

En una investigación fitoquímica preliminar, de la familia Piperaceae tienen una gran diversidad de metabolitos secundarios con actividades biológicas. Entre estos metabolitos, son lignanos, neolignanes, terpenos, propenylphenoles, chalconas, flavonas, benzopyranes amidas, alcaloides de amida constituyen los metabolitos característicos de la familia Piperaceae.⁽¹⁰⁾

2.3.4 *Piper tuberculatum*: Popularmente conocido como " Pimenta longa " y " Pimenta Darta ", se utiliza ampliamente en la medicina popular como una sedante y antídoto para la mordedura de serpiente. En otras comunidades, los frutos se utilizan como especia de alimentos con granos. Se ha demostrado que las amidas aisladas de *P. tuberculatum* tienen también una actividad antifúngica potente. Las propiedades organolépticas especiales de la familia Piperaceae han dado lugar a los estudios químicos sobre las especies del género *P. tuberculatum* y la abundancia de sesquiterpenoides. Los aceites esenciales de *P. tuberculatum* han presentado actividades biológicas variadas como, antimicrobianas, antiinflamatorias, larvicidas y antimutagénicas, entre otras, esta planta aromática puede presentar una valiosa fuente de metabolitos bioactivos.⁽¹¹⁾

2.3.5 *Piper amalago*: Esta planta es utilizada contra los problemas cardiovasculares como la hipertensión y trastornos renales como piedras renales. Tradicionalmente el uso de *P. amalago* se utiliza para aliviar el dolor en el pecho y la inflamación, además el té de las hojas de *P. amalago* se utilizan en el tratamiento de quemaduras. Estudios científicos y farmacológicos de la especie *Piper Amalago*, han demostrado su acción anti-inflamatoria, antimicrobiana, cicatrizante y leishmanicida. Además, se ha sugerido que tiene propiedades antioxidantes, ya que contiene vitexina y lupeol que se han aislado a través de análisis fitoquímicos.⁽¹²⁾

2.4 Aceites Esenciales:

Son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos. Las plantas elaboran estos aceites con el fin de protegerse de las enfermedades,

ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización.

2.4.1 Localización de los Aceites Esenciales:

- En las flores (como en el caso de la lavanda, el jazmín y la rosa)
- En todo el árbol (como sucede con el eucaliptus)
- En las hojas (la citronela)
- En la madera (el sándalo)
- En la raíz (el vetiver)
- En la cáscara de los frutos (el limón, la naranja y la bergamota).

Los aceites esenciales siempre deben de estar protegidos de la luz y mantenerse en botellas de vidrio, son muy inestables: volátiles, frágiles, y alterables con la luz. Todos los aceites esenciales son antisépticos, analgésicos, fungicidas, diuréticos o expectorantes. En el organismo, los aceites esenciales pueden actuar de modo farmacológico, fisiológico y psicológico.⁽¹³⁾

2.4.2 Componentes de los Aceites Esenciales:

1. Monoterpenos: Son biogénicamente derivados de dos unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos, plantas, microorganismos e insectos; algunos tienen funciones específicas en el individuo, otros presentan actividades biológicas de distintas maneras.
2. Sesquiterpenos: Son estructuras que contienen 15 átomos de carbono, presentan una gran diversidad esquelética como resultado de la facilidad de reorganizarse que tienen estas estructuras.
3. Serie de compuestos aromáticos derivados del fenilpropano: Los compuestos de esta serie, muchos menos frecuentes que el mono y el sesquiterpeno, derivan en su mayoría, del fenilpropano C₆-C₃.
4. Serie por degradación de ácidos grasos: Existen ciertos compuestos aromáticos como los aldehídos, cetonas, ácidos o alcoholes con cuatro o cinco átomos de carbono, que son formados por la degradación de ácidos grasos y se encuentran principalmente en los frutos.⁽¹⁴⁾

2.4.3 Obtención de los Aceites Esenciales

- **Extracción por destilación con vapor de agua:**

Permite aislar la esencia con gran rendimiento y puede utilizar gran cantidad de material. Se opera corrientemente sobre el material desengrasado y pulverizado. La operación se verifica en alambiques especiales y se recoge el vapor cargado de esencia en recipientes, que llevan en su parte inferior una tubuladura larga que facilita la separación del agua condensada de la esencia, la cual por más ligera, sobrenada.

- **Hidrodestilación:**

Es el proceso para obtener el aceite esencial de alguna materia prima vegetal mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica. La materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compactado. El vapor de agua es inyectado con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. El vapor entra en contacto con el lecho, para calentar la materia prima y liberar el aceite esencial contenido, a su vez, se evapora, debido a su alta volatilidad.

- **Método de Enflorado o Enfleurage:**

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otro medio físico-químico. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

- **Extracción por disolventes orgánicos:**

Para este método los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos (pentanos, hexanos), hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno) y menos frecuentes los hidrocarburos halogenados. Las soluciones obtenidas se destacan o centrifugan y se

concentran, el disolvente recuperado se recicla. Al final de la operación el disolvente que permanece en el residuo, se recupera por inyección de vapor de agua en este.

2.4.4 Análisis de los Aceites Esenciales:

➤ Cromatografía en Capa Fina:

La cromatografía de capa fina es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. En la biología celular se utiliza frecuentemente para separar azúcares simples, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, metabolitos, y ocasionalmente para separar cadenas cortas de polipéptidos y ácidos nucleicos. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil y el principio es el mismo: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria.

➤ Cromatografía de Gases:

En la cromatografía de gases se incluyen todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas (gas portador), siendo la fase estacionaria un líquido o un sólido. Se desarrolla en una columna cerrada en la que se encuentra retenida la fase estacionaria y por la que se hace pasar el gas portador, la técnica de separación es la elución. La elución tiene lugar forzando el paso de un gas inerte a través de la columna. La fase móvil no interacciona con el analito y su única misión es la de transportar la muestra.

➤ Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrofotométrica de Masa:

Da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.⁽¹⁵⁾

2.4.5 Importancia de los Aceites Esenciales:

Distintos tipos de extractos y aceites han sido utilizado a lo largo de la historia en forma empírica y constituyen la base de numerosas terapias homeopáticas, debido a las propiedades biológicas de sus compuestos que confieren una defensa antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena. Como resultado de estos estudios y observaciones, actualmente son de gran interés científico. ⁽¹⁶⁾

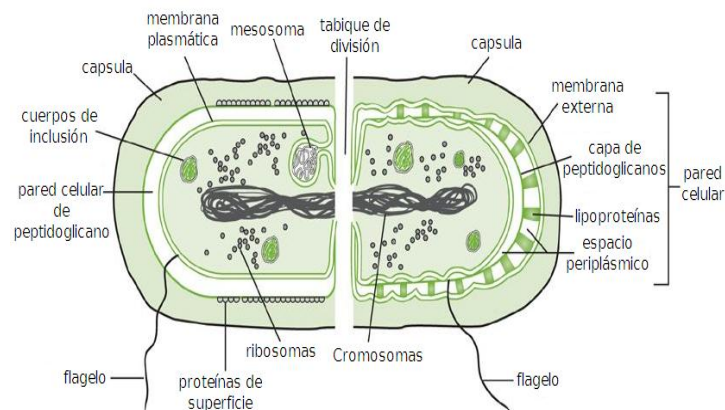
2.4.6 Actividad Farmacológica de los Aceites Esenciales:

- **Poder antiséptico:** Este se manifiesta frente a diversas bacterias patógenas, incluso cepas habitualmente a los antibióticos. Algunos aceites esenciales también son activos sobre hongos responsables de micosis y sobre levaduras (cándida).
- **Propiedad espasmolítica y sedante:** Numerosas drogas con aceites esenciales son catalogadas como eficaces para disminuir los espasmos gastrointestinales.
- **Propiedad irritante:** Ciertos productos por tópica, provocan aumento de la microcirculación, sensación de calor y, en ciertos casos, ligera acción anestésica local. En la actualidad, son aun numerosas las pomadas, cremas o geles a base de aceites esenciales destinadas a aliviar distensiones, esguinces y otras molestias articulares o musculares. ⁽¹⁶⁾

2.5 Estructura Bacteriana:

Los microorganismos se clasifican de acuerdo a la composición de su pared celular; Grampositivos y Gramnegativos. ⁽¹⁷⁾

Gráfico 2. ESTRUCTURA BACTERIANA



Fuente: Estructura Bacteriana. <http://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1LHFDD80N-H69XWN-4Z5T/Estructura%20bacteriana.cmap>

Tabla 2. Diferencias entre las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas:

	GRAM POSITIVAS	GRAM NEGATIVAS
Estructura	Más gruesa y químicamente sencilla	Más fina, pero químicamente más compleja
Contenido de lípidos	Bajo (1-4%)	Alto (11-22%)
Peptidoglicano	Mayor cantidad (50%)	Menor cantidad (10%)
Ácidos teicoicos	Presentes	Ausentes
Lipopolisacaridos	Ausentes	Presentes

2.5.1 Microorganismos Patógenos:

Los agentes infecciosos que afectan más comúnmente al ser humano y objeto de estudio de esta investigación son:

***Staphylococcus aureus*:** Es un microorganismo que forma predominante de la flora de la mucosa nasal, aunque también puede hallarse en la piel. Tiene la morfología propia de los estafilococos, es hemolítico, produce la enzima coagulasa y un pigmento carotenoide. Causa procesos patológicos por mecanismo invasivo, toxigenico e inmunitario. ⁽¹⁸⁾

***Enterococcus faecalis*:** *E. faecalis*, de acuerdo a la clasificación de Lancefield, pertenece a los estreptococos del grupo D. Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado, que posee numerosos factores de virulencia tales como lipoproteínas, citolisinas y enzimas proteolíticas como gelatinasas y serina. ⁽¹⁹⁾

El hábitat normal de *E. faecalis* es el tracto gastrointestinal, pero puede encontrarse transitoriamente en el tracto hepatobiliar, vagina, cavidad oral y lesiones de tejidos blandos. ⁽²⁰⁾

***Escherichia coli*:** Es una especie que se halla en el tubo digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente; causante de enteritis, infecciones urinarias en la mujer, colecistitis, peritonitis, infecciones de oído, infecciones oculares, neumonía y bacteriemia. Estas cepas poseen factores de virulencia que la hacen enteropatógenas como son adhesinas específicas, sistemas para la penetración intracelular y toxinas. ⁽²¹⁾

2.5.2 Mecanismos de Acción de los Antimicrobianos:

Bacteriostáticas: Detienen o impiden el crecimiento de una población de bacterias. Ejemplo: Cloranfenicol.

Concentración Mínima Inhibitoria: es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.

Bactericidas: Tienen acción letal rápida sobre las bacterias, efecto irreversible. Ejemplo: Penicilinas.⁽²²⁾

Concentración Mínima Bactericida: es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

Inhibición de la síntesis de la pared celular: Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglucano, capa esencial para la supervivencia de las bacterias, y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede causarle la muerte, por lo tanto son considerados como agentes bactericidas.

Daño a nivel de la membrana citoplásmica: Numerosos agentes catiónicos y aniónicos pueden causar la desorganización de la membrana. Dentro de los antibióticos que actúan a este nivel, está la polimixina B y la colistina (polimixina E), inhibidores de bacterias Gramnegativas que tienen lípidos de carga negativa en su superficie. Su acción es desorganizar la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes de la célula bacteriana y provocando pérdida del contenido citoplasmático de la bacteria.

Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: Muchos agentes antimicrobianos pueden interferir a diferentes niveles en la síntesis de los ácidos nucleicos. Pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o causar una interconversión de nucleótidos, pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN.

Antimetabolitos: Sustancias que matan o inhibe a un metabolito en específico, produciendo alteraciones metabólicas en la síntesis de ácidos nucleicos ejerciendo su acción en la fase del ciclo celular. Inhibiendo la síntesis de DNA, RNA y proteínas de la pared celular bacteriana.

Inhibidores de betalactamasas: Las betalactamasas son enzimas producidas por algunas especies bacterianas y son las responsables de la resistencia que presentan dichas bacterias hacia antibióticos que en su estructura química presentan el anillo betalactámico (como penicilinas y cefalosporinas), ya que las betalactamasas rompen ese anillo con lo cual bloquean la actividad antimicrobiana de los esos compuestos. ⁽²²⁾

Gráfico 3 Mecanismos de acción de los antibióticos

MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS			
PARED CELULAR	Penicilinas	Cefalosporinas	Vancomicina
SINTESIS PROTEICA	Aminoglucósidos (30S) Cloramfenicol (50S)	Eritromicina (50S)	Tetraciclinas (30S) Lincomicinas (50S)
SINTESIS DEL ADN	Acido nalidixico		Acido oxolinico
SINTESIS DEL ARN	Fluoroquinolonas		Griseofulvina
METABOLISMO DEL ACIDO FOLICO	Sulfonamidas	Trimetoprim	Pirimetamina
DETERGENTES DE SUPERFICIE	Polimixina		Anfotericina-B
ENZIMAS CELULARES	Nitrofurantoina	Metronidazol	Azoles

*Fuente: Mecanismo de acción de los Antimicrobianos.
<http://es.slideshare.net/wcuaylacruz/trabajo-de-antibioticos>*

2.5.3 Mecanismos de Resistencia Bacteriana:

1.- Enzimas Hidrolíticas: Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo.

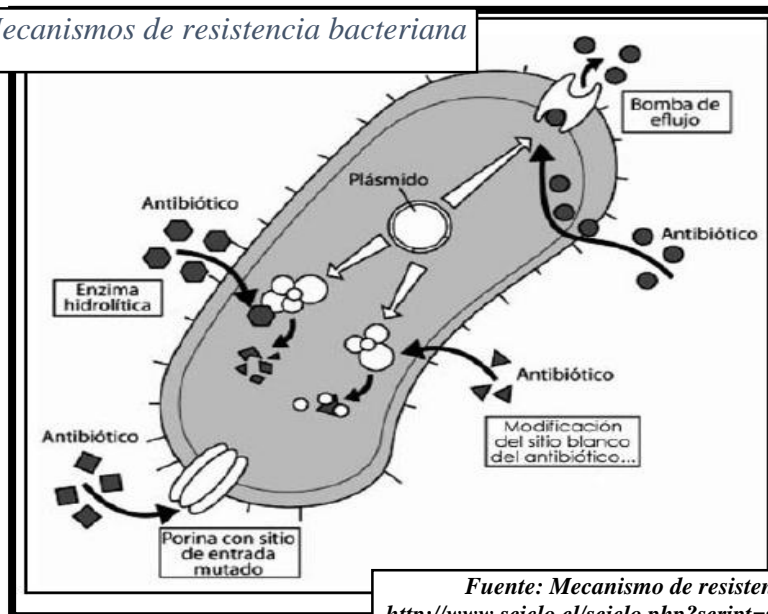
2.- Modificación del Sitio Activo: La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano.

Modificación de PBP: El PBP (penicillin binding protein) es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Grampositivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos. ⁽²³⁾

3.- Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano: Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria.

4.- Bombas de Eflujo: Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidroga en la pared bacteriana que permiten la expulsión de drogas como los antimicrobianos. Estos genes explican la resistencia a macrólidos en estos patógenos y a fluoroquinolonas. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto con el antimicrobiano. ^{(24) (25)}

Gráfico 4 Mecanismos de resistencia bacteriana



Fuente: Mecanismo de resistencia bacteriana.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014

CAPÍTULO III

3. Material y Métodos

3.1. Material Biológico:

3.1.1. Especies Vegetales:

Las hojas de *P. amalago* fueron recolectadas en noviembre de 2015 en el cantón Olón provincia de Santa Elena. La identificación botánica fue realizada por el especialista Biólogo, Xavier Cornejo y un espécimen con número de colección MER11 fue depositado en el herbario GUAY, Facultad de Ciencias naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

Las hojas de *Piper tuberculatum*, fueron recolectadas en julio de 2015 en la localidad General Antonio Elizalde, mejor conocida como Bucay, provincia del Guayas, Ecuador. La identificación botánica fue realizada por el especialista Biólogo, Xavier Cornejo y un espécimen con número de colección MER08 fue depositado en el herbario GUAY, Facultad de Ciencias naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

3.1.2. Cepas Bacterianas:

Facilitadas por el laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo: *Escherichia coli* ATCC: 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC: 6538P *Enterococcus faecalis* ATCC: 29212

3.2. Medios de Cultivo

Para la elaboración de los diferentes experimentos realizados en este trabajo empleamos los siguientes medios de cultivo:

- Caldo nutritivo, CN

Tabla 3 Componentes Caldo nutritivo

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
<i>Lab-Lemco powder</i>	1
<i>Extracto de levadura</i>	2
<i>Peptona</i>	5
<i>Cloruro sódico</i>	5

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

- Agar nutritivo

Tabla 4 Componentes Agar nutritivo

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD (g/L)</i>
<i>Agar</i>	15
<i>Extracto de carne</i>	3
<i>Peptona</i>	5
<i>Cloruro sódico</i>	5

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

- Infusión cerebro corazón, BHI

Tabla 5 Componentes BHI

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD (g/L)</i>
<i>Extracto de cerebro</i>	12,5
<i>Extracto de corazón</i>	5
<i>Peptona</i>	10
<i>Dextrosa</i>	2
<i>Cloruro sódico</i>	5
<i>Fosfato sódico</i>	2,5

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.3. Metodología:

3.3.1 Extracción y Aislamiento de los Aceites Esenciales de *P. Tuberculatum* y *P. amalago*:

La extracción del aceite esencial se realizó a partir de 500gr de material vegetal fresco, de la cual se separaron las partes aéreas (hojas); estas se sometieron a la extracción por el método de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger durante 3 horas, obteniéndose 0,1% de rendimiento de *P. tuberculatum*, y 0,4% de rendimiento de *P. amalago*. El aceite obtenido fue almacenado a una temperatura de 4-6°C, en frasco hermético y resguardado de la luz.

3.3.2. Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales *P. Tuberculatum* y *P. amalago*:

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas: La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se utilizará para analizar el aceite a obtener, para lo cual se empleará un cromatografo de gases marca Hewlet-Packard modelo 6898, con una columna capilar HP-5 de 30 metros de largo que contiene un detector de masa marca Hewlet-Packard modelo 5973. Los espectros de masa a obtener se espera muestren información sobre el patrón de fragmentación del compuesto, su masa molecular y porcentaje de similitud con los compuestos contenidos en la sexta edición de la base de datos Wiley MS. Para el proceso de análisis se preparará una solución de 20µl de aceite y 1mL de heptano. De la muestra se inyectará 1.0µl. el programa de temperaturas que se utilizará para este proceso será el siguiente: iniciándose en 60°C durante cero minutos, luego se incrementará la temperatura a 4°C/min hasta llegar a 260°C. El inyector se mantendrá a 200°C y el detector a 280°C. La relación de reparto será de 1:100. La identificación de los componentes se realizará por medio de la base de datos computarizada Wiley MS Data (sexta Ed).

3.3.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana:

Preparación Stock y Producto:

- a) El stock (solución concentrada de los aceites esenciales en DMSO) tiene una concentración de 50.000 ppm (partes por millón)
- b) El stock lo prepararemos con la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 50.000 \text{ ppm} = 500 \mu\text{l} \times 12.800 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{500 \mu\text{l} \times 12.800 \text{ ppm}}{50.000 \text{ ppm}}$$

$$50.000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 128 \mu\text{l stock} + 372 \mu\text{l Caldo nutritivo (6400 } \mu\text{g/mL)}$$

- c) Tomamos 200µl y lo colocamos en el primer pocillo
- d) Se realiza diluciones seriadas en la placa de 96 pozos.

Preparación del Inóculo:

1. Tener listo en un matraz estéril 20mL de caldo nutritivo
2. Inocular cepas bacterianas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* con un asa bacteriológica en el caldo nutritivo (2 0 3

colonias máximo), tener en cuenta la esterilización y usar siempre mechero o campana de flujo laminar para evitar contaminación.

3. Cerrar la boca del matraz con un trozo de papel aluminio y ponerlo a incubar por 18 horas a 37⁰ C
4. Con el pre-inoculo listo vamos a bajar la concentración de 10⁹ UFC/mL de bacterias a un promedio de inoculo ideal entre 2X10⁵ UFC/mL – 5X10⁵ UFC/mL realizando diluciones.

Dilución de Pre-inoculo:

- a) Del pre-inoculo tomamos 0,5 mL y lo pasamos a un tubo que contiene 4,5mL de solución salina al 0.9% realizando la primera dilución 1:10 mezclamos bien.
- b) Una vez mezclado tomamos otra vez 0,5mL de la dilución 1:10 y la pasamos a otro tubo que contiene 4,5mL de solución salina al 0.9% realizando la segunda dilución 1:100 mezclamos.
- c) Una vez mezclado tomamos otra vez 0,5mL de la dilución 1:100 y la pasamos a otro tubo que contiene 4,5mL de solución salina al 0.9% realizando la tercera dilución 1:1000 mezclamos.
- d) Una vez mezclado tomamos otra vez 0,5ml de la dilución 1:1000 y la pasamos a otro tubo que contiene 4,5mL de caldo nutritivo. (realizamos este trabajo por duplicado obteniendo 10mL en total de inoculo con una concentración 10⁵ UFC/mL.
- e) Realizamos el mismo procedimiento de dilución en placas Petri con agar nutritivo y corroboramos mediante el contaje de colonias.

3.3.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) se determinaron por el método de microdilución en medio líquido en placas de 96 pocillos (antibiograma), ensayando los aceites a una concentración máxima de 6400 µg/mL. Se depositaron 200 µL del aceite en el medio de cultivo (caldo nutritivo o BHI) a doble concentración de la requerida para el ensayo en los pocillos de la columna 2 y 100 µL de medio en los restantes, para llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µL de una suspensión del microorganismo a ensayar, realizada a partir de pre-inóculos preparados, de modo que quedara a una densidad celular inicial de 1-5×10⁵

UFC./mL. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control positivo se inocularon pocillos en las mismas condiciones pero carentes de producto y con dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problemas, en ningún caso la concentración de DMSO superó la máxima tolerable por cada bacteria. El control negativo (blanco control), se preparó añadiendo 200 µL de medio a los pocillos de la columna 1. Tras 24 horas de incubación a 37 °C en agitación orbital se determinó la turbidez de los cultivos. De aquellos pocillos en los que no se observó crecimiento visible, se tomaron alícuotas (100 µL) para efectuar un recuento de viables en placas de agar nutritivo ó BHI con el fin de establecer la CMI (mínima concentración de producto a la cual no hubo crecimiento) y CMB (mínima concentración de producto que produjo la muerte del 99,9% de la población inicial)

3.4 Resultados y Discusión

Rendimiento del Aceite Esencial:

El rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas de *P. amalago* en el proceso de hidrodestilación y calculado sobre la base del peso seco fue de 0,4%. Mientras que el rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas *P. tuberculatum* en el proceso de hidrodestilación y calculado sobre la base del peso seco fue de 0,1%. Este rendimiento es relativamente bajo si lo comparamos con el reportado en un trabajo realizado en Brasil por otros investigadores en 2010, quienes reportaron un rendimiento para *P. tuberculatum* de 0,70%. Sin embargo, en un estudio realizado en Venezuela en 2011 el rendimiento del aceite esencial de *P. tuberculatum* fue de 0,032%, más bajo que el obtenido en este estudio. ⁽²⁶⁾

Composición Química del Aceite Esencial:

La actividad biológica de los aceites esenciales ha sido confirmada en muchos estudios, los datos recogidos en esos materiales muestran una gran variabilidad. Las causas de ese comportamiento parecen ser las diferencias en la composición del aceite esencial debido a factores genéticos y ambientales y es por eso que resulta de interés la identificación y estudio de los principales constituyentes que son responsables de la actividad del aceite esencial. ⁽²⁶⁾

Entre los compuestos que conforma el aceite esencial del género *Piper*, se le atribuye propiedades antibacterianas, podemos mencionar: terpenos como el safrol, α -humuleno, β -cariofileno, β -elemeno, germacreno, *p*-cimeno, γ -terpineno, mirceno, entre otros. ⁽²⁶⁾

El género *Piper*, ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas. Este género es bien conocido como fuente de compuestos biológicamente activos como monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe, en gran medida, a la presencia de terpenoides que contienen grupos alcoholes, aldehídos y por último grupos cetónicos, que les confieren notables propiedades antimicrobianas.

Las plantas del género *Piper* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales y como citotóxico y antimicrobiano. Los

metabolitos secundarios encontrados en extractos, obtenidos de diferentes partes de estas plantas, muestran actividad antifúngica, insecticida, estimulante, bactericida, antiviral, antimicótica y citotóxica.⁽²⁶⁾ El género *Piper* ha sido utilizado por el hombre como condimento y medicina desde tiempos inmemorables, varias especies de *Piper* se utilizan para muchos propósitos tales como alimentos, especias, perfumes, aceites, insecticidas, alucinógenos y en América Latina, las especies de *Piper* se han utilizado para tratar una variedad de dolencias ginecológicas, así como problemas gastrointestinales, dolor, inflamación, también infecciones bacterianas y fúngicas.⁽²⁷⁾

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula. Algunos autores plantean que su actividad bacteriostática y/o bactericida se debe fundamentalmente, a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad. Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides, consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos produce la muerte en la célula bacteriana.⁽²⁸⁾

Se demostró por análisis fitoquímicos que el extracto del fruto de *P. tuberculatum* contiene sustancias bioactivas con un gran potencial para mejorar la formulación estándar de acaricidas.⁽²⁹⁾

Los principales componentes químicos que contiene el aceite esencial de *P. tuberculatum* son:

Tabla 6 Componentes mayoritarios del Piper tuberculatum

Dilapiol	32,32 %
1,8 cineol	17,62%
1,3-Benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl)	10,74 %
Beta-ocimeno	5,32 %
Total compuestos	31

Dilapiol es el componente mayoritario del *Piper Tuberculatum*. El Dilapiol es un compuesto orgánico que demostró ser eficaz en el control de plagas en India, Europa, EE.UU y Brasil. El porcentaje de Dilapiol que se analizó en el *Piper tuberculatum*, es de

32.32% en el cual relacionándolo, con diferentes investigaciones que se han realizado en diferentes *Piper*, se determinó que es uno de los compuestos más mayoritarios del genero *Piper*. Por ejemplo en la región occidental de Cuba, con 0,96% de rendimiento presenta 82,2% de dilapiol, en el Estado de Acre, donde se reporta cerca de 2% de rendimiento, tiene 73,97% de dilapiol, y en el Estado de Pará, con el 2,5% de rendimiento está en el 88,9% de dilapiol. También hay plantas con niveles más bajos de dilapiol, como en Papua Nueva Guinea, con 0,35% de rendimiento y el 43,3% de dilapiol y en Macas - Ecuador, con el 0,8% rendimiento y 45,92% de dilapiol. ⁽³⁰⁾

Componentes químicos de *Piper amalago*:

Tabla 7 Componentes mayoritarios de *Piper amalago*

Sabineno	20,42 %
Spathulenol	10,82%
Biciclogermacreno	8,50 %
Gamma- cadineno	5,06 %
Total compuestos	49

El componente mayoritario del *Piper amalago*, es el Sabineno, con un 20,42%. relacionando el presente análisis con investigaciones a nivel mundial, existen estudios que la presencia de este compuesto químico (Sabineno) en otras *Piper*, es uno de los componentes mayoritarios que existen científicamente, este hidrocarbano monoterpeneo Sabineno presenta, una cantidad de 52,39%.^{(31) (32)}

Actividad Antibacteriana:

En nuestro país, el estudio de los aceites esenciales del genero *Piper* registran resultados, en la Universidad de Guayaquil – Ecuador, se han realizado investigaciones acerca del aceite esencial de las hojas y espigas de *Piper lenticillosum* (Piperaceae).

La actividad antibacteriana del aceite esencial fue evaluada frente a tres importantes cepas bacterianas patógenas humanas utilizando el método de agar de difusión en disco. Los resultados mostraron actividad moderada frente *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* ATCC (25922), con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 100, 200 µl/mL y actividad débil frente *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) con CMI de 900 µl/mL, respectivamente. Según la literatura consultada, este es el primer informe

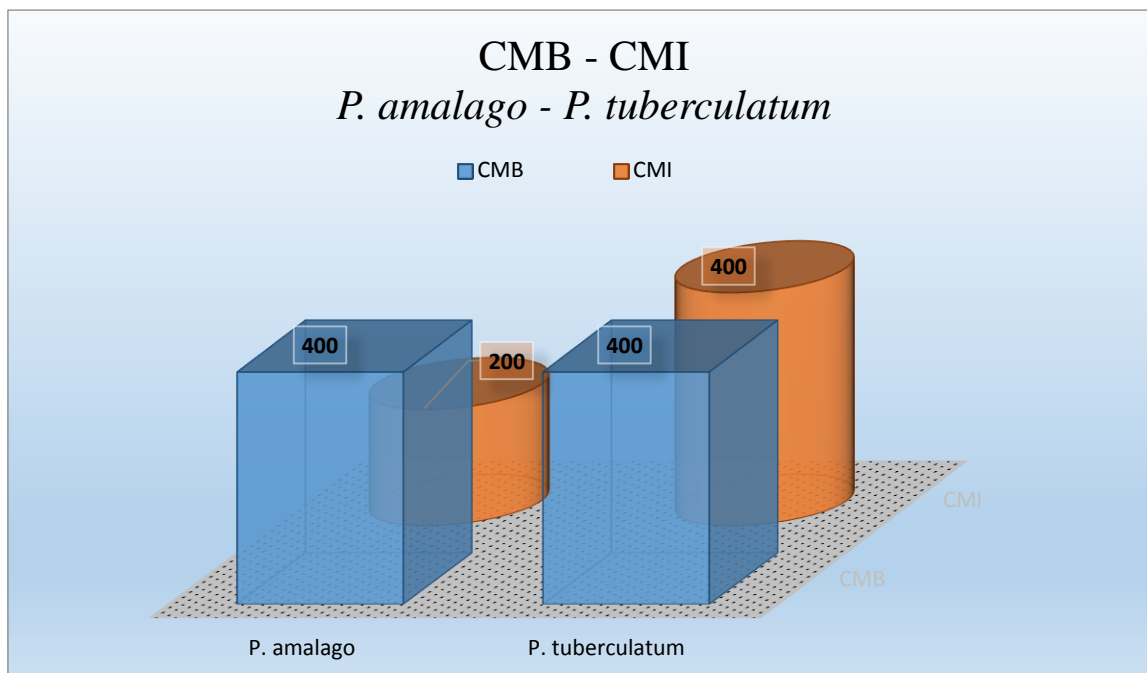
sobre la composición y actividad antibacteriana del aceite esencial del genero *Piper lenticelosum* en el Ecuador. ⁽³³⁾

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales evaluada frente a *Staphylococcus Aureus*, se muestra en la Tabla 8, y se ilustra en el gráfico 5, en la que se observa que la CMI fue de 200 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL para *P. amalago*, presentando mejores resultados que *P. tuberculatum* ya que su CMI es de 400 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL comparando con el ensayo hecho por Rondón, utilizando el método agar de difusión en disco este obtuvo una CMI de 100 µg/mL, lo que sugiere que los aceites esenciales de *P. amalago*, *P. tuberculatum* y *Piper lenticelosum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Staphylococcus Aureus*, . Algunos autores consideran la actividad antimicrobiana alta cuando los valores de CMI son inferiores a 100 µg/mL, moderada de 100 a 500 µg/mL, débil de 500 a 1000 µg/mL, o ninguna cuando es superior a 1000 µg/mL. ⁽³³⁾

Tabla 8: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales *P. tuberculatum* y *P. amalago* frente a *Staphylococcus aureus*: ATTC 6538P

<i>Staphylococcus aureus</i> : ATTC 6538P	
<i>Piper amalago</i>	
CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)
400	200
<i>Piper tuberculatum</i>	
CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)
400	400

Grafico 5: CMB – CMI de los aceites esenciales de *P. amalago*, *tuberculatum* frente a *Staphylococcus Aureus*.



La bacteria *Escherichia coli*, es conocida por ser uno de los microorganismos que mayormente causa infección del tracto urinario según estudios realizados en Brasil y en el mundo, por esto, es importante tener en cuenta que el uso indiscriminado de antibióticos contra este microorganismo desencadena sus mecanismos de resistencia a fármacos comerciales haciendo que la infección sea de difícil curación. En este contexto, la búsqueda de nuevas fuentes naturales con actividad antibacteriana principalmente en el bioma Amazónico ha crecido en los últimos tiempos basada en la investigación de sustancias que presentan un potencial antibacteriano o incluso antibacteriostático.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales evaluada frente a *Escherichia coli*, se muestra en la Tabla 9, y se ilustra en el gráfico 6, en la que se observa que la CMI fue de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CMB fue de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *P. amalago*, presentando mejores resultados que *P. tuberculatum* ya que su CMI es de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CMB fue de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparando con el ensayo hecho por Rondón, utilizando el método agar de difusión en disco este obtuvo una CMI de 200 $\mu\text{l}/\text{mL}$, lo que sugiere que los aceites esenciales de *P. amalago*, *P. tuberculatum* y *Piper lenticelosum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

Tabla 9: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales *P. tuberculatum* y *P. amalago* frente a *Escherichia coli*: ATTC 25922

<i>Escherichia coli</i> : ATTC 25922	
<i>Piper amalago</i>	
CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)
200	100
<i>Piper tuberculatum</i>	
CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)
800	400

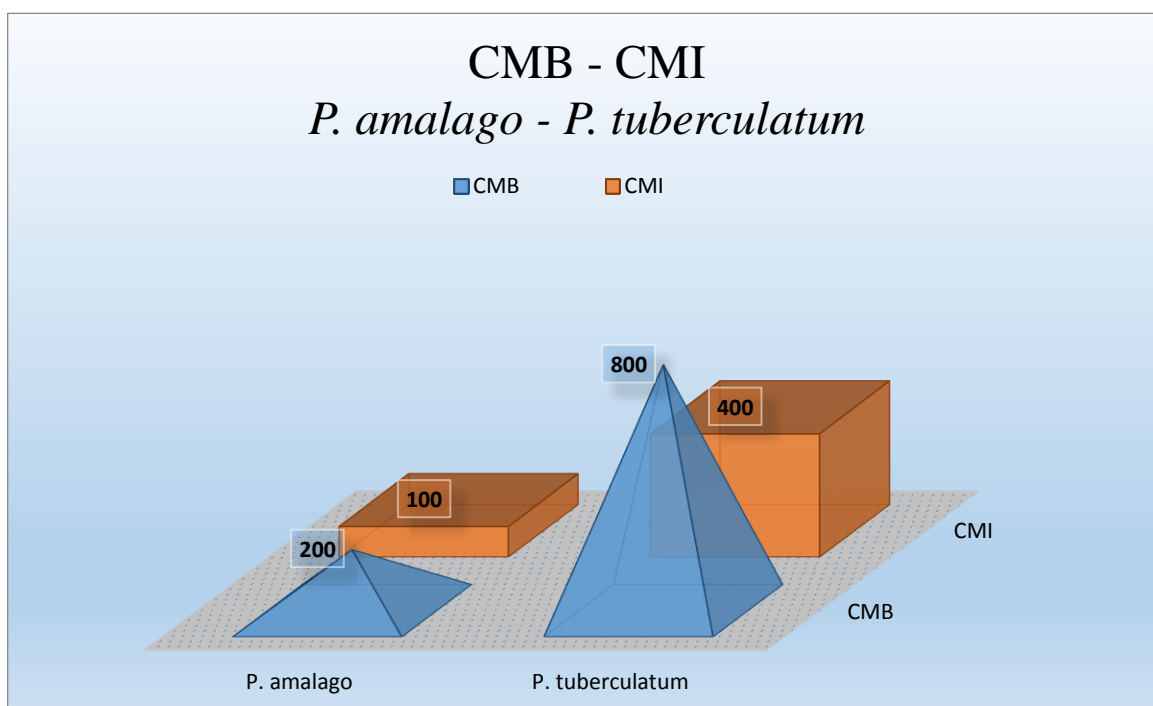


Gráfico 6: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de *P. amalago*, *tuberculatum* frente a *Escherichia coli*.

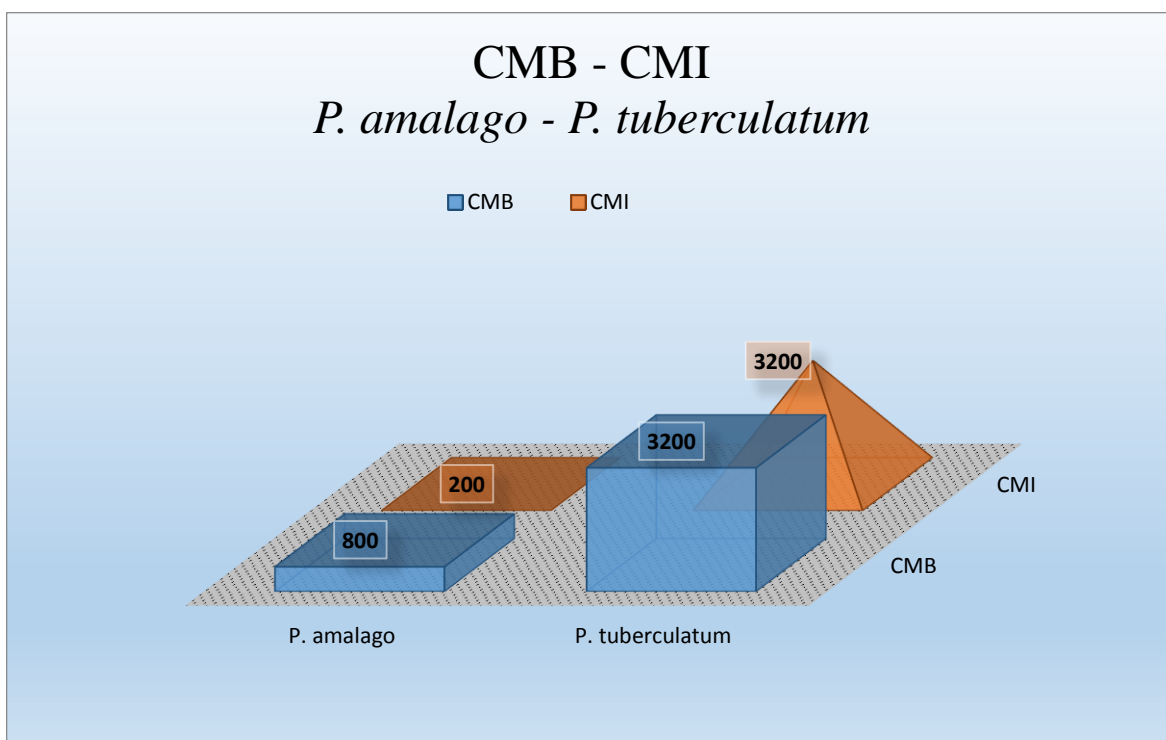
La actividad antibacteriana de los aceites esenciales evaluada frente a *Enterococcus faecalis*, se muestra en la Tabla 10, y se ilustra en el gráfico 7, en la que se observa que la CMI fue de 200 µg/mL y la CMB fue de 800 µg/mL para *P. amalago*, presentando mejores resultados que *P. tuberculatum* ya que su CMI es de 3200 µg/mL y la CMB fue de 3200 µg/mL comparando con el ensayo hecho por Rondón, utilizando el método agar de

difusión en disco este obtuvo una CMI de 900 $\mu\text{l/mL}$, lo que sugiere que el aceite esencial de *P. amalago*, presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, mientras que *P. tuberculatum* no presenta ninguna actividad inhibitoria ya que su CMI supera los 1000 $\mu\text{g/mL}$ y *Piper lenticelosum* por su parte presenta una actividad inhibitoria débil sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.

Tabla 10: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales *P. tuberculatum* y *P. amalago* frente a *Enterococcus faecalis*: ATTC 29212

<i>Enterococcus faecalis</i> : ATTC 29212	
<i>Piper amalago</i>	
CMB ($\mu\text{g/ml.}$)	CMI ($\mu\text{g/ml.}$)
800	200
<i>Piper tuberculatum</i>	
CMB ($\mu\text{g/ml.}$)	CMI ($\mu\text{g/ml.}$)
3200	3200

Grafico 7: Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales *P. amalago*, *tuberculatum* frente a *Enterococcus faecalis*



Con estos resultados, esperamos contribuir al estudio de especies del género *Piper*, de Ecuador, de los cuales muchos se utilizan desde la antigüedad por la población Ecuatoriana. Por lo que se sugiere ampliar el estudio de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales frente a otros agentes patógenos con el fin de conocer su espectro de acción.

CAPÍTULO IV

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones:

- 1 Se identificaron botánicamente las especies vegetales por el especialista Biólogo, Xavier Cornejo otorgándole a *Piper tuberculatum* el número de colección MER08 y a *P. amalago* el número de colección MER11, las cuales fueron depositadas en el herbario GUAY, de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- 2 Se realizaron las extracciones de los aceites esenciales de las especies vegetales en estudio mediante la técnica de hidrodestilación, obteniéndose un rendimientos de 0,4% para *P. tuberculatum* y 0,1% para *P. amalago*. Los aceites esenciales fueron obtenidos por la Dra. María Eugenia Rondón del Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- 3 Se determinó la composición química de los aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lo cual fue realizado por el Dr. Luis Rojas PhD. Docente e Investigador del Instituto de Investigación; Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Los componentes principales del aceite esencial de *Piper tuberculatum* identificados fueron el Dilapiol (32,32%) y el 1,8 Cineol (17,62%), entre otros, dentro de un total de 31 compuestos, mientras que los componentes principales del aceite esencial de *Piper amalago* identificados fueron el Sabineno (20,42%) y el Espatuleno (10,82%) entre otros en un total de 49 componentes.
- 4 Se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) frente a *Staphylococcus Aureus*, dando una CMI fue de 200 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL para *P. amalago*, *P. tuberculatum* su CMI es de 400 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL lo que sugiere que los aceites esenciales de *P. amalago*, *P. tuberculatum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Staphylococcus Aureus*; además la actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue evaluada frente a *Escherichia coli*, la CMI fue de 100 µg/mL

y la CMB fue de 200 $\mu\text{g/mL}$ para *P. amalago*, mientras que *P. tuberculatum* su CMI es de 400 $\mu\text{g/mL}$ y la CMB fue de 800 $\mu\text{g/mL}$, lo que sugiere que los aceites esenciales de *P. amalago*, *P. tuberculatum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Escherichia coli.*, por último la actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue evaluada frente a *Enterococcus faecalis*, la CMI fue de 200 $\mu\text{g/mL}$ y la CMB fue de 800 $\mu\text{g/mL}$ para *P. amalago*, mientras que para *P. tuberculatum* su CMI es de 3200 $\mu\text{g/mL}$ y la CMB fue de 3200 $\mu\text{g/mL}$; lo que sugiere que el aceite esencial de *P. amalago*, presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, mientras que *P. tuberculatum* no presenta ninguna actividad inhibitoria ya que su CMI supera los 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Recomendaciones:

- Determinar la actividad antimicrobiana frente a otras cepas de interés clínico, así como frente a hongos.
- Ampliar con otras actividades biológicas como antioxidante, insecticidas, fungicidas, entre otras.
- Continuar el estudio antimicrobiano de otras especies botánicas.
- Informar los resultados de la investigación científica en artículos científicos.
- Actualmente existen varios estudios acerca de la importancia que tienen las plantas medicinales, con la extracción de aceites esenciales y extractos, para la salud del ser humano con el fin de combatir, enfermedades bacterianas que son resistentes a varios antibióticos, por lo que sería necesario que los profesionales de salud, conozcan estas nuevas alternativas de ciencia científica, que puede ser de gran ayuda medicinal a las diferentes patologías bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

1. García A, Morón F, Larrea C. Plantas medicinales en revistas científicas de Cuba colonial y neocolonial Rev. Cubana Plant. Med. [Internet]. 2010 Oct [citado 10 Jul 2016]; 15(4):182-191. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000400001
- 2.- Navickiene H, Alécio A, Kato M, et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry. [Internet]. 2000 Nov [citado 11 de Jul 2016]; 55(6):621–626. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00226-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00226-0)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200002260>
- 3.- Rovetto G, Moreno N, Bolívar V, et al. Aplicaciones medicinales del tomillo. Univ. Cienc. Soc. Santa. [Internet]. 2010 [citado 11 Jul 2016]; 1(2):16-20. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S8888-88882010000100004&script=sci_arttext&tlng=pt
- 4.- Thomas G. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo [Internet]. 2014 [citado 14 Jul 2016]; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
- 5.- Pallmay B. “Perfil de resistencia bacteriana a infección de vías urinarias en pacientes embarazadas atendidas en el servicio de ginecología y obstetricia del hospital provincial general docente Riobamba. Período enero 2010 – diciembre 2011 [Internet]. 2011 [citado 14 Jul 2016]; Riobamba - Ecuador. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/normas-vancouver-buma-2013-guia-breve.pdf>.
- 6.- Avello M, Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. [Internet]. 2010 Oct [citado 15 Jul 2016]; 138(10):1288-1293. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014
- 7.- Bermúdez A, Oliveira M, Velázquez D, et al. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales INCI. [Internet]. 2005 Ago [citado 15 Jul 2016]; 30(8):453-459. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005
- 8.- Paredes G, Ruiz M. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de extractos vegetales de los géneros *Aspidosperma* y *Piper* frente a cepas de *Pseudomonas*. Iquitos – Perú. [Internet]. 2014 Sep [citado 14 Jul 2016]. Disponible en: <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/276/1/EVALUACION%20DE%20LA%20ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20IN%20VITRO%20DE%20EXTRACTOS%20VEGETALES%20DE%20LOS%20G%20NEROS%20ASPIDOSP.pdf>
- 9.- Burci L, Pereira I, Silva L, et al. Antiúlceras. *Piper tuberculatum* Jacq. In rats [Internet]. 2013 Jun [citado 16 Jul 2016]; 148(1):165–174. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113002547>

- 10.- Carmona J, Gil R, Rodríguez M. Descripción taxonómica, morfológica y etnobotánica de 26 hierbas comunes que crecen en la ciudad de Mérida– Venezuela Universidad de Los Andes. [Internet]. 2008 Ago [citado 12 de Jul 2016]; 1325(2610):113-129. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30448/1/articulo1.pdf>
- 11.- Navickiene H, Alécio A, Kato M, et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum* [Internet]. 2000 Nov [citado 11 de Jul 2016]; 55(6):621–626. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00226-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00226-0)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200002260>
- 12.- Novaes A, Silva J, Barison A, et al. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). [Internet]. 2014 Mar [citado 19 de Jul 2016]; 21(4):523–528. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711313004236>
- 13.- Duarte I Y, Pino O, Martínez B. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz. Rev. Protección Veg. [Internet]. 2014 [citado 20 de Jul 2016]; 29(1):62-65. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100008
- 14.- Duarte Y, Pino O, Martínez B. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium spp.* Rev. Protección Veg. [Internet]. 2013. [citado 20 de Jul 2016]; 28(3):232-235. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300013
- 15.- Navarrete C, Gil J, Durango D, et al. Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. Dyna. [Internet]. 2010. [citado 20 de Jul 2016]; 77(162):8592. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v77n162/a10v77n162.pdf>
- 16.-. Rojas J, Perea A, Stashenko E. Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. VITAE. [Internet]. 2008. [citado 21 de Jul 2016]; 16(1):110-115. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a13.pdf>
- 17.- Morales G, Artículo de revisión. La coloración de Gram y su importancia en el diagnóstico microbiológico. Revista Electrónica de PortalesMedicos.com. [Internet]. 2015. [citado 23 de Jul 2016]; Disponible en: <http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/coloracion-gram-diagnostico-microbiologico/>
- 18.- Santos A, Santos O, Freitas C, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando una cepa de importância hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Lab. [Internet]. 2007. [citado 23 de Jul 2016]; 43(6):413-423. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167624442007000600005&lng=en
- 19.- Carrero C, González M, Martínez M, et al. Baja frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. Rev Fac Odontol Univ Antioq [Internet]. 2015 Jun. [citado 23 de Jul 2016]; 26(2):261-270. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121246X2015000100003&lng=en.
- 20.- Kenneth J. Ryan, C. George Ray. Microbiología médica. (5ta edición). México: McGraw-Hill Education; 2011. Pp. 539,541, 542.

- 21.- López D, Torres M, Prada C. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Rev Univ Salud [Internet]. 2016 Abr [citado 24 de Jul 2016]; 18:190-202. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012471072016000100018&lng=en.
- 22.- Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2009 Ene [citado 24 de Jul 2016]; 27(1):44-52. Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001; <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-los-antimicrobianos-S0213005X08000177>
- 23.- Velázquez C, Cornejo P, Volkow P. Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años. Salud pública Méx [Internet]. 2016 Ago [citado 27 de Jul 2016]; 58(4):446-452. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342016000400446&lng=es. <http://dx.doi.org/10.21149/spm.v58i4.8025>.
- 24.- Hernández C, Blanco V, Mota G, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Biomédica [Internet]. 2014 Abr [citado 27 de Jul 2016]; 34(1):91-100. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572014000500011&lng=en. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>.
- 25.- Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Biomédica [Internet]. 2013 Jul [citado 27 de Jul 2016]; 38(2). Disponible en: <http://hdl.handle.net/10893/4679>
- 26.- Sánchez Y, Pino O, Correa T, et al. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *piper auritum kunth* (caisimón de anís). Rev. Protección Veg. [Internet]. 2009 Abr [citado 21 Nov 2016]; 24(1):39-46. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100006&lng=es.
- 27.- Paredes G, Ruiz M. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de extractos vegetales de los géneros *Aspidosperma* y *Piper* frente a cepas de *Pseudomonas*. Iquitos – Perú. [Internet]. 2014 Sep [citado 21 Nov 2016]. Disponible en: <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/276/1/EVALUACION%20DE%20LA%20ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20IN%20VITRO%20DE%20EXTRACTOS%20VEGETALES%20DE%20LOS%20G%20C%20NEROS%20ASPIDOSP.pdf>
- 28.- Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet). Facultad de Agroindustrias, UNNE, .2006. [citado 30 Nov 2016]. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>.
- 29.- Silva K, Baldin E, Lopes L, et al. Use of botanical insecticides as an alternative for the management of the mexican bean weevil. Rev. Caatinga, Mossoró. [Internet]. 2016 Jun [citado 21 Nov 2016]; 29(2):348-357. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-21252016000200348&lng=en&nrm=iso, <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n211rc>.

- 30.- Dousseau S, Souza De I, Evaristo M, et al. Caracterización del limbo de *Piper aduncum* L. (Piperaceae): Análisis estructurales, histoquímicos y de sus aceites esenciales. *Gayana. Botánica*. [Internet]. 2014 Jun [citado 15 Ene 2017]; 71(1):0717-6643. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-66432014000100015
- 31.- Santos L, Franco R, Amano E, et al. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. *Rev. bras. farmacogn.* [Internet]. 2015 Abr [citado 21 Nov 2016]; 25(2):85-91. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2015000200085&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.03.001>.
- 32.- Pumaylle K, Paredes L, et al. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*. [Internet]. 2012 Dec. [citado 16 Ene 2017]; 3(0):291-302. Disponible en: <file:///C:/Users/VCarlos/Downloads/Dialnet-ExtraccionCaracterizacionYEvaluacionDeLaActividadA-4104068.pdf>; <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>
- 33.- Rondón M, Velasco J, Cornejo X, et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Piper lenticellosum* C.D.C essential oil collected in Ecuador. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. [Internet]. 2016 Ago [citado 29 Nov 2016]; 6(08):156-159. Disponible en: http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1965_pdf.pdf DOI: 10.7324/JAPS.2016.60824

Anexos



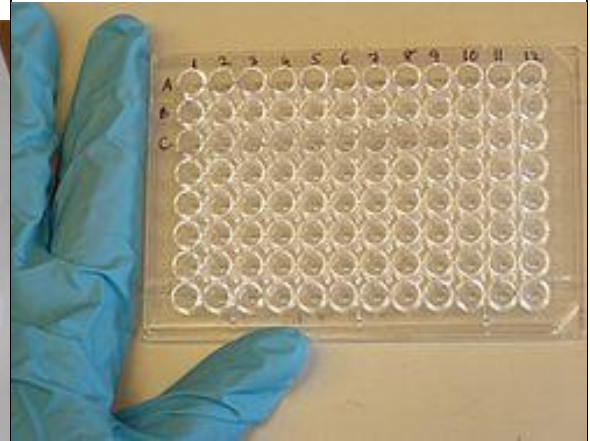
Anexo 1: *Piper amalago* recogida en el cantón Olón. Provincia de Santa Elena. en Noviembre de 2015



Anexo 2: *Piper tuberculatum* recogida en Bucay. en 07 de 2015



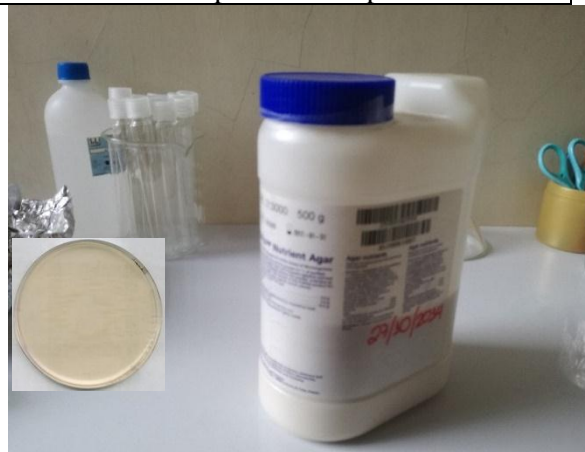
Anexo 3: Cajas Petri



Anexo 4: Micro placas de 96 pozos



Anexo 5: Caldo nutritivo



Anexo 6: Agar nutritivo



Anexo 7: Estufa



Anexo 8: Contador de colonias



Anexo 9: Campana de flujo laminar



Anexo 10: Tubos eppendorf



Anexo 11: Pipeta multicanal y automáticas



Anexo 12: Mechero



Anexo 13: Gradillas



Anexo 14: Pipetas pasteur



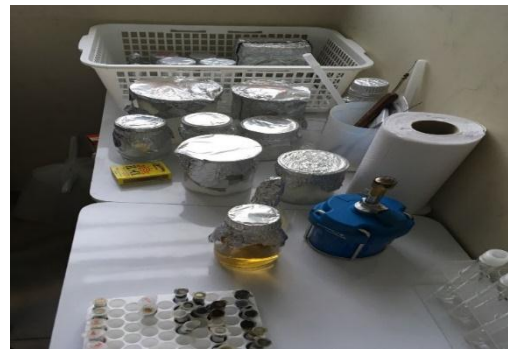
Anexo 15: Hidrodestilación



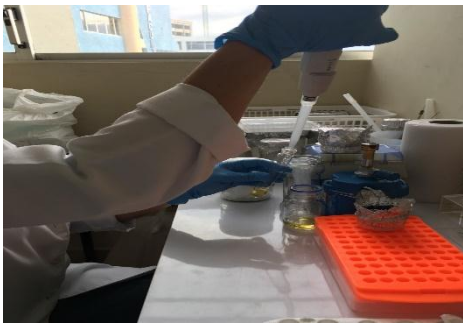
Anexo 16: Trampa de Clevenger



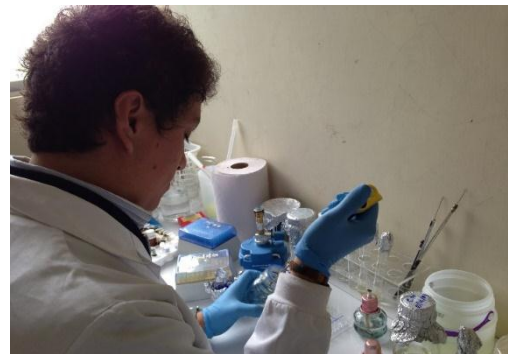
Anexo 17: Aceites esenciales



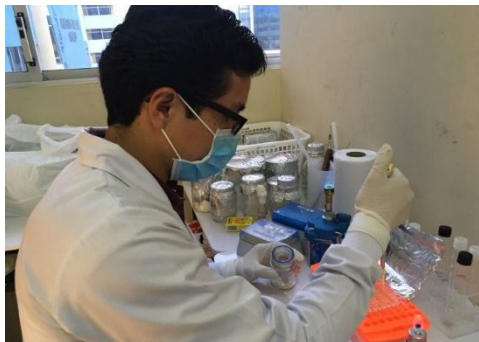
Anexo 18: Materiales esterilizados



Anexo 19: Caldo Nutritivo



Anexo 20: Inoculación de cepas bacterianas



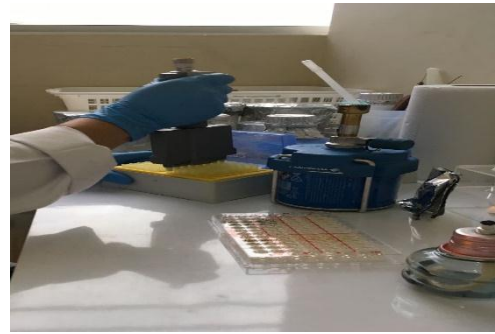
Anexo 21: Diluciones seriadas en tubos



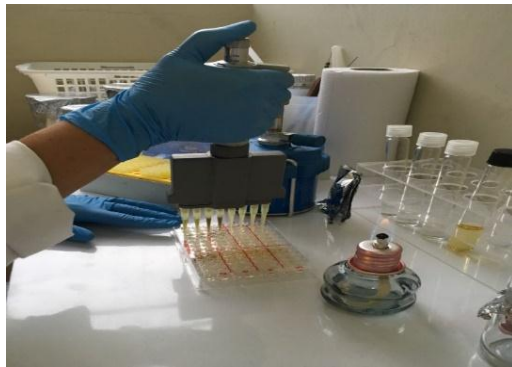
Anexo 22: Inoculo



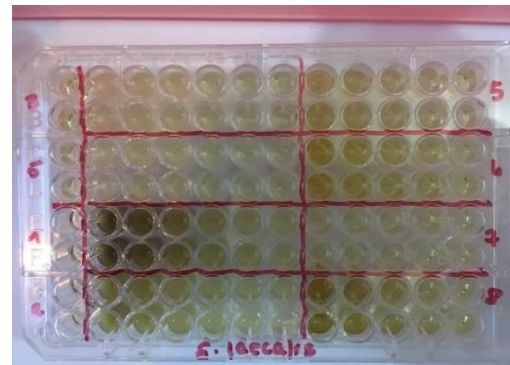
Anexo 23: Adición del inoculo a la placa



Anexo 24: Diluciones en placas



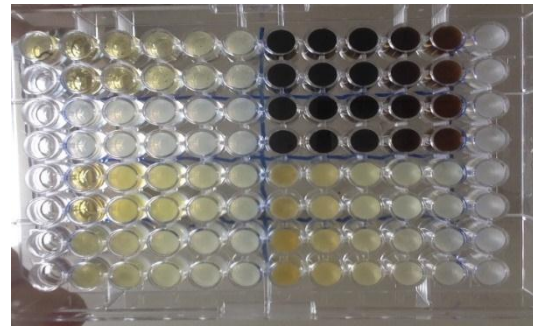
Anexo 25: Diluciones seriadas



Anexo 26: Dilución completa



Anexo 27: Incubación de 24h a 37⁰ C



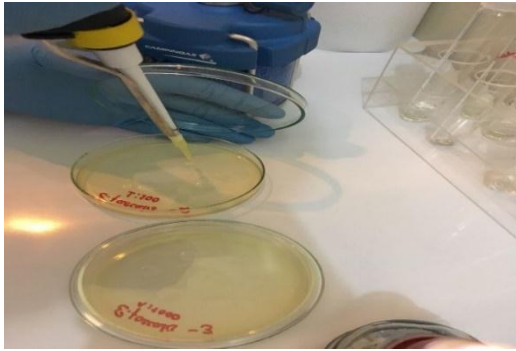
Anexo 28: Observación de resultados



Anexo 29: Rotulado de cajas Petri



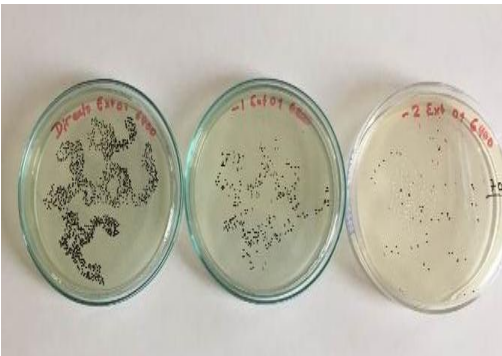
Anexo 30: Cultivo de muestras turbias



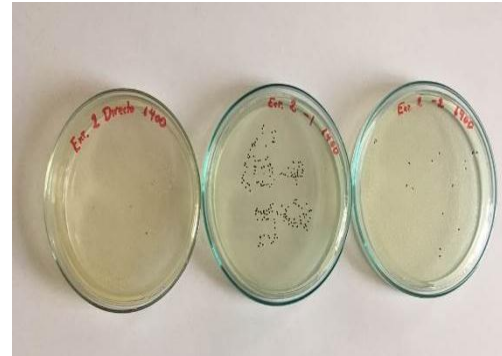
Anexo 31: Inoculación de muestras



Anexo 32: Incubación de 24 a 37⁰ C



Anexo 33: Contaje de colonias



Anexo 34: Contaje de Colonias



Anexo 35: DOCENTE TUTOR



Anexo 36: FIN