

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

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

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
LA ESPECIE *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) DE ECUADOR FRENTE A CEPAS  
DE INTERÉS CLÍNICO”

**Autores:** Guamán Aranda Walter Darío

Jaramillo Panamá Soraya Estefany

**Tutora:** Dra. Liliana Araujo Baptista PhD.

**Riobamba - Ecuador  
2018**

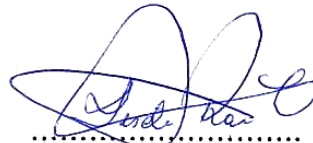
## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: "Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) de Ecuador frente a cepas de interés clínico", presentado por Guamán Aranda Walter Darío y Jaramillo Panamá Soraya Estefany y 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:

**MsC. Yisella Ramos**

.....

Presidente del Tribunal




Firma

**Dr. Celio García**

.....

Miembro del Tribunal

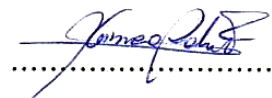


Firma

**MsC. Ximena Robalino**

.....

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 investigación con el tema: "Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) de Ecuador frente a cepas de interés clínico", propuesto por el Sr. Guamán Aranda Walter Darío y la señorita Jaramillo Panamá Soraya Estefany, 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.

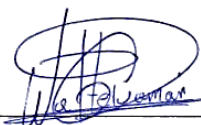


.....  
Dra. Liliana Araujo Baptista PhD.

Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

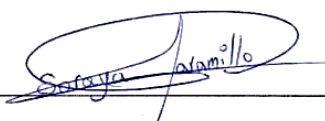
## AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, nos corresponde exclusivamente a: los autores Guamán Aranda Walter Darío con cedula de identidad número 060377775-6 y Jaramillo Panamá Soraya Estefany con cedula de identidad número 140049753-1 y la Directora del Proyecto Dra. Liliana Araujo Baptista PhD.; y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



---

Guamán Aranda Walter Darío  
C.I. 060377775-6



---

Jaramillo Panamá Soraya Estefany  
C.I. 140049753-1

### **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos primero a Dios por darnos fuerza y valor para superar obstáculos y dificultades a lo largo de nuestras vidas, a nuestros padres por la confianza y el apoyo que nos han brindado, ellos han sido fuente de inspiración y ejemplo de constancia y dedicación; agradecemos a la Universidad Nacional de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias de la Salud y a la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, por habernos permitido el cumplimiento de nuestras aspiraciones y guiarnos en el camino hacia una nueva etapa de vida y formarnos como Licenciados en Laboratorio Clínico e Histopatológico.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico principalmente a Dios por haberme dado la vida y permitirme llegar a esta instancia de mi formación profesional. A mis padres por darme el apoyo incondicional y permitirme contar siempre con ellos. A mi familia, mi esposa y mi hijo que han sido el pilar fundamental para culminar este proceso en mi formación profesional, a mi compañera de tesis que sin mutuo apoyo no hubiésemos culminado este gran paso de nuestras vidas; de manera muy especial a nuestra tutora Dra. Liliana Araujo Baptista PhD. y finalmente a la institución.

**Guamán Aranda Walter Darío**

## **DEDICATORIA**

La concepción de este proyecto está dedicada a Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar; a mi madre Esther Panamá, quien a lo largo de mi existencia ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, el pilar fundamental en mi vida. A mis hermanos que me han permitido contar con ellos siempre. Sobre todo, a mi hijo Dylan quien a pesar de su corta edad me ha enseñado que el amor y paciencia dan la fuerza para levantarse todos los días y enfrentar todos los obstáculos. A mis abuelitos porque con sus sabios consejos me han ayudado a ser mejor persona Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar. También dedico este proyecto a todo el personal del laboratorio del Hospital General Macas (2017) por brindarme su amistad, apoyo y sabiduría. A ellos este proyecto, que, sin ellos, no hubiese podido ser.

**Jaramillo Panamá Soraya Estefany**

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
<b>ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA</b> .....	16
Antecedentes Históricos de Plantas con Fines Medicinales.....	16
Importancia de las Plantas Medicinales en Ecuador.....	17
Plantas Antimicrobianas.....	18
Estructura de una Bacteriana.....	18
Estructura de una Levadura.....	19
Microorganismos Patógenos.....	19
Bacterias Gram Positivas.....	20
Bacterias Gram Negativas.....	20
Levadura <i>Candida albicans</i> .....	21
Generalidades de los Antibióticos .....	21
Mecanismos de Acción de los Antibióticos.....	21
Mecanismos de Resistencia de las Bacterias Frente a los Antibióticos.....	22
Actividad antimicrobiana.....	22
Aceites Esenciales (AEs).....	23
Composición Química de los AEs.....	23
Mecanismo de Acción e Importancia de los AEs como Antimicrobianos.....	23
Cromatografía de Gases-espectrometría de Masas.....	23
Características de la especie vegetal <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	24
Familia Piperaceae.....	24
Especie <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	24
Usos tradicionales de <i>P. marginatum</i> Jacq.....	25
Composición Química de <i>P. marginatum</i> Jacq.....	26
Actividades Biológicas de <i>P. marginatum</i> Jacq.....	26
<b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	27
Tipo de Investigación.....	27
Diseño de la Investigación.....	27
Población y Muestra.....	27

Sistema de Variables.....	27
Instrumento de Recolección de Datos.....	28
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
Material y Equipos de Laboratorio.....	28
Material Vegetal.....	28
Aceite Esencial (AE) de la Especie Vegetal <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	28
Cepas Microbianas ATCC.....	28
Medios de Cultivo.....	29
<b>PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>29</b>
Identificación Botánica de la Especie <i>P. marginatum</i> Jacq.....	29
Extracción y Aislamiento del AE de <i>P. marginatum</i> Jacq.....	29
Determinación de la Composición Química del AE de <i>P. marginatum</i> Jacq.....	29
Determinación de la Actividad Antibacteriana del AE <i>P. marginatum</i> Jacq.....	30
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes Químicos Mayoritarios del AE de <i>Piper marginatum</i> Jacq.	33
<b>Tabla 2.</b> Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AE de <i>Piper marginatum</i> Jacq. frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	35
<b>Tabla 3.</b> Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AE de <i>Piper marginatum</i> Jacq. frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 85923 y <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	35
<b>Tabla 4.</b> Concentración mínima fungicida (CMF) y concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Piper marginatum</i> Jacq. frente a la levadura <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de una Bacteria	18
<b>Figura 2.</b> Estructura de una Levadura	19
<b>Figura 3.</b> <i>Piper marginatum</i> Jacq. Taxonomía	25
<b>Figura 4.</b> Situación Geográfica de <i>Piper marginatum</i> Jacq.	25

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y a la levadura *Candida albicans*. El tipo de investigación fue interactiva, confirmatoria y evaluativa, con un diseño cuasi-experimental y transversal. El aceite esencial de la planta fue obtenido mediante un proceso de hidrodestilación y la composición química se determinó usando el método de cromatografía de gas-espectrometría de masas. Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron *in vitro* y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) se obtuvieron mediante la aplicación del método de microdilución en caldo. El rendimiento del aceite esencial obtenido fue de 0,05%, calculado a partir del peso de 3000 g de material vegetal fresco. En el análisis de los componentes químicos del aceite fue el compuesto Miristicina que resultó estar en mayor proporción (33,17%), seguido de  $\gamma$ -terpineno (10,78%), Trans-cariofileno (8,71%),  $\gamma$ -terpinoleno (5,70%), D-germacreno (4,59%) y Apiol (3,97%). El aceite esencial de *P. marginatum* mostró igual actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las cepas *S. aureus* y *E. coli* (CMI de 400-800  $\mu\text{g/mL}$ ) y frente a *P. aeruginosa* la actividad antibacteriana observada resultó ser más baja ya que la CMI determinada fue de 800-1600  $\mu\text{g/mL}$ ; *E. faecalis* se mostró insensible a la acción del aceite a la máxima concentración ensayada (CMI >6400  $\mu\text{g/mL}$ ). El aceite presentó actividad antimicótica media frente a *C. albicans* con una CMI de 800-1600  $\mu\text{g/mL}$ .

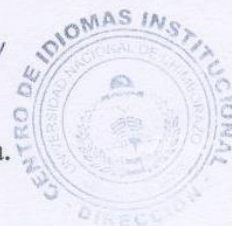
**Palabras clave:** *Piper marginatum*, actividad antibacteriana, actividad antimicótica, aceite esencial, *in vitro*.

## ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the antimicrobial activity of the essential oil of the plant species *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), against strains such as: are the bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans*. In order to carry out the research project, the following methods were used,: experimental, analytical and comparative method. The essential oil of the plant was obtained by a hydrodistillation process and the chemical composition was determined using the gas chromatography-mass spectrometry method. The antimicrobial activity tests were performed in vitro. The minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations were determined by the broth microdilution method. An oil yield of 0.05% was obtained, it was calculated from the weight of 3,000 g of fresh plant material. The analysis of the chemical components of oil determined the compound Miristin in greater proportion (33.17%), followed by  $\alpha$ -terpinene (10.78%), Trans-caryophyllene (8.71%),  $\beta$ -terpinolene (5, 70%), D-germacrene (4.59%) and Apiol (3.97%). The essential oil of *Piper marginatum* Jacq. presented irregular antimicrobial activity against the strains under study, being the MICs of 400-800  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for *E. coli* and *S. aureus*. The CMI of *P. aeruginosa* and *C. albicans* was 800-1600  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and finally *E. faecalis* a MIC higher than 6400  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . In this study the oil was applied against the aforementioned bacteria and yeast, but this can be effective bactericide in other bacteria and / or yeasts.

**Key words:** *Piper marginatum*, antibacterial activity, antifungal activity, essential oil, in vitro.

Translation reviewed by: Fuertes, Narcisa.  
Language Center Teacher.



## INTRODUCCIÓN

El presente proyecto de investigación se basa fundamentalmente en la detección de actividad antimicrobiana frente a cepas de interés clínico y el análisis de la composición química del aceite esencial de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) de Ecuador.

Una de las causas más importantes de muerte en la humanidad continúa siendo las enfermedades infecciosas(1). Los antibióticos son la clase de medicamentos desarrollada más exitosa, que ha sido efectiva en el tratamiento de muchas infecciones(2), quizás durante toda la historia de la medicina. Han salvado innumerables vidas humanas desde su descubrimiento e introducción en el comercio hace más de 70 años(3).

El excesivo e imprudente uso de antibióticos, así como la evolución y diseminación continua de los elementos de resistencia genética móvil han dado lugar a la aparición de un número creciente de patógenos bacterianos resistentes a múltiples fármacos (MDR) e incluso extremadamente resistentes a los medicamentos (XDR)(3). En febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una lista mundial de patógenos prioritarios de bacterias resistentes a los antibióticos para ayudar a priorizar la investigación y el desarrollo de nuevos y efectivos tratamientos con antibióticos. *Klebsiella pneumoniae* que causa infecciones nosocomiales es resistente al tratamiento utilizado como último recurso (carbapenémicos) y se ha propagado a todas las regiones del mundo. Así mismo, la resistencia de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas y de *Staphylococcus aureus* a los fármacos de primera línea para su tratamiento, está muy generalizada. Se calcula que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que los pacientes con infecciones no resistentes(4). *Pseudomonas aeruginosa* también implicada en infecciones intrahospitalarias con altas tasas de morbilidad y mortalidad, tiene la capacidad de crecer en ambientes adversos, y posee múltiples mecanismos de resistencia(5). La reciente alerta sobre *Enterococcus* de la OMS no solo se debe a su incremento en las infecciones nosocomiales, sino también por su resistencia a penicilinas y cefalosporinas de varias generaciones y a la adquisición de altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos, especialmente a la vancomicina(6).

A nivel de Latinoamérica la frecuencia de infecciones causadas por gérmenes productores de  $\beta$ -lactamasas es superior al 32% y 58% para *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente(7). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) reveló que en el año 2009 en Ecuador existía un porcentaje de resistencia de *E. coli* a cefalosporinas de tercera generación que oscilaba entre el 18-20% y de *K. pneumoniae* entre 42-48%(7). En el año 2007, la OPS

señaló que en este país las enfermedades del sistema urinario ocupaban el décimo y tercer lugar en hombres y mujeres, respectivamente, y se ubican dentro de las primeras 10 causas de muerte(8). En este mismo año se realizó una evaluación de la frecuencia de resistencia bacteriana en el laboratorio de Microbiología del Hospital Vozandes de Quito de urocultivos de pacientes del servicio de ginecología, resultando *Escherichia coli* el principal germen aislado que mostró resistencia en un 65% a ampicilina, 18,7% a ampicilina + sulbactam y 11,3% a gentamicina(9). Por otra parte, entre enero de 2010 y diciembre de 2011 en el Hospital General Docente de Riobamba se determinó el perfil de resistencia bacteriana en infección de vías urinarias en pacientes embarazadas atendidas en el servicio de ginecología y obstetricia, y se reportó una elevada resistencia de *E. coli* a ampicilina, fosfomicina, nitrofurantoina, trimetoprim – sulfametoxazol y amoxicilina + ácido clavulánico(10).

Los productos naturales (PN) han sido vitales en la industria farmacéutica y biotecnológica, ya que son una importante fuente de compuestos bioactivos que forman mezclas complejas de agentes terapéuticos(11). Entre 1981 y 2014 de las 1211 moléculas químicas identificadas y aprobadas como fármacos un 65% (n=791) son PN, análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos, y un número significativo corresponde a agentes antibacterianos, antifúngicos y antitumorales. Así, de 112 medicamentos aprobados en el área bacteriana, los compuestos de origen natural y derivados representan el 73%(12). Aunque diversos métodos sustitutivos desafían el descubrimiento de fármacos, los PN continúan siendo en la investigación farmacéutica una base importante de nuevos medicamentos, particularmente en terapias antiinfecciosas(13-16).

Durante siglos, las plantas han sido utilizadas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos(17,18) y continúan siendo importantes en las culturas tradicionales ya que se usan de diversas formas para sobrevivir(19,20). La OMS ha considerado que cerca del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para su atención primaria de salud y con frecuencia subestimada(21). Alrededor del 25% de los medicamentos prescritos en todo el mundo provienen directamente de las plantas(22). A nivel mundial, hay aproximadamente 391000 especies de plantas descritas, de las cuales más de 31000 (8%) tienen un uso documentado(23) y tan solo entre el 5% y 15% han sido investigadas para compuestos bioactivos(24). Ecuador alberga cerca de 17000 especies de plantas y se ha considerado que 3000 (18%) tienen usos medicinales(25).

Las plantas aromáticas concentran una gran cantidad de compuestos volátiles que pueden aportar más de un producto comercialmente importante, dependiendo de factores relativos a la especie, del medio ambiente o de los procesos de extracción empleados(26). La

investigación en el descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales implica un enfoque multifacético que combina técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares(27). Los extractos vegetales y aceites esenciales (AEs) poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales y se han evaluado mediante técnicas microbiológicas como posibles fuentes de nuevos compuestos antimicrobianos y alternativas para tratar enfermedades infecciosas(28-30). Entre los más de 3000 AEs conocidos, unos 300 son importantes para las industrias farmacéutica, agronómica y alimentaria(31). Los AEs muestran propiedades antioxidante, antibacteriana, antidiabética, antimutagénica, antimicótica, antivirales e insecticida por lo que son prometedores para su uso como compuestos bioactivos(32,33). Los AEs pueden servir como una herramienta poderosa para reducir la resistencia bacteriana(34), por lo tanto, esta investigación se ha desarrollado con el interés de determinar la propiedad antimicrobiana del AE de *Piper marginatum* Jacq.

*P. marginatum* Jacq. del género *Piper* uno de los más abundantes de la familia Piperaceae, que tiene cerca de 700 especies(35), ha sido ampliamente reconocida por sus propósitos medicinales dentro de una serie de culturas indígenas ubicadas en las regiones del Caribe y el Amazonas, desde América Central y las Antillas hasta Brasil(36-39). Varios datos biológicos y farmacológicos publicados(40) parecen apoyar su uso en la medicina tradicional. Sus principales metabolitos secundarios son terpenoides y fenilalcanoides(41). La mayoría de los estudios que evalúan las propiedades biológicas y farmacológicas de *P. marginatum* se han centrado en su AE. El AE de la hoja mostró inhibición del crecimiento frente a dos cepas patógenas de *E. coli*(42) y frente a la bacteria fitopatogena *Xanthomonas albilineans*(43). El AE de la hoja también mostró una actividad moderada frente a los hongos *Alternaria solanii* y *Fusarium oxysporum*(44,45). Estas propiedades sugieren que el aceite de *P. marginatum* puede ser una fuente potencial de valiosos compuestos antimicrobianos para uso directo o combinado con otros antimicrobianos.

Por los antecedentes descritos resultó interesante el planteamiento de la siguiente interrogante: ¿Presentará actividad antimicrobiana el aceite esencial obtenido de la especie vegetal *P. marginatum* Jacq. que crecen en Ecuador, frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y a la levadura *Candida albicans*?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la actividad antimicrobiana y composición química del aceite esencial de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. de Ecuador frente a cepas ATCC de interés clínico.

### **Objetivos Específicos**

1. Obtener la ficha de la identificación botánica de la especie vegetal realizada por un especialista en el área.
2. Extraer el aceite esencial de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. mediante la técnica de hidrodestilación empleando la trampa tipo Clevenger.
3. Interpretar el análisis de la composición química del aceite esencial determinada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana mediante la detección de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. frente a las bacterias ATCC Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y a la levadura *Candida albicans*.

## **ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA**

En su discurso de aceptación del premio Nobel, Fleming hizo una advertencia:

*"Pero quiero dar una advertencia, la penicilina aparece como no-tóxica, de modo que no hay preocupación con sobredosis e intoxicar al paciente. Sin embargo, puede existir el peligro de sub-dosificación. No es difícil conseguir microorganismos resistentes a penicilina en el laboratorio exponiéndolos a concentraciones no letales y lo mismo puede pasar en el organismo."* Sir Alexander Fleming (Discurso de recepción del premio Nobel, 1945)(46).

El progreso de la era antimicrobiana se aceleró; en 1940 Ron Waksman aisló la actinomicina, en 1942 la estreptotricina y en 1944 la estreptomycinina, él bautizó estos compuestos como antibióticos. La estreptomycinina demostró alta potencia sobre microorganismos Gram negativos y actividad anti Mycobacterium. El Dr. Waksman obtuvo el premio Nobel en 1952. Pero con el pasar de los años, a pesar del estado actual de la terapia antimicrobiana y la existencia de una gran variedad de productos, existen dificultades serias para el manejo de infecciones bacterianas producidas por microorganismos resistentes a los productos disponibles, necesiéndose nuevos compuestos que sean capaces de sobrepasar las barreras de resistencia a los antimicrobianos que nosotros mismos hemos ayudado a construir(46).

### **Antecedentes Históricos de Plantas con Fines Medicinales**

Las plantas medicinales son todas aquellas que la medicina tradicional y oficial consideran curativas o que se usaron para ese propósito. El conocimiento del efecto sanador de estas plantas provino de la experiencia y las lecciones aprendidas por métodos empíricos que se transmitieron de generación en generación(47). Aunque los avances en medicina se basan en evidencia científicamente probada aportada por investigaciones de laboratorio o resultados clínicos, ha surgido gradualmente del conocimiento empírico de las medicinas tradicionales en las civilizaciones antiguas (Egipto, Mesopotamia, Grecia, India, China)(48).

Determinar el tiempo exacto de uso de las plantas como medicinas es muy difícil. La evidencia indica que las plantas medicinales se han utilizado desde hace aproximadamente 60000 años. Los guiones sobre plantas medicinales datan de hace casi 5000 años en India, China y Egipto, y 2500 años en Grecia y Asia Central. La evidencia escrita más temprana del uso de plantas medicinales se ha encontrado en una tabla de arcilla sumeria de Nagpur que data de hace casi 5000 años. Según algunas inscripciones, los egipcios y los chinos



fueron de los primeros que utilizaron las plantas como medicina desde hace más de 27 siglos a.C. Los antiguos griegos también estaban familiarizados con las propiedades de algunas plantas medicinales, e Hipócrates, el fundador de la medicina griega, y Aristóteles, discípulo de Hipócrates, utilizaron plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades. Después, Theophrastus, un científico griego, fundó la Escuela de Plantas Medicinales; y Pedanius Dioscorides, médico y cirujano en los años 75-45 a.C., escribió una enciclopedia (De Materia Medica) para describir 600 plantas medicinales terapéuticas en forma de una serie de estudios científicos(49).

### **Importancia de las Plantas Medicinales en Ecuador**

Las plantas medicinales han tomado más importancia en la actualidad. Desde hace siglos, las comunidades y pueblos ancestrales encontraron en la tierra sus "farmacias" naturales. En el Ecuador cada vez son más las personas que cosechan sus propios ejemplares, ya que sea para tratar enfermedades o curar dolencias(50). Las plantas medicinales son las que se han estudiado con mayor intensidad en la región andina. Así, los estudios realizados por Misael Acosta-Solís, científico de la Misión de Cinchona, contribuyeron al conocimiento de especies medicinales de uso tradicional milenario y en especial de las quinas andinas. Numerosas investigaciones han dado a conocer una gran cantidad de especies medicinales de uso común entre la población mediante el estudio de las plantas que se venden en los mercados de Quito, Guaranda, Riobamba, Ibarra, Otavalo, Saquisilí, Cuenca, Loja, de la Costa y Amazonía. El número de especies medicinales registradas en estos mercados varía entre 79 en Guaranda y 215 en Loja. En Vilcabamba (Loja) se ha realizado un estudio que recopila información de 140 especies nativas e introducidas utilizadas como medicinas. Estos estudios han sido complementados con investigaciones sobre especies que se encuentran, además, en chacras, áreas naturales y parches de bosques andinos, registrándose 432 especies medicinales(24).

Actualmente, en nuestro país están registradas 3118 plantas (de 206 familias) con fines medicinales. Según estudios de la PUCE, el 45% se registra en la categoría de síntomas y el 26% en las afecciones causadas por bacterias, virus, hongos o protozoos, y otro grupo de plantas tratan las heridas, lesiones y desórdenes del sistema digestivo. Son los kichwas de la Amazonía los que más especies usan, seguidos de los kichwas de la Sierra y de los mestizos. Dentro del "vademécum" etnobotánico del Ecuador existen una gran cantidad de especies, tipos de plantas, hierbas y remedios caseros, que se usan con fines medicinales para aliviar las manifestaciones de enfermedades. Estas plantas alivian las manifestaciones fácilmente

perceptibles, pero no curan la enfermedad que las ocasionan, otras por el contrario sí lo hacen de manera visiblemente efectiva(50).

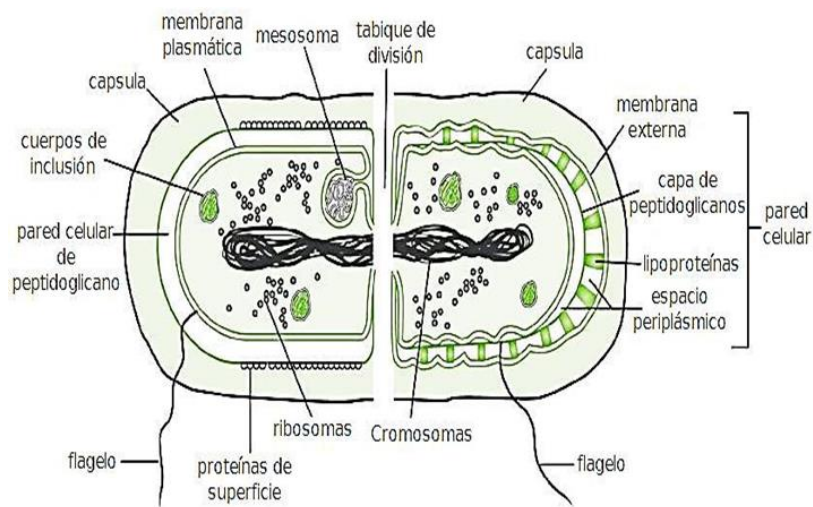
### Plantas Antimicrobianas

El arsenal terapéutico del reino vegetal es incalculable y magno. Las plantas aportan una gran cantidad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, estas sustancias pueden ser utilizadas directamente o como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones que se originan a nivel sistémico o de la cavidad oral(51).

Además, se sabe que el avance de la fitoterapia como disciplina médica es cada vez más benéfica, se evidencia que casi el 25% del total de las prescripciones médicas se basa en plantas medicinales y sumado a ello en los países emergentes el uso de plantas medicinales en el arsenal terapéutico alcanza casi el 80%(52).

### Estructura de una Bacteria

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple (Figura 1). Son microorganismos procariotas, es decir, unicelulares que carecen de membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico y se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, lo que permite principalmente diferenciar las Gram positivas de las Gram negativas. Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa capa de peptidoglucano y las Gram negativas tiene una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Existen, además, otras diferencias tanto bioquímicas como morfológicas. Por ejemplo, todas las bacterias con flagelos polares son Gram negativas, y las bacterias Gram positivas son más sensibles a los antibióticos que las Gram negativas(53).

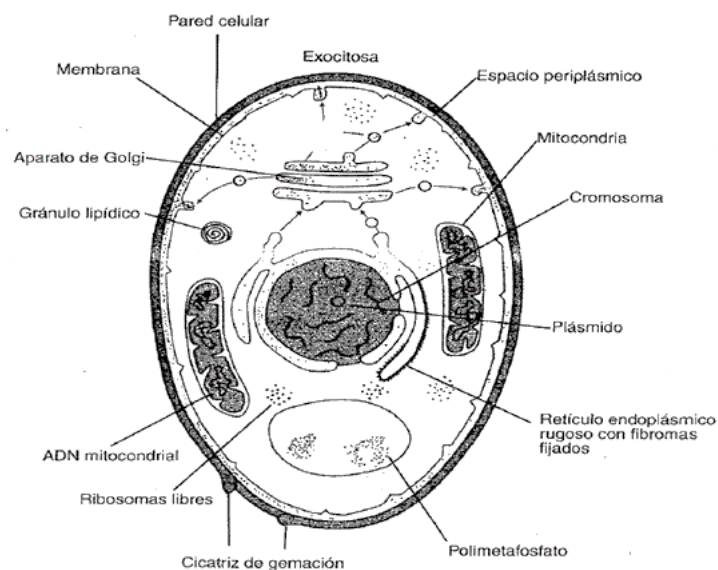


**Figura 1.** Estructura de una bacteria.

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

## Estructura de una Levadura

A diferencia de las bacterias, la estructura celular de los hongos es más compleja. Son microorganismos eucariotas que poseen un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Figura 2). Los hongos pueden existir en una forma unicelular (levadura) capaz de replicarse de manera asexual, o en una forma filamentosa (moho), capaz de replicarse de forma tanto asexual como sexual. La mayor parte de los hongos existen en forma de levadura o bien en forma de moho. Sin embargo, algunos de ellos pueden adoptar ambas morfologías; se trata de los llamados hongos dimórficos, como *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Coccidioides*(53).



**Figura 2.** Estructura de una levadura.

Fuente: Estructura levadura. <http://alumnatbiogeo.blogspot.com/2015/05/similitud-genetica-entre-celulas.html>

## Microorganismos Patógenos

Los microorganismos patógenos son aquellos que dañan la salud humana, y son principalmente bacterias, virus y protozoarios. Algunos de ellos fueron y siguen siendo causa de una elevada mortalidad. La continua interacción entre los humanos y los microorganismos se debe a que las condiciones que garantizan su éxito son compartidas; es decir, la alimentación microbiana y humana incluye por ejemplo agua, carbohidratos (azúcares) y otras sustancias que proporcionan energía y son esenciales para su existir(54).

La capacidad de un microorganismo para causar una enfermedad se llama patogenicidad. Hay una amplia gama de microorganismos que pueden causar daños graves al cuerpo y volverse letales(55). La virulencia varía de especie a especie desde insignificante hasta

muerte inmediata. La teoría clásica de la evolución de la virulencia resulta del desequilibrio entre los factores de virulencia del patógeno y los mecanismos que están o aparecen en el hospedador como defensa contra dicho patógeno(56). Los microbios infecciosos en evolución muestran un interesante grupo de desafíos nosocomiales(57).

### **Bacterias Gram Positivas**

*Staphylococcus aureus*. Es uno de los patógenos nosocomiales de mayor importancia, causante de una gran variedad de infecciones desde simples hasta severas. En el hombre, la localización nasal de *S. aureus* permite su diseminación y, como consecuencia, la multirresistencia a los antibióticos como a la meticilina (MRSA)(58). La patogenia surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped; estas condiciones propician que *S. aureus* posea características de virulencia y daño bastante particulares(59).

*Enterococcus faecalis*. Es un coco Gram positivo de la flora normal endógena humana, y tienen poco potencial patogénico en el hospedador normal. Sin embargo, en el anciano o en el paciente inmunocomprometido, estos organismos se vuelven patógenos oportunistas. Las infecciones ocurren cuando las defensas del huésped descienden por una enfermedad y por el uso de dispositivos invasivos. *E. faecalis* es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos. La colonización rectal y de la piel por *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (ERV) fue encontrada en el 100% y 86% de los pacientes con bacteriemia, respectivamente. La colonización persistente del tracto gastrointestinal es el impacto clínico más común de los ERV(60).

### **Bacterias Gram Negativas**

*Escherichia coli*. Constituye parte de la microbiota habitual del intestino de muchos animales, incluidos los humanos. Según su relación con el huésped se agrupa en cepas comensales, prototipos intestinales y patógenas extraintestinales. Este último grupo es la causa principal de infecciones urinarias, abdominales y de tejidos blandos, así como de meningitis, neumonía, bacteriemias y osteomielitis. Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas y las diferencias entre las patógenas y las comensales se fundamentan en sus antecedentes filogenéticos, con base en los cuales se clasifican en cuatro grupos principales: A, B1, B2 y D. Las cepas A y B1 se consideran de bajo poder virulento, en tanto que las patógenas extraintestinales albergan genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y evasión de los mecanismos de defensa del huésped humano, y pertenecen principalmente a los filogrupos B2 y D(61).

***Pseudomonas aeruginosa***. En la actualidad uno de los microorganismos de mayor impacto en las infecciones hospitalarias. Su frecuencia oscila según los países, estas variaciones están asociadas al tipo de hospital, área geográfica, tipo de servicio, tipo de pacientes y patrón de uso de antibióticos, cambiante según la epidemiología de cada hospital. Asimismo, su mortalidad oscila entre 35%-70%, según la localización de las infecciones, pronóstico de la enfermedad de base, gravedad clínica inicial y también el tratamiento antibiótico empírico o dirigido no adecuado. En los últimos años están aumentando las resistencias a antimicrobianos, incluida la resistencia a carbapenémicos, y las infecciones producidas por estas cepas se han asociado a un aumento de la mortalidad(62).

### **Levadura *Candida albicans***

Diversas especies de levaduras del género *Candida* causan una micosis denominada candidosis o candidiasis. El hallazgo de estos organismos como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias, ha aumentado en los últimos años. La distribución geográfica de la candidosis es universal y más de 70% de los casos reportados son causados por *C. albicans* serotipo B. Cualquier tejido puede ser afectado, por lo que existe una gran diversidad de cuadros clínicos, asociados directamente al estado inmunológico del paciente. El uso indiscriminado de los azoles, ha contribuido al aumento de poblaciones de levaduras resistentes a los antifúngicos(63).

### **Generalidades de los Antibióticos**

Un *antibiótico* es una sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Su origen puede ser natural o biológico y semisintético. El natural se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias. El semisintético, se obtiene a partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables; y un *antimicrobiano* es un término que incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como los conseguidos totalmente en el laboratorio. Un agente antimicrobiano debe cumplir tres condiciones como mínimo: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped(64).

## **Mecanismos de Acción de los Antibióticos**

Los mecanismos por los que los antibióticos alteran la biología de los microorganismos son variados: inhibición de la síntesis de la pared celular, desorganización de la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis de proteínas, interferencia en la síntesis y metabolismo de los ácidos nucleicos y antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico(64).

## **Mecanismos de Resistencia de las Bacterias Frente a los Antibióticos**

Independientemente de que la resistencia sea intrínseca o adquirida, las bacterias comparten vías o estrategias similares para efectivizar la resistencia a los agentes antimicrobianos, las más frecuentes son las que involucran destrucción o alteración enzimática del antibiótico, disminución de la captación o acumulación intracelular del fármaco y modificación del sitio de acción del antibiótico. Una sola célula puede expresar una o más de estas vías para evitar el efecto de uno o más antibióticos(65).

## **Actividad Antimicrobiana**

Los agentes antimicrobianos se comportan como *bactericidas* cuando producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso, pertenecen a este grupo los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas; y como *bacteriostáticos* cuando inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y, por tanto, de su estructura, pero también contribuyen paralelamente otros factores: concentración alcanzada en el sitio de la infección, tipo de germen, tamaño del inóculo, tiempo de acción, fase de crecimiento de la bacteria(64).

Diversos bioensayos, como la difusión en disco y la dilución en caldo o en agar, son métodos bien conocidos y comúnmente utilizados. La concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento del organismo en los pocillos de microdilución o en los tubos detectados a simple vista se denomina *concentración mínima inhibitoria* (CMI). Los métodos de dilución son los más apropiados para la determinación del valor de CIM, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizado en el agar (dilución de agar) o caldo (macrodilución o microdilución). La estimación más común de la actividad bactericida es la determinación de

la *concentración mínima bactericida* (CBM), que se define como la concentración que produce la muerte al 99,9% o más de los inóculos iniciales(65).

### **Aceites Esenciales (AEs)**

Son líquidos oleosos, volátiles y con propiedades aromáticas. Se obtienen de materiales vegetales (hojas, brotes, frutas, flores, hierbas, ramas, corteza, madera, raíces y semillas y su función en la naturaleza es la protección de las plantas al actuar como agentes antifúngicos, antibacterianos, antivirales e insecticidas y también la protección contra los herbívoros. Pueden ser extraídos mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación, que es el método más común para la obtención comercial de aceites esenciales(66).

### **Composición Química de los AEs**

Los AEs pueden constar de aproximadamente 20-60 componentes a concentraciones bastante diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes principales que están presentes en concentraciones bastante altas (20-70%) en comparación con otros componentes que están presentes en cantidades traza. La cantidad de los componentes varía entre diferentes partes de plantas y diferentes especies de plantas, ya que se derivan químicamente de terpenos y sus derivados oxigenados, es decir, terpenoides que son ésteres de ácido aromático y alifático y compuestos fenólicos(66).

### **Mecanismo de Acción e Importancia de los AEs como Antimicrobianos**

Una característica importante de los AEs y sus componentes es la hidrofobicidad, que les permite dividirse con los lípidos presentes en la membrana celular de las bacterias y las mitocondrias, haciéndolas más permeables al alterar las estructuras celulares. Ésto finalmente resulta en la muerte de células bacterianas debido a la fuga de moléculas críticas e iones de la célula bacteriana en gran medida. Algunos compuestos modulan la resistencia a los medicamentos dirigiéndose a los mecanismos de eflujo en varias especies de bacterias Gram negativas(67).

### **Cromatografía de Gases-espectrometría de Masas**

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación

inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. 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. Así, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado(68).

### **Características de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq.**

#### **Familia Piperaceae**

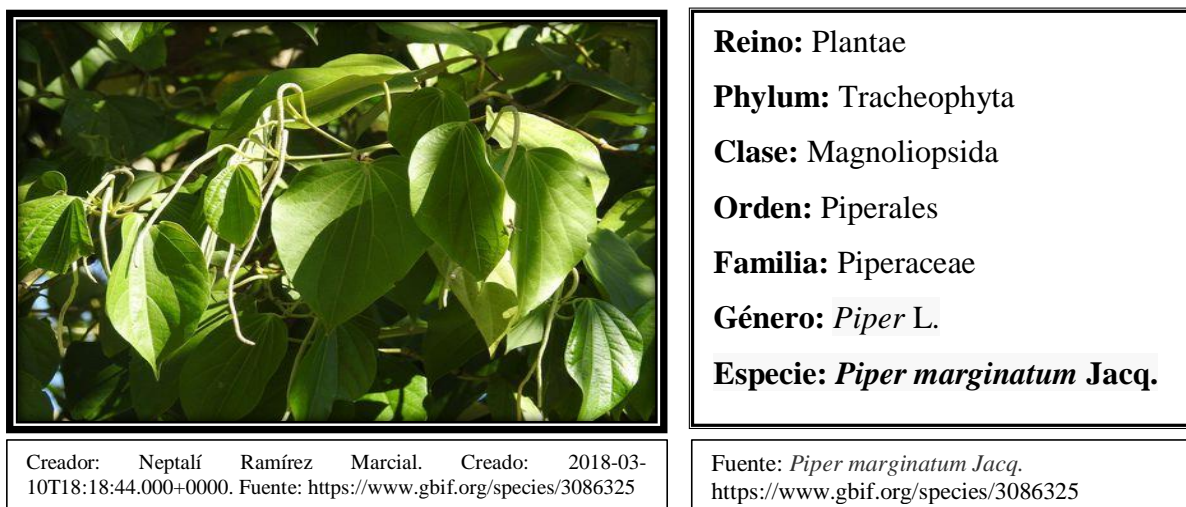
La familia Piperaceae se distribuye por todo el trópico y subtrópico del planeta. Incluye cinco géneros y unas 3000–3600 especies. El género *Piper* es considerado el más expresivo de esta familia, con más de 1.000 especies identificadas(69). Las especies de *Piper* han sido ampliamente estudiadas y documentadas debido a sus propiedades medicinales y plaguicidas atribuidas a la presencia de diversos metabolitos secundarios encontrados en sus tejidos(70).

#### **Especie *Piper marginatum* Jacq.**

*Piper marginatum* Jacq., (Figura 3) fue descrita por primera vez en 1781 por el botánico holandés Nikolaus Joseph von Jacquin y los caracteres morfológicos se registraron como hojas en forma de corazón, acuminadas, multivedadas y reticuladas, con un pecíolo marginal, ranurado y alado, y flores solitarias(71). Se encuentra naturalmente por toda Centroamérica desde México, se extiende por el Caribe hasta Colombia, Venezuela y Perú



(Figura 4). Conocida comúnmente como “Santa María, malvaíscó”, “Aniseto”, “Anisillo”, “Corazón de la Virgen”, “Cordoncillo” e “Hinojo”.



**Figura 3.** *Piper marginatum* Jacq. Taxonomía



**Figura 4.** Situación Geográfica de *Piper marginatum* Jacq.

Fuente: *Piper marginatum* Jacq. Publicado en: Collectanea 4:128. 1791 ("1790"); Icon. pl. rar. 2:2, t. 215. 1795 ("1786-1793"). Catalogue of Life. <https://www.gbif.org/es/species/3086325>

#### Usos tradicionales de *P. marginatum* Jacq.

Es una planta medicinal importante se utiliza para tratar enfermedades del hígado, vesícula biliar, bazo y vías urinarias; también como analgésico, antiinflamatorio y hemostático (38,72-77). Las comunidades indígenas de América Central, las Antillas y Sudamérica informaron repetidamente que usan *P. marginatum* para tratar una variedad de enfermedades

y dolencias. Los problemas gastrointestinales son el uso terapéutico más común en la medicina tradicional, que abarca diferentes lugares y culturas. La planta se emplea de forma recurrente como una decocción o infusión por sus efectos tónicos, diuréticos y carminativos (39,78).

#### **Composición Química de *P. marginatum* Jacq.**

Gran parte de la bioactividad de los aceites esenciales de *P. marginatum* se atribuye a la abundancia de compuestos terpenoides y bencenoides en la composición de su aceite esencial(41,79). Compuestos como el anetol, estragol, carvacrol, timol, eugenol, isoeugenol, metil eugenol, safrol, entre otros, han demostrado propiedades antioxidantes y fumigantes(80,81).

#### **Actividades Biológicas de *P. marginatum* Jacq.**

Estudios químicos sobre *Piper marginatum* Jacq han permitido el aislamiento de varios productos naturales, biológicamente activos; sus aceites esenciales y extractos han sido ampliamente caracterizados, evaluando sus propiedades bioactivas como actividad antimicrobiana, antimutagénica, antiplasmodial, antioxidante, antiinflamatorio, hemostático, antiespasmódico y larvicida, repelente contra insectos, entre otras(38,43,74,79,82, 83).

En vista de que varios datos biológicos y farmacológicos publicados(40) parecen apoyar su uso en la medicina tradicional, esta investigación se basó en la evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de *P. marginatum* Jacq. frente a cepas ATCC de interés clínico, cuyos resultados servirán de soporte científico para una posible aplicación de la especie en medicina.

## METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

**Tipo de Investigación:** Este trabajo está integrado en un nivel de complejidad constituido por los tipos de investigación interactiva, confirmatoria y evaluativa. Fue confirmatoria ya que se intentó confirmar la relación entre la actividad antibacteriana frente a bacterias (Gram positivas y Gram negativas) y una levadura y el aceite obtenido de las partes aéreas de *Piper marginatum* Jacq. Fue interactiva pues se recolectó información durante el proceso de investigación con el propósito de reorientar las actividades necesarias en el proceso y finalmente es evaluativa pues se evaluó los resultados obtenidos para ver así si estos están aplicados dentro de un contexto determinado.

**Diseño de la Investigación:** El presente estudio tuvo un diseño de laboratorio ya que los datos se obtuvieron en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis-ULA y en los Laboratorios E300 y E302 de la Facultad de Ciencias de la salud-UNACH. También, fue contemporáneo pues los datos se recolectaron en el presente. Durante la investigación también se adoptó un diseño experimental-transversal. Fue experimental, pues la dilucidación de los eventos se logró en base a ensayos experimentales propiamente dichos, caracterizados por la manipulación de la variable independiente. Fue transversal, ya que el dato fue recolectado en un mismo periodo de tiempo.

### Población y Muestra

**Población:** En esta investigación la población estuvo representada por las especies vegetales del género *Piper* que crecen en Ecuador, así mismo las bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras de interés clínico.

**Muestra:** Se seleccionó la especie *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) de la cual un espécimen está almacenado en el Herbario GUAY, de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador. Además, la muestra estuvo representada por dos cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), dos Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y una levadura (*Candida albicans*), que fueron usadas para el análisis y confirmación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie vegetal en estudio.

**Sistema de Variables:** En esta investigación se formularon las siguientes variables: dependiente e independiente. La variable independiente fue el aceite esencial de las partes aéreas de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) y la variable dependiente

fue la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y a la levadura en estudio.

**Instrumento de Recolección de Datos:** El procedimiento para la recolección de información que se adapta al diseño del estudio es "La observación directa de los datos en el Laboratorio", descrita como aquella que nos pone en contacto con los hechos, fenómenos y situaciones en el momento que acontecen y permite la búsqueda deliberada de datos necesarios para desarrollar el proceso investigativo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material y Equipos de Laboratorio**

**Material:** Cajas mono Petri estériles desechables, microplacas de 96 pozos estériles desechables, micropipetas automáticas y puntas, matraces, tubos de ensayos con tapa de rosca, frascos de boca ancha con tapa, gradillas, mecheros, termómetro, medios de cultivo, solución salina fisiológica al 0,9%, agua destilada, cinta testigo para esterilizar.

**Equipos:** campana de flujo laminar (marca HFsafe 900), incubadora a 37°C (marca Memmert), agitador orbital (marca Stuart Scientific SO3), vortex (marca BenchMixer™), contador de colonias (marca Stuart®), balanza analítica (marca Adam Equipment), congelador a -20 °C (marca Mabe®), autoclave (marca Tuttnauer).

### **Material Vegetal**

Las partes aéreas de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq. fueron recolectadas en la Provincia del Guayas, cantón El Triunfo, Ecuador.

### **Aceite Esencial (AE) de la Especie Vegetal *Piper marginatum* Jacq.**

El AE fue obtenido a partir de 3000 g de material vegetal fresco (hojas) en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo.

### **Cepas Microbianas ATCC**

Las bacterias empleadas en este estudio fueron facilitadas por el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo y corresponden a cepas de la Colección de Cultivo Tipo Americano con sus siglas en inglés ATCC (American Type Culture Collection). El ensayo incluyó las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 85923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 así como la levadura *Candida albicans* ATCC 10231.

## **Medios de Cultivo**

Para la ejecución de los ensayos de actividad antibacteriana se emplearon medios de cultivo comerciales cuya preparación se realizó según las instrucciones del envase, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. La composición de cada uno de los medios empleados se muestra a continuación:

**Caldo tripticasa soya (TSB), tryptic soy broth marca Difco™:** Digerido pancreático de caseína 17 g/L, digerido péptico de harina de soja 3 g/L, Glucosa (dextrosa) 2,5 g/L, cloruro sódico 5 g/L, fosfato dipotásico de hidrógeno 2,5 g/L.

**Caldo nutritivo (CN), nutrient broth marca Difco™:** Extracto de carne de vaca 3 g/L, peptona 5 g/L.

**Agar nutritivo (AN), nutrient agar marca Difco™:** Extracto de carne de vaca 3 g/L, peptona 5 g/L, agar 15 g/L.

**Infusión cerebro corazón (BHI), brain heart infusion marca Himedia:** Infusión de cerebro de ternero 200 g/L, infusión de corazón de ternera 250 g/L, proteína peptona 10 g/L, glucosa (dextrosa) 2 g/L, cloruro sódico 5 g/L, fosfato disódico 2,50 g/L.

**Medio líquido Sabouraud marca Cultimed:** Glucosa 40 g/L, peptona de carne 5 g/L, peptona de caseína 5 g/L.

## **PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Identificación Botánica de la Especie *P. marginatum* Jacq.**

La identificación botánica de la planta en estudio fue realizada por el Ing. Xavier Cornejo de la Facultad de Ciencias naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

### **Extracción y Aislamiento del AE de *P. marginatum* Jacq.**

Para el aislamiento del aceite de la especie *Piper marginatum* Jacq. previamente se pesó el material fresco (hojas) el cual fue troceado y licuado, seguido de la extracción que se realizó mediante el método de hidrodestilación, usando la trampa de Clevenger, durante 4 - 5 horas a una temperatura entre 60 y 70 °C.

### **Determinación de la composición química del AE de *P. marginatum* Jacq.**

La determinación de la composición química del aceite fue realizada por el Dr. Luis Rojas PhD. investigador de la Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Instituto de Investigación, Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal Mérida–Venezuela. La detección se llevó a cabo mediante Cromatografía de Gases (GC) acoplada a

Espectrometría de Masas (MS), para lo cual se empleó un cromatógrafo de gases marca Hewlet-Packard modelo 6898, con una columna capilar de fenilmetil-polisiloxano de 30 metros de largo por 0,25 mm (HP-5) que contiene un detector de masa marca Hewlet-Packard modelo 5973 (Anexo 6). La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos Wiley MS (6ª Ed). Para el proceso de análisis se preparó una solución al 2% del aceite (20 µL de aceite y 1 mL de eterdietílico). Se inyectó de muestra. Se comenzó con una temperatura de 60 °C con un incremento de temperatura de 4 °C/min hasta llegar a 260 °C. La muestra (1,0 µL) fue inyectada con una relación de reparto de 1:100. Los constituyentes del aceite esencial fueron identificados por comparación de sus espectros de masa con espectros de referencia y también comparando sus índices de retención con los de compuestos auténticos o comparados con valores reportados en la literatura(84).

### **Determinación de la Actividad Antibacteriana del AE *P. marginatum* Jacq.**

#### ***Preparación de la Solución Stock del AE***

La solución stock del aceite fue preparada en Dimetilsulfóxido (DMSO) a la concentración de 50000 µg/mL (ppm) para lo cual se pesó 0,05 g de aceite y se añadió 1000 µl de DMSO.

#### ***Mantenimiento y Conservación de los Microorganismos***

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutritivo, a excepción de *E. faecalis* que por sus exigencias metabólicas lo fue en agar cerebro corazón y la levadura *C. albicans* que fue mantenida en agar Sabouraud. Las placas fueron conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas. La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó por congelación (-20 °C), empleando una suspensión celular de glicerol al 15% (v/v).

#### ***Preparación del Preinóculo***

La preparación del preinóculo consistió en sembrar de una a dos colonias de las distintos microorganismos en estudio (crecidos en medio sólido), en aproximadamente 20 mL de caldo TSB para las bacterias *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 85923, caldo BHI para *E. faecalis* ATCC 29212 y caldo Sabouraud para *C. albicans* ATCC 10231. Posteriormente el preinóculo se incubó a 37°C durante 18 horas en agitación orbital.

#### ***Preparación del Inóculo***

El inóculo fue preparado a partir de diluciones seriadas del preinóculo (con un óptimo crecimiento tras 18 h de incubación) hasta alcanzar una concentración celular de  $1-5 \times 10^5$  u.f.c/mL para llevar a cabo los ensayos. Las diluciones seriadas fueron realizadas en

solución salina al 0,9% y la última (inóculo) en medio CN para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, caldo BHI para *E. faecalis* o caldo Sabouraud para *C. albicans*. La concentración microbiana del cultivo que se usó como inóculo fue comprobada mediante el recuento de colonias crecidas sobre medio sólido (AN o agar BHI según la bacteria y agar Sabouraud para *C. albicans*) en placas de Petri.

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

La detección de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. frente a cada una de las cepas bacterianas y a la levadura *C. albicans* se realizó mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) usando el método de microdilución en medio líquido en placas de 96 pozos(85). El aceite se ensayó a una concentración máxima de 6400 µg/mL.

Se depositó 200 µL de cada producto en medio de cultivo (caldos: Nutritivo, BHI o Sabouraud) a doble concentración de la requerida para el ensayo en los pozos 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 como se indicó anteriormente, de modo que quedara a una densidad celular inicial de  $1-5 \times 10^5$  u.f.c./mL. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control positivo se inocularon pocillos en las mismas condiciones, pero carentes de producto y con 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 microorganismo. 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 observó 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 bacterias viables en placas con agar Nutritivo o BHI y de la levadura en placas con agar Sabouraud 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) del aceite esencial frente a cada microorganismo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación Botánica de la Especie *Piper Marginatum* Jacq.

Un espécimen de la planta *Piper marginatum* Jacq. identificada botánicamente por el Ing. Xavier Cornejo fue depositado con el número de colección MER06 en el herbario GUAY, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador (Anexo 1).

### Obtención del AE de *Piper Marginatum* Jacq.

El aceite esencial obtenido mediante el método de hidrodestilación fue recuperado (Anexo 2), secado con sulfato de sodio anhidro y almacenado en un vial sellado a 4°C en la oscuridad hasta que fue analizado y ensayado.

### Rendimiento del AE de *Piper marginatum* Jacq.

Partiendo de 3000 g de hojas frescas de *P. marginatum* usando la técnica de hidrodestilación con la trampa de Clevenger se extrajo 1,5 mL de aceite obteniéndose un rendimiento de 0,05%. Este resultado fue muy inferior comparado con el reportado por Sánchez *et al.*(86), en 2011, quienes obtuvieron un rendimiento del aceite aislado de las hojas *P. marginatum* Jacq. recolectado en la provincia de Guantánamo en Cuba de 2,18 % (v/p).

### Composición Química del AE de *Piper marginatum* Jacq.

El aceite esencial fue analizado por Cromatografía de Gases (GC) y Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas (GC-MS) (Anexo 3). Los compuestos fueron caracterizados por comparación de cada MS con datos de la Librería Wiley GC/MS y también de sus índices de retención. En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de los componentes más abundantes del aceite esencial *Piper marginatum* Jacq. detectados, siendo el componente más abundante la miristicina (33,17%), seguido de  $\gamma$ -terpineno (10,78%), Trans-cariofileno (8,71%),  $\gamma$ -terpinoleno (5,70%), D-germacreno (4,59%) y Apiol (3,97%).

En la investigación realizada por Sánchez *et al.*(86), en 2011, en la que determinaron la composición química del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. se indica que está constituido fundamentalmente por compuestos oxigenados siendo los mayoritarios el isosafrol (37,3%) y el notosmirnol (22,7%), y se reporta la miristicina como uno de los constituyentes minoritarios (4,33%).

Existe una gran diferencia en cuanto a los componentes principales de aceites esenciales extraídos de *P. marginatum*; así Ramos *et al.*(87), en 1986 en el análisis de la composición química de los aceites esenciales de hojas y tallos de esta especie de la región amazónica de Brasil informaron como componentes mayoritarios de las hojas 3,4-metileno-dioxi



propiofenona (8,01%) y  $\beta$ -cariofileno (4,01%) y de los tallos: miristicina (9,23%), 3,4-metileno-dioxi propiofenona (8,92%) y  $\beta$ -cariofileno (5,57%), mientras que Hussain *et al.*(88), en 1990 indicó el compuesto trans-anetol como mayoritario (80,5%). Además, la misma especie recolectada en Turbaco, Colombia, mostró un aceite esencial rico en D-germacreno (36,6%)(35).

**Tabla 1.** Componentes Químicos Mayoritarios del AE de *Piper marginatum* Jacq.

N°	Compuestos	Porcentaje (%)
1	$\gamma$ -terpineno	10,78
2	$\gamma$ -terpinoleno	5,70
3	Trans-cariofileno	8,71
4	Miristicina	33,17
5	D-germacreno	4,59
6	Apiol	3,97

**Fuente:** Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Instituto de Investigación, Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal Mérida–Venezuela.

**Elaborado por:** Dr. Luis Rojas Fermín PhD.

Así mismo, los resultados encontrados en este trabajo contrastan con los reportados por Autran *et al.*, en 2009 quienes estudiaron los aceites esenciales de hojas, tallos e inflorescencias de una especie de *P. marginatum* recolectada cerca de Recife, Brasil y señalan los compuestos (Z)-asarona, (E)-asarona y pachulol como mayoritarios(79).

Las diferencias entre los componentes químicos del aceite esencial objeto de este estudio y la mostrada por otros autores para la misma especie, pueden estar asociadas a varios factores. Los componentes de los aceites volátiles pueden variar según el clima, tipo y manejo de suelo, luz solar, temperatura y humedad de diferentes ecosistemas(89), considerando además la variabilidad asociada a los fenómenos cronobiológicos (variación mensual, semanal y diaria) según la hipótesis de Moraes *et al.*(90).

Los estudios fitoquímicos con las especies de *Piper* han revelado una variedad de clases de metabolitos secundarios tales como amidas, fenilpropanoides, ácidos benzoicos prenilados, flavonoides, alcaloides, terpenos, cromenos, lignanos y neolignanos. La piplartina, una amida aislada por primera vez de *Piper longum* L., exhibe diversas actividades farmacológicas(91).

Paz *et al.*(92), en 2017 en un estudio realizado con el fin de conocer la composición química de la savia de seis especies de *Piper* se identificó el fenilpropanoide dilapiol en la savia de

*P. marginatum*, en un porcentaje de 76,9%. El mayor número de metabolitos secundarios lo identificaron en la savia de *P. marginatum*, incluidos cuatro fenilpropanoides y cinco sesquiterpenos.

La composición química es muy diversa de una especie a otra, con variaciones a veces incluso dentro de una sola especie. La variación se debe a que las expresiones de fitoquímicos en una planta son diversas y cambian en todas las etapas del desarrollo(93). También se producen alteraciones de los fitoquímicos después de la producción siendo modificados para nuevas funciones o para el almacenamiento(94).

#### **Actividad Antimicrobiana del AE de *Piper marginatum* Jacq.**

La bioactividad del aceite esencial se determinó mediante el método de microdilución en caldo (Anexo 4 y 5), como se indicó en la metodología. La acción antibacteriana fue evaluada frente a cepas de interés clínico: dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 y dos Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 85923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212); y la actividad antimicótica se determinó frente a la levadura *Candida albicans* ATCC 10231.

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(95).

#### **Actividad Antibacteriana Frente a las Bacterias Gram Negativas *E. coli* y *P. aeruginosa***

Como se puede observar en la Tabla 2, el aceite de *P. marginatum* mostró actividad frente a las bacterias ensayadas *E. coli* y *P. aeruginosa*, inhibiendo en mayor proporción el crecimiento de *E. coli* apreciándose una CMI de 400-800 µg/mL, ya que la actividad detectada frente a *P. aeruginosa* fue baja (CMI de 800-1600 µg/mL). Además, las CMBs determinadas fueron de 800 µg/mL y 1600 µg/mL frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

#### **Actividad Antibacteriana Frente a las Bacterias Gram Positivas *S. aureus* y *E. faecalis***

De la misma manera la actividad antibacteriana del AE fue evaluada frente a cepas bacterianas Gram positivas. En la Tabla 3 se evidencian las CMIs y CMBs que se obtuvieron del aceite frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y se puede apreciar que el aceite mostró una inhibición moderada del crecimiento de *S. aureus* (CMI de 200-400 µg/mL), siendo esta actividad antiproliferativa superior a la encontrada frente a *E. faecalis* (CMI 1600-3200 µg/mL). Las CMBs

determinadas frente a *S. aureus* y *E. faecalis* fueron de 800 µg/mL y >6400 µg/mL, respectivamente.

**Tabla 2.** Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AE de *Piper marginatum* Jacq. Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Bacterias Gram negativas	Aceite esencial (µg/mL)	
	CMB	CMI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	800	400 - 800
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1600	800 - 1600

**Fuente:** Laboratorios Facultad de Ciencias de la Salud E300 y E302 UNACH.

**Elaborado por:** Walter Darío Guamán Aranda y Soraya Estefany Jaramillo Panamá

**Tabla 3.** Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AE de *Piper marginatum* Jacq. Frente a *Staphylococcus aureus* ATTC 85923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Bacterias Gram positivas	Aceite esencial (µg/mL)	
	CMB	CMI
<i>S. aureus</i> ATCC 85923	800	400 - 800
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>6400	>6400

**Fuente:** Laboratorios Facultad de Ciencias de la Salud E300 y E302 UNACH.

**Elaborado por:** Walter Darío Guamán Aranda y Soraya Estefany Jaramillo Panamá

Algunas investigaciones basadas en las propiedades biológicas y farmacológicas de *P. marginatum* se han centrado en la evaluación de sus aceites esenciales, sin embargo, en la literatura científica existen pocos estudios que informen sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. marginatum* y en este sentido, este informe dirigido al control de infecciones importantes en humanos, es el primero realizado con la especie *P. marginatum* Jacq. colectada en Ecuador. En una investigación realizada por Duarte *et al.*(42), en 2007 el aceite esencial de las hojas de *P. marginatum* Jacq. mostró inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli* con un valor mínimo de concentración inhibidora (CMI) de 700 y 900 µg/mL frente a dos cepas patógenas STEC0157 y EPEC0312, respectivamente.

Por otra parte, Sánchez *et al.*(43), en 2012 reportaron un valor de CMI mucho más bajo, de 120 µg/ml frente a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas albilineans*. Este microorganismo

provoca la enfermedad bacteriana llamada escaldadura foliar, considerada la enfermedad más importante del cultivo de la caña de azúcar(96).

#### **Actividad antimicótica frente a la levadura *C. albicans***

La Tabla 4 muestra los resultados de la actividad del aceite esencial de *P. marginatum* frente a la levadura *Candida albicans* en la que se puede apreciar que el aceite mostró un efecto inhibitorio leve sobre el crecimiento de este microorganismo, ya que la CMI determinada fue de 800-1600 µg/mL, por otra parte, el aceite produjo la muerte de la levadura (CMF) a la concentración 3200 µg/mL.

**Tabla 4.** Concentración mínima fungicida (CMF) y concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. frente a la levadura *Candida albicans* ATCC 10231.

Levadura	Aceite esencial (µg/mL)	
	CMF	CMI
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3200	800-1600

**Fuente:** Laboratorios Facultad de Ciencias de la Salud E300 y E302 UNACH.

**Elaborado por:** Walter Darío Guamán Aranda y Soraya Estefany Jaramillo Panamá

En investigaciones realizadas por otros autores el aceite esencial de las hojas se examinó para la inhibición de los hongos *Alternaria solanii* y *Fusarium oxysporum*, mostrando una actividad moderada en los ensayos de difusión en disco(44,45).

Sin embargo, otro estudio señaló que el aceite esencial de *P. marginatum* fue inactivo frente a *F. oxysporum* con un valor de CMI superior a 500 µg/mL, mientras que se encontró que era débilmente activo frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* con valores respectivos de CMI de 500 y 250 µg/mL(97). Además, se ha informado que tanto el aceite esencial como el extracto etanólico de *P. marginatum* son inactivos frente a *Candida albicans* con valores de CMI superiores a 2,0 mg/mL(98), el cual supera al encontrado en este estudio.

Esta investigación representa un gran aporte al conocimiento científico ya que muestra la propiedad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq, hasta el momento poco estudiada. Esta actividad sugiere que el aceite de *P. marginatum* podría ser una fuente natural de valioso(s) compuesto(s) bactericida(s) y fungicida(s) frente a otras cepas bacterianas, y ser usado como potente antimicrobiano útil en el control de enfermedades infecciosas.

## CONCLUSIONES

1. La identificación botánica de una muestra de la especie vegetal como *Piper marginatum* Jacq. fue realizada en el herbario GUAY, de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador y depositada con el número de espécimen de colección MER06.
2. El rendimiento que se obtuvo del AE de las partes aéreas de la especie *P. marginatum* Jacq. extraído mediante la técnica de Hidrodestilación, fue de 0,05%.
3. A partir de los resultados obtenidos de la composición química del AE mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, realizado en el Instituto de Investigación; Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, se determinó que los principales componentes identificados fueron miristicina (33,17%),  $\gamma$ -terpineno (10,78%), Trans-cariofileno (8,71%),  $\gamma$ -terpinoleno (5,70%), D-germacreno (4,59%), Apiol(3,97%). Teniendo en cuenta que la miristicina constituye el componente más abundante, los resultados obtenidos sugieren que podría ser el principal responsable del efecto antibacteriano.
4. La actividad antibacteriana y antifúngica del AE de *P. marginatum* Jacq. frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y la levadura *Candida albicans*, evaluada mediante la técnica de microdilución, permitió evidenciar una actividad inhibitoria igual sobre el crecimiento de las cepas *S. aureus* y *E. coli* (CMI de 400-800  $\mu\text{g/mL}$ ) y frente a *P. aeruginosa* la actividad antibacteriana observada resultó ser más baja ya que la CMI determinada fue de 800-1600  $\mu\text{g/mL}$ ; además, *E. faecalis* se mostró insensible a la acción del aceite a la máxima concentración ensayada (CMI >6400  $\mu\text{g/mL}$ ). El aceite presentó actividad antimicótica media frente a *C. albicans* con una CMI de 800-1600  $\mu\text{g/mL}$ .

## **RECOMENDACIONES**

- 1.** La extracción del aceite debe realizarse con la planta fresca, es decir, lo más inmediato luego de la recolección, con el fin de evitar la evaporación o pérdida de componentes esenciales.
- 2.** Se recomienda, si se cuenta con los recursos económicos necesarios, realizar cada ensayo por triplicado para la confirmar los resultados y asegurar el correcto reporte de los mismos.
- 3.** Se recomienda continuar el estudio de actividad frente a otras cepas microbianas de interés clínico, tanto de estirpes ATCC como aisladas de pacientes, además con cepas que hayan mostrado resistencia a los antibióticos de uso común, teniendo en cuenta las normas de bioseguridad para evitar contaminaciones.
- 4.** El mantenimiento de las condiciones óptimas de crecimiento y la conservación de la esterilidad durante los ensayos es fundamental para la obtención de resultados completamente fiables.
- 5.** Realizar la difusión de los resultados en eventos de divulgación científica y/o en artículos de revistas indizadas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, AlMazroa MA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* [Internet]. 2012 Dic [citado 28 Nov 2017]; 380(9859):2095-128. Disponible en: <http://dro.deakin.edu.au/eserv/DU:30050819/ortblad-globalandregional-2012.pdf>.
2. Fernandes P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat. Biotechnol* [Internet]. 2006 Dic [citado 30 Nov 2017]; 24(12):1497–503. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt1206-1497>
3. Banin E., Hughes D. Kuipers OP. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [Internet]. 2017 May [citado 02 Dic 2017]; 41(3):450–2. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/450/3806588>
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos. [Internet]. 2017 Oct [citado 15 Ene 2018]. Disponible en: <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
5. Villa LM, Cortés JA, Leal AL, Meneses A, Meléndez MP (2013). *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Revista Chilena de Infectología* [Internet]. 2013 Dic [citado 29 Nov 2017]; 30(6): 605-10. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n6/art05.pdf>.
6. Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2010 May-Ago [citado 12 Dic 2017]; 48(2):147-61. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n2/hie06210.pdf>.
7. Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2014 Ene [citado 18 Nov 2017]; 18(4):421-433. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/82432029.pdf>.
8. Organización Panamericana de Salud (OPS). Estrategia de Cooperación de país, de la OPS/OMS en Ecuador, periodo 2010-2014, septiembre 2009. Organización Mundial de la salud (OMS) [Internet] 2009 Sep [citado 22 Nov 2017]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/165671/ccs\\_ecu\\_es.pdf;jsessionid=D3B7FE201FB32DDECD144E319ACEC375?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/165671/ccs_ecu_es.pdf;jsessionid=D3B7FE201FB32DDECD144E319ACEC375?sequence=1)
9. Salud de Altura. Resistencia bacteriana, un problema cada vez más frecuente en el tratamiento de infecciones de vías urinarias. Información dirigida a profesionales de la salud. Actualidad Médica: Resiliencia bacteriana de IVU. 2011 [citado 14 Nov 2016]; 2da edición. Disponible en: <http://www.saludprofesionalesdelasaludaltura.ec/información-profesionales-salud/actualidad-medica/resistencia-bacteriana-itu-ivu/>
10. 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 [tesis

- médico general] [Internet]. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo; 2012 [citado 12 Nov 2017]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/120/1/UNACH-EC-MEDI-2013-0016.pdf.pdf>
11. Mathur S, Hoskins C. Drug development: Lessons from nature. Biomedical reports [Internet]. 2017 Abr [citado 14 Dic 2017]; 6(6):612-4. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/br/6/6/612>
  12. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod [Internet]. 2016 Feb [citado 20 Nov 2017]; 79(3):629-61. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
  13. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. The Journal of antibiotics [Internet]. 2012 Abr [citado 01 Dic 2017]; 65(8):385-95. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/1787517351?pq-origsite=gscholar>
  14. Gao Y, Deng K, Cao Z, Graziani EI, Gilbert AM, Koehn FE, Wood A, Doherty P, Walsh FS. Amphotericin B, identified from a natural product screen, antagonizes CNS inhibitors to promote axon growth via activation of an Akt pathway in neurons. J Neurochem [Internet]. 2010 Mar [citado 11 Nov 2017]; 113(5):1331-42. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-4159.2010.06704.x>
  15. Zhang L, Demain AL, editors. Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; c2005. 384 p.
  16. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G: Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. Molecules [Internet]. 2015 Mar [citado 16 Nov 2017]; 20(3):3898-941. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/3/3898/htm>
  17. Nasab FK, Khosravi AR. Ethnobotanical study of medicinal plants of Sirjan in Kerman Province Iran. J Ethnopharmacol [Internet]. 2014 Abr [citado 14 Nov 2017]; 154(1):190-7. Disponible en: <http://iks.ukzn.ac.za/sites/default/files/Kerman%20Province.pdf>
  18. Ody P. The complex medicinal herbal. New York: DorlingKindersley Limited; 1993.
  19. Gonçalves PHS, Albuquerque UP, Medeiros PMD. The most commonly available woody plant species are the most useful for human populations: a meta-analysis. Ecological Applications [Internet]. 2016 May [citado 03 Dic 2017]; 26(7):2238-53. Disponible en: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/eap.1364>
  20. Pieroni A, Sökand R, Quave CL, Hajdari A, Mustafa B. Traditional food uses of wild plants among the Gorani of South Kosovo. Appetite [Internet]. 2017 Sep [citado 05 Dic 2017]; 108:83-92. Disponible en: <http://www.andreapieroni.eu/Pieroni%20et%20al.,%202017.pdf>
  21. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. 2013 [citado 22 Nov 2017] Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098\\_spa.pdf;jsessionid=9B8F3F72F9336230C2E499CFDC6927C6?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=9B8F3F72F9336230C2E499CFDC6927C6?sequence=1).



22. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* [Internet]. 2001 Abr [citado 14 Dic 2017]; 39(5):603–13. Disponible en: [http://www.farmacognosia.ufpr.br/pdf/rates\\_plant.pdf](http://www.farmacognosia.ufpr.br/pdf/rates_plant.pdf)
23. kew Royal Botanic Gardens. State of the World's Plants [Internet]. 2016 [citado 15 Dic 2017]. Disponible en: [https://stateoftheworldsplants.com/2016/report/sotwp\\_2016.pdf](https://stateoftheworldsplants.com/2016/report/sotwp_2016.pdf)
24. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ, editoras. Investigación en plantas de importancia médica. México:OmniaScience Monographs, c2016. 437 p.
25. de la Torre L, Navarrete H, Muriel M, Macía MJ, Balslev H, Andújar F, Tejada C, Moya J, Ríos Katto C, Rodríguez D, editores. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito (Ecuador). University of Aarhus (Dinamarca) [Internet]. c2008 [citado 30 Oct 2017]. 1-3 p. Disponible en: <https://www.puce.edu.ec/portal/wr-resource/blobs/1/PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf>
26. Bandoni AL, editor. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. 2da ed. Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED); c2002. P.
27. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* [Internet]; 2005 Sep [citado 26 Nov 2017]; 78(5):431–41. Disponible en: [http://webpace.pugetsound.edu/facultypages/bdasher/Chem361/Review\\_Articles\\_files/Drugs%20from%20Plants.pdf](http://webpace.pugetsound.edu/facultypages/bdasher/Chem361/Review_Articles_files/Drugs%20from%20Plants.pdf)
28. Luna-Cázares LM, Gonzáles-Esquinca AR. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal. *Polibotánica* [Internet]. 2008 Jun [citado 26 Nov 2017]; 25:121-125. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682008000100009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682008000100009)
29. Safaei-Ghomi J, Ahd AA. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag* [Internet]. 2010 Jul-Sep [citado 11 Dic 2017]; 6(23):172–5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950377/>
30. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother Res* [Internet]. 2010 [citado 03 Dic 2017]; 24(5):673–9. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/5937/fa1665eaba7f084ebfe2d11661a13531fcb8.pdf>
31. Nieto G. Biological Activities of three Essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines* [Internet]. 2017 Ago [citado 05 Dic 2017]; 4(3):63-72. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/63>
32. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2004 Mar [citado 21 Dic 2017]; 94(3):223–53. Disponible en: [http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Burt\\_Essential\\_Oils\\_A\\_Review\\_2004.pdf](http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Burt_Essential_Oils_A_Review_2004.pdf)
33. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr J* [Internet]. 2013 May [citado 25 Nov 2017]; 28(5):269–79. Disponible en: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36577083/Major\\_bioactivities\\_and\\_mechanism\\_of\\_action\\_of\\_essential\\_oils\\_and\\_their\\_components.pdf?AWSAccessKeyI](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36577083/Major_bioactivities_and_mechanism_of_action_of_essential_oils_and_their_components.pdf?AWSAccessKeyI)

- d=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538664637&Signature=kxhfp00zHO5rqZzJvou3ILZ%2Bn4U%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DMajor\_bioactivities\_and\_mechanism\_of\_act.pdf
34. Stefanakis MK, Touloupakis E, Anastasopoulos E, Ghanotakis D, Katerinopoulos HE, Makridis P. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. Food Control [Internet]. 2013 May [citado 06 Dic 201]; 34(2):539–546. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.024>.
  35. Jaramillo-Colorado B, Julio-Torres J, Duarte-Restrepo E, Gonzalez-Coloma A, Julio-Torres LF. Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. Colombia [Internet]. 2015 Sep [citado 20 nov 2017]. 14(5):344 Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/856/85641105001/>
  36. de Núñez EH, Johnson CH.. A preliminary study of *Piper marginatum* Jacq. J Am Pharm Assoc [Internet]. 1943 Sep [citado 11 Nov 2017]; 32(9):234–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jps.3030320903>
  37. Braga R. 1960. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Imprensa Oficial, Fortaleza, Brasil, 540 pp. Branch, L.C., Silva, M.d., 1983. Folk medicine of Alter do Chão, Pará, Brazil. Acta Amazon. 13:737–797.
  38. D'Angelo LCA, Xavier HS, Torres LMB, Lapa AJ, Souccar C. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, anti-inflammatory and hemostatic. Phytomedicine [Internet]. 1997 [citado 23 Nov 2017]; 4(1):33–40. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(97\)80025-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(97)80025-6)
  39. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Editor UNESP, São Paulo, pp. 125–126
  40. Sequeda-Castañeda L, Celis C, Gutiérrez S, Gamboa F. *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae): phytochemical: therapeutic, botanical insecticidal and phytosanitary uses. Pharmacol [Internet]. 2015 Dic [citado 29 Nov 2017]; 3:136–45. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Luis\\_Sequeda-Castaneda/publication/288824424\\_Piper\\_marginatum\\_Jacq\\_Piperaceae\\_Phytochemical\\_therapeutic\\_botanical\\_insecticidal\\_and\\_phytosanitary\\_uses/links/56840a0f08ae1e63f1f1c389.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Luis_Sequeda-Castaneda/publication/288824424_Piper_marginatum_Jacq_Piperaceae_Phytochemical_therapeutic_botanical_insecticidal_and_phytosanitary_uses/links/56840a0f08ae1e63f1f1c389.pdf)
  41. Andrade EHA, Carreira LMM, da Silva MHL, da Silva JD, Bastos CN, Sousa PJC, Guimarães EF, Maia JGS. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chem Biodivers [Internet]. 2008 Ene [citado 13 Nov 2017]; 5(1):197–208. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cbdv.200890011>
  42. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol [Internet]. 2007 [citado 26 Nov 2017]; 111(2):197–201. Disponible en: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44436122/Activity\\_of\\_essential\\_oils\\_from\\_Brazilia20160405-20234-1ay40m9.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538667515&Signature=ki3ookGvC84gzcoCvIwuWS0r900%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DActivity\\_of\\_essential\\_oils\\_from\\_Brazilia.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44436122/Activity_of_essential_oils_from_Brazilia20160405-20234-1ay40m9.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538667515&Signature=ki3ookGvC84gzcoCvIwuWS0r900%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DActivity_of_essential_oils_from_Brazilia.pdf)

43. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O. Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson Rev Protec Veg [Internet]. 2012 Abr [citado 03 Ene 2018]; 27(1):39–44. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v27n1/rpv07112.pdf>.
44. Dos Santos MRA, Lima RA, de Freitas C, Silva AG, Facundo VA. Atividade fungicida do óleo essencial de *Piper marginatum* L. (Piperaceae) sobre *Fusarium oxysporum* (Schlecht) *in vitro*. Saude Pesq [Internet]. 2011 Abr [citado 15 Nov 2017]; 4(1):9-14. Disponible en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42670/1/Mauricio-saudePesquisa.pdf>
45. Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso MDC, Martínez B. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Rev Protec Veg [Internet]. 2013 [citado 14 Nov 2017]; 28(1):54–9. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv07113.pdf>
46. Acuña G. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2003. [citado 21 enero 2018]; 20(1):S7-S10. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v20s1/art01.pdf>
47. Šantić Ž, Pravdić N, Bevanda M, Galić K.. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. Psychiatria Danubina [Internet]. 2017 Nov [citado 05 Ene 2018]; 5(4): 787-92. Disponible en: [http://www.hdbp.org/psychiatria\\_danubina/pdf/dnb\\_vol29\\_sup4/dnb\\_vol29\\_sup4\\_69.pdf](http://www.hdbp.org/psychiatria_danubina/pdf/dnb_vol29_sup4/dnb_vol29_sup4_69.pdf)
48. Lemonnier N, Zhou G B, Prasher B, Mukerji M, Chen Z, Brahmachari SK, Nobleg D, Auffraya C, Sagnerh M. Traditional Knowledge-based Medicine: A Review of History, Principles, and Relevance in the Present Context of P4 Systems Medicine. Progress in Preventive Medicine [Internet]. 2017 Dic [citado 10 Ene 2018]; 2(7): e0011. Disponible en: [https://journals.lww.com/progprevmed/Fulltext/2017/12000/Traditional\\_Knowledge\\_based\\_Medicine\\_\\_\\_A\\_Review\\_of.1.aspx](https://journals.lww.com/progprevmed/Fulltext/2017/12000/Traditional_Knowledge_based_Medicine___A_Review_of.1.aspx)
49. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: past history and future perspective. J Herbmed Pharmacol [Internet]. 2018 [citado 02 Feb 2018];7(1):1-7. Disponible en: <http://herbmedpharmacol.com/PDF/jhp-7-1.pdf>
50. Lista de Plantas Medicinales del Ecuador (y para qué sirven). Ecuador [Internet]. 2017 Ago [citado 25 Nov 2017]. Disponible en: <http://www.forosecuador.ec/forum/aficiones/salud/117954-lista-de-plantas-medicinales-del-ecuador-y-para-que-sirven>
51. Ponce AA, Millones PA. Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral. Crescendo Ciencias de la Salud [Internet]. 2015 Nov [citado 25 enero 2018]; 2(2):530-7. Disponible en: <https://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo-salud/article/view/946/827>
52. Ruiz JR, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. Ciencia e Investigación [Internet]. 2009 [citado 25 noviembre 2017]; 12(1):41-7. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3387/4507>

53. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editores. Microbiología Médica. 7ma ed. Barcelona, España: Elsevier España, S.L.; c2014. 3 p.
54. Montaña NM, Sandoval AL, Camargo SL, Sánchez JM. Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos: Ciencia y cultura [Internet]. 2010 [citado 11 Dic 2017]; 17(77):15-23. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
55. Microbes and disease. Microbiology [Internet]. Disponible en: <http://microbiologyonline.org/about-microbiology/microbes-and-the-human-body/microbes-and-disease>
56. Leggett HC, Cornwallis CK, Buckling A, West SA. Growth rate, transmission mode and virulence in human pathogens. Phil Trans R Soc B. [Internet]. 2017 [citado 13 Ene 2018]; 372:1-8. Disponible en: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/372/1719/20160094.full.pdf>
57. Dhilleswara V, Dattatreya A, Dan MM, Sarangi T, Sasidhar K, Rahul J. Translational approach in emerging infectious disease treatment: An update. Biomed Res [Internet]. 2017 May [citado 20 Ene 2018]; 28(13): 5678-86. Disponible en: <http://www.alliedacademies.org/articles/translational-approach-in-emerging-infectious-disease-treatment-an-update.pdf>
58. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet]. 2014 Abr [citado 20 Ene 2018]; 61(1):28-40. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2015/pt152f.pdf>
59. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed [Internet]. 2014 sep [citado 19 Ene 2018]; 25:129-43. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
60. Acosta-Gnass SI. Enterococcus. Grupo Asesor: Control de Infecciones y Epidemiología, CODEINEP. [Internet]. 2005 Ago [Citado 3 enero 2018]. Disponible en: <http://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/Enterococcus.pdf>.
61. Varela Y, Millán B, Araque M. Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud. Biomédica [Internet]. 2017 [citado 28 Ene 2018]; 37(2):209-17. doi: <http://www.redalyc.org/pdf/843/84350981011.pdf>
62. Genoveva AH, García E, Simón M, Moreno L, Canteras M, Gómez J. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. Rev Esp Quimioter [Internet]. 2017 Dic [citado 25 Ene 2018]; 31(2):123-30. Disponible en: <http://seq.es/wp-content/uploads/2018/04/full.pdf#page=31>
63. Pineda-Murillo J, Cortés-Figueroa AA, Uribarren-Berrueta T, Castañón-Olivares LR. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev Méd Risaralda [Internet]. 2017 Ene [citado 15 Ene 2018]; 23(1):38-44. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistamedica/article/viewFile/9139/9711>

64. Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Farmacología* [Internet]. 2004 [citado 21 Dic 2017]; 23(3):116-124. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414>
65. Forbes B, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico*. 12a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana S. A.; c2009, 181 p.
66. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils— Present Status and Future Perspectives. *Medicines* [Internet]. 2017 Ago [citado 12 Ene 2018]; 4(3):58-78; Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/58/htm>
67. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2010 May [citado 13 Ene 2018]; 130(1):107–15. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110002564>
68. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter* [Internet]. 2002 [citado 3 feb 2018]; 102:35-41. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>
69. Nascimento JC, Paula VF, David JM, David JP. Occurrence, biological activities and <sup>13</sup>C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). *Química Nova* [Internet]. 2012 Oct [citado 11 Ene 2018]; 35(11):2288-311. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v35n11/v35n11a37.pdf>
70. Scott IM, Jensen HR, Philogene BJR, Arnason JT. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* [Internet]. 2007 Mar [citado 10 Feb 2018]; 7(1):65-75. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Helen\\_Jensen/publication/225581469\\_A\\_review\\_of\\_Piper\\_spp\\_Piperaceae\\_phytochemistry\\_insecticidal\\_activity\\_and\\_mode\\_of\\_action/links/00463534c36d6f1ed1000000/A-review-of-Piper-spp-Piperaceae-phytochemistry-insecticidal-activity-and-mode-of-action.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Helen_Jensen/publication/225581469_A_review_of_Piper_spp_Piperaceae_phytochemistry_insecticidal_activity_and_mode_of_action/links/00463534c36d6f1ed1000000/A-review-of-Piper-spp-Piperaceae-phytochemistry-insecticidal-activity-and-mode-of-action.pdf)
71. Jacquin, N.J., 1786. *Icones plantarum rariorum*. Lugduni Batavorum, Argentorati Wappler, White et filium, Luchtmans and König, London., pp. 2.
72. van den Berg, M.E., 1982. *Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Programa Trópico Umido/Museo Paraense Emílio Goeldi, Belém, 223 pp.
73. de Oliveira MC, de Oliveira BV. Constituents from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia* [Internet]. 2002 Jun [citado 22 Ene 2018]; 73(6):547–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X02001673>
74. de Oliveira MC, de Oliveira AH, de Oliveira BV. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 2006 May [citado 12 Ene 2018]; 34(1):75–77. Disponible en: doi:10.1016/j.bse.2005.05.003
75. Pino-Benitez N, editor. *Plantas útiles en el departamento del Choco Parte I: Extractos*. Medellín, Colombia: Uryco. c2009.
76. Pereira L, Barboza GE, Bovini MG, De Almeida MZ, Guimarães EF. Caracterización y uso de pimientas en una comunidad Quilombola de la Amazonía Oriental (Brasil). *J Bot Res Inst Texas* [Internet]. 2011 [citado 20 Ene 2018]; 5(1):255–72. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11336/13832>

77. Yukes JE, Balick MJ, editors. Dominican Medicinal Plants: A Guide for Health Care Providers, 2nd ed. New York: The New York Botanical Garden; c2011. 25 p.
78. de Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, de Amorim ELC. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. J Ethnopharmacol [Internet]. 2007 [citado 05 Dic 2017]; 110(1):76–91. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106004594>
79. Autran ES, Neves IA, da Silva CSB, Santos GKN. Da Câmara CAG, Navarro DMAF. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Biores Technol [Internet]. 2009 [citado 21 Dic 2017]; 100(7):2284–88. Disponible en: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/42806361/Autran\\_ES\\_Neves\\_IA\\_da\\_Silva\\_CSB\\_Santos\\_G20160218-6070-12dp4cf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538698832&Signature=uqi4IBbc9w01lwLgAT7lMymgB8g%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DChemical\\_composition\\_oviposition\\_deterre.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/42806361/Autran_ES_Neves_IA_da_Silva_CSB_Santos_G20160218-6070-12dp4cf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538698832&Signature=uqi4IBbc9w01lwLgAT7lMymgB8g%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DChemical_composition_oviposition_deterre.pdf)
80. Ngoh SP, Choo LEW, Pang FY, Huang Y, Kini MR, Ho SH. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). Pest Sci [Internet]. 1998 Jun [citado 20 Dic 2017]. 54(3):261-68. Disponible en: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(1998110\)54:3<261::AID-PS794>3E3.0.CO;2-C](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1096-9063(1998110)54:3<261::AID-PS794>3E3.0.CO;2-C)
81. Olmedo R, Nepote V, Grosso NR. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. Food Chem [Internet]. 2014 Ago [citado 13 Ene 2018]; 156:212-19. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614001198>
82. Reigada JB, Tcacenco CM, Andrade LH, Kato MJ, Porto ALM, Lago JHG. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). Tetrahedron-Asymmetr [Internet]. 2007 Jun [citado 11 Ene 2018]; 18(9):1054–58. Disponible en: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46199276/Chemical\\_Constituents\\_from\\_Piper\\_margina20160603-12101-1217ov8.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538699502&Signature=Atc2SR%2BsX7N8UIsWB1mqA2tCk3Q%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DChemical\\_constituents\\_from\\_Piper\\_margina.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46199276/Chemical_Constituents_from_Piper_margina20160603-12101-1217ov8.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1538699502&Signature=Atc2SR%2BsX7N8UIsWB1mqA2tCk3Q%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DChemical_constituents_from_Piper_margina.pdf)
83. Mesa AM, Toro JF, Cardona F, Blair S. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*. Bol Latinoam Caribe Plantas Med [Internet]. Aromát 2012 Mar [citado 11 Dic 2017]; 11(2):154-162. Disponible en: <http://cecta.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/557/525>
84. Olgún LP, Rodríguez HM. Métodos en Biotecnología, Cromatografía de Gases. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología [Internet]. 2004

- Jun [citado 27 Ene 2018]. Disponible en: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf)
85. Araujo L, Moujir LM, Rojas J, Rojas L, Carmona J, Rondón M. Chemical Composition and Biological Activity of *Coniza bonariensis* oil collected in Mérida, Venezuela. *Nat Prod Commun* [Internet]. 2013 Ago [citado 27 Nov 2017]; 8(8):1175-78. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24079198>
  86. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Martínez B, Duarte Y, Pino O. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Rev. Protección Veg* [Internet]. 2011 [citado 22 Dic 2017]; 26(3):170-76. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v26n3/rpv06311.pdf>
  87. Ramos LS, da Silva ML, Luz AIR, Zoghbi MGB, Maia JGS. Essential oil of *Piper marginatum*. *J Nat Prod* [Internet]. 1986 Jul [citado 09 Dic 2017]; 49(4):712-713. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np50046a033>
  88. Hussain RA, Poveda LJ, Pezzuto JM, Soejarto DD, Kingjorn AD. Sweetening agents of plant origin: Phenylpropanoid constituents of seven sweet-tasting plants. *Econ Bot* [Internet]. 1990 [citado 07 Dic 2017]; 44(2):174-82. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/4255227>
  89. Almeida RP, Souto RNP, Silva MHL, Maia JGS. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chem Biodivers* [Internet]. 2009 [citado 06 Dic 2017]; 6(9):1427-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800212>
  90. Moraes MM, da Silva TM, Silva RR, Ramos CS, da Camara CA. Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. *Bol Latinoam Caribe* [Internet]. 2014 May [citado 05 Dic 2017]; 13(3):270-77. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85631010006.pdf>
  91. Bezerra DP, Pessoa C, De Moraes MO, Saker-Neto N, Silveira ER, Costa-Lotuf LV. Overview of the therapeutic potential of piperlongumine (piperlongumine). *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2013 [citado 15 Dic 2017]; 48(3):453-63. Disponible en: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/25943/2/Bezerra%20DP%20Overview%20of%20the%20therapeutic....pdf>
  92. Paz RF, Guimarães EF, Ramos CS. The occurrence of phenylpropanoids in the saps of six *Piper* species (Piperaceae) from Brazil. *Gayana Bot* [Internet]. 2017 [citado 08 Ene 2018]. 74(1):236-39. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gbot/2017nahead/0717-6643-gbot-00109.pdf>
  93. Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 2012 [citado 15 Ene 2018]; 57:405-424. Disponible en: <http://agri.ckcest.cn/ass/NK003-20161114002.pdf>
  94. Santos GKN, Dutra KA, Lira CS, Lima BN, Napoleao TH, Paiva PMG, Maranhao CA, Brandao SSF, Navarro DMAF. Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. *Molecules* [Internet]. 2014 Oct [citado 22 Ene 2018]; 19(10):16573-87. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/10/16573/htm>
  95. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortes DAG, Nakamura CV, Dias BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious

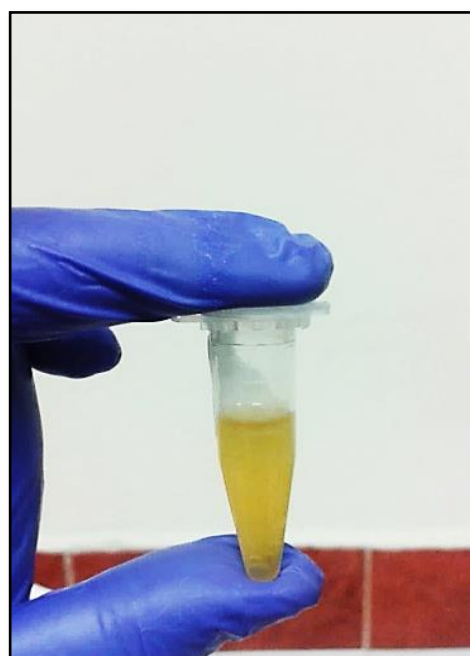
- diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2002 Sep [citado 25 Ene 2018]; 97(7):1027-31. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v97n7/4476.pdf>
96. Jiménez O, Contreras N. Respuesta de 11 variedades de caña de azúcar a la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) y evaluación de dos métodos de inoculación. Bioagro [Internet]. 2009 Ago [citado 28 Ene 2018]; 21(2):139-42. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612009000200009](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612009000200009)
97. Tangarife-Castaño V, Correa-Royero JB, Roa-Linares VC, Pino-Benitez N, Betancur-Galvis LA, Durán DC, Stashenko EE, Mesa-Arango AC. Antidermatophyte, antiFusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. J Essent Oil Res [Internet]. 2014 Ago [citado 30 Ene 2018]; 26(3):221–27. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.882279>
98. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol [Internet]. 2005 [citado 15 Feb 2018]; 97(2):305–11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>





**ANEXO 2:** Extracción del AE de las partes aéreas de la especie vegetal *Piper marginatum*

Jacq.



**Fuente:** Laboratorios Facultad de Ciencias de la Salud E300 y E302 UNACH.

**Elaborado por:** Walter Darío Guamán Aranda y Soraya Estefany Jaramillo Panamá

**Anexo 3.** Cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masas HP 5973.



**Fuente:** Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Instituto de Investigación, Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal Mérida–Venezuela.  
**Determinación de la composición química del aceite realizada por:** Dr. Luis Rojas PhD.

**ANEXO 4:** Protocolo de trabajo del ensayo de la actividad antimicrobiana del AE de *P. marginatum* Jacq. frente a cepas seleccionadas. Distribución en la placa y cálculos.



**Fuente:** Laboratorios Facultad de Ciencias de la Salud E300 y E302 UNACH.

**Elaborado por:** Walter Darío Guamán Aranda y Soraya Estefany Jaramillo Panamá

**ANEXO 5:** Realización del inóculo y ensayo de la actividad antimicrobiana del AE de *Piper marginatum* Jacq. frente a cepas ATCC seleccionadas.



**Fuente:** Laboratorios Facultad de Ciencias de la Salud E300 y E302 UNACH.

**Elaborado por:** Walter Darío Guamán Aranda y Soraya Estefany Jaramillo Panamá