

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención de título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL PROVENIENTE DE LAS HOJAS
DE *Piper barbatum* Kunth (cordoncillo).**

AUTORA:

JENNIFER TATIANA VELOZ JARAMILLO

TUTOR:

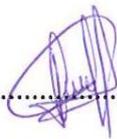
PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA

Quito, noviembre 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Jennifer Tatiana Veloz Jaramillo con documento de identificación N° 0603798265 manifiestó, mi voluntad de ceder a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: Evaluación de la composición química y actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper barbatum* Kunth (cordoncillo), mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en condición de autora me reservo el derecho moral de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



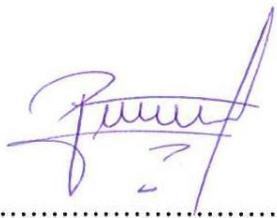
.....
Jennifer Tatiana Veloz Jaramillo

C.I. 0603798265

Quito, noviembre del 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación Evaluación de la composición química y actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper barbatum* Kunth (cordoncillo) realizado por Jennifer Tatiana Veloz Jaramillo, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.



.....

Paco Fernando Noriega Rivera

C.I. 0602421323

Dedicatoria

En primer lugar A Jehová por que ha estado conmigo a cada paso que doy,
cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres Fernando y Jenny, quienes han sido el pilar más importante a lo largo de mi vida, han velado mi bienestar y educación, siendo mi apoyo en todo momento.

A mis abuelos Gualberto y Claudina, quienes son parte crucial de mi vida.

A mis hermanos Cinthya y Diego por su apoyo y cariño, y en especial a Geovanna
quién descansa la muerte pero sé que pronto estará conmigo.

A mis tías Eliana, Julio, Mónica, Nancy, Alicia y Luisa que siempre han estado
junto a mi apoyándome incondicionalmente.

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirme culminar el presente trabajo de investigación.

A mi tutor, Paco Noriega, por su apoyo incondicional, por todos sus consejos y conocimientos durante la ejecución del trabajo de investigación.

A Erika Paredes y Edison Osorio que forman parte del personal de los Laboratorios de Ciencias de la Vida, por permitirme desarrollar con éxito el trabajo experimental dentro de las instalaciones.

A los docentes, Laura Huachi, José Luis Ballesteros, Nancy Bonifáz, Viviana Chiluisa, María Elena Maldonado, Ivonne Vaca y Elena Coyago por el apoyo a lo largo de la carrera universitaria.

A todos, infinitas gracias.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco conceptual	4
1.1. Información Botánica y Ecológica de la planta	4
1.2. Usos ancestrales y etnobotánicos	6
1.3. Estudios químicos del género <i>Piper</i>	7
1.4. Estudios de actividad biológica del género <i>Piper</i>	8
1.5. Aceites Esenciales	10
1.6. Actividad antioxidante en aceites esenciales	13
1.6.1. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	14
1.6.2. Métodos directos	14
1.6.3. Métodos indirectos	15
1.7. Actividad antimicrobiana en aceites esenciales	16
1.8. Microorganismos patógenos	17
1.8.1. Bacterias Gram positivas	18
1.8.2. Bacterias Gram negativas	20
1.9. Levaduras	22
1.10. Método de dilución o micro-dilución en caldo	22
Capítulo 2	24
Materiales y métodos	24
2.1. Localización y material vegetal	24
2.2. Extracción del aceite esencial por el método de hidrodestilación	24
2.3. Densidad del aceite	25
2.4. Índice de refracción	25

2.5.	Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.	26
2.5.1.	Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas columna apolar	26
2.5.2.	Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas columna de polaridad media	27
2.6.	Actividad antioxidante	28
2.6.1.	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres DPPH (2,2-difenil -1- picrilhidrazil).....	28
2.6.2.	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres ABTS (2,2-azinobis 3 etilbensotiazolina-6-acidosulfónico)	29
2.7.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	31
2.7.1.	Reactivación de cepas ATCC (American Type Culture Collection)..	31
2.7.2.	Preparación de las concentraciones del aceite esencial de <i>Piper barbatum</i> Kunth, <i>Thymus vulgaris</i> y citral	32
2.7.3.	Indicadores de control	32
2.8.	Método de dilución o micro-dilución en caldo	33
2.8.1.	Elaboración del inóculo bacteriano y fúngico	33
2.8.2.	Preparación del medio de cultivo	34
2.8.3.	Inoculación en placas	34
2.8.4.	Preparación y adición del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).....	35
2.8.5.	Evaluación de las placas	36
2.8.6.	Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	36

Capítulo 3.....	38
Resultados y Discusión	38
3.1. Obtención del aceite esencial mediante hidrodestilación.	38
3.2. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a masas.....	39
3.2.1. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a masas columna apolar	39
3.2.2. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a masas columna polaridad media	41
3.3. Determinación comparativa de la capacidad antioxidante entre los métodos del DPPH y ABTS	44
3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de dilución o micro-dilución en caldo	45
Conclusiones	53
Referencias.....	56
Anexos	67

Índice de tablas

Tabla 1. Datos generales	38
Tabla 2. Composición química columna DB1-MS del aceite esencial de las hojas de <i>Piper barbatum</i> Kunth.	39
Tabla 3. Composición química columna DB-Wax del aceite esencial de las hojas de <i>Piper barbatum</i> Kunth.	41
Tabla 4. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper barbatum</i> kunth comparado con el control positivo natural <i>Tymus vulgaris</i>	44
Tabla 5. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias y levaduras para cada aceite esencial.	46

Índice de figuras

Figura 1. Planta <i>Piper barbatum</i> Kunth. Quito - Ecuador.	5
Figura 2. Equipo de hidrodestilación tipo clevenger.	12
Figura 3. Microplaca del método de dilución o micro-dilución en caldo.	23
Figura 4. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper barbatum</i> Kunth comparado con el control positivo natural de <i>Thymus vulgaris</i>	45
Figura 5. Evaluación comparativa de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los diferentes aceites esenciales.	48
Figura 6. Análisis antimicrobiano de <i>Piper barbatum</i> Kunth.....	49
Figura 7. Análisis antimicrobiano de <i>Thymus vulgaris</i>	50
Figura 8. Análisis antimicrobiano del citral.....	51
Figura 9. Efectividad de los aceites esenciales frente a las bacterias Gram positivas, negativas y Levaduras..	52

Índice de anexos

Anexo 1. Hojas de <i>Piper barbatum</i> Kunth.	67
Anexo 2. Aceite esencial de <i>Piper barbatum</i> Kunth.	67
Anexo 3. Siembra en cajas Petri de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> en sus respectivos medios.	68
Anexo 4. Preparación del inóculo de bacterias y levaduras.	68
Anexo 5. Método de Dilución o micro-dilución en caldo.	69
Anexo 6. Cromatografía de gases acoplada a masas columna apolar.	69
Anexo 7. Cromatografía de gases acoplada a masas columna polaridad media.	70
Anexo 8. Curvas del porcentaje de inhibición DPPH vs. Concentración de <i>Piper barbatum</i> Kunth.	71
Anexo 9. Curvas del porcentaje de inhibición DPPH vs. Concentración del referente natural <i>Thymus vulgaris</i>	73
Anexo 10. Curvas del porcentaje de inhibición ABTS vs. Concentración de <i>Piper barbatum</i> Kunth.	75
Anexo 11. Curvas del porcentaje de inhibición ABTS vs. Concentración del referente natural <i>Thymus vulgaris</i>	77
Anexo 12. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias y levaduras para cada aceite esencial por el método de dilución o micro-dilución en caldo.	79

Resumen

En la presente investigación se evaluó la composición química y actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper barbatum* Kunth. La destilación se realizó con el equipo de hidrodestilación clevenger para la obtención del aceite, que fue analizado por cromatografía de gases acoplada a masas para caracterizar los componentes químicos. La actividad antioxidante se determinó mediante los métodos ABTS y DPPH empleando como patrón natural el aceite esencial de tomillo *Thymus vulgaris*. Los resultados evidenciaron que el aceite de *Piper barbatum* Kunth presentó baja capacidad captadora de radicales libres con (IC_{50} DPPH 51.47 ± 0.35 mg/mL; IC_{50} ABTS 127.83 ± 0.40 mg/mL) en comparación con el referente natural *Thymus vulgaris* con (IC_{50} DPPH 0.17 ± 0.005 mg/mL; IC_{50} ABTS 0.53 ± 0.24 mg/mL) que fue superior. La actividad antimicrobiana se efectuó por el método de dilución o micro-dilución en caldo, calculando la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en 10 cepas bacterianas y 2 levaduras, como controles se usaron los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, citral y los antibióticos eritromicina, gentamicina y como antimicótico clotrimoxazol. Los mejores resultados se obtuvieron en: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Candida albicans* ATCC 10231 con (MIC 132 μ g/mL), seguidos por *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con (MIC 264 μ g/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 con (MIC 528 μ g/mL).

Palabras clave: *Piper barbatum*, micro-dilución, MIC, actividad antioxidante, GC-MS.

Abstract

This research evaluated the chemical composition and biological activity of essential oil from the leaves of *Piper barbatum* Kunth. Distillation was carried out with the clevenger hydrodistillation equipment for obtaining the oil, which was analyzed by gas chromatography coupled to masses to characterize the chemical components. The antioxidant activity was determined by the methods ABTS and DPPH using as a natural pattern the essential oil of thyme *Thymus vulgaris*. The results showed that *Piper barbatum* Kunth oil presented low free radical collecting capacity with (IC50 DPPH 51.47 ± 0.35 mg/mL; IC50 ABTS 127.83 ± 0.40 mg/ml) compared with the natural reference *Thymus vulgaris* with (IC50 DPPH 0.17 ± 0.005 mg/ml; IC50 ABTS 0.53 ± 0.24 mg/ML) which was upper. The antimicrobial activity was performed by the method of dilution or micro-dilution in broth, calculating the minimum inhibitory concentration (MIC) in 10 bacterial strains and 2 yeasts, as controls were used essential oils *Thymus vulgaris*, citrate and antibiotics: erythromycin, gentamicin and as antifungal clotrimoxasol. The best results were obtained in: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Candida albicans* ATCC 10231 with (MIC 132 μ g/mL), followed by *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MIC 264 μ g/ml), *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 with (MIC 528 μ g/ml).

Key words: *Piper barbatum*, micro-dilution, MIC, antioxidant activity, GC-MS.

Introducción

Las especies vegetales como fuentes medicinales, han sido utilizadas desde épocas muy remotas en el tratamiento de enfermedades, la mayoría de éstas presentan múltiples efectos curativos, gracias a la presencia de principios activos a los que se les atribuye sus propiedades medicinales (Cuenca J. , 2013) generalmente se conoce sus usos ancestrales, a través de los relatos de los pueblos nativos, curanderos, jefes de tribus, etc. Existen evidencias que las antiguas culturas: egipcias, griega, persa, pakistaní, etc usaban estas sustancias como un medio para cuidar la salud física y mental. En la cultura persa las utilizaban para purificar el aire en los hospitales a través de la colocación de flores para limpiar el mal aire asimismo las esencias se aprovechaban como conservantes de alimentos por todas las propiedades preservantes que poseen (Loffreda, 2017).

El hombre las usó inicialmente a imitación de los animales guiados por su instinto después empíricamente y más tarde de forma más racional, conociendo sus propiedades terapéuticas de forma progresiva, con los avances tecnológicos en química analítica (Muñoz, 2012).

El uso de las plantas medicinales sigue siendo una alternativa terapéutica para tratar dolencias de cualquier origen sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde se estima que reside el 80 % de la población mundial (Cravotto, Boffa, & Genzini, 2010).

En la actualidad la necesidad de usar derivados de productos naturales ha llevado a que los aceites esenciales, sean fuentes de investigación e interés económico en el ámbito industrial principalmente, en campos como el alimenticio, cosmético y

farmacéutico con el fin de preservar la salud y cuidado se ha implementado la aromaterapia, fisioterapia, etc (Veloz T. , 2011).

Los aceites esenciales extraídos de diferentes órganos de la planta (hojas, corteza, cálices, tallos, frutos, semilla, inflorescencias, etc) presentan una diversidad de compuestos químicos (Scalvenzi, Yaguache, Cabrera, & Guerrini, 2016).

En el Ecuador se reconocen 26 zonas de vida que albergan la biodiversidad más abundante del planeta que corresponde al 0.17 % de la superficie mundial. La mayor diversidad biológica está en la zona andina con un 64 % del total de plantas registradas en el país, con una amplia variedad de especies vegetales medicinales, según (Cuenca J. , 2013) se estima que existen alrededor de 273 especies con potencial curativo, recalándose que en su mayoría son especies nativas. Dentro de este grupo de especies se encuentra *Piper barbatum* Kunth, conocida comúnmente como: cordoncillo, matico, matico verde o luto, presente en selvas tropicales o bosques nubosos ecuatorianos, colombianos, y peruanos con un mayor porcentaje en diversos sitios de Ecuador (Tropicos, 2018).

La investigación realizada por (Ordóñez, P; Vega, M; Malagón , O, 2006) menciona que *Piper barbatum* Kunth contiene: lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, esteroides, taninos y cumarinas lo que lleva a deducir que estos compuestos son los responsables de la actividad biológica y medicinal.

Según (Yue-Hu Wang, 2014) ha demostrado que los estudios realizados en 35 extractos de 24 especies presentaron 32 compuestos pertenecientes al género *Piper* con actividad citotóxica y antitumoral.

Tradicionalmente se han utilizado las hojas de *Piper barbatum* Kunth para tratar: dolores de estómago, artritis reumatoide, diarrea y otras infecciones generales

(Mgbeahuruike, 2017). En dicha especie los estudios de composición química y la actividad biológica son escasos, teniéndose como único referente la investigación realizada por (Vargas, 2003), en donde se reporta la presencia del 2 metoxi 4,5 metilen - dioxi - propiofena, α y β azarona y piperitona.

La presente investigación tiene como objetivo general: evaluar la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial proveniente de las hojas de la especie *Piper barbatum* Kunth (cordoncillo) y como objetivos específicos: caracterizar los componentes químicos totales presentes en el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth (cordoncillo) mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas. Evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial por los métodos espectrofotométricos: 2,2- azinobis - 3- etilbenzotioazolín - 6 - sulfónico (ABTS), 2,2 - Difetil 1 - picrilhidrazil (DPPH). Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial por la técnica de dilución o micro-dilución en caldo de 10 cepas bacterianas y 2 levaduras.

Para cada uno de los objetivos propuestos en esta investigación se realizarán las pruebas estadísticas correspondientes de acuerdo a los datos que se obtengan.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Información Botánica y Ecológica de la planta

La familia Piperaceae, generalmente se encuentra en forma de arbustos, hierbas, lianas de adaptaciones anuales o perennes, erectas o escandentes, aromáticos con tallos nudosos. Las hojas en su mayor proporción son alternas a veces opuestas, simples, sésiles o pecioladas, con un tamaño y forma variable (de ancho 8-15 cm. y 10-20 cm de largo) (Trindade, 2012). Sus flores pequeñas y numerosas, generalmente monoicas de forma variable con estambres que van de 2 a 6 cercanos a la base del ovario con filamentos libres y cortos, sus anteras contienen de 1 a 4 tecas ubicadas en forma lateral o apical, el gineceo contiene de 1 a 5 ovarios con 5 carpelos fusionados y 1 locular. Las inflorescencias de tamaño variable son foliares, terminales a menudo con espiga colgada, erecta, solitaria, umbelada o paniculada (Abe & Ohtani, 2013). El fruto es variado en forma de baya o drupa con un pericarpio fino y endocarpio endurecido, semilla pequeña, solitaria frecuentemente roja o amarilla.

La mayoría de plantas del género *Piper* son fáciles de reconocer en el campo por sus brotes nodosos, espigas de florescencias y hojas de típico olor "picante" o aromático de donde se obtiene el aceite esencial (Moreira, P.O, Kaplan, & Guimaraes, 2013).

La importancia ecológica de este género radica principalmente en la gran cantidad de especies se estima alrededor de 2.000 especies y más de 4.000 taxones reconocidos y descritos siendo de gran relevancia económica, medicinal y cruciales en su hábitat nativo (Ramírez, 2016). En América tropical se tienen alrededor de 700 especies de

las cuales 411 están en Ecuador y 134 son endémicas de gran importancia para la sobrevivencia de otras especies (Jorgensen, P; León, S., 1999). En el pasado se consideraba, que los bosques del sudeste de Asia albergaban mayor diversidad de plantas hay pruebas recientes que indican que los bosques neotropicales ubicados en América Latina presentan gran cantidad de plantas vasculares 85.000 plantas, motivo por el cual se pueden encontrar gran variedad de especies de este género.

Piper barbatum Kunth planta originaria del Norte de América del Sur (ver figura 1) comúnmente se lo conoce con varios nombres: cordoncillo, mucachaglla, pimienta, rabo de ratón, matico, matico verde o luto de acuerdo a cada país donde este localizado (Noriega, P; Taxo, A, 2018).

Planta *Piper barbatum* Kunth



Figura 1. Planta *Piper barbatum* Kunth. Quito - Ecuador.
Fuente: (Noriega, P; Taxo, A, 2018).

Son especies de habitat nativo pueden ser herbáceas o trepadoras algunas crecen como arbustos o pequeños árboles tienen una distribución pantropical por lo que se

las localiza con mayor proporción y diversidad en el mundo, ya sea en selvas tropicales o bosques nubosos (Moreira, P.O, Kaplan, & Guimaraes, 2013).

La clasificación botánica para *Piper barbatum* Kunth es:

Clase: Equisetopsida C. Agardh
Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht
Superorden: Magnolianaes Takht
Familia: Piperaceae Giseke
Género: *Piper* L.
Orden: Piperales Bercht. & J. Presl
Especie: *Piper barbatum* Kunth (Tropicos, 2018).

1.2. Usos ancestrales y etnobotánicos

Desde la antigüedad el género *Piper* ha sido utilizado por el hombre en actividades místicas, culturales, y en medicina popular para tratar muchas enfermedades (Jaramillo, M.A; Manos, P.S., 2001).

Muchas especies de este género están siendo utilizadas con fines medicinales, basados en un conocimiento ancestral (Muñoz, 2012), entre estas se tiene: *Piper puvinervulum* C. DC., sus hojas son utilizadas por los indígenas amazónicos del sur del Ecuador para problemas gástricos, reumáticos, antiinflamatorios y para contrarrestar mordeduras de serpientes (Noriega P. , y otros, 2016), *Piper holtonii* utilizado para la fiebre y la malaria en Colombia (Brú, J; Guzman, J.D., 2016), *Piper umbellatum* se emplea en Brasil como antiinflamatorio, en Perú para fiebres y en Cuba para heridas, *Piper cavalcantei*, usado por nativos de la Amazonía para obtener un efecto antipirético y analgésico (Cáceres, A; Kato, M.J., 2014), *Piper marginatum*

utilizado por las comunidades indígenas en América Central para: afecciones gastrointestinales, daño de la vesícula, enfermedades del hígado y como antiespasmódico (Takeara, Goncalves, Ayres, & Guimarães, 2017).

Tradicionalmente se ha utilizado las hojas de *Piper barbatum* Kunth para tratar: artritis reumatoide, dolores e inflamaciones estomacales, dolor de cabeza, desinfectante de heridas (Mgbeahuruike, 2017) dermatitis, hemorragias uterinas, lavados vaginales (Noriega, P; Taxo, A, 2018) diarreas, como antiparasitarios, laxantes, antifúngico, antimicrobiano, actividad citotóxica, para limpieza de malas energías y su eficacia se ha atribuido a sus compuestos bioactivos (Moreira, P.O, Kaplan, & Guimaraes, 2013).

1.3. Estudios químicos del género *Piper*

La presencia en gran proporción de la familia Piperaceae en América Latina ha facilitado la investigación de ciertas especies, de las cuales se ha recopilado importante información de compuestos químicos asociados específicamente con las actividades metabólicas y biológicas responsables de la acción medicinal con enfoque en la industria farmacéutica (Loffreda, 2017). Los diversos compuestos químicos son extraídos de diferentes órganos los que están constituidos principalmente por hidrocarburos monoterpénicos: α -pineno, mirceno, limoneno, α -terpineno, p - cimeno, monoterpénoides oxigenados: 1,8 cineol, linalool, terpinen- 4 ol, borneol, alcanfor, hidrocarburos sesquiterpénicos: β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, α -cubebene, sesquiterpenoides oxigenados: spathulenol, nerolidol (E), óxido de cariofileno, α -cadinol, epi- α -bisabolol y fenilpropanoides: safrol, dillapiole, miristicina, elemicina, asarona (Z), eugenol (Ordóñez, P; Vega, M; Malagón , O, 2006).

Se destacan muchos estudios de este género como menciona (Noriega P. , y otros, 2016) en *Piper puvinervulum* C. DC, se obtuvieron 44 constituyentes químicos dentro de los cuales: β -cariofileno, isoeugenol-metil éter, asarona y el nerolidol fueron los mayoritarios resaltando la actividad antioxidante y antimicrobiana. *Piper divaricatum* (Barbosa & da Câmara, 2012) y *Piper auritum* (Diego, 2012) presentan un elevado contenido de safrol y una buena actividad antimicrobiana y antifúngica, en *Piper holtonii* determinaron que el compuesto químico apiol es el responsable de la eficacia en la actividad antifúngica.

Los estudios químicos realizados por (Vargas, 2003) en *Piper barbatum* Kunth son basados principalmente en la extracción de aceite esencial de las hojas donde se determinó un alto contenido de arilpropanoides, 2 metoxi 4,5 metilendioxi propiofenona con 29.5 %, α -asarona con 14.1 %, apiole con 8.9 %, *p*-asarona con 9.4 %, metoxi - 4, isómero de 5 - metilendioxi propiofenona con 10.9 % y isolemicina (Z) con 9.5 %. De esta investigación es necesario manifestar que realizaron solo el reconocimiento químico pero no se menciona específicamente la función de cada uno de ellos.

1.4. Estudios de actividad biológica del género *Piper*

Los diversos compuestos químicos presentes en los aceites esenciales desarrollan una serie de actividades biológicas (antimicrobiana - antifúngica). Según (Yue-Hu Wang, 2014) ha demostrado que los estudios realizados en los 35 extractos de las 24 especies analizadas, ha determinado 32 compuestos químicos presentes en plantas del género *Piper* los cuales poseen actividad citotóxica y antitumoral donde el 53 % está representado por alcaloides: amida, piplartina (piperlongumina) como principio

activo prometedor siendo tóxico para docenas de líneas celulares cancerosas y extraordinario en actividad in vivo.

La investigación realizada por (Da Silva, 2017) resalta el potencial biológico del género *Piper* como agente antimicrobiano en hongos, bacterias y antiprotozoario en *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. y *Trypanosoma* spp., a su vez inhibición de acetilcolinesterasa, como antiinflamatorio y citotóxico contra diferentes líneas de células tumorales (mama, leucemia, melanoma gástrico, etc).

El análisis realizado por (Calderón & Romero, 2010) evaluaron 94 extractos de 86 plantas de 68 géneros y 39 familias donde el 49 % de las especies más activas corresponden al género *Piper* entre las que destacan *Piper barbatum* Kunth, *Piper holtonii*, *Piper gaudichaudianum*, *Piper aduncum*, etc, determinando una buena correlación en actividades antiparasitarias de *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*.

El ensayo de citotoxicidad que llevó a cabo (Calderón A. , 2006) empleó extractos de diferentes plantas para medir la actividad usaron líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano. Como resultado en el extracto de *Piper barbatum* Kunth se determinaron 14 compuestos químicos de los cuales 3 de estos fueron los más importantes para cada línea celular en el caso del 2 farnesil - 1,4 - benzoquinona observaron muy buena actividad en el cáncer de mama (MCF-7 GI50 $\frac{1}{4}$ 1.8 mg = mL), el 2 farnesylhydroquinone con buena actividad para el cáncer de pulmón (H-460 GI50 $\frac{1}{4}$ 4.8 mg = mL) y dictyochromenol eficaz para el cáncer del sistema nervioso central (SF- 268 GI50 $\frac{1}{4}$ 3.5 mg = mL).

1.5. Aceites Esenciales

Las plantas aromáticas y medicinales originan una gran variedad de productos naturales, el uso de los aceites esenciales se remonta desde tiempos muy antiguos, el primer reporte de sus beneficios surge hace unos 1.550 años A.C. (Cuenca J. , 2013), con las culturas egipcias, griegas, romanas, persas, etc, estas las empleaban para conservar alimentos, embalsamar a los muertos, aromaterapia, salud física y mental, ritos religiosos, repelente de insectos, controlador de plagas, etc (Scalvenzi, Yaguache, Cabrera, & Guerrini, 2016).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos casi incoloros que se obtienen como producto final del metabolismo secundario de las plantas almacenados en diferentes segmentos como en vesículas secretoras o glándulas en el interior de los tejidos de las hojas, flores, semillas, ramas, corteza, frutos, raíces y madera. Son mezclas complejas de composición variada presentan ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua (Acevedo, Navarro, & Monrroy, 2013).

Los componentes activos presentes en los aceites esenciales son normalmente fracciones líquidas volátiles, hidrofóbicos y muy lábiles se distribuyen en las diferentes estructuras proporcionándole aroma, sabor y protección a las plantas superiores, sus mecanismos de defensa química contra insectos, hongos, depredadores, etc. Incluso para corregir cualquier lesión o daño interno generalmente la producción de esta sustancia va de 0.5 a 0.6 % debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas y de gran interés industrial (Torres, Velandia, & Murcia, 2013).

Las propiedades antimicrobianas de algunos segmentos vegetales como: el orégano, tomillo, jengibre, romero, cilantro, cebolla y ajo, se debe a la presencia o del eugenol o del aldehído cinámico y oleorresinas compuestos que han confirmado la inhibición en el crecimiento de un amplio rango de bacterias, hongos, parásitos y virus (Yue-Hu Wang, 2014).

Para extraer el aceite esencial de muestras vegetales se pueden utilizar varios métodos físicos y químicos (Noriega, 2009) como: hidrodestilación, destilación de vapor de agua, expresión, extracción con solventes volátiles (acetato, etanol, y cloruro de etileno), enfleurage y flúidos supercríticos.

Al método más usado para la destilación de aceites esenciales se lo conoce como: *destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre o hidrodestilación* donde la muestra es encerrada en una cámara con una corriente de vapor de agua sobrecalentado, el aceite arrastrado es recolectado y separado de la fracción acuosa se la utiliza especialmente para esencias fluidas (perfumería) (Canella, 2016). A nivel industrial es muy usado ya que no necesita tecnología sofisticada.

En el *método de expresión* se extrae del material vegetal el aceite se lo recolecta y filtra se usa generalmente para extraer esencia de cítricos (Martinez, 2003). En *la extracción con solventes volátiles*, se toma la muestra seca y molida se coloca los solventes, estos solubilizan la esencia y extraen otras sustancias como: grasas y ceras obteniendo una esencia impura. Se lo usa a nivel de laboratorios pues a nivel industrial resulta costoso por los solventes que se necesitan.

Equipo de hidrodestilación tipo cleveger



Figura 2. Equipo de hidrodestilación tipo cleveger.
Elaborado por: La autora, 2018.

El enflorado o enfleurage las flores se colocan con aceite vegetal que actúa como vehículo extractor y la solubiliza se obtiene una mezcla de aceite esencial y vegetal separada por otros medios fisicoquímicos se emplea para esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc). *La extracción con fluidos supercríticos* es un método actual el material vegetal molido o licuado se empaca en una cámara de acero inoxidable donde circula a través de un líquido supercrítico (dióxido de carbono líquido) los aceites se solubilizan y se arrastran el solvente es eliminado por descompresión (Canella, 2016).

La presencia de diferentes compuestos volátiles en el aceite esencial son analizados por el mercado internacional debido a su gran importancia económica principalmente para las industrias farmacéuticas, cosméticas y de productos de limpieza, entre otras aplicaciones (Acevedo, Navarro, & Monrroy, 2013).

1.6. Actividad antioxidante en aceites esenciales

Los antioxidantes son moléculas que tiene la capacidad de: retrasar, impedir, inhibir las oxidaciones catalíticas y los procesos que involucran la formación de radicales libres (Castillo, 2012). El déficit de estos, provocan “estrés oxidativo” desencadenando desequilibrio celular causante de muchas enfermedades degenerativas entre estas tenemos: aterosclerosis, cáncer, envejecimiento, diabetes, parkinson, etc (Carhuapoma, Bonilla, Suarez, Vila, & G., 2014). Los principales factores que contribuyen a esta degradación son: tabaquismo, malos hábitos alimenticios, sedentarismo, ansiedad, alcohol, rayos ultra violeta, estrés, depresión, medicamentos, contaminación y pesticidas (Environmental Health Science, 2012) formando parte de una problemática de salud pública. Entre las principales sustancias con propiedades antioxidantes se encuentran carotenos, aminoácidos, α -tocoferol, β -caroteno, polifenoles, carotenoides, glucosinolatos, ciertos compuestos azufrados, ácido ascórbico, hidroxibutiltolueno (BHT), hidroxibutilanisol (BHA), extractos de plantas y/o sus aceites esenciales (Zapata, Cortes, & Rojano., 2013).

Los aceites esenciales en los últimos tiempos son de gran interés y objeto de un sinnúmero de estudios debido a las propiedades antioxidantes que presentan, el uso de estas características están siendo utilizadas en el campo alimenticio y cosmético puesto que un buen segmento de consumidores buscan alimentos y productos de cuidado personal exentos de derivados y aditivos de síntesis química como: insecticidas, fungicidas, fertilizantes, pesticidas, colorantes, antioxidantes, saborizantes, neutralizantes, etc (León Méndez, Osorio, Fortich, Torrenegra, & González, 2015).

1.6.1. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

En la actualidad existen numerosos métodos para medir la capacidad antioxidante ya sea de una mezcla, alimento o componente siendo un factor importante el microambiente en que se encuentran éstos ya que pueden interactuar entre si provocando efectos inhibitorios y sinérgicos (Moreira & Mancinii Filho, 2003). En general los métodos más usados se pueden clasificar como: directos (CARO) “Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno” (CRHF) “Capacidad para Reducir el Hierro Férrico, o conocido en inglés cómo (FRAP) “Ferric Reducing Antioxidant Power”, indirectos (DPPH) 2,2-Difenil-1- picril hidrazilo, (ABTS) ácido 2,2, azino - bis (3 - etilbenzotiazolin) - 6 - sulfónico, (DMPD) diclorhidrato de N, N-dimetil - fenilendiamina o de acuerdo con el mecanismo mediante se da el proceso antioxidante el β -caroteno “bleaching (BCB) test” (Tovar, 2013). En los métodos directos e indirectos se emplean varios compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) que son sustancias que poseen un fuerte poder de tinción que se fijan sobre la superficie de las partículas estos compuestos son usados para determinar la capacidad fenólica y captar los radicales libres causantes de los efectos dañinos que generan los procesos de oxidación ocasionadas por los EROS (especies reactivas de oxígeno).

1.6.2. Métodos directos

1.6.2.1. Método CARO “Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno”

Se fundamenta en medir el grado de inhibición producto de la oxidación del peróxido de hidrógeno siendo este uno de los cuatro radicales libres más comunes. El AAPH (2,2 - azobis (2- amidinopropano dihidrocloruro) genera dicho radical producto de la

descomposición térmica que forma nitrógeno molecular y radicales de alquilo, al estar presente el oxígeno produce radicales peroxilo estos reaccionan con una sonda fluorescente formando un producto no fluorescente o incoloro (Castañeda, E., & L., 2008). La reacción que genera los radicales peroxilo conjuntamente con el antioxidante da como resultado un producto no radicalario. En este método se usa fluoresceína como sonda durante periodos mayores a 30 minutos de esta manera se garantiza la estabilidad de la reacción (Agudo, 2010).

1.6.2.2. Método del CRHF o FRAP “Capacidad para Reducir el Hierro Férrico”

Este método fue usado principalmente para medir el poder reductor del plasma, sus primeras aplicaciones fueron desarrolladas por Benzie y Strain posteriormente se las uso para evaluar la capacidad antioxidante en diversos productos nutracéuticos y fitoterapéuticos. La reducción de estos radicales libres inducen a la pérdida o aparición de una sustancia que al estar en contacto con el 2, 4, 6 Tripiridiltriazina Férrica (TPTZ) detecta compuestos con potenciales redox (Londoño, 2014).

1.6.3. Métodos indirectos

1.6.3.1. Método del DPPH 2,2-Difenil -1- picril hidrazilo

Fue desarrollado por (Brand, Cuvelier, & C., 1995) es la capacidad que tiene el antioxidante para mantener en equilibrio el radical DPPH que es un electrón desapareado de color azul violeta convirtiéndose en amarillo pálido producto de la reacción. La evaluación de la capacidad antioxidante se la realiza por espectrofotometría UV-Vis cuya longitud de onda es 517 nm. La diferencia de

absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Ronquillo & Galarza, 2016). El cálculo del porcentaje de inhibición del DPPH se realiza con los valores de las absorbancias obtenidas mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Captacion radical libre} = \frac{[1 - (A2 - A3)]}{A1} \times 100$$

Dónde:

A1=Absorbancia del patrón de referencia

A2= Absorbancia de la muestra

A3= Absorbancia del blanco de muestra (Ronquillo & Galarza, 2016).

1.6.3.2. Método del ABTS ácido 2, 2 azino-bis (3 - etilbenzotiazolin) 6 - sulfónico

Se basa en la capacidad que tiene un antioxidante para estabilizar el radical ABTS producto de la reacción de la oxidación del mismo con una enzima metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados se determinan por espectrofotometría UV-Vis a 342 nm expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Granados, Yanez, & Santafe, 2012).

1.7. Actividad antimicrobiana en aceites esenciales

Desde la antigüedad, se ha usado sustancias químicas derivadas de productos naturales para combatir un sinnúmero de enfermedades infecciosas. El matico para inflamaciones dérmicas y urinarias, el jengibre usado para proteger el sistema inmune, el clavo de olor para infecciones dentales, el ajo usado por su actividad antibacterial. Del mismo modo muchos aceites esenciales como el tomillo han permitido tratar infecciones causadas por: cocos, enterococos, neumococos, estafilococos y estreptococos involucrados en la mayoría de enfermedades de la

población principalmente en afecciones intestinales, respiratorias, abdominales, etc (Informe21.com, 2015).

Actualmente muchas especies de plantas aromáticas son fuente principal de productos etnofarmacológicos debido a que contienen diversas sustancias aisladas de sus aceites esenciales con importante actividad biológica (antimicrobiana y antifúngica) como: el eugenol (clavo de olor), el citral (limoncillo), aldehído cinámico (canela), y el timol (tomillo) (Rosas & López, 2011). En los últimos años el aumento de enfermedades y resistencia antimicrobiana ocasionadas por el mal uso de antibióticos está generando la necesidad de buscar medicamentos de derivados naturales (moléculas bioactivas) y nuevas alternativas de tratamiento con una tendencia de volver a las costumbres ancestrales para la cura de enfermedades. Los estudios microbiológicos son fundamentales para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales ya que estos métodos (difusión de disco, dilución o micro-dilución de caldo y bioautografía) (Elizari, 2013) permiten evaluar la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano y así identificar a qué microorganismos son sensibles o resistentes. Los efectos que producen los antimicrobianos en pequeñas cantidades sobre los gérmenes son microbiocidas (bactericidas, fungicidas) o microbiostáticos (bacteriostático, fungistático) (Lizcano & Vergara, 2008).

1.8. Microorganismos patógenos

A mediados del siglo XVII, Anton Van Leewenhoek realiza las primeras observaciones de seres vivos muy diminutos que no pueden ser visibles al ojo humano por lo que los denomina “microorganismos”. Estos constituyen un grupo sumamente

heterogéneo y abundante en nuestro planeta puesto que se los puede encontrar en todos los ambientes como: agua, suelo, aire e interactúan de manera continua con el medio y diversas formas de vida como: el ser humano, animales y plantas (Brooks, Carroll, Butel, & Morse, 2008). De este amplio grupo se tiene los microorganismos “beneficiosos” los cuales ayudan a un correcto funcionamiento del organismo protegiendo de un excesivo crecimiento de patógenos y de muchas infecciones y fortaleciendo las defensas (Díaz, Rodríguez, & Zhurbenko, 2010). Al contrario de los denominados “patógenos” que son capaces de provocar enfermedades en el organismo ya que infectan las células, se reproducen, las matan, o bien se alimentan de ellas, el contagio puede generarse por dos vías directas: piel, mucosas, uñas, vía parental y sexual etc, o por vías indirectas: aire, agua y animales.

1.8.1. Bacterias Gram positivas

Staphylococcus epidermidis, pertenece a la familia Staphylococcaceae se presentan en forma de coco o en asociación en racimos irregulares, son aerobios facultativos pueden ser comensales inofensivos o patógenos invasores (Fariña, y otros, 2013). Asociados principalmente a infecciones en superficies cutáneas, mucosas y al uso de dispositivos protésicos (catéteres, válvulas cardiacas, prótesis ortopédicas, etc) ya que tiene la capacidad de formar biopelículas para adherirse a dichos dispositivos (Rabionet, Vivar, Mancl, Bennett, & Shenefelt, 2016). *Listeria grayi*, de la familia Listeraceae son cocoides cortos o regulares, sin ramificaciones, no esporulados, anaerobios facultativos se los puede encontrar en disposición individual o en cadenas cortas. Ampliamente distribuidas en el medio ambiente se las puede aislar del suelo, barro, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, alimentos frescos y procesados (leche no procesada y queso), residuos de mataderos, en el tracto digestivo y en las heces de humanos y animales pueden ser esporádicos o

epidémicos. Relacionados principalmente con listeriosis enfermedad causada por transmisión directa con alimentos contaminados (pollo fresco o congelado, pavo, setas y vegetales frescos, etc). En personas adultas provoca bacteriemia o meningoencefalitis, en mujeres embarazadas una amnionitis e infección fetal, aborto, alumbramiento de un niño muerto o parto prematuro (Enciclopedia, 2018). *Streptococcus mutans* corresponde a la familia Streptococcaceae se presentan en forma de cocos dispuestos en cadena, su hábitat natural es la cavidad oral donde se adhieren muy cerca de la superficie del diente principal causante de caries dentales, bacteremia y endocarditis infecciosa puesto que tiene la capacidad de formar biopelículas , adherirse y soportar fluctuaciones del pH e incrementar la acidificación y desmineralización de la superficie del diente (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013). También se puede mencionar a *Streptococcus pyogenes* que es el causante de la fiebre reumática, y una de las causas son las caries dentales. *Micrococcus luteus* de la familia Micrococaceae de forma esférica distribuida en tétradas se encuentran en el agua y el suelo pueden crecer en ambientes hostiles con poca agua o con altas concentraciones de sal, son comensales, oportunistas, viven en la piel humana (en el sudor causante del mal olor) se las puede aislar de la cerveza y de productos lácteos de origen animal. Afecta particularmente a pacientes con inmunodeficiencia (enfermos de VIH) implicados en infecciones pulmonares, shock séptico, bacteremia, endocarditis, meningitis, artritis séptica, es difícil identificar este tipo de infecciones puesto que este se encuentra en la microflora cutánea (Brooks, Carroll, Butel, & Morse, 2008). *Enterococcus faecalis* pertenece a la familia Enterococcaceae son cocos esféricos u ovoides están en pares o de cadenas cortas, son inmóviles, anaerobios facultativos, fermentan la glucosa sin producir gas, muy resistentes a temperaturas y condiciones adversas (procesos térmicos, congelación, desecación,

niveles letales de sales biliares, detergentes, etc), son oportunistas para los humanos ya que pueden transmitirse de una persona a otra en el hospital (contacto directo con instrumentos clínicos, manos de los trabajadores de la salud). Generalmente se presentan cuando el huésped se encuentra inmunodeprimido provocando infecciones del tracto urinario, endocarditis, alteraciones en el sistema nervioso central, bacteriemias, septicemia, infecciones de heridas quirúrgicas, abscesos intraabdominales y pélvicos, infecciones de piel (en tejidos blandos, neonatales y pediátricas) (Pérez, Martínez, & Zhurbenko, 2010). *Staphylococcus aureus* corresponde a la familia Staphylococcaceae en forma de cocos se encuentran en agrupaciones de racimos irregulares son aerobios facultativos presentan gran capacidad de adaptación (afectan a mamíferos y roedores) se encuentran en superficies cutáneas, mucosas, tracto gastrointestinal y urogenital, heridas infectadas, quemaduras, aire, leche, huevos, productos cárnicos, equipos de procesamiento de alimentos, agua potable y residual, presentan elevada resistencia a muchos antibióticos sobre todo a la meticilina (García, González, & Schettino, 2014). Dentro de este grupo son los más virulentos asociados con muchas enfermedades como: bacteriemia nosocomial, infecciones en el torrente circulatorio, intoxicaciones por alimentos (capacidad del patógeno de producir enterotoxinas), foliculitis, forunculitis, endocarditis, abscesos, septicemias, meningitis y neumonías (Guadalupe Socorro, Héctor Avalos, & Marisela Yadira, 2014).

1.8.2. Bacterias Gram negativas

Escherichia coli de la familia Enterobacteriaceae es un bacilo anaerobio facultativo, no esporulante, mesófilo, capaz de resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas. Sus mecanismos de adhesión mediante fimbrias que les permite colonizar e infectar de forma específica un receptor celular con la ayuda de

una proteína (intimina) de su membrana externa. Existen numerosos patotipos que corresponden a poblaciones de la misma especie que difieren por su capacidad patogénica, causantes de muchas enfermedades de relevancia y mortalidad humana como: gastroenteritis infantil, diarrea sanguinolenta, insuficiencia renal, infecciones urinarias que ocurre especialmente en niños pequeños y ancianos (Chalar, Mamani, Elmer Vargas, & Romero, 2014). *Proteus vulgaris* pertenece a la familia Enterobacteriaceae tienen forma de bacilos, con flagelos, son aerobios y anaerobios facultativos. Están presentes en abonos, aguas contaminadas, muestras de animales y forman parte de la microbiota intestinal. Afectan principalmente al tracto urinario provocando infecciones urinarias, pielonefritis aguda, cálculos de la vejiga y el riñón, urolitiasis e infecciones nosocomiales sobre todo en pacientes con diagnósticos de diabetes e inmunodeprimidos y que estén en cuidados intensivos (Cantóna, Sánchez, & Morosini, 2006). *Pseudomona aeruginosa* corresponde a la familia Pseudomonadaceae, bacilos, aeróbios, con motilidad unipolar, patógeno oportunista en humanos y plantas produce una variedad de pigmentos como azul verdoso (piocianina), amarillo verdoso (fluoresceína) y rojo pardo (piorrubina) (Ochoa, y otros, 2013). Constituye uno de los microorganismos más problemáticos con elevados índices de mortalidad de los de su grupo, causantes de un sinnúmero de infecciones como: neumonía o bacteriemia estas infectan pulmones, sangre, piel, huesos, oídos, ojos, sistema urinario, válvulas cardíacas. En su gran mayoría, las infecciones se dan en ambientes hospitalarios (localizados en vertederos, tuberías de agua, manos de trabajadores de la salud, respiradores, duchas, humidificadores, piscinas de hidroterapia, etc) (Roca & Luján, 2014). *Klebsiella oxytoca* de la familia Enterobacteriaceae de forma redondeada con y sin cápsula, no presenta endoesporas, inmóviles ya que carece de flagelo, anaerobios facultativos, forman ácidos fuertes

para su metabolismo puesto que están involucrados en la fermentación de carbohidratos, son oportunistas. Se encuentran normalmente en la boca, nariz, tracto gastrointestinal del hombre y de muchos animales, también están presentes en: suelo, agua, ambientes acuáticos, en procesos de obtención de caña de azúcar, acabado de textiles, residuos de fábricas de papel, etc. Causantes de un sinnúmero de enfermedades del tracto urinario, septicemia, neumonías, infecciones del torrente sanguíneo, sepsis (infección daña órganos y tejidos) (Lavan Singh, MP Cariappa, Mandeep Kaur., 2016).

1.9. Levaduras

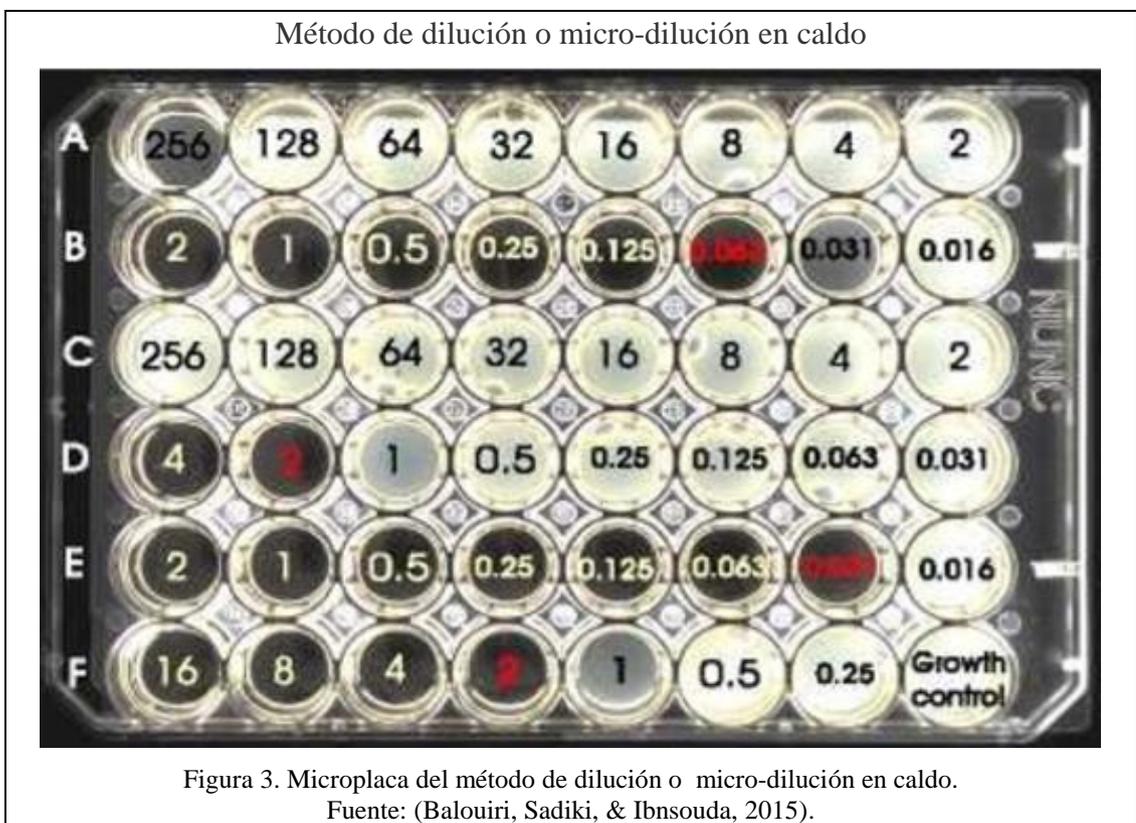
Candida albicans pertenece a la familia Saccharomycetaceae es dimórfico esta característica le permite esquivar el mecanismo de defensa del huésped e infectarlo en nuestro organismo se encuentra en: piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal, genitales y heces. Se las considera como una de las especies más patógenas provocando afecciones como: candidiasis, uretritis, vaginitis, problemas para tragar, llagas en la boca, etc (Sanabria, R; Samudio, M; Fariña, N; Laspina, F; Figueredo, L; Aguilar, G; Espínola, C., 2014).

Candida tropicalis es muy común en poblaciones de países tropicales su virulencia afecta a diversos sistemas del cuerpo como: gastrointestinal provocando dolor abdominal, gases, diarrea, estreñimiento, indigestión, sensibilidad repentina o intensa a los alimentos y alergias.

1.10. Método de dilución o micro-dilución en caldo

Permite la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana con el uso de microplacas con 96 pocillos. Este método evalúa la “Concentración Mínima Inhibitoria” (MIC) ya sea de un extracto de planta, aceites esenciales, antibióticos,

etc. La metodología se basa en determinar una concentración específica del compuesto activo y mezclarlo con una cantidad de medio de cultivo líquido (100 μL) acompañado de inóculo microbiano (100 μL) (Scalvenzi, y otros, 2017). La interpretación de los resultados se realiza con indicadores de color (cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y resazurina que son utilizados para analizar el crecimiento/viabilidad microbiana presentando una coloración (rojo intenso) como respuesta negativa de inhibición (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015).



Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Localización y material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el Parque Metropolitano de “La Armenia” ubicado en el valle de los chillos de la ciudad de Quito en la Parroquia Conocoto con las siguientes coordenadas geográficas: Latitud: -0.283333, Longitud: -78.4667, Altitud 2537 m.s.n.m. La autora, 2018.

La investigación se realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.2. Extracción del aceite esencial por el método de hidrodestilación

El proceso de extracción del aceite se llevó a cabo utilizando el equipo de hidrodestilación tipo clewenger, donde se procede a pesar 100 g de las hojas de *Piper barbatum* Kunth (ver anexo 1) se las cortó en pequeños pedazos y se las introdujo en el balón redondo de destilación, cubriendo el material vegetal con 300 mL de agua destilada durante dos horas. El destilado como se observa en la (Figura 2) fue recolectado y separado de la fracción acuosa colocando 0.65 g de sulfato de sodio anhidro, para retirar fracciones de agua finalmente fueron almacenados en frascos ámbar a 4 °C hasta la realización de los respectivos análisis como se observa en el (anexo 2) (Canella, 2016).

El porcentaje del rendimiento del aceite se calculó:

$$\% = \frac{\text{gramos de aceite esencial}}{\text{gramos de material vegetal}} \times 100$$

Pesando respectivamente el aceite que se obtuvo en cada destilación. (Noriega, 2009).

2.3. Densidad del aceite

Se determinó mediante el método del picnómetro de 1mL previamente calibrado para lo cual se procede a pesar el picnómetro vacío, luego el picnómetro con agua destilada y finalmente el picnómetro con el aceite esencial en estudio, en la balanza analítica M 1204 Mettler Toledo se anota la masa de cada uno. Este proceso se lo realiza por triplicado los datos que se obtiene se lo interpreta (Paucar, Salvador, Guillén, Capa, & Moreno, 2015) mediante la siguiente fórmula:

$$Densidad = \frac{\text{peso del picnómetro con el aceite esencial} - \text{peso del picnómetro vacío}}{\text{peso del picnómetro con agua destilada} - \text{peso del picnómetro vacío}}$$

2.4. Índice de refracción

La prueba se realizó utilizando un refractómetro marca Atago Nar it Liquid con la ayuda de un capilar se depositó 0.1 mL de aceite sobre el prisma del refractómetro y se procedió con la lectura a 20 °C (León, Osorio, & Martínez, 2015). Se lo realizó por triplicado los datos de las mediciones fueron interpretados mediante la siguiente fórmula:

$$IR = (IR_{obs} + fact. correc) \times (T_{obs} - 20^{\circ}C)$$

Siendo: IR_{obs} = Índice de refracción observado en el refractómetro

$fact. correc$ = factor de corrección

T_{obs} = Temperatura a la cual se observó

2.5. Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Los estudios de composición química se realizaron empleando dos sistemas de columnas cromatográficas, la primera con una columna apolar y la segunda con una columna de polaridad media.

2.5.1. Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas columna apolar

Para el análisis de la composición química del aceite se empleó un equipo de cromatografía de gases acoplada a masas GC-MS de modelo EVOQ 436 GC - TQ Select EI marca Bruker DB5 cuyas condiciones fueron: frecuencia de corriente alterna: 50/60 Hz, voltaje: 100 - 240 V, horno con una rampa de calentamiento: 170 °C/ minuto, control electrónico de flujo (EFC) con 3 canales con resolución de 0.001 psi, capacidad para 100 muestras, con 2 Inyectores: detector y detector de espectro de masas (MS), columna apolar marca Zebron ZB-5MS con una longitud de 30 m, espesor: 0.25 mm, ancho de película: 0.25 µm, temperatura máxima: 325 °C a 350 °C (Noriega P. , y otros, 2015). La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas en cada tiempo de retención con los reportados en la base de datos EI- MS librería comercial NIST.

Se realizó una dilución (1:10) donde se tomó 100 µL del aceite con 1000 µL de diclorometano y se colocó en un vial ámbar finalmente se inyectó en el equipo GC-MS para su análisis durante 90 minutos. Para la cuantificación de los principales componentes químicos presentes en el aceite se comparó los Índices de Kovats (IK) experimentales con los teóricos encontrados en el libro “Identificación de

componentes de aceites esenciales por cromatografía gaseosa a espectrometría de masas” (Adams, 2007).

2.5.2. Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas columna de polaridad media

Los componentes químicos del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth fueron analizados en un equipo de cromatografía gaseosa acoplada a masas GC – MS marca Varian 3900 acoplado a un espectrofotómetro de masas Varian modelo Saturn 2100, con las siguientes especificaciones: temperatura de horno: 45 °C a 1 °C/min o 250 °C a 5 °C/min, flujo de helio (1 mL/min), inyección modo split 1:50, columna de polaridad media marca Thermoscientific TG-Wax Ms con una longitud de 30 m, espesor: 0.25 mm, ancho de película: 0.25 µm, temperatura máxima: 250 °C a 260 °C (Noriega P. , y otros, 2015). El espectrofotómetro de masas Saturno 2100 cuenta con las siguientes características: voltaje: 70 V, corriente de emisión: 10 µAmp, velocidad de barrido: 1barrido /min, rango de masas: 35 a 400 Da, temperatura trampa: 220° C, temperatura de línea de transferencia: 260 °C.

Se realizó una dilución (1:10) donde se tomó 100 µL del aceite con 1000 µL de diclorometano y se colocó en un vial ámbar finalmente se inyectó en el equipo GC-MS, para su análisis durante 90 minutos. La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas en cada tiempo de retención con los reportados en la base de datos EI- MS librería comercial NIST.

2.6. Actividad antioxidante

2.6.1. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres DPPH (2,2difeníl -1- picrilhidrazil)

Se preparó una solución de DPPH (1×10^4 molar en alcohol al 96% en moles /mL) esta solución se depositó en un frasco ámbar y se lo dejó en refrigeración un día antes de realizarse el análisis. A su vez se prepararon diluciones en frascos ámbar en diferentes concentraciones de los aceites (*Thymus vulgaris* y *Piper barbatum* Kunth) desde: 0 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 90 μ L y 100 μ L y fueron completados con DMSO (dimetilsulfóxido) para obtener un volumen final de 100 μ L. De la solución de DPPH se tomó 2.8 mL y se añadió a las disoluciones con los aceites (*Thymus vulgaris* y *Piper barbatum* Kunth) estas fueron puestas en agitación por 30 minutos (Chen, Wang, Rosen, & Ho, 1999). Para la determinación de esta prueba se usó el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. el cual fue encerado con agua destilada luego se colocó en celdas de plástico las soluciones y se obtuvo las absorbancias respectivas de cada aceite, la medición se realizó cuatro veces para cada uno.

La actividad antioxidante del DPPH se cuantificó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100$$

Dónde:

Ab: absorbancia del blanco (agua destilada)

Aa: es la absorbancia de las muestras.

Al calcular el porcentaje de inhibición de los aceites se puede obtener las curvas (en el eje Y el porcentaje de inhibición vs. el eje X la concentración) determinando de esta manera el IC₅₀ (concentración a la cual se inhibe el 50 % de la capacidad captadora de los radicales libres) de la oxidación de DPPH para lo cual se realizó una regresión lineal de cada aceite esencial.

La actividad captadora de radicales libres del aceite esencial fue evaluada calculando el IC₅₀ que es la concentración a la cual se inhibe el 50 % de la capacidad captadora de los radicales libres de la oxidación de DPPH (Noriega P. , y otros, 2015). Para lo cual se construyeron curvas entre el porcentaje de inhibición (eje Y) vs. la concentración (eje X) efectuando regresiones lineales para cada aceite esencial. Para comparar la actividad captadora de radicales libres del aceite esencial de estudio frente al control del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue ejecutado un histograma en el software R-project.

2.6.2. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres ABTS (2,2-azinobis 3 etilbensotiazolina-6-acidosulfónico)

Se procedió a preparar la disolución de ABTS (2 mM) pesando 27.51 mg de ABTS diluyéndolo con 25 mL de agua ultra pura. Luego se pesó 188.20 mg de K₂S₂O₈ que se disolvieron en 10 mL de agua ultra pura. A la disolución de ABTS preparada se le añade 0.25 mL de la solución de K₂S₂O₈ y se almacenó en un frasco ámbar en refrigeración por 24 horas en oscuridad antes de realizar el análisis. Para la preparación de diluciones de los aceites (control natural *Thymus vulgaris* y *Piper barbatum* Kunth) se utilizó la siguiente serie de concentraciones desde: 0 µL, 1 µL, 2 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL para alcanzar un volumen final de 100 µL se complementó con DMSO (dimetilsulfóxido).

Para la cuantificación del ABTS se usó el espectrofotómetro UV Jasco V-730 a una longitud de onda de 754 nm. Se agregó 0.9 mL de ABTS a las soluciones preparadas en las celdas de plástico, se realizaron cuatro mediciones respectivamente (Granados, Yanez, & Santafe, 2012).

La actividad antioxidante del ABTS se cuantificó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100$$

Dónde:

Ab: absorbancia del blanco (agua destilada)

Aa: absorbancia de las muestras.

Al calcular el porcentaje de inhibición de los aceites se puede obtener las curvas (en el eje Y el porcentaje de inhibición vs. el eje X la concentración) determinando de esta manera el IC₅₀ (concentración a la cual se inhibe el 50 % de la capacidad captadora de los radicales libres) para lo cual se realizó una regresión lineal de cada aceite esencial.

La actividad captadora de radicales libres del aceite esencial fue evaluada calculando el IC₅₀ que es la concentración a la cual se inhibe el 50 % de la capacidad captadora de los radicales libres de la oxidación de DPPH (Noriega P. , y otros, 2015). Para lo cual se construyó curvas entre el porcentaje de inhibición (eje Y) vs. la concentración (eje X) efectuando regresiones lineales para cada aceite esencial. Para comparar la actividad captadora de radicales libres del aceite esencial de estudio frente al control natural del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue ejecutado un histograma en el software R-project.

2.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de dilución o micro-dilución en caldo este método permite evaluar la sensibilidad de los microorganismos al obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g/mL}$ de una gran cantidad de compuestos (antibióticos, aceites esenciales, etc) (Sánchez, Castillo, & García, 2016). Las cepas usadas fueron 6 bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6328, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Listeria grayi* ATCC 19120, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, 4 Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y 2 levaduras *Candida tropicalis* ATCC 13803 y *Candida albicans* ATCC 10231. En la investigación se usó como control natural al aceite esencial de *Thymus vulgaris* puesto que es uno de los mejores indicadores de inhibición microbiana, al citral como control positivo de comparación y antibióticos de amplio espectro en el control del crecimiento microbiano se usaron las presentaciones en concentraciones del principio activo en la forma farmacéutica para Levaduras: clotrimoxazol (600 mg), bacterias Gram positivas: eritromicina (500 mg) y para Gram negativas: gentamicina en ampolla de 20 mg/2 mL, todos estos antibióticos fueron usados a una concentración al 10 % para la metodología de la dilución o micro-dilución en caldo (Mayorga Marin, 2015).

2.7.1. Reactivación de cepas ATCC (American Type Culture Collection)

Se realizó la reactivación tanto de cepas bacterianas y fúngicas las cuales fueron hidratadas y posteriormente sembradas usando la técnica de estriado simple en cajas Petri de plástico con diversos medios de acuerdo con el requerimiento de cada

bacteria (ver anexo 3). Para las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 6328, medio TSA (triptycase soy agar), *Streptococcus mutans* ATCC 25175 medio agar sangre, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 medio TSA (triptycase soy agar), *Micrococcus luteus* ATCC 4698 medio agar sangre, *Listeria grayi* ATCC 19120 medio TSA (triptycase soy agar), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 medio agar sangre, *Escherichia coli* ATCC 25922 medio TSA (triptycase soy agar), *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 medio agar sangre, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 medio TSA (triptycase soy agar, agar centrimida o agar sangre), *Proteus vulgaris* ATCC 6380 medio TSA (triptycase soy agar); mientras que para las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida tropicalis* ATCC 13803 en medio SDA (Sabouraud Dextrose Agar). Para su óptimo crecimiento se incubó a las bacterias por 24 h a 35 °C y las levaduras por 48 h a 25 °C (Microbiologics, 2011).

2.7.2. Preparación de las concentraciones del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth, *Thymus vulgaris* y citral.

Para la investigación se realizaron controles positivos (aceites esenciales y antibióticos) y negativos DMSO (dimetilsulfóxido) los cuales permiten realizar parámetros de comparación.

Para los aceites esenciales se preparó una solución de concentración al 10 % respectivamente para cada uno los cuales contienen 100 µL de aceite esencial con 900 µL de DMSO (dimetilsulfóxido).

2.7.3. Indicadores de control

Como controles positivos tenemos al *Thymus vulgaris* y citral los cuales fueron preparados a una concentración del 10 % tomando de cada uno 100 µL más 900 µL de DMSO (dimetilsulfóxido).

Como controles positivos antibióticos se usaron: clotrimoxazol (600 mg), eritromicina (500 mg) y gentamicina en ampolla de 20 mg/2 mL (Mayorga Marin, 2015). Estos fueron preparados a una concentración del 10 % se pesó 100 mg de cada antibiótico con 900 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) a excepción de la gentamicina que se tomó 0.1 mL de esta con 900 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido).

2.8. Método de dilución o micro-dilución en caldo

2.8.1. Elaboración del inóculo bacteriano y fúngico

Para el inóculo bacteriano se seleccionó de 3 a 5 colonias aisladas de la placa de agar (de acuerdo a la bacteria y sus requerimientos nutricionales para su crecimiento, se los siembra en medio TSA (triptycase soy agar) o agar sangre luego de las 24 horas de su crecimiento) (Sánchez, Castillo, & García, 2016). Mientras que para las levaduras se seleccionó de 1 a 2 colonias de la placa de agar SBA (medio agar sabouraud) luego de 48 horas de su crecimiento.

En un tubo de ensayo con 5 mL de caldo Mueller Hinton (medio específico para el método de dilución o micro-dilución en caldo) para bacterias y caldo dextrosa sabouraud (medio específico para el método de dilución o micro-dilución en caldo) para levaduras se introdujo con la ayuda de un asa de siembra tanto a la bacteria como a la levadura luego se la dejó incubar 24 horas a 35 °C o a 25 °C respectivamente. Al transcurrir el tiempo establecido el inóculo fue colocado en la centrifuga Hermle Z400 por 30 minutos a 3000 rpm quedando la bacteria y levadura suspendida eliminando el sobrenadante posteriormente se añadió 4 mL aproximadamente de solución fisiológica estéril al 0.9 % y fue mezclado en el agitador tipo vórtex por 3 min. Se fue agregando pequeñas cantidades de solución fisiológica estéril al 0.9 % controlando que llegue a la turbidez establecida por la

escala McFarland 0.5 (ver anexo 4). La estandarización del inóculo se realizó en el equipo espectrofotómetro Shimad 2V UV mini-1240 con una longitud de onda de 625 nm. a una absorbancia de 0.08 a 0.12 para obtener un inóculo de 10^8 UFC/mL en bacterias y en levaduras una longitud de onda de 530 nm. a una absorbancia de 0.15 para obtener un inóculo de 10^6 UFC/mL (Sánchez, Castillo, & García, 2016).

2.8.2. Preparación del medio de cultivo

Para el método de dilución o micro-dilución en caldo se pesaron 5.5 g en 250 mL de agua destilada del caldo Mueller Hinton para las bacterias siendo el mejor medio para las pruebas de sensibilidad en el método aplicado mientras que para las levaduras se pesaron 0.15 g en 50 mL de agua destilada del caldo dextrosa sabouraud. Se prepararon estos medios para las doce placas cada una con los microorganismos seleccionados. El medio debe estar estéril para evitar la contaminación y por ende alteración en los resultados los medios fueron esterilizados a 121 °C, 1 atmosfera por 30 minutos en el autoclave (Malbrán, 2012).

2.8.3. Inoculación en placas

La metodología utilizada en la investigación está basada en (Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K., 2016) se usaron microplacas estériles de 96 pocillos en la parte superior horizontal de la fila A se colocaron 10 µL de las disoluciones preparadas a una concentración al 10 % de los aceites esenciales (*Piper barbatum* Kunth, *Thymus vulgaris*, citral y antibióticos seleccionados) con la ayuda de la micropipeta multicanal luego se adicionó 190 µL de medio de cultivo (caldo Mueller Hinton o dextrosa sabouraud SDB) de la misma manera en los pocillos restantes desde la fila de la B hasta la H se puso 100 µL del caldo de cultivo. Se procedió a tomar con la micropipeta multicanal 100 µL de la fila A a la fila B mezclando el medio de cultivo

con los aceites esenciales o antibióticos este paso se realiza consecutivamente hasta llegar a la fila H, de la cual se toma 100 μL y se lo desecha finalmente se colocó 100 μL del inóculo tanto de las bacterias y levaduras se obtuvo un volumen final de 200 μL . Las placas de microdilución deben sellarse con plástico adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo y fueron llevadas a incubación a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas se debe tener en cuenta que la incubación en bacterias es con agitación lenta (40 rpm) y constante mientras que en las levaduras es sin agitación y en 48 horas (ver anexo 5). En cada placa se evalúa a un microorganismo vs. los aceites esenciales este proceso se realizaba por triplicado. En la fila H de la microplaca se incluyó un control negativo de crecimiento donde se colocó medio de cultivo más DMSO (dimetilsulfóxido).

2.8.4. Preparación y adición del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

Para la preparación del colorante se pesaron en la balanza analítica M 1204 Mettler Toledo 100 mg del reactivo de cloruro de trifeniltetrazolio TTC en 10 mL de agua destilada estéril y se colocó en un vaso Erlenmeyer la solución fue puesta en oscuridad y sometida a refrigeración puesto que esta solución reacciona inmediatamente al estar en contacto con luz o calor provocando su coloración característica (rojo intenso) dicha solución se la debe preparar un día antes de realizar el análisis.

La adición del colorante se realizó una vez que la microplaca cumplió las 24 o 48 horas establecidas de acuerdo al microorganismo analizado. Se añadió 40 μL de colorante TTC en cada uno de los pocillos y se los incubó a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos con agitación en caso de las bacterias y sin agitación en el caso de las

levaduras puesto que estudios realizados por (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015) indican mejores resultados en lavaduras sin agitación.

2.8.5. Evaluación de las placas

Una vez establecido el tiempo de coloración de las microplacas se observó que algunos pocillos se pintaron de rojo intenso producto de la reacción del TTC, mientras que otros pocillos no presentaban ninguna coloración. Luego se procedió a llevarlas al equipo de lectura Microplate Reader a una longitud de onda de 450 nm para evaluar las diferentes absorbancias de acuerdo los microorganismos.

2.8.6. Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada una de las microplacas se evaluó las filas de pocillos con el aceite en estudio, así como de los controles positivos y negativos donde se pudo observar que los pocillos coloreados (rojo intenso) no presentaron inhibición frente a cada parámetro planteado a su vez hubo pocillos sin coloración que indican inhibición. Para poder interpretar y analizar la presencia y ausencia de coloración de las microplacas nos basaremos en la categorización planteada por (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015) los que establecen 4 clasificaciones a la que se le adicionó una clasificación puesto que el aceite en estudio y aceites control presentaron parámetros más bajos ($< 500 \mu\text{g/mL}$) a lo establecido, para medir la concentración y la efectividad de los aceites siendo: Muy Fuerte (MF) ($\text{MIC} < 500 \mu\text{g/mL}$), Fuerte (F) ($\text{MIC} > 500 \mu\text{g/mL}$), Moderada (M) ($500 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} < 5000 \mu\text{g/mL}$), Débil (D) ($5000 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} < 20000 \mu\text{g/mL}$) y Ausente (A) ($\text{MIC} < 20000 \mu\text{g/mL}$).

Para la normalización de los datos de la concentración de cada uno de los aceites esenciales (*Piper barbatum* Kunth, *Thymus vulgaris* y citral) se usó la fórmula: densidad $(d) = \frac{m}{v}$ despejando la masa (m) para calcular cada una de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$. Los datos de la densidad (d) ($dp = 1.13 \text{ g/mL}$; $dt = 0.940 \text{ g/mL}$; $dc = 0.891 \text{ g/mL}$) y el volumen (v) (al 10% que es 0.001 mL) son datos conocidos. Una vez establecidas las concentraciones específicas se deben dividir a la mitad consecutivamente ocho veces por el fundamento usado en el método de dilución o micro-dilución en caldo.

Estos datos fueron analizados en el programa estadístico de Infostat para el gráfico se utilizó un diagrama de perfil multivariado y gráfico de sectores.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Obtención del aceite esencial mediante hidrodestilación.

Tabla 1.
Datos generales

Rendimiento	0.902 % \pm 0.032 %
Densidad del aceite	1. 013 g/mL \pm 0.003
Índice de refracción	1.490 \pm 0.009

Elaborado por: La autora, 2018.

En la tabla 1., se estableció los parámetros físicos del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth destacando el elevado rendimiento de 0.902 % equivalente a 1 mL con poco material vegetal (100 g) (ver anexo 2) y tomando en cuenta que se destiló material vegetal fresco en comparación a un seco ya que se hubiese recolectado mayor cantidad.

Si se evalúa el porcentaje de rendimiento que se obtuvo del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth se puede destacar que es de gran importancia industrial tomando en cuenta que la mayoría de los aceites esenciales se encuentran en pocas cantidades desde 0.5 a 0.6 % presentando rendimientos muy bajos y por ende costosos como menciona (Torres, Velandia, & Murcia, 2013).

En el análisis tanto de densidad e índice de refracción se establecen rangos dentro de las especificaciones técnicas en relación a los aceites esenciales según (chankuap.org, 2014). También se puede destacar que la mayoría de estudios

realizados en la especie generalmente se hace en extractos por lo que se podría decir que estos parámetros evaluados son recientes.

3.2. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a masas

En la evaluación de la totalidad de compuestos químicos se empleó dos sistemas de columnas cromatográficas: columna apolar y columna de polaridad media.

3.2.1. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a masas columna apolar

Se encontró en el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth 34 compuestos de los cuales se identificaron 29 que equivale al 85.29 % del total de los compuestos entre los más importantes tenemos: α - Phellandrene 43.16 %, sesquisabinene hydrate trans 8.23 %, limonene 7.04 %, elemol 7.21 %, α - pinene 5.63 %, carene (delta-3) 4.60 %, β – phellandrene 3.82 % y β -eudesmol 3.49 % (ver anexo 6). La información detallada se presenta en la tabla 2.

Tabla 2.
Composición química columna DB1-MS del aceite esencial de las hojas de *Piper barbatum* Kunth.

Compuesto	(%) RDA	Índice retención
α - Thujene	0.65 \pm 0.11	924
α- Pinene	5.63 \pm 0.48	932
Camphene	0.33 \pm 0.05	946
Sabinene	2.49 \pm 2.25	969
β - Pinene	0.18 \pm 0.03	974
Myrcene	1.09 \pm 0.11	988

α- Phellandrene	43.16 \pm 2.91	1002
Carene <delta 3>	4.60 \pm 0.38	1008
Cymene <para>	1.69 \pm 0.37	1020
Limonene	7.04 \pm 0.58	1024
β-Phellandrene	3.82 \pm 1.71	1025
Mentha- 2,4 (8) diene <para>	1.29 \pm 0.41	1085
Bicyclogermacrene	0.73 \pm 0.04	1500
Dihydrogarofuran <4 -epi-cis->	0.64 \pm 0.03	1499
β -Dihydro agarofuran	2.74 \pm 0.08	1503
β -Curcumene	0.69 \pm 0.04	1514
Cubebol	0.15 \pm 0.09	1514
Sesquisabinene hydrate <para>	0.48 \pm 0.39	1542
Elemol	7.21 \pm 2.10	1548
Sesquisabinene hydrate <trans>	8.23 \pm 2.06	1542
Nerolidol E	0.69 \pm 0.26	1561
Germacrene D-4- ol	0.16 \pm 0.07	1574
No identificado	-	-
Eudesmol <10-epi-gamma >	1.07 \pm 0.34	1622
Cubenol 1 <epi>	0.20 \pm 0.08	1627
Eremoligenol	0.21 \pm 0.15	1629
β -Eudesmol	3.49 \pm 1.07	1649
Bisabolol <epi- β >	0.26 \pm 0.03	1670
α - Bisabolol	1.73 \pm 0.18	1685

Nota: Del total de la composición química del aceite esencial tenemos: 2 % de sesquiterpenos hidrocarburos (C₁₅H₂₄), 27% de sesquiterpenos oxigenados (C₁₅H₂₆O) y 71 % de monoterpenos hidrocarburos (C₁₀H₁₆). Elaborado por: La autora, 2018.

En lo referente a la categorización de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth se debe tomar en cuenta las condiciones de temperatura, distribución geográfica, altitud, épocas del año (estaciones), edad y segmentos de la planta según (Ramírez, 2016). Al comparar la presente investigación con la realizada por (Vargas, 2003) en la que se mencionan compuestos muy diferentes a los determinados pese a aplicar las misma técnica y la misma parte vegetal.

3.2.2. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a masas columna polaridad media

En la columna de polaridad media se determinó en el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth 45 compuestos de los cuales se identificaron 35 que equivale al 77.77 % del total de los compuestos entre los más importantes tenemos: sesquisabinene hydrate <trans> 20.85 %, elemol 10.16 %, α -phellandrene 9.81 %, β -eudesmol 4.64 %, α -bisabolol 4.27 %, caryophyllene (E) 4.08 %, selina - 3,7 (11) - diene 3.59 %, α -thujene 2.64 %, limonene 2.82 %, himachalol y δ -elemene 2.48 %, β -dihydro agarofuran 2.07 %, dihydro agarofuran <4 epi cis > 2.04 % (ver anexo 7). La información detallada se presenta en la tabla 3.

Tabla 3.
Composición química columna DB-Wax del aceite esencial de las hojas de *Piper barbatum* Kunth.

Compuesto	(%) RDA	Índice de retención
α-Thujene	2.64 ± 1.58	1038
α -Pinene	1.36 ± 0.81	1045
α-Phellandrene	9.81 ± 4.76	1178

Limonene	2.82 ± 1.44	1213
Sabinene	1.95 ± 0.99	
Cymene <para>	1.31 ± 0.54	
Terpinolene	0.58 ± 0.22	1287
δ -Elemene	2.48 ± 0.27	
α -Terpinyl acetate	0.66 ± 0.17	
α -Cubebene	0.84 ± 0.06	
Caryophyllene (E)	4.08 ± 0.58	
No Identificado	-	-
α -Guaiene	0.47 ± 0.07	2030
β-Dihydro agarofuran	2.07 ± 0.20	
β-Himachalene	0.62 ± 0.09	
Epizonarene	1.31 ± 0.08	
Dihydro agarofuran <4 epi cis >	2.04 ± 0.07	
Bicyclogermacrene	1.01 ± 0.65	
α -Farnesene (E,E)	1.17 ± 0.07	
α -Bulnesene	0.54 ± 0.33	
β-Curcumene	1.06 ± 0.13	
δ -Carene	1.90 ± 0.18	
No Identificado	-	-
γ-Bisabolene (E)	1.12 ± 0.10	
α -Calacorene	0.57 ± 0.06	2053
No Identificado		
Muurool -5-en-4-beta-ol- cis	0.51 ± 0.05	
Caryophyllene oxide	0.36 ± 0.05	

No Identificado		
Sesquisabinene hidrate <trans>	20.85 ± 2.48	
No Identificado	-	-
Selina -3,7 (11) - diene	3.59 ± 0.55	
Elemol	10.16 ± 0.61	
γ -Eudesmol	1.39 ± 0.27	
Himachalol	2.48 ± 0.44	
No Identificado	-	-
No Identificado	-	-
β -Bisabolol	1.33 ± 0.21	2213
No Identificado	-	-
Cubenol	0.67 ± 0.02	2050
No Identificado	-	-
No Identificado	-	-
α -Bisabolol	4.27 ± 0.16	2213
β -Eudesmol	4.64 ± 0.86	2229
Calamenen - 10 -one	0.92 ± 0.17	

Elaborado por: La autora, 2018.

En la tabla 3., se muestra nuevos compuestos químicos como el caryophyllene (E) 4.08 %, selina - 3,7 (11) - diene 3.59 %, himachalol y δ -elemene 2.48 %) puesto que la determinación se realizó mediante la columna de polaridad media la cual generó información más completa de los componentes químicos presentes en el aceite esencial.

Si comparamos la tabla 2 y 3 se puede observar una diferencia y aumento en compuestos debido a que se usó dos tipos de columnas que nos dieron resultados más completos.

3.3. Determinación comparativa de la capacidad antioxidante entre los métodos del DPPH y ABTS

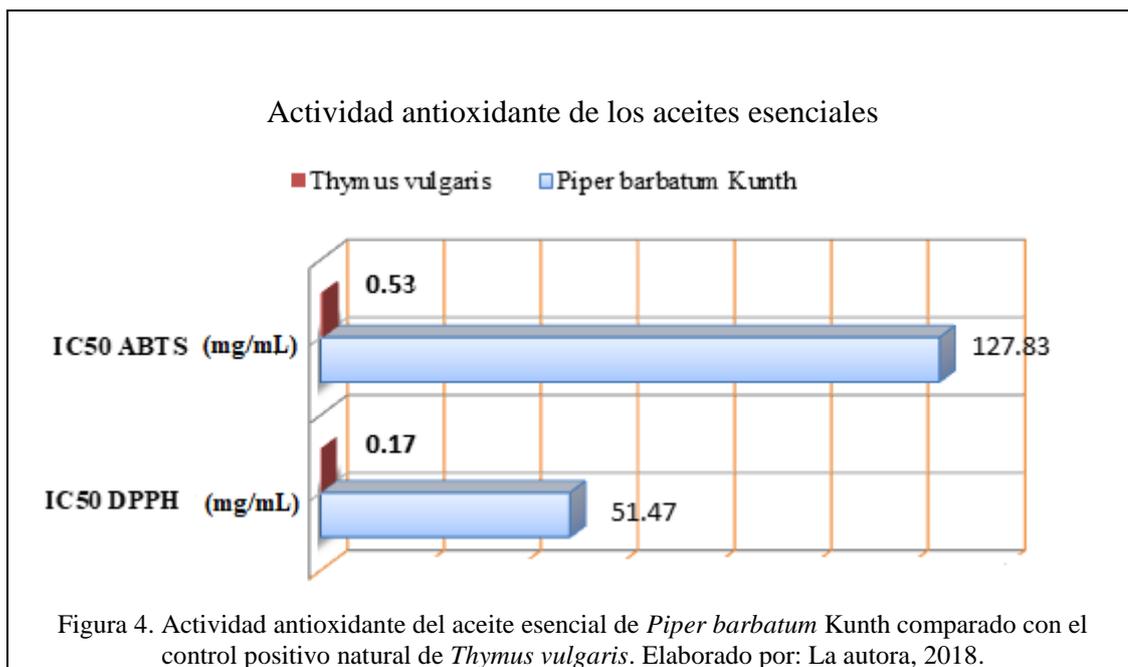
Se comparó la capacidad captadora de radicales libres entre el aceite esencial *Piper barbatum* Kunth y el control positivo natural *Thymus vulgaris*. Se observó los resultados de la comparación del IC₅₀ de DPPH y ABTS (ver tabla 4 y figura 4).

Tabla 4.

Actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper barbatum* kunth comparado con el control positivo natural *Tymus vulgaris*

Aceite esencial	IC ₅₀ A (mg/mL)	IC ₅₀ B (mg/mL)
<i>Piper barbatum</i> Kunth	51.47 ± 0.35	127.83 ± 0.40
<i>Thymus vulgaris</i>	0.17 ± 0.005	0.53 ± 0.24

Nota: Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales IC₅₀ (A) mediante el método de DPPH, IC₅₀ (B) mediante el método ABTS. Elaborado por: La Autora, 2018.



Como cita (Noriega, P; Taxo, A, 2018) en el “Libro de La Flora Medicinal de los Parques de Quito” el principal uso ancestral de *Piper barbatum* Kunth es en el ámbito patogénico lo que se ratifica en la presente investigación al analizar los resultados teóricos de la (Tabla 4) y evaluar el gráfico de la (figura 4) que indica que la actividad antioxidante del aceite esencial en estudio es muy baja en relación con el control natural de *Thymus vulgaris*.

3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de dilución o micro-dilución en caldo

Los resultados del ensayo antimicrobiano están basados en el análisis de la presencia o ausencia de color con relación a las diferentes concentraciones tanto de los aceites esenciales como los controles (antibióticos) establecidos para cada una de las microplacas de acuerdo a los microorganismos citados.

Se puede atribuir la eficaz inhibición con los diferentes microorganismos a los componentes químicos con mayor porcentaje citados en las tablas 2 y 3 presentes en

el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth los cuales están ejerciendo acción y generando los excelentes resultados que se obtuvieron. La interpretación se realizó por la categorización planteada por (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015) donde se presenta varios niveles de eficacia de los aceites esenciales considerando los siguientes parámetros: muy Fuerte (MF) (MIC < 500 µg/mL), fuerte (F) (>500 µg/mL, moderada (M) (500 µg/mL < MIC < 5000 µg/mL), débil (D) (5000 µg/mL < MIC < 20000 µg/mL) y ausente (A) (MIC < 20000 µg/mL). La determinación de la actividad antimicrobiana se resume en la tabla 5.

Tabla 5.
Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias y levaduras para cada aceite esencial.

Microorganismos	<i>P. barbatum</i> Kunth MIC (µg/mL)	<i>T. vulgaris</i> MIC (µg/mL)	Citral MIC (µg/mL)
Bacterias Gram negativas			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	528 (F)	245 (MF)	464 (MF)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	528 (F)	122 (MF)	464 (MF)
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	2110 (A)	122 (MF)	464 (MF)
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	2110 (A)	245 (MF)	9283 (A)
Bacterias Gram positivas			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6328	264 (MF)	245 (MF)	232 (MF)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	528 (F)	122 (MF)	464 (MF)
<i>Listeria grayi</i> ATCC 19120	2110 (A)	122 (MF)	464 (MF)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	528 (F)	500 (F)	232 (MF)
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	528 (F)	245 (MF)	464 (MF)
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	132 (MF)	61 (MF)	232 (MF)
Levaduras			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	132 (MF)	61 (MF)	116 (MF)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	264 (MF)	122 (MF)	116 (MF)

Nota: Se midió la concentración y la efectividad de los aceites estableciendo los siguientes parámetros: Muy Fuerte (MF) (MIC < 500 µg/mL), Fuerte (F) (>500 µg/mL, Moderada (M) (500 µg/mL < MIC < 5000 µg/mL), Débil (D) (5000 µg/mL < MIC < 20000 µg/mL) y Ausente (A) (MIC < 20000 µg/mL) Fuente: (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015).

En la Tabla 5., se evaluó la actividad antimicrobiana para cada uno de los aceites esenciales los cuales presentaron una buena actividad inhibitoria respecto al poder bacteriostático del aceite esencial *Piper barbatum* Kunth.

Las investigación realizada por (Da Silva, 2017) corrobora la efectividad que presentó *Piper barbatum* Kunth, *Thymus vulgaris* y *citral* frente a bacterias causantes de muchas enfermedades.

El aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth presentó una interacción inhibitoria tan efectiva como *Thymus vulgaris* ya que este es considerado entre los aceites esenciales, uno de los más eficaces en la actividad inhibitoria de un sin número de microorganismos patógenos (Rosas & López, 2011).

Se pudo identificar de igual manera que para la mayoría de bacterias y levaduras la concentración al 10 % del aceite esencial en estudio fue adecuado para llevar a cabo la inhibición bacteriostática dando como resultado parámetros muy fuerte (MF) y fuerte (F) , escala descrita por (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015).

Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales

Aceites Esenciales	E. coli	P. aeruginosa	P. vulgaris	K. oxytoca	S. aureus	E. faecalis	L. grayi	S. epidermidis	M. luteus	S. mutans	C. albicans	C. tropicalis
<i>Piper barbatum</i> Kunth	528	528	2110	2110	264	528	2110	528	528	132	132	264
<i>Thymus vulgaris</i>	245	122	122	245	245	122	122	490	245	61	61	122
<i>Citral</i>	464	464	464	9283	245	122	122	490	245	61	116	116

Evaluación comparativa de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales de *Piper barbatum kunth*, *Thymus vulgaris* y *Citral*

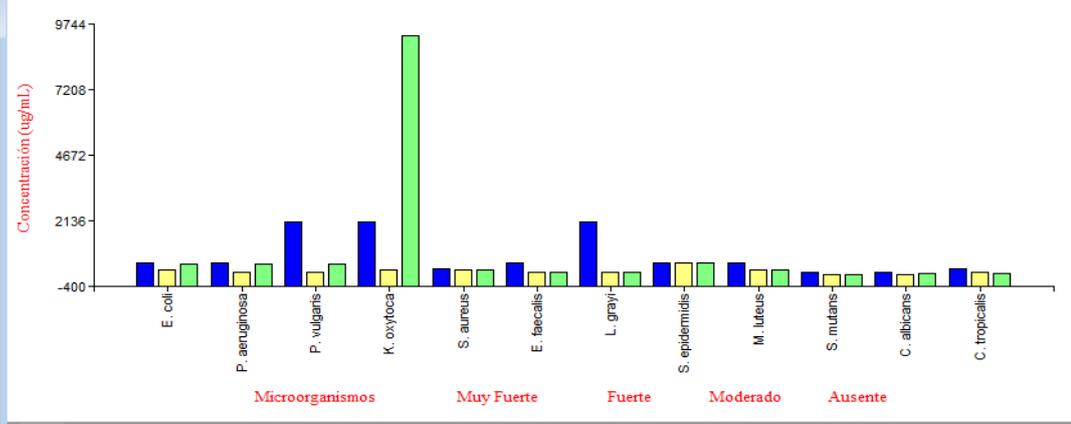


Figura 5. Evaluación comparativa de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los diferentes aceites esenciales. Elaborado por: La Autora, 2018.

Nota: La barra de color azul identifica a *Piper barbatum* Kunth, la amarilla a *Thymus vulgaris* y la verde al citral. Elaborado por: La autora, 2018.

La figura 5., muestra un enfoque global de evaluación entre concentración ($\mu\text{g/mL}$), versus microorganismos donde se identificó claramente la eficacia de inhibición bacteriostática en los diferentes aceites esenciales.

La determinación de inhibición en la dilución o micro-dilución en caldo citada por (Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2015) establece hasta el parámetro Fuerte (F) ($>500 \mu\text{g/mL}$) para nuestra investigación se tuvo que aumentar un parámetro adicional de muy fuerte (MF) ($\text{MIC} < 500 \mu\text{g/mL}$) puesto que los aceites evaluados presentan un rango mucho más efectivo de inhibición bacteriostática con los microorganismos evaluados.

La barra de color azul identifica a *Piper barbatum* Kunth, la amarilla a *Thymus vulgaris* y la verde al citral. Al observar las barras azules de mayor tamaño se identificó baja inhibición a una concentración de 2110 ($\mu\text{g/mL}$) para las bacterias *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 y *Listeria grayi* ATCC 19120 mientras que para las demás bacterias y levaduras todas presentaron un parámetro elevado de inhibición. Si se compara las barras amarillas y verdes se puede observar una tendencia equilibrada de inhibición considerando muy fuerte (MF) y fuerte (F). En contraste solo se puede observar una barra verde de mayor tamaño la que señala que *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 también presenta baja inhibición a una concentración de 9283 ($\mu\text{g/mL}$).

Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de *Piper barbatum* Kunth

	S. mutans	C. albicans	S. aureus	C. tropicalis	E. coli	P. aeruginosa	E. faecalis	S. epidermidis	M. luteus	P. vulgaris	K. oxytoca	L. grayi
Aceite Esencial	132	132	264	264	528	528	528	528	528	2110	2110	2110
<i>Piper barbatum</i> kunth	Muy fuerte				Fuerte					Ausente		

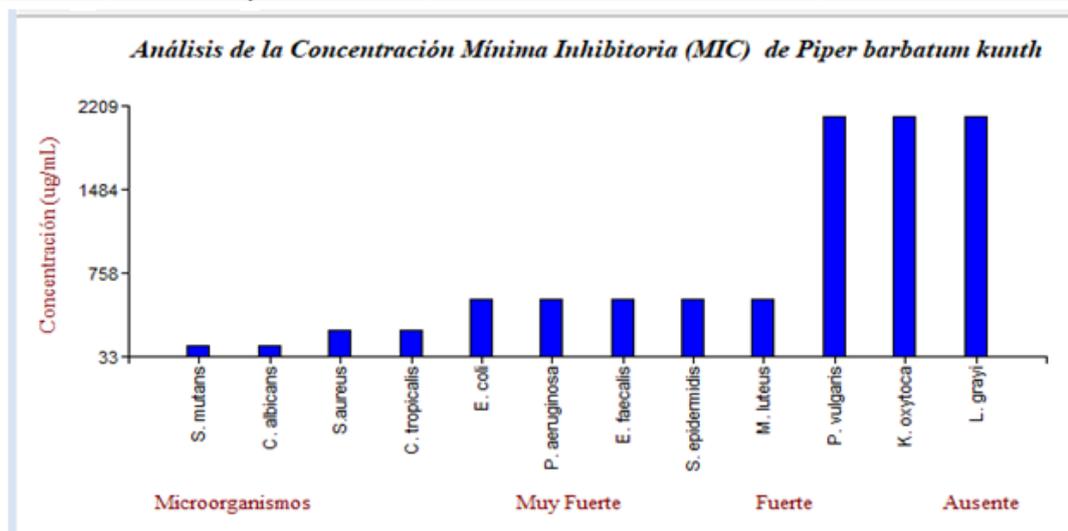
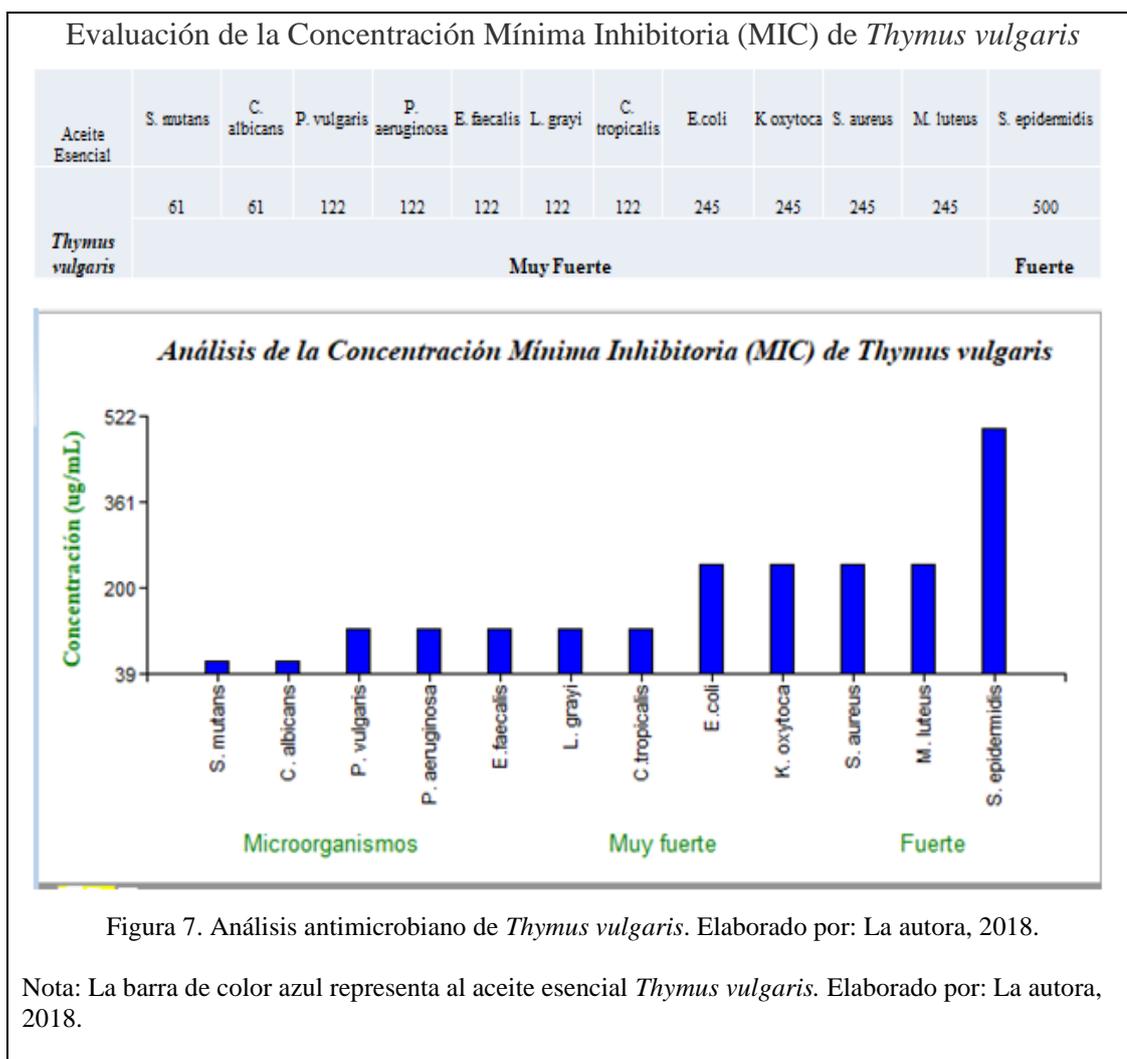


Figura 6. Análisis antimicrobiano de *Piper barbatum* Kunth. Elaborado por: La autora, 2018.

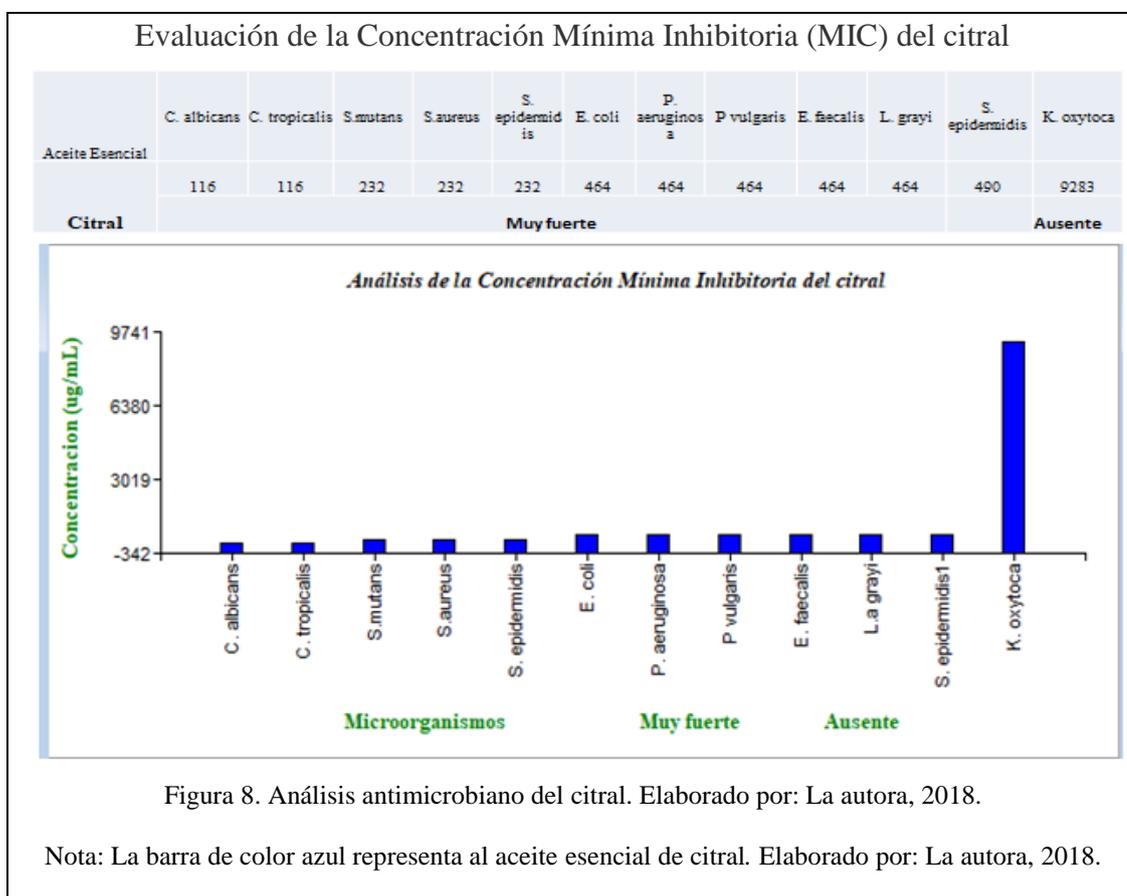
Nota: La barra de color azul representa al aceite esencial *Piper barbatum* Kunth. Elaborado por: La autora, 2018.

En la figura 6., se observa que para la mayoría de bacterias y levaduras el aceite esencial inhibió por completo a excepción de *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 y *Listeria grayi* ATCC 19120 que presentaron baja inhibición.

Los resultados más interesantes se producen con las 2 levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 con (MIC 132 µg/mL) y *Candida tropicalis* ATCC 13803 con (MIC 264 µg/mL) puesto que se ratifica los usos ancestrales para lavados vaginales mencionados por (Noriega, P; Taxo, A, 2018) versus el gran potencial de inhibición antimicrobiana que presentó.



Al analizar la figura 7., se ratifica la gran eficacia de inhibición que presenta el aceite esencial de *Thymus vulgaris* como menciona (Rosas & López, 2011) frente a bacterias como: *Staphylococcus aureus* ATTC 6328, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Listeria grayi* ATCC 19120, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y levaduras *Candida tropicalis* ATCC 13803 y *Candida albicans* ATCC 10231.



Como muestra la figura 8., el aceite esencial de citral inhiben a casi todas las bacterias y levaduras al observar todas las barras se puede establecer que a diferentes concentraciones como: 61, 122, 245 y 500 (µg/mL) causan efecto inhibitorio, mientras que en *Klebsiella oxytoca* ATCC 872 presenta baja inhibición.

Comparación del porcentaje (%) de inhibición de los aceites esenciales

Aceite Esencial	Gram positivas	Gram negativas	Levaduras
<i>Piper barbatum</i> Kunth	100%	66.66%	100%
<i>Thymus vulgaris</i>	100%	100%	100%
<i>Citral</i>	100%	83.33%	100%

Evaluación del % de Inhibición de los microorganismos vs. aceites esenciales

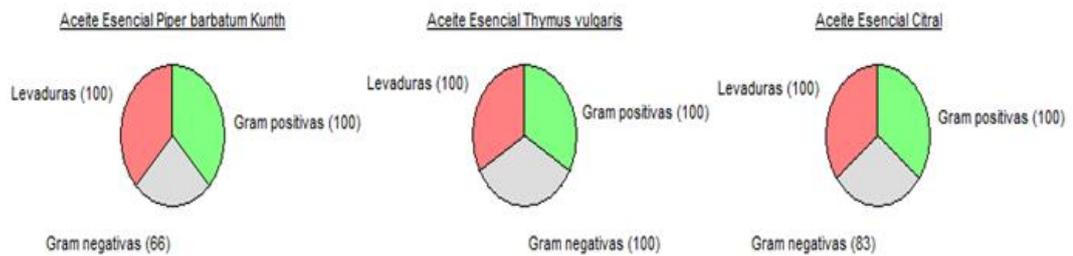


Figura 9. Efectividad de los aceites esenciales frente a las bacterias Gram positivas, negativas y Levaduras. Elaborado por: La autora, 2018.

En la figura 9., se puede observar que el aceite *Piper barbatum* Kunth presento 100 % de efectividad en inhibición en las Gram positivas, 100 % en Levaduras y el 66 % en Gram negativas.

Al comparar con los porcentajes de los aceites de control podemos observar que el aceite en estudio es completamente eficaz y está en el rango de los aceites más usados en cuanto a la efectividad contra un sin número de microorganismos patógenos como menciona (Rosas & López, 2011).

Conclusiones

En el análisis de la composición química realizada en la cromatografía de gases de columna apolar del aceite esencial de las hojas de *Piper barbatum* Kunth se cuantificó un total de 34 compuestos siendo 29 de estos identificados que corresponde a un 85.29 % del total de los compuestos entre los más importantes tenemos: α -phellandrene 43.16 %; sesquisabinene hydrate <trans> 8.23 %; limonene 7.04 %; elemol 7.21 %; α -pinene 5.63 %; carene (delta-3) 4.60 %; β - phellandrene 3.82 % y β -eudesmol 3.49 %.

Se pudo determinar igualmente que la composición química de los aceites varían de acuerdo al segmento usado de la planta siendo las hojas el mejor material vegetal para obtener un buen rendimiento según (Sacchetti, Guerrini, Noriega, Bianchi, & Bruni, 2006).

En la columna de polaridad media se determinó 45 compuestos de los cuales se identificaron 35 que equivale al 77.77 % del total de los compuestos entre los más importantes tenemos: sesquisabinene hydrate <trans> 20.85 %, elemol 10.16 %, α -phellandrene 9.81 %, β -eudesmol 4.64 %, α -bisabolol 4.27 %, caryophyllene (E) 4.08 %, selina - 3,7 (11) - diene 3.59 %, α - thujene 2.64 %, limonene 2.82 %, himachalol y δ -elemene 2.48 %, β -dihydro agarofuran 2.07 %, dihydro agarofuran <4 epi cis > 2.04 %. Lo que se pudo determinar al realizar el análisis en las dos columnas es una información más específica de cada componente presente en el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth.

En lo que respecta a los estudios de capacidad captadora de radicales libres por el método del DPPH y ABTS los resultados indican una baja actividad de *Piper barbatum* Kunth con un (IC_{50} DPPH 51.47 ± 0.35 mg/mL; IC_{50} ABTS 0.17 ± 0.01 mg/mL) comparada con el referente natural *Thymus vulgaris* (IC_{50} DPPH 127.83 ± 0.40 mg / mL; IC_{50} ABTS 0.53 ± 0.24 mg / mL).

La evaluación de la “Concentración Mínima Inhibitoria” (MIC) en el aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth demostró ser muy efectiva en todas las bacterias y levaduras empleadas en la investigación obteniéndose los siguientes resultados: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Candida albicans* ATCC 10231 con (MIC 132 μ g/mL) seguidos por *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con (MIC 264 μ g/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 con (MIC 528 μ g/mL) y con baja inhibición *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Listeria grayi* ATCC 19120. Con excepción de *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 y *Listeria grayi* ATCC 19120 (MIC 2110 μ g/mL) que presentaron ausencia de inhibición antimicrobiana. Interpretándolos como muy fuerte (MF) en un rango (< 500 μ g/mL), fuerte (F) (>500 μ g/mL) y ausente (A) (MIC < 20000 μ g/mL).

Los resultados demuestran que el aceite es muy eficaz y de gran importancia, puesto que es una de las pocas investigaciones que evalúan el aceite, muchos estudios están enfocados únicamente al extracto. Este podría ser usado principalmente en la formulación de muchos antibióticos con el fin de combatir a un sinnúmero de agentes patógenos causantes de muchas enfermedades.

Recomendaciones

Al hacer la hidrodestilación para obtener el aceite se debe realizar un control previo en la selección de las mejores hojas sin cortes, roturas, o residuos extraños.

Almacenar en refrigeración el material vegetal máximo 4 días para obtener un mejor rendimiento de aceite esencial y evitar que se deteriore.

Al colocar las microplacas con bacterias en la incubadora es importante generar agitación mientras que con las levaduras es mejor hacerlo sin agitación a una temperatura de 35 °C.

Preparar el colorante TTC con agua destilada estéril un día antes de realizar el análisis y dejarlo en refrigeración y en oscuridad para evitar que el colorante reaccione a condiciones ambientales.

Realizar estudios de su toxicidad tanto sistémica como dérmica. Con miras a introducir el aceite esencial en formulaciones de tipo farmacéutico y cosmético.

Referencias

- Abe, R., & Ohtani, K. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies. *Journal of Ethnopharmacology*, 554-565.
- Acevedo, D., Navarro, M., & Monrroy, L. (2013). Composición química del aceite esencial de hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Información Tecnológica Vol. 25 N° 3*, 11-13.
- Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. USA, Illinois: Allured.
- Agudo, L. (2010). *TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS*. Obtenido de http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf
- Alcayaga, S., & Hott, B. (2008). Listeria y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Revista Chilena de Salud Pública*, 12(3), 188-195. Obtenido de <http://200.89.78.45/index.php/RCSP/article/viewFile/2216/2094>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2015). Methods for in vitro evaluation of antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis Elsevier*, 72-77.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (23 de noviembre de 2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. (Elsevier, Editor) Obtenido de Science Direct: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- Barbosa, Q., & da Câmara, C. R. (2012). Chemical composition, circadianrhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Química Nova*, 35, 1806-1808.
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2015). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Brand, W., Cuvelier, M., & C., B. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology*, 25-30.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., & Morse, S. (2008). *Microbiología Médica* (19 ed.). (D. M. Martinez, Ed.) Bogota- Atlanta: Manual Moderno .
- Brú, J ; Guzman, J.D. (2016). Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 767-779.
- Cáceres, A ; Kato, M.J. (2014). *Importance of a multidisciplinary evaluation of Piper genus for development of new natural products in Latin America*. *Phytocosmetics Nat. Ingrid*. .
- Calderón, A. (2006). Proyección de plantas de América Latina para la actividad citotóxica. *Biología farmacéutica*, 130-140.
- Calderón, A., & Romero, L. (2010). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, 545-553.
- Canella, E. (2016). Aceites, aromas, esencias, sales de baño. En *Técnicas, materiales, fragancias* . Estados Unidos USA. : De Vecchi.

- Cantóna, R., Sánchez, M., & Morosini, M. (2006). *Proteus penneri*. *Elsevier*, 1-18.
- Carhuapoma, R., Bonilla, P., Suarez, S., Vila, R., & G., S. L. (2014). ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE Luma chequen (Moliná) A. Gray "arrayán. *Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica*, 74-75.
- Castañeda, C., E., R. L., & L., I. V. (2008). EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF SEVEN PERUVIAN MEDICINAL PLANTS. *Revista Horizonte Médico*, 8, 57-63.
- Castillo, J. (2012). *Antioxidantes en la salud, en la enfermedad y en la alimentación*.
 Obtenido de <http://www.um.es/lafem/Actividades/OtrasActividades/CursoAntioxidantes/MaterialAuxiliar/2012-01-24-AntioxidantesEnNaturaleza-TiposDistribucion.pdf>
- Chalar, L., Mamani, J., Elmer Vargas, S. M., & Romero, B. (22 de Junio de 2014). Antimicrobial function of Garlic Allicin in cultures of Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa and Escherichia Coli. *Revista Científica Ciencias Médicas*, 17(1), 26-28.
- chankuap.org. (2014). *El aprovechamineto del Ishpink*. Obtenido de <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Ishpink.pdf>
- Chen, Y., Wang, M., Rosen, R. T., & Ho, C. T. (1999). 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from Polygonum multiflorum Thunb. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2226-2228.

- Cravotto, G., Boffa, L., & Genzini, I. (2010). Phytotherapeutics an evaluation of the potential of 1000 plants. *Pharm*, 11-48.
- Cuenca, J. (2013). *Plantas Medicinales del Ecuador*. Obtenido de <http://plantasmedicinalesecuador.blogspot.com/2013/02/plantas-medicinales-y-su-poder-curativo.html>
- Da Silva, J. (2017). Essential Oils from Neotropical Piper Species and their Biological Activities. *International Journal of Molecular Science*, 2-42.
- Díaz, M., Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 147-161.
- Diego, L. (2012). Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agricultural Research*(4), 72.
- Elizari, I. (2013). *Actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo incorporados en soluciones formadoras de films sobre la microbiota superficial de filetes de merluza*. Obtenido de http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/8746/TyCIAA_TFM%20ELIZARI%20RETA.pdf?sequence=1
- Enciclopedia, A. (12 de junio de 2018). *ABIS ENCICLOPEDIA*. Recuperado el 12 de junio de 2018, de Regnun Procaiotae: <https://translate.google.ca/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.tgw1916.net/Listeria/grayi.html&prev=search>

Environmental Health Science. (2012). Obtenido de <http://ehscc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf>

Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., . . . H, M. d. (2013). Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena Infectol*, 480-498. Obtenido de www.sochinf.cl

García, E., González, R., & Schettino, P. (24 de febrero de 2014). Características generales del Staphylococcus aureus. *Revista Latinoamericana Patología Clínica Med Lab*, 61(1), 28-40.

Granados, C., Yanez, X., & Santafe, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de Calycolpus moritzianus y Minthostachys mollis. *Redalyc*, 12-23.

Guadalupe Socorro, Z. M., Héctor Avalos, F., & Marisela Yadira, S. P. (16 de junio de 2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomed*, 25(3), 129-143.

Informe21.com. (2015). Obtenido de <https://informe21.com/antibioticos/10-antibióticos-naturales-que-no-requieren-prescripción>

Jaramillo, M.A; Manos, P.S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). *PubMed*, 706-716.

Jorgensen, P ; León, S. (1999). *Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador*.

- Lavan Singh , MP Cariappa, Mandeep Kaur. (14 de junio de 2016). *Klebsiella oxytoca* : ¿un patógeno emergente? *Med J Armed Forces India Elsevier*, 59-61.
- León Méndez, G., Osorio, M., Fortich, M., Torrenegra, E., & González, J. (2015). Extraction, characterization and antioxidant activity of essential oil from *Plectranthus amboinicus* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 709-711.
- León, G., Osorio, M., & Martínez, S. (2015). Comparison of two methods for extraction of essential oil from. *Revista Cubana de Farmacia.*, 49(4), 742-750.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferrugines, Mycianthes rhopaloides, y Passiflora, frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*. Obtenido de Repositorio institucional - Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
- Loffreda, C. (2017). *Mantra*. Obtenido de <http://www.mantra.com.ar/contterapiasalternativas/aceitesesencialeshistoria.html>
- Londoño, J. (2014). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En J. Londoño.
- Malbrán, C. (junio de 2012). DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN. *Servicio Antimicrobianos*, 32(2), 1-48.

- Martínez, A. (2003). *ACEITES ESENCIALES*. Medellín: Facultad Química Farmacéutica.
- Mayorga Marin, F. (2015). *Perfil de resistencia y sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas en urocultivos de usuarios que acuden al laboratorio del Campus UNAM*. Managua: Cies UNAM.
- Mgbeahuruike, E. (2017). Bioactive compounds from medicinal Plants: Focus in Piper species. (Elsevier, Ed.) *South African Journal of Botany*, 55.
- Microbiologics. (2011). *Technical Information Bulletin*. EE.UU: Retail Catalog.
- Moreira, A., & Mancinii Filho, J. (2003). Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aq oso e lipídico. *Nutrire*.
- Moreira, D., P.O, S., Kaplan, E., & Guimaraes, G. C. (2013). Estudios fitoquímicos e farmacológico de Piper gaudichaudianum Kunth (Piperaceae). *Brasil Farm*, 29-32.
- Muñoz, F. (2012). *Plantas Medicinales y Aromáticas*. Madrid - México: Mundi - Prensa.
- Noriega. (2009). Extracción química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *La Granja*, 3-15.
- Noriega, P ; Taxo, A. (2018). La Flora Medicinal de los Parques del Distrito Metropolitano de Quito. Quito, Pichincha, Ecuador : Abya- Yala.
- Noriega, P., Mosquera, T., Abad, J., Cabezas, D., Piedra, S., Coronel, I., . . . Manfredini, S. (12 de Octubre de 2016). CHEMICAL COMPOSITION,

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF *Piper pubinervulum* C. DC PIPERACEAE. *La Granja Scopus*, 24(2), 111-123.

Noriega, P., Mosquera, T., Baldisserotto, A., Abad, J., Cabezas, D., Aillon, C., & Manfredini, S. (2015). Chemical Composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, II, 29-31.

Ochoa, S., López, F., Jiménez, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández, R., & Xicohtencatl, J. (5 de Marzo de 2013). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Bol Med Hosp Infant Mex* 138, 70(2), 138-148.

Ojeda, J., Oviedo, E., & Salas, L. (junio de 2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *Revista CES Odontología Scielo*, 6(1), 44 - 55.

Ordóñez, P; Vega, M; Malagón, O. (2006). Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyona Journal Ecology and application*, 65-71.

Paucar, L. M., Salvador, R., Guillén, J., Capa, J., & Moreno, C. (7 de 6 de 2015). *Scientia agropecuaria*. Obtenido de *Scientia agropecuaria*: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu2015.04.05>

Pérez, M. D., Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. (2010). Fundamental features on the *Enterococcus* genus as a very important pathogen at present time. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología Scielo*, 147-161.

- Rabionet, A., Vivar, K., Mancl, K., Bennett, A., & Shenefelt, P. (2016). Ecthyma associated with *Moraxella* and *Staphylococcus epidermidis*. *JAAD Case Report*, 473-475.
- Ramírez, J. (2016). *Piper commutatum* (Piperaceae) the correct name for a widespread species in México and Mesoamerica. *Acta Botánica Mexicana*, 9-19.
- Roca, D., & Luján, Á. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: a dangerous adversary. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465-474.
- Ronquillo, E. C., & Galarza, T. (Marzo de 2016). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (Ocotea quixos; Psidium guajava; Eugenia stipitata; Piper auritum; Piper imperiale)*. Obtenido de Repositorio digital de la Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12141/1/UPS-QT09649.pdf>
- Rosas, A., & López, A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Tymus vulgaris*). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 41-50. Obtenido de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf)
- Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A., & Bruni, R. (2006). Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour and fragrance journal*, 674-676.
- Sanabria, R; Samudio, M; Fariña, N; Laspina, F; Figueredo, L; Aguilar, G; Espínola, C. (mayo de 2014). Anti-fungal susceptibility profile of *Candida* spp isolates

by the microdilution method. New cutoff points for fluconazole. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 12(1), 33-40.

Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. En OmniaScience, *INVESTIGACIÓN EN PLANTAS DE IMPORTANCIA MÉDICA* (págs. 77-100.). España.

Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., David Neill, D., J.L, B., . . . Guerrini, A. (12 de Julio de 2017). Myrcia splendens (Sw.) DC. (syn. M. fallax (Rich.) DC.) (Myrtaceae) Essential Oil from Amazonian Ecuador: A Chemical Characterization and Bioactivity Profile. *Molecules*, 22(1163), 2-12.

Scalvenzi, L., Yaguache, B., Cabrera, P., & Guerrini, A. (2016). Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm y Piper aduncum L. *Bioagro*, 39-46. Obtenido de Bioagro: [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev28\(1\)/5.%20ms%201533.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev28(1)/5.%20ms%201533.pdf)

Takeara, R., Goncalves, R., Ayres, V., & Guimarães, A. (2017). Biological properties of essential oils from the Piper species of Brazil. 81-93.

Torres, S., Velandia, M., & Murcia, H. (2013). Aplicación alternada de ácido acetilsalicílico con fungicidas en el control de mildew polvoso en rosa. *Ciencia y Agricultura*, 45-51.

Tovar, J. (2013). *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS DE 30 PLANTAS RECOLECTADAS EN LA ECOREGIÓN CAFETERA*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Obtenido de

<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;jsessionid=14128E24BB760DC289C94135D8537D50?sequence=1>

Trindade, F. S.-J. (2012). Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of Piper alatabaccum branches and P. I., 2012. Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of Piper alatabaccum branches and P. I. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 979-984.

Tropicos. (2018). *Tropicos*. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/25000467?tab=distribution>

Vargas, L. (2003). Leaf Essential Oil of Piper barbafum H.B.K. (Piperaceae) from Perú. *Journal of Essential Oil Research*, 163-164.

Veloz, T. (2011). *Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de ishpingo (Ocotea quixos) y clavo de olor (Syzygium aromaticum)*. Obtenido de Repositorio Digital - Universidad Politécnica Salesiana: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6923/1/UPS-QT02498.pdf>

Yue-Hu Wang, S. L.-N.-N.-L.-H. (2014). Principios contra el cáncer de Medicinal Piper (胡椒 Hú Jiao) Plantas. *Revista de Medicina Tradicional y Complementaria*, 8-12.

Zapata, K., Cortes, F., & Rojano. (2013). Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (Psidiumaraca). *Información Tecnológica*, 103-112.

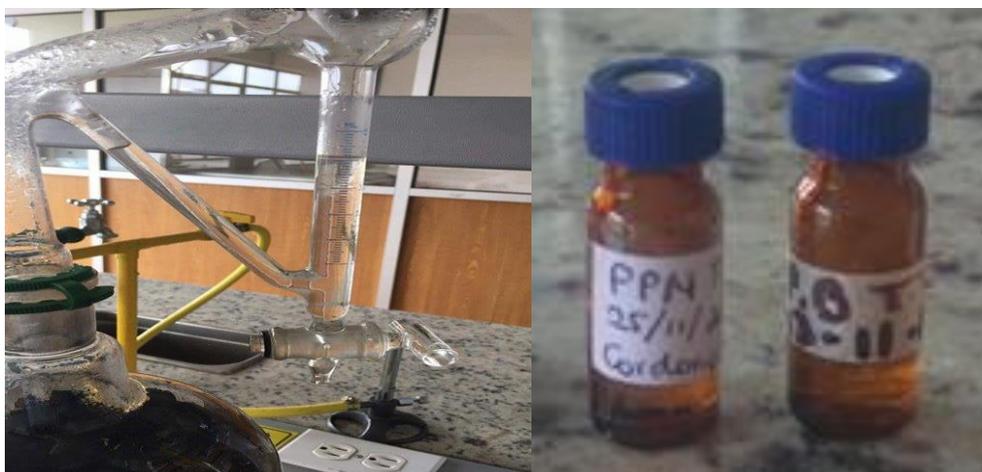
Anexos

Anexo 1. Hojas de *Piper barbatum* Kunth.



Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 2. Aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth.



Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 3. Siembra en cajas Petri de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*,
Staphylococcus aureus en sus respectivos medios.



Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 4. Preparación del inóculo de bacterias y levaduras.



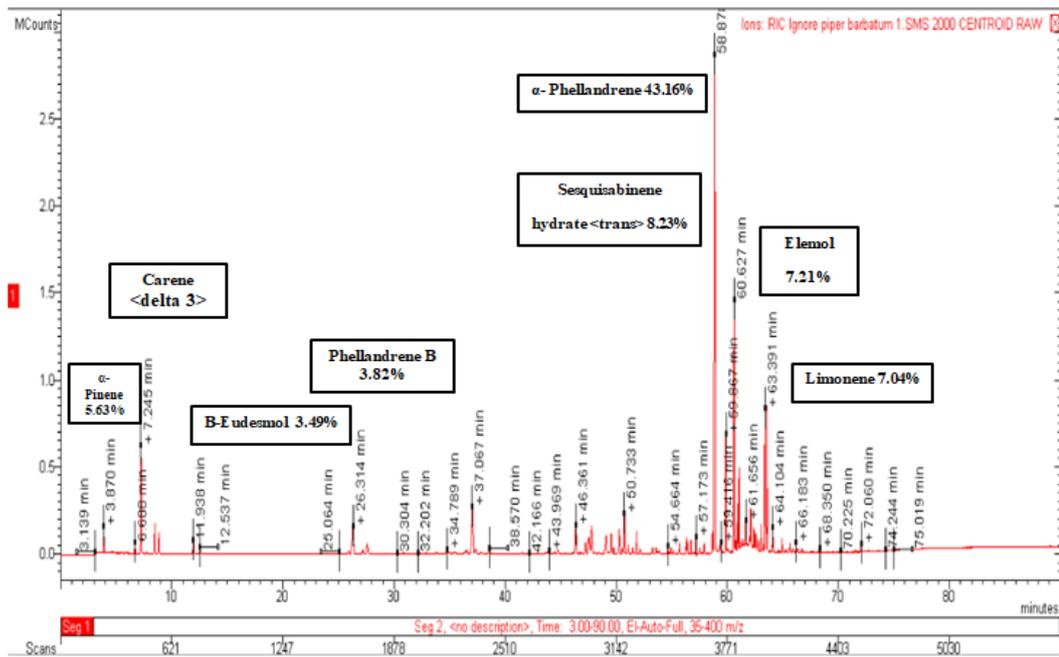
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 5. Método de Dilución o micro-dilución en caldo.



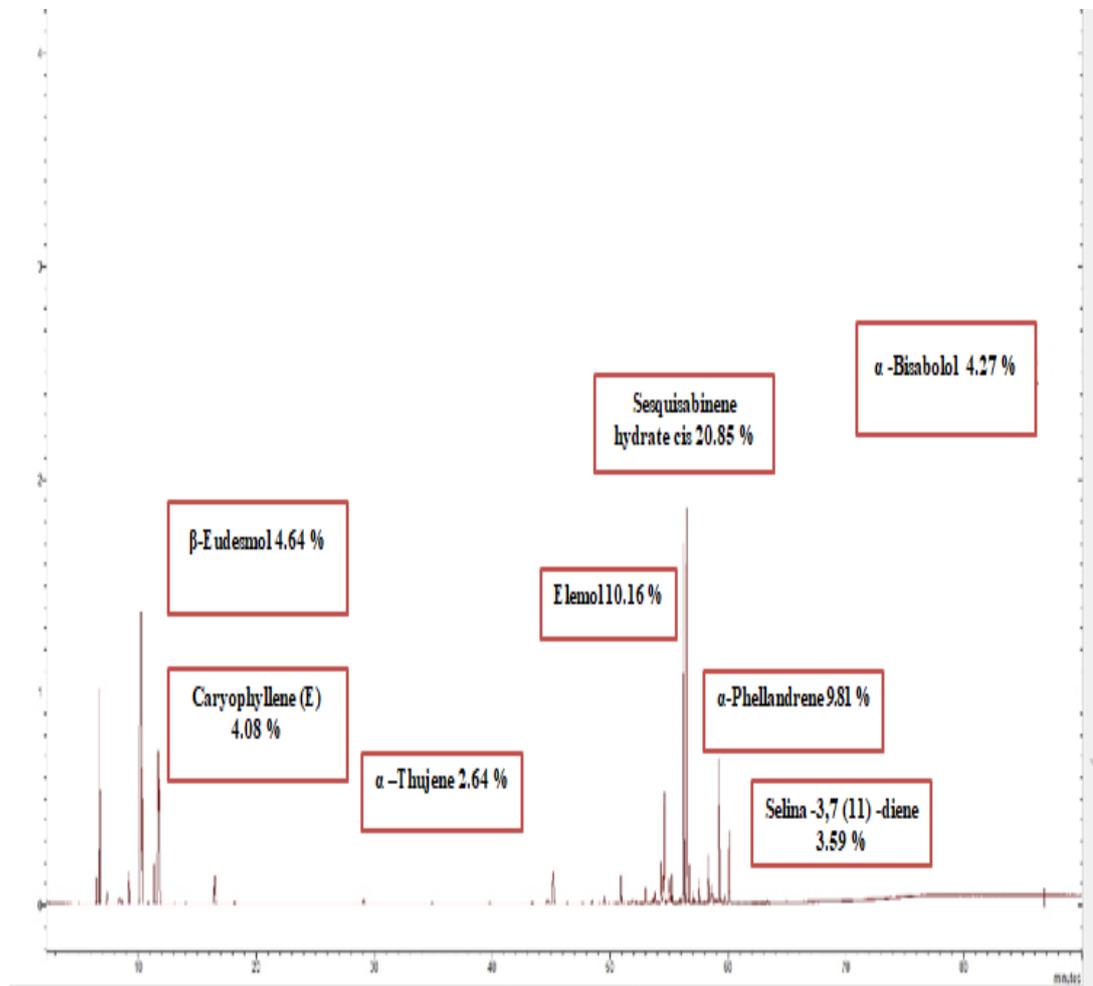
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 6. Cromatografía de gases acoplada a masas columna apolar



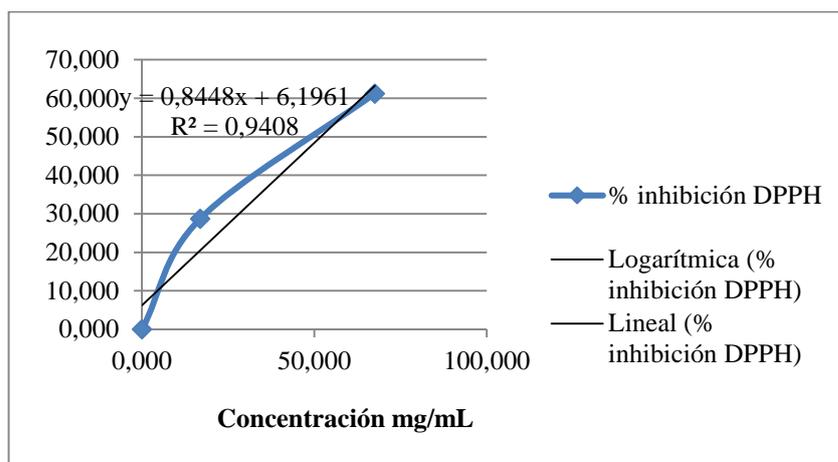
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 7. Cromatografía de gases acoplada a masas columna polaridad media



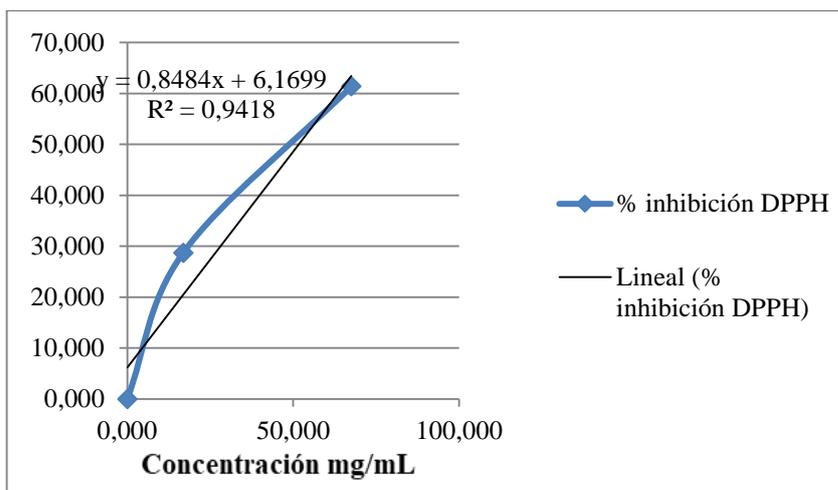
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 8. Curvas del porcentaje de inhibición DPPH vs. Concentración de *Piper barbatum* Kunth.



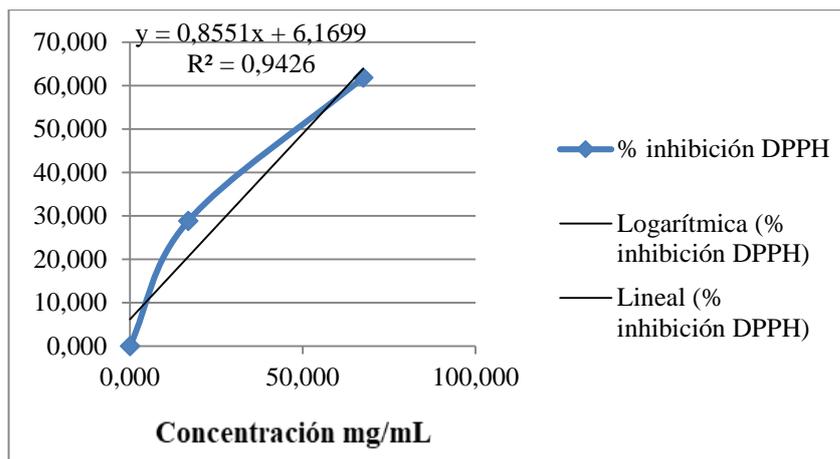
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 1.

Elaborado por: La autora, 2018.



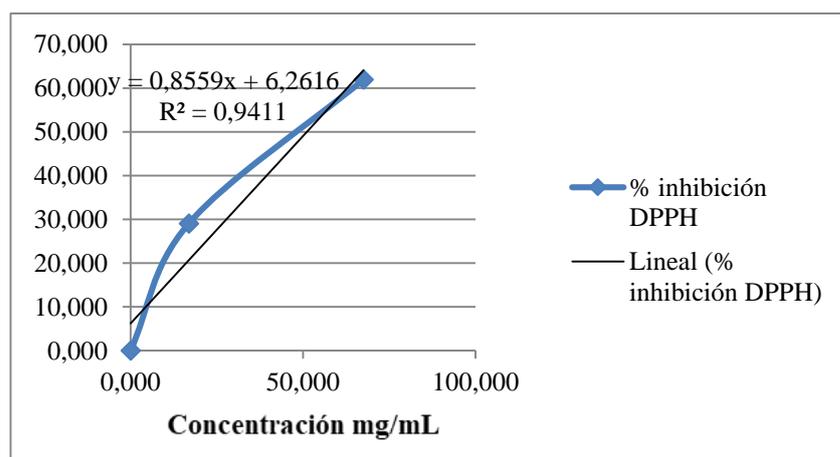
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 2.

Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 3.

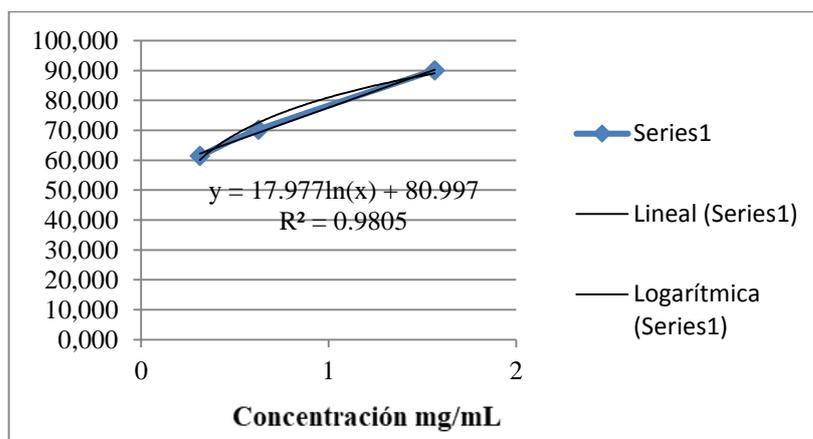
Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 4.

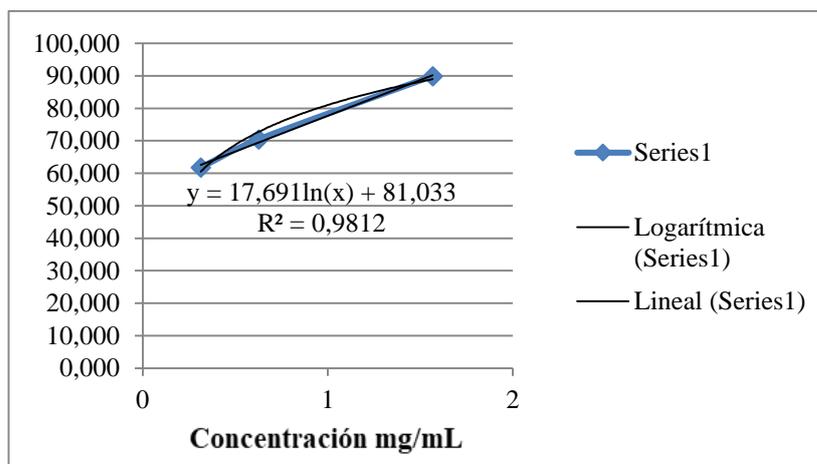
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 9. Curvas del porcentaje de inhibición DPPH vs. Concentración del referente natural *Thymus vulgaris*.



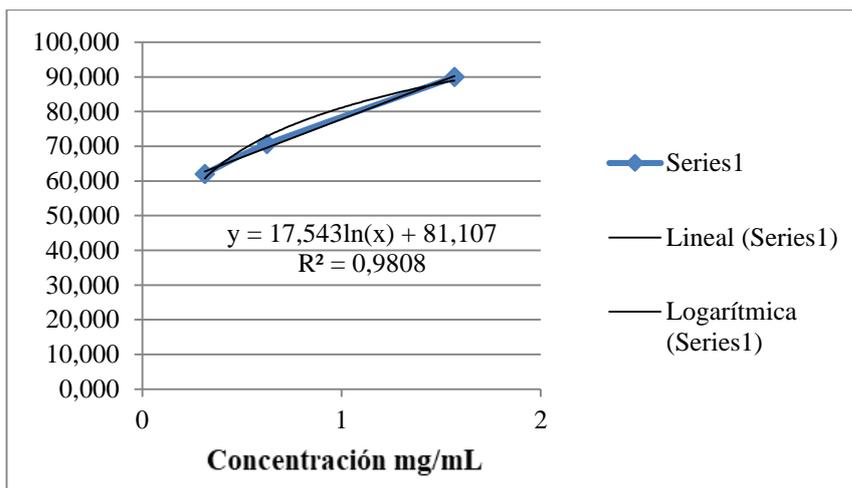
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 1.

Elaborado por: La autora, 2018.



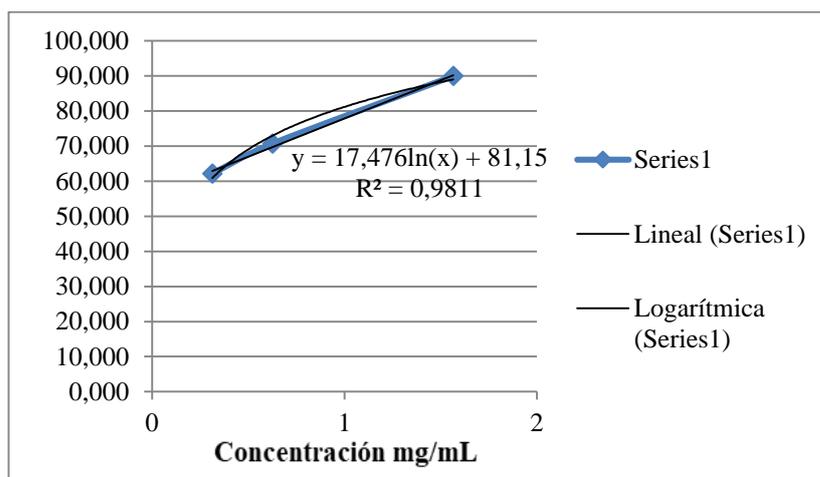
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 2.

Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 3.

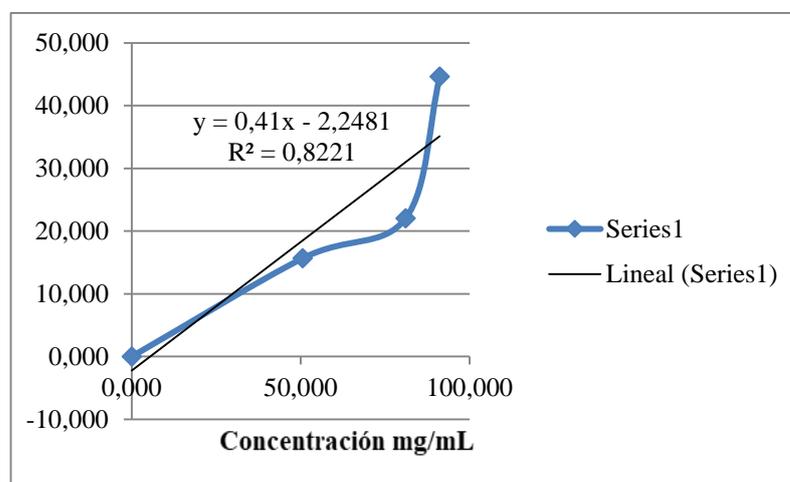
Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 4.

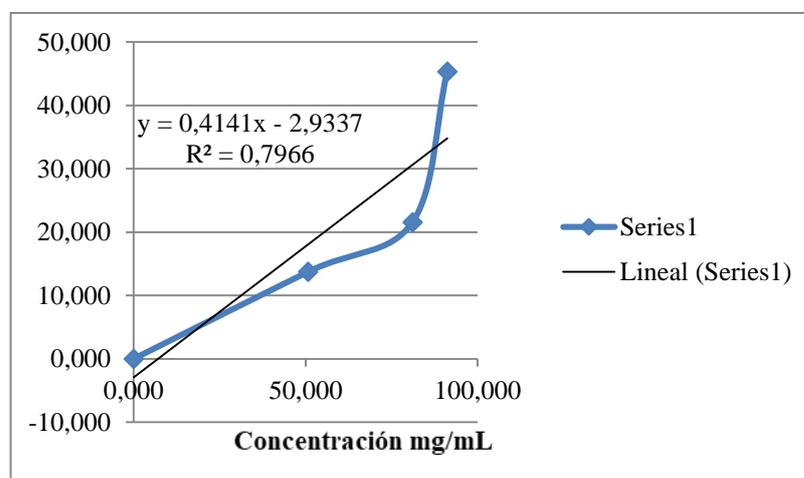
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 10. Curvas del porcentaje de inhibición ABTS vs. Concentración de *Piper barbatum* Kunth.



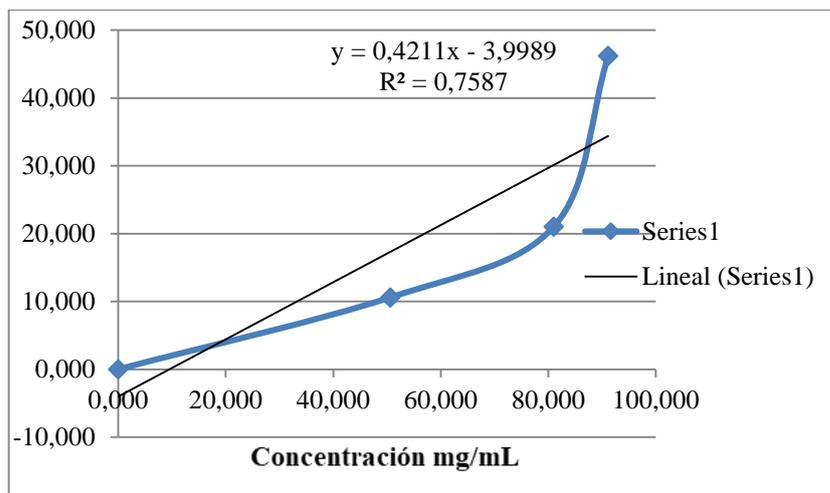
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 1.

Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 2.

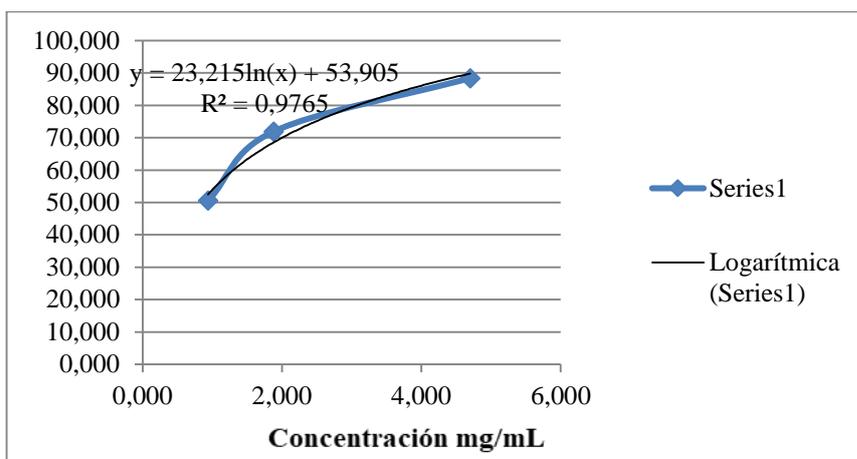
Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Piper barbatum* Kunth vs. % de Inhibición 3.

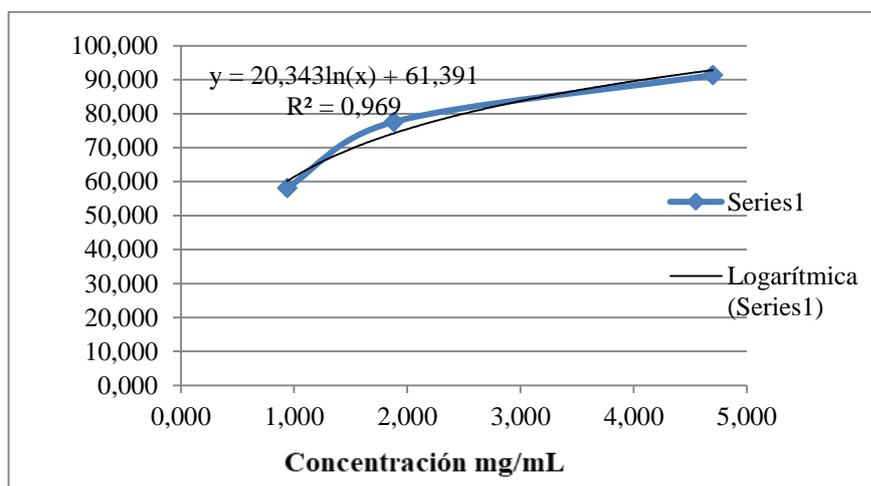
Elaborado por: La autora, 2018.

Anexo 11. Curvas del porcentaje de inhibición ABTS vs. Concentración del referente natural *Thymus vulgaris*.



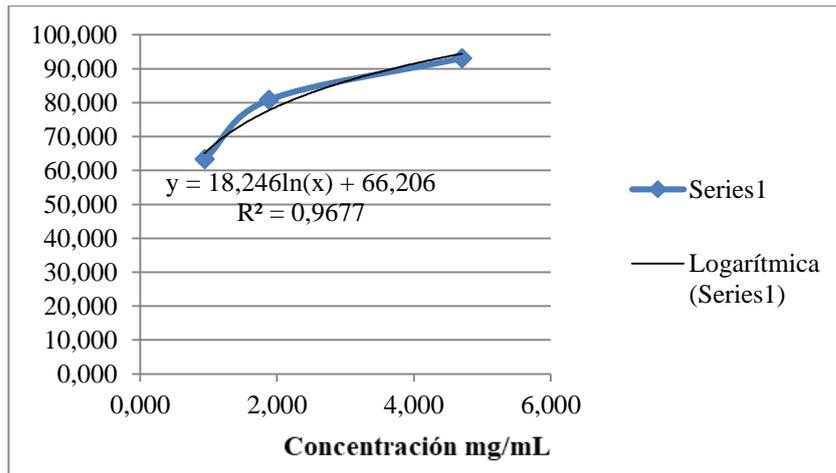
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 1.

Elaborado por: La autora, 2018.



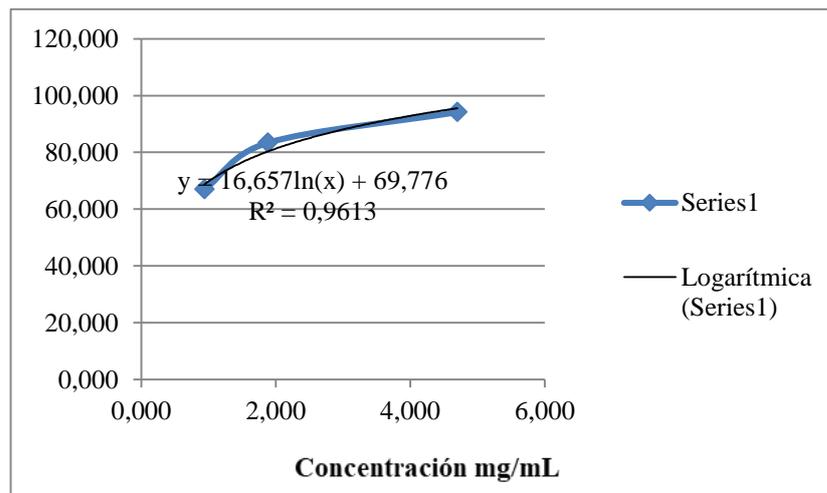
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 2.

Elaborado por: La autora, 2018.



Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 3.

Elaborado por: La autora, 2018.



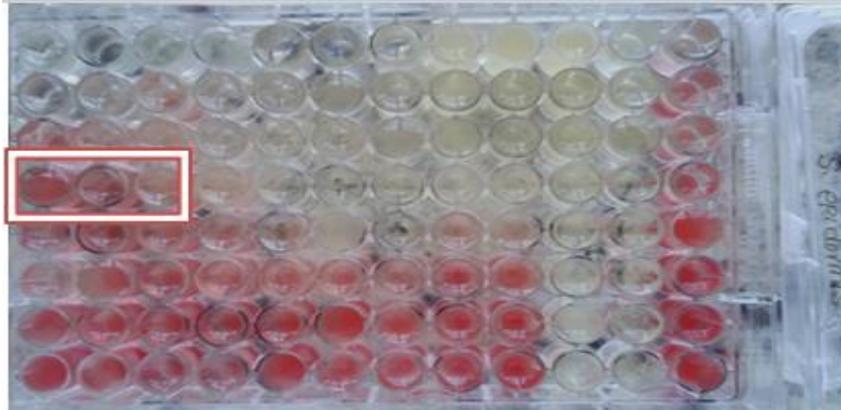
Concentración (mg/mL) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* vs. % de Inhibición 4.

Elaborado por: La autora, 2018.

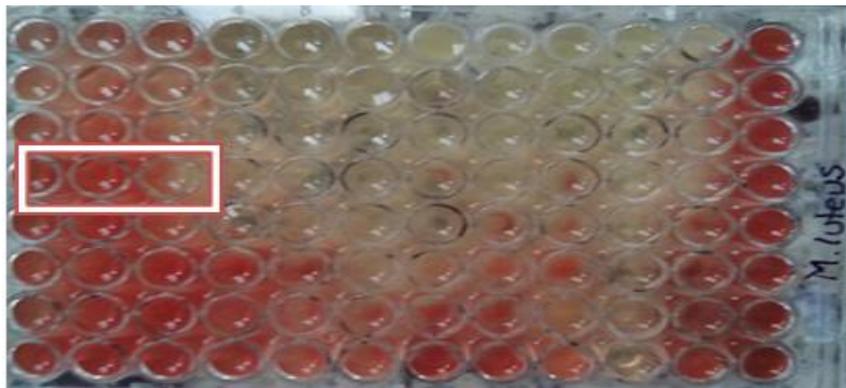
Anexo 12. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias y levaduras para cada aceite esencial por el método de dilución o micro-dilución en caldo.

Bacterias Gram Positivas

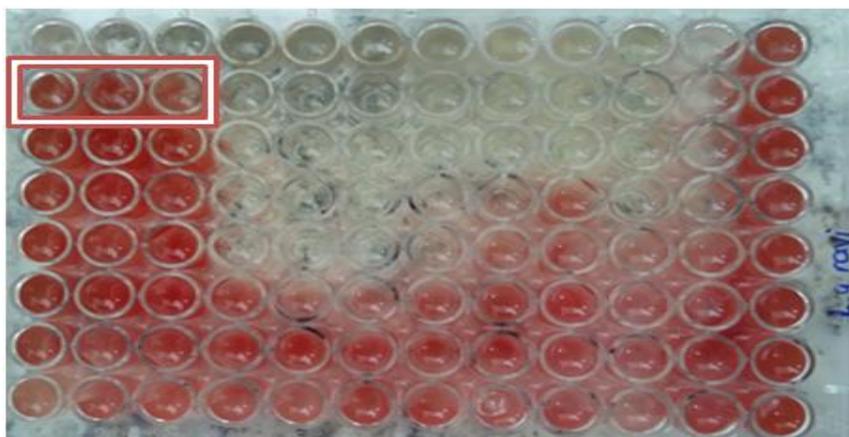
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990



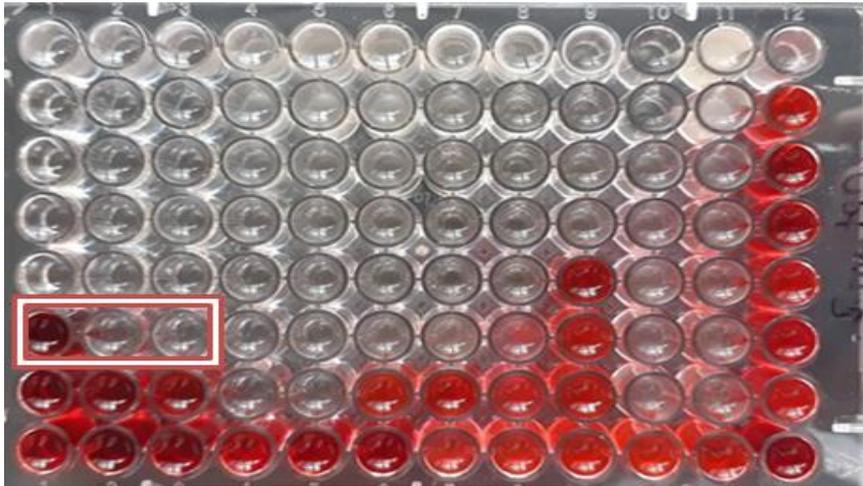
Micrococcus luteus ATCC 4698



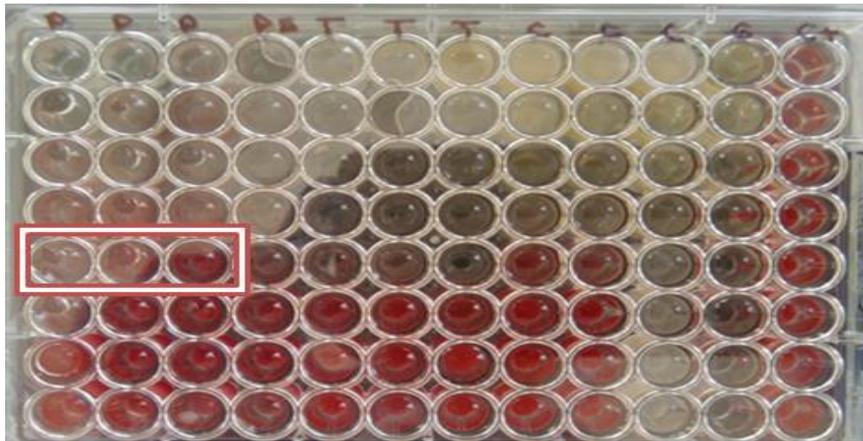
Listeria grayi ATCC 19120



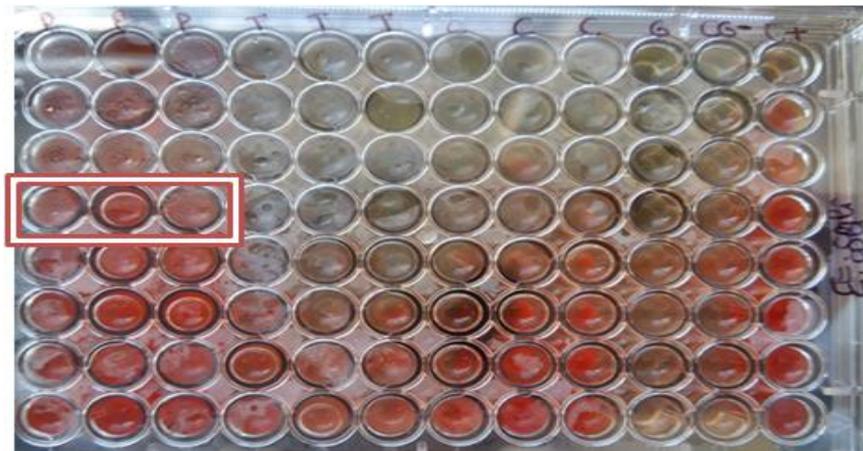
Streptococcus mutans ATCC 25175



Staphylococcus aureus ATCC 6328

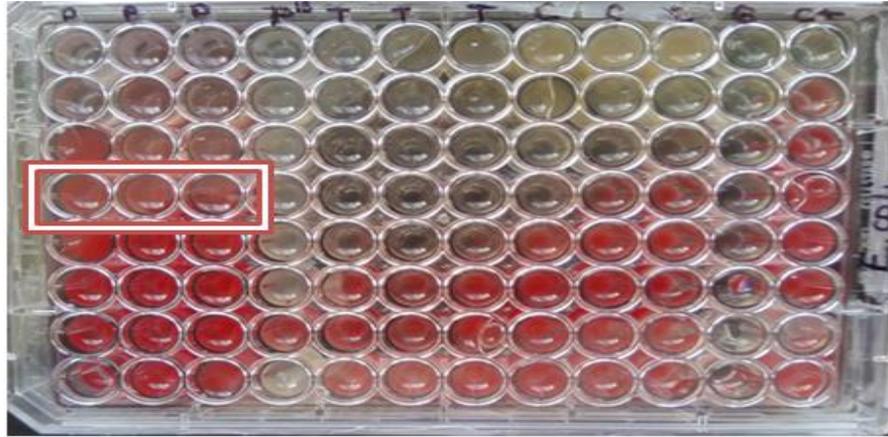


Enterococcus faecalis ATCC 29212

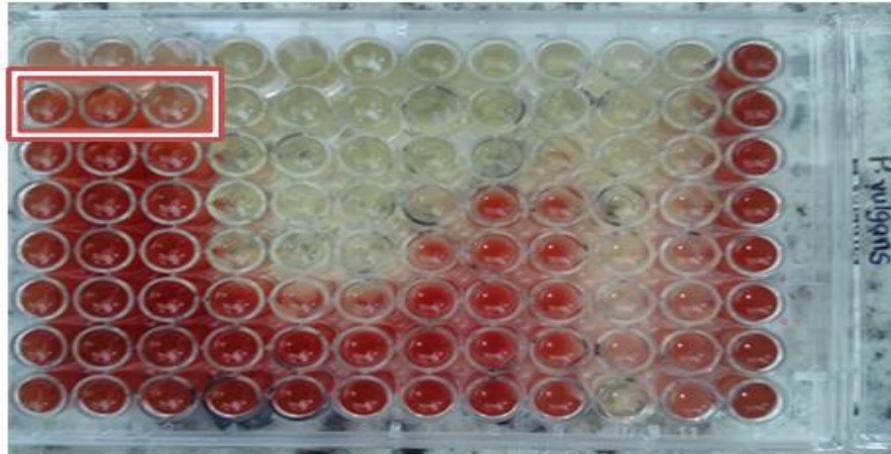


Bacterias Gram Negativas

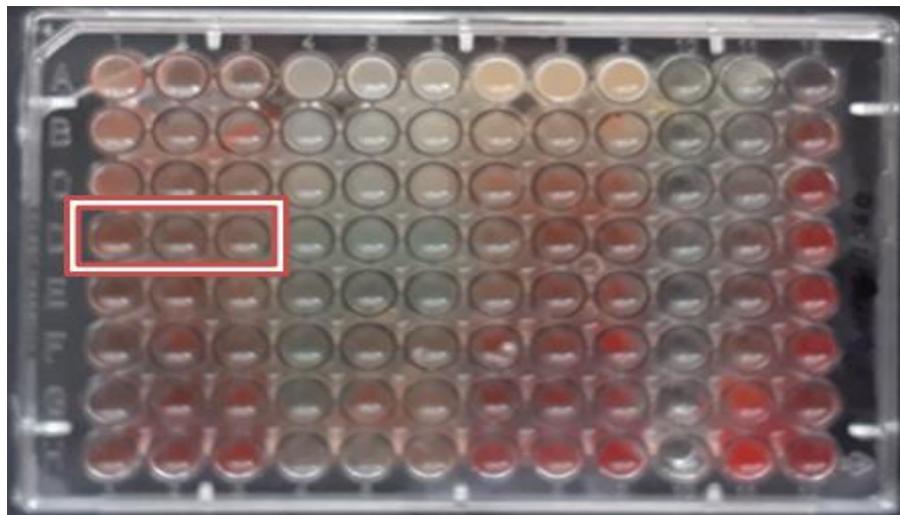
Escherichia coli ATCC 25922



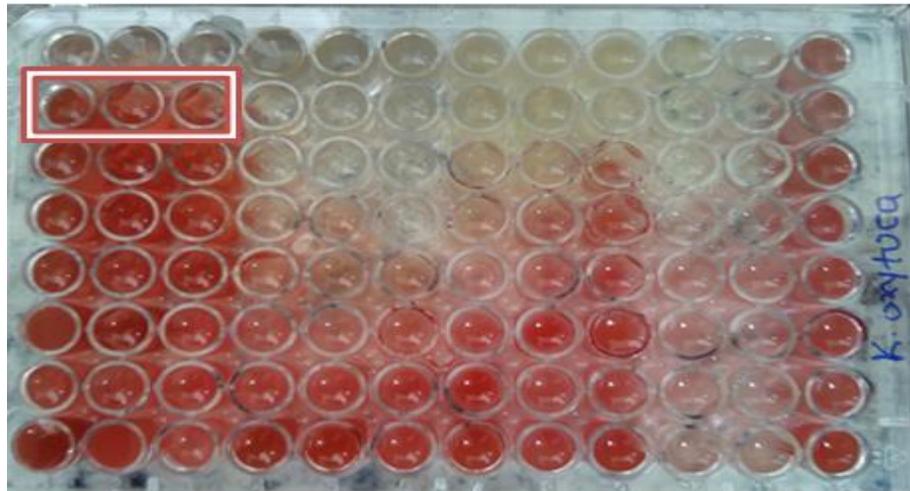
Proteus vulgaris ATCC 6380



Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

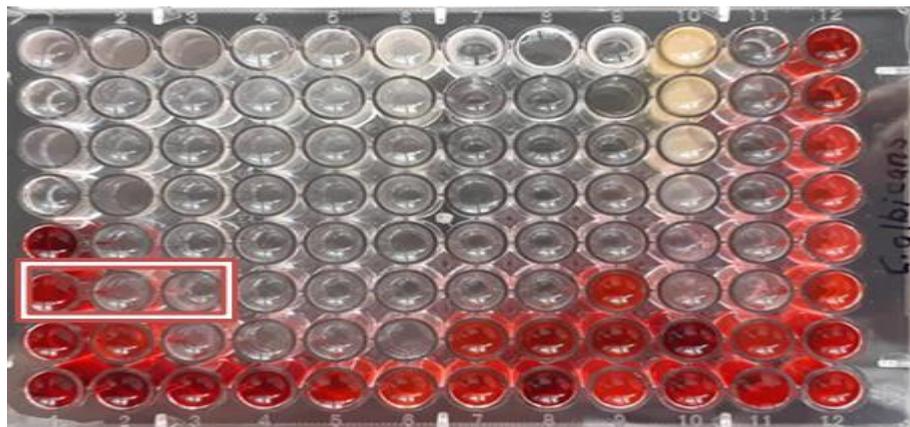


Klebsiella oxytoca ATCC 8724

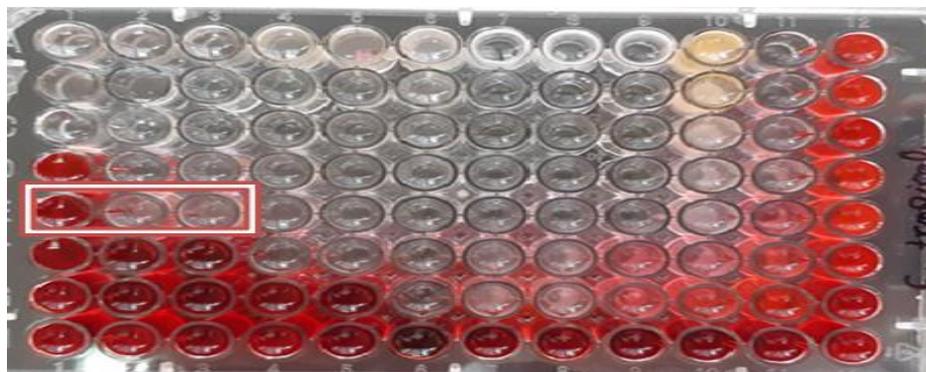


Levaduras

Candida albicans ATCC 10231



Candida tropicalis ATCC 13803



Nota: El recuadrado identifica la mejor concentración de inhibición del aceite *Piper barbatum* Kunth. Elaborado por: La autora, 2018.