



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL ACEITE
ESENCIAL DE *PIPER TUBERCULATUM* JACQ. FRENTE A DOS BACTERIAS DE
IMPORTANCIA CLÍNICA (*ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*)**

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera(o) en Biotecnología*

AUTORES:

ZAVALA LALAMA MARÍA EMILIA
HARO LÓPEZ JUSTIN ADAM

TUTOR:

Q.F. JAIRO JOEL JAIME CARVAJAL MSC.

GUAYAQUIL - ECUADOR

2026

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, **María Emilia Zavala Lalama** con documento de identificación N° 0929002517 y **Justin Adam Haro López** con documento de identificación N° 0928376318; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2026

Atentamente,



María Emilia Zavala Lalama
CI: 0929002517



Justin Adam Haro López
CI: 0928376318

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **María Emilia Zavala Lalama** con documento de identificación N° 0929002517 y **Justin Adam Haro López** con documento de identificación N° 0928376318, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *PIPER TUBERCULATUM* JACQ. FRENTE A DOS BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA (*ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*)**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera/o en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2026

Atentamente,



María Emilia Zavala Lalama

CI: 0929002517



Justin Adam Haro López

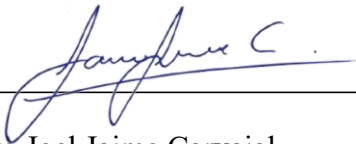
CI: 0928376318

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Jairo Joel Jaime Carvajal** con documento de identificación N° 1207482108, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *PIPER TUBERCULATUM* JACQ. FRENTE A DOS BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA (*ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*)**, realizado por **María Emilia Zavala Lalama** con documento de identificación N° 0929002517 y **Justin Adam Haro López** con documento de identificación N° 0928376318, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2026

Atentamente,



Jairo Joel Jaime Carvajal

CI: 1207482108

Dedicatoria

Dedico este trabajo, en primer lugar, a Dios, por darme salud y fortaleza necesaria para seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

A mis padres, Mariela y Edwin, por su amor incondicional y apoyo constante, son el pilar fundamental de mi formación como persona y profesional.

A mi familia, por acompañarme siempre con paciencia y comprensión, son un apoyo permanente a lo largo del camino.

De manera muy especial, a María Emilia Zavala Lalama. Tengo tanto por agradecerte, por compartir conmigo este proceso, por mantenerte en los buenos momentos y también en los difíciles, a tu lado aprendí a confiar y buscar lo que quiero sin importar las circunstancias. Gracias por acompañarme y ser un apoyo en mi camino.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Universidad Politécnica Salesiana, por brindarme la formación académica, los recursos y el espacio necesario para desarrollar este trabajo de tesis. Esta etapa no solo fortaleció mis conocimientos, sino también mi compromiso con la investigación y el aprendizaje constante.

Mi gratitud especial a nuestro tutor de tesis, Q.F Jairo Joel Jaime Carvajal, por su guía, paciencia y acompañamiento durante el proceso. Sus observaciones y correcciones fueron clave para mejorar cada avance y culminar este proyecto con mayor claridad y criterio científico.

De igual forma, expreso mi reconocimiento a los docentes Ing. Jaime Naranjo, Ing. María Alejandra de la Cruz Mora e Ing. Kevin Cedeño que contribuyeron de manera significativa con sugerencias, recomendaciones y apoyo académico oportuno, aportando una perspectiva valiosa que fortaleció el desarrollo del estudio.

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi compañera de tesis, María Emilia Zavala Lalama, su apoyo, compromiso y dedicación fueron parte clave del proceso. Su recuerdo se ve reflejado en cada página de este trabajo. Este trabajo también le pertenece y compartir mi camino académico a su lado dejó enseñanzas y momentos llenos de esfuerzo y gratitud que permanecen.

Finalmente, agradezco a todos los compañeros y amigos que, con su tiempo, apoyo y palabras de ánimo, me motivaron a lo largo del tiempo. Este logro es resultado de un esfuerzo constante y del acompañamiento de quienes confiaron en mi compañera de tesis y en mí, a lo largo del camino.

Resumen

Alrededor del mundo, la resistencia bacteriana es una problemática para el sistema de salud debido a su constante desarrollo pese al uso de distintos tratamientos aplicados para contrarrestarlos. Organismos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son los principales responsables de múltiples infecciones, además de generar cepas multirresistentes que representan un inconveniente en ambientes hospitalarios. Ante esta exponencial adversidad de resistencia bacteriana, se busca generar una alternativa natural como variedad de tratamiento. Debido a esto, se plantea el uso de aceites esenciales vegetales, que cuentan con propiedades antimicrobianas, y su alto contenido en metabolitos secundarios. Se busca extraer aceite esencial de *Piper tuberculatum* Jacq., una especie del género *Piper*, conocidas por su contenido químico rico en terpenos, alcaloides y fenilpropanoides las cuales destacan en propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas. A partir de la recolección de la especie descrita, se las somete a un proceso de secado y trituración, para posteriormente emplear el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger, de modo que, obtenemos el aceite y almacenamos en frascos ámbar. Se procedió a calcular su rendimiento y la respectiva evaluación de concentración mínima inhibitoria y máxima bactericida mediante la técnica de microdilución en pocillos, empleando a las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, cultivándolas y mezclándolas con la solución de aceite, y seguido a esto, se hizo por medio de una matriz comparativa, un análisis de resultados, evaluando así su capacidad antibacteriana frente a los microorganismos mencionados.

Palabras clave: Aceites esenciales, resistencia antibacteriana, hidrodestilación, *Piper tuberculatum*.

Abstract

Antibacterial resistance is a major global health concern due to its constant evolution despite the application of various therapeutic treatments. Microorganisms such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are primarily responsible for multiple infections and the emergence of multidrug-resistant strains, representing a significant challenge in hospital environments. In response to this increasing bacterial resistance, the development of natural alternatives as potential treatment options has gained interest. Essential oils derived from plants possess antimicrobial properties and are characterized by a high content of secondary metabolites. In this study, essential oil was extracted from *Piper tuberculatum* Jacq., a species of the genus *Piper*, known for its rich chemical composition of terpenes, alkaloids, and phenylpropanoids, which exhibit anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. The collected plant material was dried and ground, followed by hydrodistillation using a Clevenger apparatus to obtain the essential oil, which was stored in amber vials. The oil yield was calculated, and its minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were evaluated using the microdilution method in microplates, employing *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. These strains were cultured and exposed to the oil solution, and the antibacterial activity was analyzed through a comparative matrix to assess its effectiveness against the tested microorganisms.

Keywords: Essential oils, antibacterial resistance, hydrodistillation, *Piper tuberculatum*.

Contenido

Capítulo 1	1
Antecedentes	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Pregunta de investigación.....	3
1.4. Justificación.....	3
1.5. Limitaciones	4
1.6. Objetivos	5
1.6.1. Objetivo general	5
1.6.2. Objetivos específicos.....	5
• Caracterizar la composición química del aceite esencial de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq. obtenido mediante destilación por arrastre de vapor, empleando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).	5
• Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> mediante el método de microdilución en caldo.	5
• Contrastar los perfiles químicos y la eficacia antibacteriana obtenidos con reportes previos en la literatura para establecer el potencial fitofarmacéutico de la especie estudiada.....	5
1.7. Hipótesis.....	6
Capítulo 2	7

Marco teórico	7
2.1. Género <i>Piper</i> y <i>P. tuberculatum</i>	7
2.2. Composición química.....	9
2.3. Aceites esenciales.....	9
2.4. Antioxidantes	10
2.5. <i>Escherichia coli</i>	11
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.7. Resistencia bacteriana	12
2.8. Microdilución en pocillos.....	13
2.9. Potencial antibacteriano	13
3.0. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	14
Capítulo 3	16
Materiales y métodos	16
3.1. Obtención de materia vegetal.....	16
3.2. Hidrodestilación con trampa tipo Clevenger.....	18
3.3. Proceso de extracción.....	19
3.4. Técnica de micro dilución en pocillos.....	20
3.5. Inoculación en microplacas	22
3.6. Concentración Mínima Inhibitoria	23
3.7. Lectura de datos en GC-MS	24
3.8. Matriz comparativa	24

Capítulo 4.....	26
4.1. Resultados	26
4.2. Composición química.....	27
4.2.1. Cálculo de rendimiento	30
4.3. Lectura de resultados de actividad antimicrobiana en prueba piloto	30
4.4. Resultados Experimentales de la prueba piloto.....	31
4.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite de <i>Piper tuberculatum</i> frente a <i>E. coli</i>	33
4.6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite de <i>Piper tuberculatum</i> frente a <i>S. aureus</i>	35
4.7. Cálculo de Concentración mínima Inhibitoria (CMI).....	37
4.8. Concentración aceite	39
4.9. Valores de controles	40
4.9.1. Relación entre los compuestos mayoritarios y la actividad antimicrobiana.	42
Discusiones.....	44
Conclusiones	46
Recomendaciones.....	47

Abreviaturas

RAM	Resistencia Antimicrobiana
CMI	Concentración mínima inhibitoria
TSB	Tripticasa Soya
ATTC	Colección Americana de Cultivos Tipo
TTC	Trifeniltetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido

Simbología

°C	grados Celsius
nm	nanómetro
μm	micrómetro
h	hora
g	gramo
rpm	revoluciones por minuto
ml	mililitro
μL	microlitro

Índice de figuras

Figura 1. <i>Piper tuberculatum</i> Jacq	7
Figura 2. Ubicación de la zona de recolecta de la planta.	16
Figura 3. Segunda ubicación de la zona de recolecta de la planta.	16
Figura 4. Muestras de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq. recolectadas.	17
Figura 5. Equipo de hidrodestilación con trampa tipo Clevenger.	18
Figura 6. Diagrama de metodología de hidrodestilación.	20
Figura 7. Diagrama de metodología de técnica de microdilución.....	23
Figura 8. Diagrama de metodología de matriz comparativa de resultados.	25
Figura 9. Estructura química de espectro mayoritario identificado	29
Figura 8. Compuestos mayoritarios identificados.	43

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía.....	8
Tabla 2. Listado de materiales empleados para la hidrodestilación.	19
Tabla 3. Insumos empelados para la técnica de microdilución en pocillos.	22
Tabla 4. Parámetros Fisicoquímicos del aceite esencial de <i>P.tuberculatum</i>	27
Tabla 5. Resultados analíticos por GC-MS: Composición química y comparación de índices de retención.	27
Tabla 6. Diseño para lectura de datos en micro-Elisa.....	31
Tabla 7. Resultados de lectura de datos prueba piloto en micro-Elisa.....	32
Tabla 8. Resultados de lectura de datos en micro-Elisa usando <i>E. coli</i>	33
Tabla 9. Resultados de lectura de datos en micro-Elisa usando <i>S. aureus</i>	35
Tabla 10. Resultados de concentraciones en <i>E.coli</i> y <i>S. aureus</i>	37
Tabla 11. Resultados de concentraciones finales por fila.	39
Tabla 12. Matriz comparativa de análisis de componentes químicos encontrados en especies de <i>Piper</i>	42

Índice de anexos

Anexo 1. Recolección de muestras de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	57
Anexo 2. Muestras de <i>Piper tuberculatum</i> secas y rotuladas.	57
Anexo 3. Demostración del proceso de armado del equipo de Hidrodestilación	58
Anexo 4. Pesaje y llenado de los balones con la muestra material vegetal.....	58
Anexo 5. Proceso de extracción por hidrodestilación.	59
Anexo 6. Recolección del aceite esencial extraído.	59
Anexo 7. Inoculación de cepas.....	60
Anexo 8. Preparación de diluciones seriadas.	60
Anexo 9. Prueba piloto placa de microdilución de 96 pocillos.....	61
Anexo 10. Técnica de microdilución en pocillos.	61
Anexo 11. Proceso de lectura de absorbancia en lector de microplacas (ELISA) tras el periodo de incubación.	62
Anexo 12. Cromatograma de gases y espectro de masas obtenido mediante el software AMDIS para la identificación de metabolitos.....	62
Anexo 13. Identificación de Elemicina en programa AMDIS.	63
Anexo 14. Identificación de Isoelemicina en programa AMDIS.....	63
Anexo 15. Identificación de Agglomerone en programa AMDIS.	64
Anexo 16. Viales ámbar con el aceite extraído	64
Anexo 17. β -cis-ocimene de aceite <i>Piper tuberculatum</i>	65
Anexo 18. Compuestos mayoritarios de aceite <i>Piper tuberculatum</i>	65

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Introducción

Las infecciones bacterianas son una preocupación sanitaria global por el aumento de cepas resistentes, lo que limita las alternativas terapéuticas e incrementa los índices de mortalidad. Entre los patógenos de mayor impacto en brotes hospitalarios o infecciones asociadas a cepas multirresistentes destacan *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Álvarez-Martínez et al., 2021a) los cuales son microorganismos con gran relevancia clínica, y de gran importancia en investigaciones al ser representantes de grupos de bacterias tanto Gram negativas y Gram positivas respectivamente (Solís et al., 2022).

Por otro lado, investigaciones recientes como las de (Urbaniak et al., 2014) refuerzan la viabilidad del uso de aceites esenciales en el entorno clínico. En los ensayos con aislados hospitalarios de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*, se demostró que el aceite de canela mantiene valores de CIM bajos (entre 1.0 y 1.75 $\mu\text{l/ml}$ para bacterias Gram-negativas) siendo esto, independiente del perfil de resistencia previo de la bacteria. Esto sugiere que los mecanismos de acción del aceite, basados en el aldehído cinnámico (76.8%), no comparten las vías de resistencia que las bacterias han desarrollado contra los antibióticos convencionales, permitiendo atacar incluso a cepas resistentes a múltiples fármacos.

De acuerdo a la emergencia de la Resistencia Antimicrobiana (RAM), los microorganismos *E. coli* y *S. aureus* son elevados a la categoría de amenazas sanitarias globales prioritarias, se demuestra en su impacto epidemiológico. Estos patógenos han sido responsables de más de 3.5 millones de muertes (Murray et al., 2022).

El análisis de datos recopilados de 2023 revela que aproximadamente 1 de cada 6 (16,7%) de las infecciones bacterianas confirmadas por laboratorio notificadas a GLASS fueron causadas por patógenos resistentes entre los que destacan *E. coli* y *S. aureus*, empleando al menos un antibiótico de primera línea utilizado habitualmente (Organization, 2025).

Dentro de las investigaciones realizadas en especies botánicas, la familia Piperaceae, se encuentra distribuida en regiones sub tropicales, se le atribuyen una gran variedad de compuestos químicos, especialmente su riqueza de metabolitos secundarios. De modo que, el género *Piper*, con más de 1000 especies resumidas, es ampliamente investigado por su gran composición fitoquímica que abarca terpenos, fenilpropanoides, alcaloides y amidas bioactivas (Salehi et al., 2019). Debido a esta diversidad de compuestos presentes, tiene un amplio espectro de actividades biológicas, entre las cuales sobresalen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antioxidantes y larvicidas (Akram et al., 2024). Bajo este contexto, *Piper tuberculatum* Jacq., conocida comúnmente como “cordoncillo” o “matico macho”, produce un aceite esencial con un perfil químico altamente relevante y una capacidad farmacológica potencial.

Gracias a la biodiversidad vegetal presente en la región, el estudio y desarrollo de una alternativa con potencial antibacteriano frente a dos microorganismos multirresistentes, brinda a este trabajo una serie de objetivos que aporten a más investigaciones y estrategias en desarrollo de alternativas biotecnológicas para futuros tratamientos.

1.2. Planteamiento del problema

El constante desarrollo de resistencia por parte de microorganismos en general, es un problema sanitario que amenaza con elevar la tasa de mortalidad y reducir de forma drástica la eficacia de los tratamientos convencionales. Teniendo esta necesidad crítica de encontrar soluciones, en el campo de la biotecnología, la parte vegetal es un área con un potencial latente para industrias farmacológicas.

Haciendo uso de una especie vegetal del género *Piper*, conocido por su riqueza fitoquímica y capacidades antibacterianas, representa más que un desafío experimental, si no que permite aprovechar de forma sostenible la biodiversidad de la región. Teniendo evidencia para posible desarrollo de terapias naturales para mitigar el crecimiento exponencial, que si bien, no es un tema investigado a profundidad, es necesario ya que nos otorga bases experimentales para análisis de una problemática que escala cada vez más, y que, haciendo uso de procesos aplicados en biotecnología, logramos concretar una posible alternativa y expandir un poco más el perfil de especies botánicas y los aceites esenciales.

1.3. Pregunta de investigación

¿El aceite esencial de *Piper tuberculatum* Jacq. tiene potencial antibacteriano frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

1.4. Justificación

Una de las problemáticas actuales en el sector de la salud y la biotecnología es la creciente pérdida de efectividad de los agentes antibacterianos debido a su uso indiscriminado en campos como la agricultura y la medicina. Esta situación favorece el desarrollo de bacterias

multirresistentes (MDR), entre las que destacan *E. coli* y *S. aureus*, representando una amenaza constante por su impacto en las tasas de mortalidad (Galvano et al., 2022).

Actualmente, se calcula que existen entre 250,000 y 500,000 especies vegetales. Una cantidad asombrosa en cuanto a flora, pese a esta notable diversidad biológica, los humanos solo aprovechamos una fracción limitada de ellas, aproximadamente el 1% y el 10% (Stuper-Szablewska et al., 2022). Esto demuestra el vasto potencial inexplorado dentro del reino vegetal para la identificación de metabolitos secundarios con aplicaciones terapéuticas.

La evaluación del potencial de *Piper tuberculatum Jacq.* nos permite entender cómo la composición química del aceite se relaciona con su actividad biológica y sus respectivos mecanismos de acción, aportando información útil para el desarrollo de compuestos vegetales con propiedades antibacterianas y moduladoras de la resistencia. Sumado a esto, promueve el uso sostenible de plantas tropicales y apoya la innovación farmacológica basada en la biodiversidad (Moncayo et al., 2021).

1.5. Limitaciones

La limitación principal es la falta de metodologías estándar. A diferencia de los antibióticos comerciales que ya vienen con una fórmula predeterminada, los compuestos naturales tienden a ser muy variados; esto significa que los resultados pueden variar dependiendo el factor como zona o método de extracción. Entonces, ante la ausencia de un protocolo fijo para hacer las pruebas, se limitan las investigaciones, ya que es muy complejo replicar a exactitud un procedimiento, si la composición química de la muestra obtenida va a variar.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Evaluar el potencial antibacteriano del aceite de *Piper tuberculatum Jacq.* frente a bacterias de importancia clínica (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

1.6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la composición química del aceite esencial de *Piper tuberculatum Jacq.* obtenido mediante destilación por arrastre de vapor, empleando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de microdilución en caldo.
- Contrastar los perfiles químicos y la eficacia antibacteriana obtenidos con reportes previos en la literatura para establecer el potencial fitofarmacéutico de la especie estudiada.

1.7. Hipótesis

H₁: El aceite esencial de *Piper tuberculatum Jacq.* ejercerá un efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, evidenciado por una mayor inhibición del crecimiento en comparación con los controles.

H₀= El aceite esencial de *Piper tuberculatum Jacq.* no ejerce un efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, evidenciado por una menor inhibición del crecimiento en comparación con los controles.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Género *Piper* y *P. tuberculatum*



Figura 1. Piper tuberculatum Jacq. Fuente: Autores, 2026.

El género *Piper* forma parte de la subfamilia Piperioideae. Sus características morfológicas van desde plantas con hábitos variados, entre ellas arbustos, lianas y hierbas perennes o anuales. Sus hojas son alternas o verticiladas, con una lámina foliar de venación palmada o pinnada y consistencia variable. Las inflorescencias se caracterizan por ser espádices solitarios o compuestos, de posición terminal, axilar o "opuesta a la hoja". Sus flores, no poseen perianto, se disponen de forma densa o espaciada en el raquis, agrupando de 2 a 6 estambres y entre 1 y 4 estigmas. En la actualidad, este género es reconocido como uno de los más diversos de la familia, con aproximadamente 2,000 especies distribuidas en regiones pantropicales (Marie-Stéphanie Samain, 2008).

La familia Piperaceae es catalogada como uno de los grupos más representativos dentro de la división de angiospermas, reúne cerca de 2000 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Su importancia científica se sustenta en la amplia diversidad química que posee, la cual se manifiesta en la producción de metabolitos secundarios de gran interés, entre los cuales destacan: fenilpropanoides, lignanos, flavonoides, amidas y protoflavonoides (Mosquera et al., 2020).

Su distribución abarca regiones tropicales, en cuanto al género *Piper* cuyos orígenes se remontan a regiones de Asia, y que actualmente se encuentra ampliamente distribuida en América (Salehi et al., 2019).

La taxonomía de *Piper tuberculatum* Jacq. se compone de:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>
Especie	<i>Piper tuberculatum</i>

Tabla 1. Taxonomía. Fuente: (Universidad de El Salvador, 2022)

2.2. Composición química

En el género *Piper* se producen aceites esenciales que combinan principalmente monoterpenos y sesquiterpenos volátiles, junto con fenilpropanoides y otros compuestos oxigenados. Por ejemplo, se han identificado en múltiples compuestos mayoritarios como β -caryophyllene, safrole, aromadendrene y dillapiole según la especie y región geográfica (Noriega et al., 2019).

En el estudio realizado por (Mora et al., 2008) sobre muestras de *P. tuberculatum* recolectadas en Mérida, Venezuela, se determinó que los componentes predominantes son el apiol y el piperitono. Es importante considerar que la composición química está estrechamente ligada al origen geográfico de la planta.

2.3. Aceites esenciales

En teoría, los aceites esenciales son compuestos aromáticos que las plantas producen de forma natural, cumplen un papel importante en el desarrollo de productos farmacéuticos y como insecticidas (NaturMed Scientific., 2024).

Los principales componentes de los aceites esenciales son los terpenos, se generan mediante la vía del isoprenoide en tejidos vegetales especializados. Se clasifican según el número de unidades de isopreno (C5) presentes: los monoterpenos contienen dos unidades (C10), los sesquiterpenos tres (C15), los diterpenos cuatro (C20) y los triterpenos seis (C30) (Guimarães et al., 2019). Pueden incorporar distintas funciones, las cuales influyen directamente en su actividad biológica.

La cantidad de aceite que se logra extraer varía considerablemente; mientras que en algunas especies el rendimiento es mínimo, en otras llegan a representar entre el 1% y 3% del peso del vegetal. Los aceites esenciales se distribuyen de forma específica en la planta, concentrándose principalmente en órganos como las flores, hojas, frutos e incluso raíces. Se producen y almacenan en glándulas especializadas (pequeñas bolsas formadas por células secretoras) en las cuales se acumula la esencia. Se debe tener en cuenta que la composición química puede verse alterada por factores externos como la zona geográfica, la época del año en que se recolecta o incluso variaciones genéticas de la planta (Noriega Rivera, 2009).

2.4. Antioxidantes

Se definen a los antioxidantes como sustancias capaces de frenar o incluso prevenir el daño oxidativo en moléculas críticas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, aun cuando se encuentran en concentraciones muy bajas (Pham-Huy et al., 2008). De acuerdo a (Pham-Huy et al., 2008), los antioxidantes logran detener este proceso donando sus propios electrones para estabilizar al radical o, en otros casos, impidiendo que estos se formen desde el inicio. De esta manera, ayudan a evitar el estrés oxidativo y protegen la integridad celular, lo cual es clave para prevenir enfermedades crónicas relacionadas con el desgaste por oxidación. Su función principal es neutralizar a los radicales libres; estas son especies químicas inestables que, al tener electrones desapareados, intentan estabilizarse reaccionando de forma agresiva con las células cercanas.

2.5. *Escherichia coli*

Descrito por primera vez por Theodor Escherich en 1885, *Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa, en forma de bacilo y anaerobia facultativa. Sus cepas colonizan de manera inofensiva el tracto gastrointestinal tanto de humanos y animales como flora normal. Sin embargo, existen algunas cepas que han evolucionado hacia una *E. coli* patógenas en caso que el sistema inmune del hospedador está suprimido o si adquieren factores de virulencia (Ravindra B. Malabadi et al., 2024).

Al ser una Gram-negativa tiene una ventaja defensiva superior gracias a la membrana externa. Esta funciona como un escudo que "reflecta" o bloquea las moléculas del aceite antes de que estas puedan hacer atravesar esa barrera. Se requiere de dosis mucho más concentradas o tiempos de exposición más largos para lograr el efecto inhibitorio (Nazzaro et al., 2013). En términos de resistencia antibacteriana *E. coli* es considerablemente más resistente.

2.6. *Staphylococcus aureus*

Descubierto en 1880 por el cirujano escocés Alexander Ogston (1844-1929), *Staphylococcus aureus* constituye un coco Gram-positivo que, debido a su forma redondeada semejante a racimos de uvas, es reconocido principalmente por su capacidad de provocar infecciones. Por ende, dichas infecciones afectan tanto la piel como diversos tejidos blandos, entre los que se incluyen los músculos, los tendones y el tejido adiposo (Pasachova Garzón et al., 2019).

Debido a su estructura, *S. aureus* presenta una mayor sensibilidad, ya que, al ser una bacteria Gram-positiva, posee únicamente una capa de monopéptidos que rodea su membrana. En consecuencia, al no contar con una protección adicional, los componentes de un aceite esencial logran penetrar con mayor facilidad en la célula bacteriana. Así, se produce la destrucción de su membrana y, como resultado, la inhibición de su actividad (Wang et al., 2020).

2.7. Resistencia bacteriana

La crisis actual de resistencia bacteriana se explica, en primer lugar, por el uso masivo e inadecuado de fármacos en el ámbito médico. A ello se suma que la agricultura contribuyó a acelerar la selección de cepas capaces de sobrevivir a dichos tratamientos. Además, desde finales de los 60 no se han desarrollado nuevas clases de antibióticos innovadores; en consecuencia, la evolución bacteriana ha seguido avanzando, mientras que nosotros continuamos enfrentándola con herramientas propias del siglo pasado (Hutchings et al., 2019).

La resistencia antimicrobiana (RAM) representan hoy en día un desafío a nivel mundial. Puesto que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cataloga como una de las diez amenazas más graves para la salud pública que enfrenta la humanidad en la actualidad (Iskandar et al., 2025). Esto refleja la urgencia de abordar el problema, ya que compromete la eficacia de los tratamientos disponibles.

La resistencia creciente de patógenos como *S. aureus* y *E. coli* frente a los antibióticos de uso convencional ha generado la necesidad de explorar distintas alternativas terapéuticas. Bajo este contexto, es constante la búsqueda de compuestos

bioactivos de origen vegetal con propiedades antimicrobianas. De modo que, diversos estudios han puesto en evidencia que los aceites esenciales (Romero (Rosmarinus officinalis) y árbol de té (Melaleuca alternifolia)) presentan una marcada capacidad bactericida. Por lo tanto, logran desestabilizar la organización celular y disminuir la viabilidad de estas cepas bajo condiciones in vitro (Liu et al., 2020).

2.8. Microdilución en pocillos

Para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales, se emplea el método de microdilución en caldo en placas de 96 micropocillos, reconocido como técnica de referencia por su capacidad de ofrecer resultados cuantitativos y reproducibles. Dicho procedimiento consiste en preparar diluciones seriadas del extracto en un medio de cultivo líquido, lo que permite el contacto directo entre los compuestos bioactivos y los microorganismos en cada pocillo. Asimismo, resulta indispensable la estandarización del inóculo bacteriano, ya que solo de esta manera se asegura que la carga microbiana sea constante durante el ensayo (Hulankova, 2024).

2.9. Potencial antibacteriano

En base a esto, las especies de *Piper* suelen ser más efectivas inhibiendo bacterias Gram positivas, como el temido *Staphylococcus aureus* (incluyendo cepas Meticilina Resistentes, MRSA). Esto debido a que su pared celular, sin la membrana externa lipopolisacárida, es más vulnerable a los aceites esenciales (Yasir et al., 2024).

La acción antibacteriana de los aceites esenciales se relaciona con la presencia de terpenos, cuya naturaleza lipofílica ayuda a la disrupción de la membrana plasmática. Es considerado el mecanismo más frecuente en los fitocompuestos, genera alteraciones en el

potencial de membrana y ocasiona la pérdida de contenido intracelular (Álvarez-Martínez et al., 2021).

El extracto crudo de hojas de una planta del género *Piper*, la *Piper hispidum* ha sido objeto de estudio por su capacidad para combatir microorganismos. Los resultados muestran que este extracto es activo contra *S. aureus* (bacteria Gram positiva), alcanzando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) efectivas en rangos bajos (entre 15.6 y 62.5 ug/mL). Además, se determinó que el extracto es eficaz atacando las células de biofilm de *S. aureus*, cuya estructura confiere resistencia a los tratamientos (Costa et al., 2016).

Existe evidencia que, en el género *Piper* y su uso contra bacterias Gram negativas es prometedora. Ya que un estudio de *Piper betle*, demostró la capacidad de los extractos para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Se reportó que, bajo condiciones específicas y mediante un proceso de contacto directo prolongado con extracto inmovilizado en perlas, lograron una eliminación total de las cepas de *E. coli* evaluadas (Ngamsurach & Praipipat, 2022).

3.0. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

En términos generales, se define como una metodología de análisis “híbrida” aquella que se fundamenta en la integración de dos procesos que operan con muestras en estado gaseoso. Gracias a esta combinación, se constituye como una de las herramientas más sólidas y confiables, ya que permite separar, identificar y medir con elevada precisión los componentes presentes en mezclas orgánicas de gran complejidad (Harvey, 2005).

Se logra mediante la combinación de dos tipos de análisis:

La Cromatografía de Gases (GC) se caracteriza por efectuar la separación física de las sustancias, asignando a cada una un tiempo de retención determinado. En consecuencia, esta técnica adquiere gran relevancia en el análisis de isómeros, ya que, gracias a una adecuada separación cromatográfica, nos permite diferenciar compuestos que, de otro modo, presentarían espectros de masas bastante complejos y difíciles de distinguir (Harvey, 2005).

La Espectrometría de Masas (MS) funciona, en teoría, como el detector principal del sistema cromatográfico. A través de su aplicación, se logra interpretar las características estructurales correspondientes a cada pico obtenido en la separación cromatográfica. De este modo, se obtiene una confirmación precisa de la estructura del compuesto analizado, lo que refuerza la validez del resultado (Harvey, 2005).

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Obtención de materia vegetal



La especie de *Piper tuberculatum* Jacq. se recolectó en el sector de Vía a la costa (2°09'51.6"S 79°58'31.8"W), (2°09'52.0"S 79°58'34.1"W) tras una extensa caminata en los alrededores de la zona, y tras una inspección física/visual, se logra identificar a la especie, se recolectaron las hojas y se guardaron en sacos de yute.

Posteriormente se hace una selección de hojas que se encuentren en buen estado, puesto que se trabaja con únicamente esta parte de la planta para este proceso, luego de seleccionadas, se las lleva a un proceso de secado en una estufa por 24 h a una temperatura de 40°C.

Finalizado el secado, las hojas secas se trituraron hasta obtener partículas homogéneas que faciliten la liberación de compuestos volátiles durante la extracción. Se las almacena en una funda Ziploc para la siguiente etapa.



Figura 4. Muestras de *Piper tuberculatum* Jacq. recolectadas. Fuente: Autores, 2026

3.2. Hidrodestilación con trampa tipo Clevenger

Para obtener el aceite esencial se recurre a la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor con trampa de Clevenger, la cual consiste en hervir el material vegetal sumergido en agua dentro de un balón de vidrio. A medida que el líquido se calienta, el vapor generado atraviesa la planta y rompe las estructuras glandulares donde se encuentra almacenado el aceite. Posteriormente, este se libera y se evapora junto con el agua, desplazándose a través del tubo refrigerante, que los enfría nuevamente y los devuelve a estado líquido. Finalmente, dado que el aceite no se mezcla con el agua y posee una menor densidad, se acumula en la parte superior de la trampa, lo que facilita su separación (Glicerio León Méndez et al., 2015). Este es un método que toma su tiempo (3 – 4 horas aproximadamente) es bastante efectivo, ya que nos garantiza que los componentes químicos principales de la planta no se alteren.



Figura 5. Equipo de hidrodestilación con trampa tipo Clevenger. Fuente: Autores, 2026.

3.3. *Proceso de extracción*

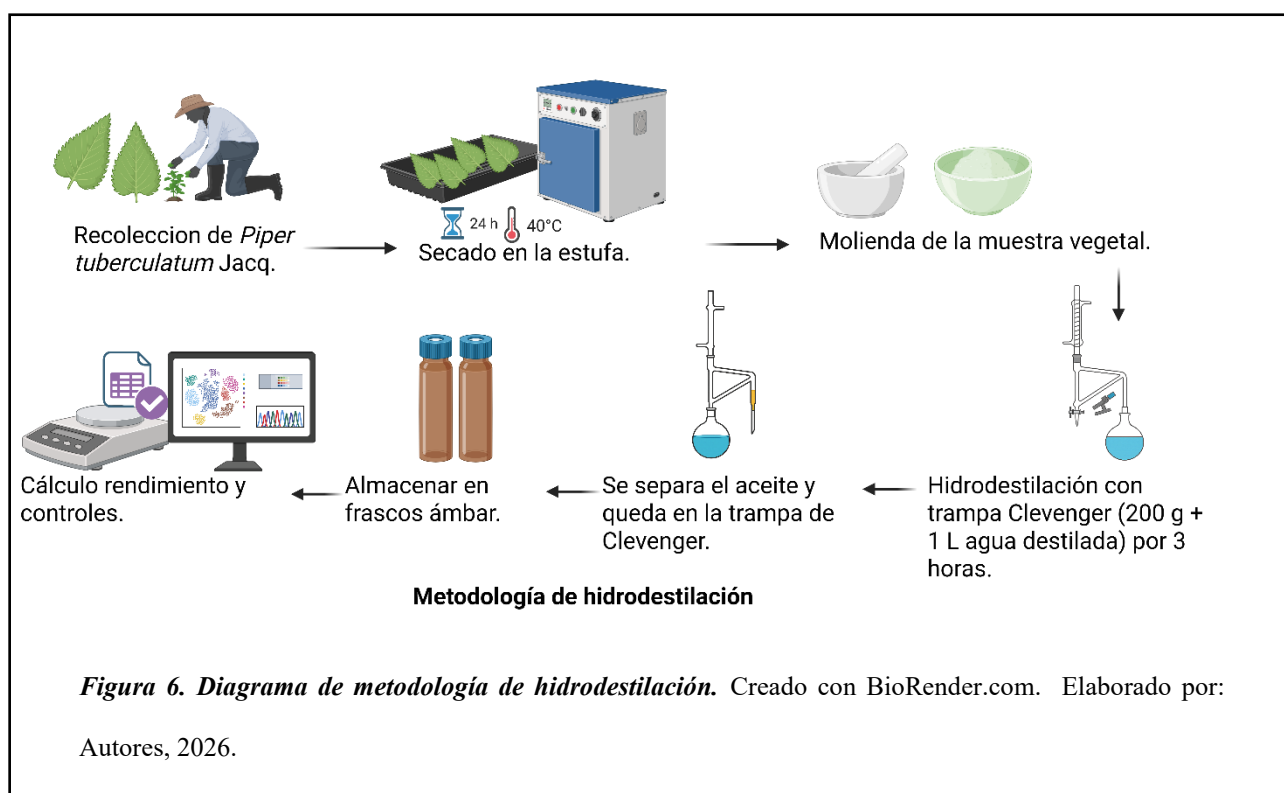
La extracción del aceite esencial se realizará por el método de hidrodestilación utilizando un equipo tipo Clevenger, técnica ampliamente empleada en especies del género *Piper* por su eficiencia en la recuperación de compuestos volátiles (Moncayo et al., 2021).

Equipos	Cantidad
Manta de calentamiento para balones	2
Balón de destilación de fondo redondo 1 L	2
Trampa de Clevenger	2
Condensador de vidrio	2
Matraz esférico 2 L doble boca esmerilado	2
Bomba de agua	1
Mangueras	2
Frascos ámbar	4

Tabla 2. Listado de materiales empleados para la hidrodestilación. Elaborado por:

Autores, 2026.

Se colocaron un aproximado de 591 g de hojas secas en un balón de 2000 ml, siendo este el que contenía la materia vegetal, debajo de este un balón de 1000 ml de agua destilada, el cual reposara en una manta de calentamiento. El aceite recolectado se separará de la fase acuosa y se almacenará en frascos ámbar a 4 °C para evitar la degradación de sus compuestos volátiles (Moncayo et al., 2021) El rendimiento se calculará en porcentaje de volumen por masa de hojas secas y se realizarán al menos tres extracciones independientes para garantizar la reproducibilidad de los resultados.



3.4. Técnica de micro dilución en pocillos

Mediante la técnica de microdilución en pocillos, siguiendo las recomendaciones de (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018) se utilizarán cepas de referencia (ATCC) de *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva), las cuales serán cultivadas en Agar Tripticasa Soya (TSB) a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, a partir de colonias frescas se elaborará una suspensión bacteriana en

solución salina estéril, ajustada al estándar 0.5 McFarland. Finalmente, dicha suspensión se diluirá en caldo Tripticasa Soya (TSB), con el fin de garantizar condiciones homogéneas para el análisis.

Es de suma importancia que la estandarización del inóculo mediante la escala 0.5 de McFarland se realice para obtener resultados reproducibles y comparables. Al garantizar una densidad celular uniforme, se evita que variaciones en la carga bacteriana inicial alteren los valores de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Según (Hulankova, 2024) este control es clave para que los datos sean cuantitativamente válidos, permitiendo que la eficacia del aceite esencial se evalúe con rigor técnico frente a otros estudios.

Medios, cepas y controles	Variables microbiológicas y agentes antimicrobianos
Medio TSA	Para cultivos en placa
Medio TSB	Para caldo
Bacterias	<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Control natural	Terpineol 20%
Control sintético	Ampicilina al 5%

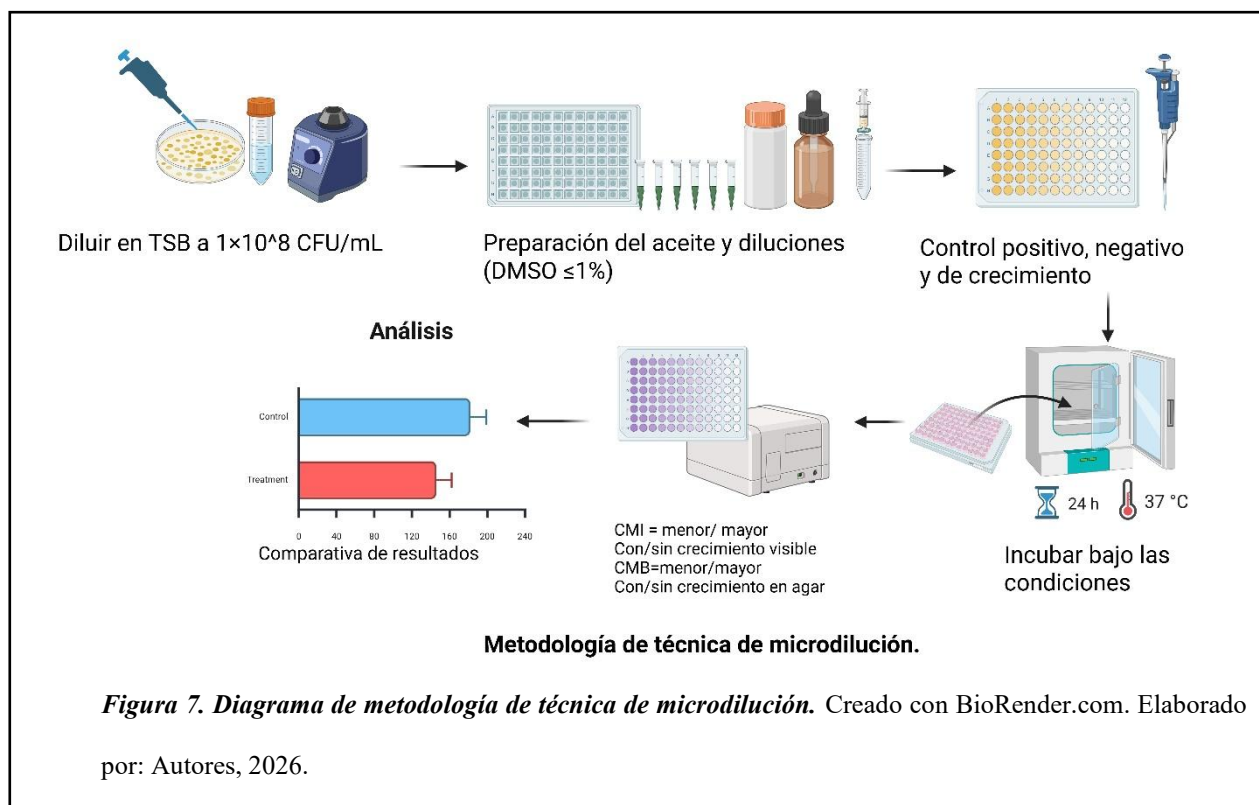
Blanco positivo	Medio + bacteria
------------------------	------------------

Blanco negativo	Medio + DMSO
------------------------	--------------

Tabla 3. Insumos empelados para la técnica de microdilución en pocillos. Elaborado por: Autores, 2026.

3.5. Inoculación en microplacas

El aceite esencial será diluido en DMSO, utilizado como emulsionante, con el fin de preparar una solución madre que servirá para trabajar en las microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo se dispondrá finalmente de un volumen de 100 μL . En cuanto al primer pocillo, se añadirán 180 μL del caldo de cultivo correspondiente junto con los microorganismos y 20 μL de la solución preparada, alcanzando así un volumen total de 200 μL . A partir de este, se transferirán 100 μL hacia el siguiente pocillo, repitiendo el procedimiento de manera consecutiva hasta completar la última cavidad de la fila, siguiendo lo establecido en el protocolo de referencia (da Silva et al., 2023). Se incluirán tres controles: control natural con terpineol, control sintético con un antibiótico y como blanco negativo DMSO. Finalmente agregar 30 μL de *E. coli* y 50 μL de *S. aureus* respectivamente en su placa. Una vez agregado el inóculo sellar con parafilm o papel aluminio, llevar a incubación con agitación a 50 rpm por 24h.



3.6. Concentración Mínima Inhibitoria

Se definirá como la menor concentración del aceite sin crecimiento visible en comparación con el control positivo y podrá confirmarse midiendo su absorbancia utilizando TTC.

En el método de dilución en caldo, se inoculan cantidades equivalentes de bacterias en pocillos que contienen un medio líquido con concentraciones decrecientes del antimicrobiano evaluado. La CMI se establece como el intervalo comprendido entre la concentración más baja en la que no se observa crecimiento bacteriano y la siguiente concentración inferior que sí permite dicho crecimiento.

3.7. Lectura de datos en GC-MS

La caracterización química del aceite esencial se realizó mediante dos técnicas complementarias: por un lado, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), utilizada para la identificación cualitativa de los compuestos; y por otro, la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), empleada para su cuantificación. Para ello, se trabajó con una columna capilar apolar TR-5MS, cuya fase estacionaria correspondió a un 5% de fenil-polisilfenileno-siloxano, con dimensiones de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. En cuanto a las condiciones de inyección, estas se fijaron a una temperatura de 230 °C, con una relación de división (split ratio) de 1:80, mientras que el helio se utilizó como gas de arrastre a un flujo constante de 1 mL/min. Finalmente, el programa de temperatura del horno inició a 50 °C durante 3 minutos; posteriormente, se aplicó una rampa de calentamiento de 3 °C/min hasta alcanzar los 230 °C, manteniendo esta temperatura por 3 minutos adicionales (Jaime-Carvajal et al., 2025).

3.8. Matriz comparativa

En primer lugar, se realizó la selección de las posibles variables comparativas que orientan el estudio, en específico aquellas asociadas con las propiedades antibacterianas del aceite. Posteriormente, se procedió a recopilar tanto los resultados obtenidos en la investigación como los reportados en estudios previos. Con ambas fuentes de información, se efectuó la comparación en función de las variables establecidas y, por medio de una matriz comparativa, se facilitó la organización y la visualización de los datos. De esta manera, se siguió un enfoque sistemático que permitió estructurar el análisis con mayor claridad. De acuerdo a (Loayza Maturrano, 2021) elaboramos un análisis comparativo que

nos permite identificar relaciones y diferencias significativas, dando lugar a una conclusión argumentada y a la presentación de resultados mediante una matriz comparativa consolidada, que brinda conexiones lógicas entre categorías y diseño que abarca las referencias consultadas.

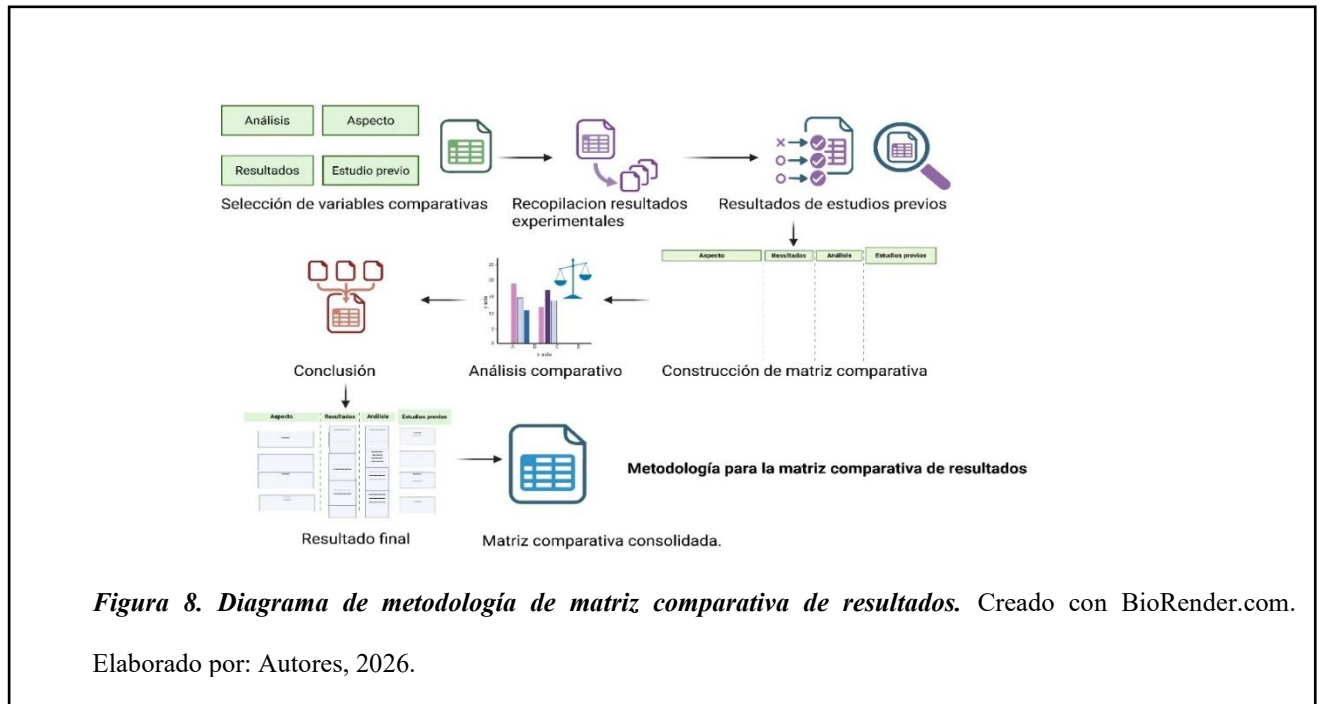


Figura 8. Diagrama de metodología de matriz comparativa de resultados. Creado con BioRender.com.

Elaborado por: Autores, 2026.

Capítulo 4

4.1. Resultados

Caracterizar la composición química del aceite esencial de *Piper tuberculatum* Jacq. obtenido mediante destilación por arrastre de vapor, empleando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Se obtuvo el aceite esencial a partir de las hojas de *Piper tuberculatum* Jacq. por el método de destilación por arrastre de vapor

Parámetro	Valor <i>P.</i>	Método /
Fisicoquímico	<i>tuberculatum</i>	Equipo
Rendimiento (%)	0.20% – (p/p)	Gravimetría
Densidad Relativa (20°C)	0.890	Picnómetro
Índice de Refracción (20°C)	1.480	Refractómetro de Abbe
Color	Amarillo pálido	Organoléptico

Olor	Picante, especiado, herbal	Organoléptico
Solubilidad en Etanol 90%	1:2 (v/v)	Prueba de solubilidad

Tabla 4. Parámetros Físicoquímicos del aceite esencial de *P.tuberculatum*. Elaborado por: Autores, 2026.

4.2. Composición química

	Compuestos	%	RT	IR ₁	IR ₂
1	α -pinene	5,3	3,99	1072	1071
2	Cubebene < α ->	0,23	4,15	1092	1090
3	Cubenol <1,10-di-epi->	5,3	4,47	1117	1118
4	α -Phellandrene	0,23	4,75	1137	1140
5	Longipinene < β ->	6,52	5,03	1157	1168
6	β -cis-ocimene	28,22	5,17	1166	1173
7	<i>Croweacin</i>	15,64	5,39	1182	1191
8	Linalool	0,63	5,65	1200	1202
9	Terpinen-4-ol	0,39	6,46	1242	1231
10	α -Terpineol	0,77	6,55	1246	1257
11	α -Copaene	1,06	8,26	1350	1351
12	<i>Germacre-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol</i>	15,6	8,67	1381	1392
13	α -Humulene	0,41	8,98	1408	1413
14	Alloaromadendrene	0,18	9,06	1417	1423
15	α -Amorphene	0,14	9,14	1426	1437
16	Germacrene-D	1,08	9,23	1438	1444
17	bicyclogermancrene	0,82	9,4	1457	1464
18	δ -Cadinene	0,14	9,59	1480	1494
19	Nerolidol	0,25	9,88	1511	1514
20	α -Muurolol	0,15	10,27	1545	1561
21	Caryophyllene oxide	10,5	10,4	1556	1565
	TOTAL	93,56			

Tabla 5. Resultados analíticos por GC-MS: Composición química y comparación de índices de retención. Elaborado por: Autores, 2026.

Tras realizar la hidrodestilación del *Piper tuberculatum*, logramos un rendimiento del 0.30%. Al comparar este dato con otros estudios, vemos que encaja perfectamente en el rango normal para esta planta (que suele ir de 0.03% a 0.70%). Esto nos confirma que la extracción fue eficiente. A diferencia de (Muñoz-Acevedo et al., 2023), quien reportó un rendimiento del 0.08% con su aceite esencial de *P. eriopodon*, un valor bastante bajo comparado a la literatura citada, la cual abarcaba 0.16% y 0.19%. a esto se le atribuye los factores ambientales o partes específicas de la planta.

La cromatografía de gases acoplada a masas permitió identificar 15 componentes en *P. arboreum* y 22 componentes en *P. gaudichaudianum* (A. C. A. da Silva et al., 2021). Demostrando así la variedad de composición química existente en las especies del género *Piper*.

Componentes Mayoritarios:

β -copaen-4- α -ol (31.38%): Componente de *P. arboreum*.

Espatulenol (25.92%): Componente principal de *P. aduncum*.

Germacreno B (21.53%): Componente mayoritario de *P. gaudichaudianum*.

Componentes mayoritarios *P. tuberculatum*

β -cis-ocimene (28.22%)

Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol (15.64%)

Croweacin (15.64%)

Caryophyllene oxide (10.4%)

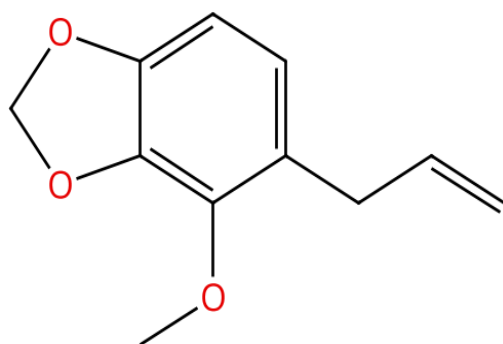


Figura 9. Estructura química de espectro mayoritario identificado β -cis-ocimene. Fuente: CAS SciFinder.

4.2.1. Cálculo de rendimiento

El rendimiento del aceite esencial de *P. tuberculatum* se obtuvo a partir de la relación entre el volumen de aceite obtenido al final de la hidrodestilación, y la masa del material vegetal seco que fue introducido en los balones de destilación. Se expresa en porcentaje en base a los datos registrados, por lo que:

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

$$(\%) = \frac{1.8 \text{ ml}}{591.77} \times 100$$

$$(\%) = 0.30\%$$

4.3. Lectura de resultados de actividad antimicrobiana en prueba piloto

Mediante el ensayo micro-ELISA, realizado en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Guayaquil, se obtuvieron los resultados a partir del diseño de una matriz específica en el software Skanlt, basada en las muestras a evaluar. Para ello, se trabajó con una longitud de onda de 450 nm y se diseñó un modelo acuerdo a organización las muestras en la placa multipocillos de acuerdo con su posición: las filas 1 a 4 correspondieron al aceite esencial de *Piper*, la fila 6 al control natural de terpineol 20, la fila 8 al control sintético de ampicilina 5, mientras que las filas 10 y 12 se destinaron al blanco negativo y positivo, respectivamente.

De acuerdo con (Chen et al., 2023), el uso de microagar frente a la microdilución en caldo convencional permitió una lectura de resultados más precisa, lo que elimina la

interferencia visual causada por la emulsión del aceite esencial. A diferencia de medios líquidos la turbidez del aceite suele solaparse con el crecimiento bacteriano.

4.4. Resultados Experimentales de la prueba piloto

Muestra	1	2	3	4	6	8	10	12
A	Aceite Piper 0001	Aceite Piper 0009	Aceite Piper 0017	Aceite Piper 0025	Control natural 0001	Control sintetico0001	Blanco1	Blanco1
B	Aceite Piper 0002	Aceite Piper 0010	Aceite Piper 0018	Aceite Piper 0026	Control natural 0002	Control sintetico0002	Blanco1	Blanco1
C	Aceite Piper 0003	Aceite Piper 0011	Aceite Piper 0019	Aceite Piper 0027	Control natural 0003	Control sintetico0003	Blanco1	Blanco1
D	Aceite Piper 0004	Aceite Piper 0012	Aceite Piper 0020	Aceite Piper 0028	Control natural 0004	Control sintetico0004	Blanco1	Blanco1
E	Aceite Piper 0005	Aceite Piper 0013	Aceite Piper 0021	Aceite Piper 0029	Control natural 0005	Control sintetico0005	Blanco1	Blanco1
F	Aceite Piper 0006	Aceite Piper 0014	Aceite Piper 0022	Aceite Piper 0030	Control natural 0006	Control sintetico0006	Blanco1	Blanco1
G	Aceite Piper 0007	Aceite Piper 0015	Aceite Piper 0023	Aceite Piper 0031	Control natural 0007	Control sintetico0007	Blanco1	Blanco1
H	Aceite Piper 0008	Aceite Piper 0016	Aceite Piper 0024	Aceite Piper 0032	Control natural 0008	Control sintetico0008	Blanco1	Blanco1

Tabla 6. Diseño para lectura de datos en micro-Elisa. Elaborado por: Autores, 2026.

La elección del método de microdilución en caldo para evaluar el aceite esencial de *P. tuberculatum* responde a las limitaciones físicas de la muestra. Tal y como plantea (Elshikh et al., 2016) los compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofóbica, como los aceites esenciales, presentan una difusión deficiente en medios sólidos, es decir, de haber hecho por el método de difusión en disco habría aumentado el riesgo de obtener falsos

negativos, ya que el aceite quedaría retenido en el punto de aplicación sin alcanzar a la bacteria.

La microdilución garantiza un contacto íntimo y directo entre los metabolitos del aceite y las cepas a tratar en un entorno líquido homogéneo, permitiendo que los valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) sean mucho más confiables.

Teniendo el diseño registrado en el programa, insertamos las microplacas de 96 pocillos en el lector de microplacas ELISA, por medio del programa empieza la lectura de los datos, los cuales son los siguientes.

Abs	1	2	3	4	6	8	10	12
A	0,2680	0,3182	0,3465	0,4393	0,1671	0,2600	0,1561	1,8227
B	0,6249	0,4920	0,7774	0,5988	0,1863	1,3311	0,1687	1,2743
C	0,7961	0,7434	0,4918	1,2158	0,2640	1,3402	0,1685	1,2465
D	1,0784	0,4247	0,6922	1,4581	0,5650	1,1885	0,1798	1,6061
E	1,3276	0,4836	0,5817	0,7861	0,9898	1,9368	0,1762	1,7555
F	2,3358	1,1006	0,8763	0,4129	0,9754	1,0836	0,1737	1,2489
G	0,7864	1,3307	1,1657	0,3094	0,7659	1,0860	0,1705	0,8863
H	1,2190	1,0848	0,8653	0,5044	1,2079	1,2466	0,2399	0,1465

Tabla 7. Resultados de lectura de datos prueba piloto en micro-Elisa. Elaborado por: Autores, 2026.

Al ser esta una prueba piloto usando a *S. aureus* obtenemos que en las columnas 6 y 10, se observan valores notablemente más bajos. Esto sugiere que en esas concentraciones el aceite o el control logran frenar el crecimiento bacteriano.

Por otra parte, se observaron valores elevados en algunas filas, lo que evidencia que la bacteria logró crecer sin dificultad. En la determinación de la CIM, las columnas 6

y 10 destacaron como opciones prometedoras, considerando que una absorbancia superior a 1.2 indica que el microorganismo continúa su crecimiento independientemente de los controles. En este contexto, la columna 6, correspondiente al control natural, mostró una mayor efectividad debido a sus resultados.

Posterior a esta prueba piloto desarrollada, se hicieron 2 pruebas más usando *S. aureus* y *E. coli* en dos microplacas usando los mismos controles y diseño establecidos en la prueba piloto, finalizado esto, se obtuvieron los siguientes datos:

4.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite de *Piper tuberculatum* frente a *E. coli*.

Abs	1	2	3	4	6	8	10	12
A	0,2270	0,0862	0,2908	0,1112	0,1039	0,1565	0,1690	1,2223
B	1,6692	0,6543	0,9537	1,1584	0,1125	0,4459	0,1335	1,7293
C	2,6894	1,6633	2,1666	1,4277	0,1276	0,7987	0,1254	1,2448
D	1,2233	1,4351	2,4324	1,7095	0,9755	1,5402	0,1379	1,0658
E	2,9439	2,3042	2,1188	1,9932	1,0803	1,7228	0,1260	1,5149
F	1,7827	2,8327	2,6111	1,5210	1,2408	1,2017	0,1237	1,1495
G	0,1483	1,5200	3,6211	3,7516	1,1146	1,1967	0,1431	1,1789
H	1,9902	1,4655	1,4915	1,2625	1,2258	1,3134	0,1299	1,1156

Tabla 8. Resultados de lectura de datos en micro-Elisa usando *E. coli*. Elaborado por: Autores, 2026.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de microdilución en caldo.

Los resultados del ensayo de microdilución con TTC mostraron un efecto inhibitorio del aceite esencial frente a *E. coli*, evidenciado por la disminución de

absorbancia en las diluciones más concentradas. Dichos valores fueron similares al blanco negativo (DMSO + medio), lo que confirma la ausencia de crecimiento bacteriano. En este contexto, la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se estableció como la menor concentración del aceite sin crecimiento visible, demostrando su potencial antimicrobiano.

El aceite demostró ser muy eficaz en sus concentraciones iniciales, manteniendo la absorbancia en un nivel mínimo de 0.12 en los primeros pocillos de la columna 6, sin embargo, pierde este efecto al bajar la dosis. Entre la fila C y la D, el valor salta de 0.127 a 0.975. Este resultado nos señala el umbral donde el aceite deja de ser suficiente para contener a la bacteria, permitiendo que esta recupere su ritmo de crecimiento normal y siga proliferando.

Al comparar los datos de *E. coli*, se observó que mientras el control de crecimiento alcanzó una densidad óptica máxima de 3.751, los pocillos con mayor acción del aceite mantuvieron en niveles mínimos de absorbancia, alrededor de 0.12 (similares a los del control de esterilidad). Asimismo, se pudo notar un claro efecto dependiente de la dosis: a medida que la concentración del aceite disminuía, las bacterias proliferaban, lo que elevaba la absorbancia por encima de 0.97. En consecuencia, el aceite de *P. tuberculatum* demuestra que actúa de forma precisa según la concentración utilizada.

4.6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite de *Piper tuberculatum* frente a *S. aureus*.

Abs	1	2	3	4	6	8	10	12
A	1,0026	0,9359	1,2169	1,1416	0,1339	0,1465	0,1836	3,3262
B	1,8297	2,2388	2,5062	3,0354	0,1313	0,2980	0,1176	3,6298
C	2,9382	2,7882	2,9557	3,1220	0,1426	0,5255	0,1162	3,5021
D	3,1204	3,2756	2,7307	2,6794	1,6841	0,9405	0,1289	3,6055
E	3,0570	3,3112	3,0096	3,5884	2,7182	1,7837	0,1236	3,6173
F	3,8183	3,6063	3,6549	3,1014	2,9753	2,4301	0,1216	3,3620
G	0,1244	3,7098	3,1607	3,5641	3,3187	2,5557	0,1133	3,4533
H	2,4250	4,3150	3,6553	4,1290	3,4018	4,8542	0,1273	2,8568

Tabla 9. Resultados de lectura de datos en micro-Elisa usando *S. aureus*. Elaborado por: Autores, 2026.

El aceite esencial evidenció actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, reflejada en una disminución significativa de la absorbancia medida con TTC en determinadas diluciones. Sin embargo, la inhibición resultó menos marcada en comparación con *E. coli*, lo que indica una mayor resistencia de *S. aureus*. En este caso, la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se estableció cualitativamente en la dilución correspondiente a la columna 10.

El aceite evidenció una capacidad inhibitoria marcada en la columna 6 (filas A, B y C) y en la columna 8 (filas A y B), donde los valores de absorbancia se mantuvieron entre 0.1313 y 0.2980. Al encontrarse próximos a la línea base del control de esterilidad (~ 0.12), se concluye que el aceite logró inhibir el crecimiento bacteriano casi por completo en dichas concentraciones.

En la columna 6 se observa que, en las primeras filas, la bacteria permanece completamente controlada. Sin embargo, al llegar a la fila D la absorbancia aumenta de

manera abrupta hasta 1.6841 y continúa elevándose por encima de 3.5. Estos resultados evidencian un punto de quiebre en el tratamiento, ya que cuando la concentración del aceite desciende por debajo del nivel correspondiente a la CIM, la inhibición desaparece y el crecimiento bacteriano se reactiva con intensidad.

El análisis de los datos mostró que el control de crecimiento alcanzó una densidad óptica máxima de 4.315, mientras que los pocillos con mayor acción del aceite mantuvieron valores mínimos de absorbancia cercanos a 0.12, similares al control de esterilidad. Se evidenció además un efecto dependiente de la dosis: cuando la concentración del aceite disminuía, las bacterias retomaban su proliferación y la absorbancia superaba 1.6. Por lo tanto, se valida el uso del aceite de *Piper tuberculatum*, confirmando su potencial como fuente prometedora para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos de origen natural.

La comparación de los valores de absorbancia obtenidos mediante el ensayo de microdilución evidenció diferencias significativas entre *E. coli* y *S. aureus*. En el caso de *E. coli* se observó una disminución de la absorbancia en un mayor número de diluciones, demostrando una mayor sensibilidad al aceite esencial de *Piper tuberculatum* Jacq. En contraste, tenemos a *S. aureus*, la cual tiene valores elevados de absorbancia en la mayoría de las concentraciones evaluadas, mostrando una mayor resistencia. Estos resultados nos demuestran un comportamiento diferenciado entre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

4.7. Cálculo de Concentración mínima Inhibitoria (CMI).

Se determinaron las concentraciones finales de tratamiento considerando la dilución secuencial y el volumen final tras la inoculación. En la siguiente tabla se resumen estos valores, los cuales nos sirven como base para el análisis de la actividad inhibitoria del aceite de *P. tuberculatum* en el rango evaluado (filas A a H).

Fila	Aceite / Ampicilina (<i>E. coli</i>) [%]	Aceite / Ampicilina (<i>S. aureus</i>) [%]	Terpineol (<i>E. coli</i>) [%]	Terpineol (<i>S. aureus</i>) [%]
A (CMI)	0.3846	0.3333	1.5385	1.3333
B	0.1923	0.1667	0.7692	0.6667
C	0.0962	0.0833	0.3846	0.3333
D	0.0481	0.0417	0.1923	0.1667
E	0.0240	0.0208	0.0962	0.0833
F	0.0120	0.0104	0.0481	0.0417
G	0.0060	0.0052	0.0240	0.0208
H	0.0030	0.0026	0.0120	0.0104

Tabla 10. Resultados de concentraciones en *E.coli* y *S. aureus*. Elaborado por: Autores, 2026.

El ensayo de microdilución evidenció un comportamiento diferenciado en función de la cepa analizada, lo que permitió establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de manera cualitativa a través de la lectura de absorbancia.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \left[1 - \frac{OD_{\text{pozo}} - OD_{\text{blanco}}}{OD_{\text{control}} - OD_{\text{blanco}}} \right]$$

Se determinaron las concentraciones finales de tratamiento considerando la dilución secuencial y el volumen final tras la inoculación. En la siguiente tabla se resumen estos valores, los cuales nos sirven como base para el análisis de la actividad inhibitoria del aceite de *P. tuberculatum* en el rango evaluado (filas A a H).

En *E. coli*, los aceites de *Piper* evaluados mostraron inhibición principalmente en la fila A (CMI = A). Sin embargo, el aceite 0017 no alcanzó inhibición dentro del rango analizado. En contraste, el control natural mantuvo la inhibición hasta la fila C (CMI = C).

Se observó que varios pocillos presentaron actividad inhibitoria. En primer lugar, el Aceite *Piper* 0001 mostró inhibición en la Fila A con una concentración de 0.3846% v/v. De manera similar, el Aceite *Piper* 0009 evidenció el mismo comportamiento en la Fila A con idéntica concentración. Por el contrario, el Aceite *Piper* 0017 no presentó CMI, lo que indica resistencia dentro del rango evaluado. También, el Aceite *Piper* 0025 se comportó como los anteriores, inhibiendo en la Fila A con 0.3846% v/v.

En cuanto a otros compuestos, el Terpineol manifestó inhibición en la Fila C con una concentración de 0.3846% v/v. Finalmente, el control positivo con Ampicilina mostró actividad en la Fila A, pero a una concentración mucho mayor, equivalente a 3.846 mg/mL.

Por otro lado, en *S. aureus* no se evidenció una inhibición consistente para los aceites, razón por la cual no se determinó un CMI. En cambio, tanto el control natural como el control sintético sí presentaron actividad, con valores de CMI en las filas B y C, respectivamente.

Se evidenció que los aceites de *Piper* no mostraron actividad inhibitoria. En efecto, el Aceite *Piper* 0001, al igual que el Aceite *Piper* 0009, resultaron resistentes en el rango evaluado. De la misma manera, tanto el Aceite *Piper* 0017 como el Aceite *Piper* 0025 tampoco presentaron CMI, confirmando su resistencia.

Por otro lado, el Terpineol sí manifestó inhibición, específicamente en la Fila C, con una concentración de 0.333% v/v. Finalmente, el control positivo con Ampicilina mostró actividad en la Fila B, alcanzando una concentración de 1.667 mg/mL.

Fila	Aceite / Ampicilina (<i>E. coli</i>)	Aceite / Ampicilina (<i>S. aureus</i>)	Terpineol (<i>E. coli</i>)	Terpineol (<i>S. aureus</i>)
A	Aceite 0.3846% v/v · Amp 3.846 mg/mL	Aceite 0.333% v/v · Amp 3.333 mg/mL	1.538% v/v	1.333% v/v
B	Aceite 0.1923% v/v · Amp 1.923 mg/mL	Aceite 0.1667% v/v · Amp 1.667 mg/mL	0.769% v/v	0.6667% v/v
C	Aceite 0.09615% v/v · Amp 0.9615 mg/mL	Aceite 0.08333% v/v · Amp 0.833 mg/mL	0.3846% v/v	0.333% v/v
D	Aceite 0.04808% v/v · Amp 0.4808 mg/mL	Aceite 0.04167% v/v · Amp 0.417 mg/mL	0.1923% v/v	0.1667% v/v
E	Aceite 0.02404% v/v · Amp 0.2404 mg/mL	Aceite 0.02083% v/v · Amp 0.208 mg/mL	0.09615% v/v	0.08333% v/v
F	Aceite 0.01202% v/v · Amp 0.1202 mg/mL	Aceite 0.01042% v/v · Amp 0.104 mg/mL	0.04808% v/v	0.04167% v/v
G	Aceite 0.00601% v/v · Amp 0.0601 mg/mL	Aceite 0.00521% v/v · Amp 0.0521 mg/mL	0.02404% v/v	0.02083% v/v
H	Aceite 0.00301% v/v · Amp 0.0300 mg/mL	Aceite 0.00260% v/v · Amp 0.0260 mg/mL	0.01202% v/v	0.01042% v/v

Tabla 11. Resultados de concentraciones finales por fila. Elaborado por: Autores, 2026.

4.8. Concentración aceite

Se evaluó un rango de ocho concentraciones mediante diluciones seriadas (Filas A-H). Los resultados mostraron que, en el caso de *E. coli*, la inhibición se manifestó únicamente en la concentración más alta analizada (0.3846%). En contraste, en las diluciones inferiores (Filas B a H) se registró un crecimiento bacteriano constante, con

valores de absorbancia superiores a 1.10. Este comportamiento evidencia un punto de quiebre inmediato, directamente relacionado con la reducción de la biodisponibilidad del aceite. Por lo tanto, la CIM para esta cepa se estableció en 0.3846%.

Por su parte, en *S. aureus* se observó crecimiento en todo el gradiente evaluado (Filas A-H). Incluso en la concentración máxima (0.3333%), la absorbancia alcanzó 1.0742, valor que supera ampliamente al blanco. Este hallazgo indica que la CIM se encuentra por encima del límite superior del ensayo ($> 0.3333\%$).

En relación con la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida de *P. tuberculatum*, en comparación con (Moncayo et al., 2021), se observa cómo se mantienen ciertos patrones en la composición del aceite. Aunque existen perfiles parecidos, hay diferencias en las concentraciones de algunos componentes secundarios que probablemente se deban a la variabilidad geográfica de las muestras. Se considera que el clima y el estado de la planta influyen directamente en qué tanto produce la planta estos compuestos.

En síntesis, *E. coli* demostró una mayor sensibilidad al aceite de *Piper tuberculatum*, mientras que *S. aureus* presentó una resistencia marcada dentro del rango evaluado. Esto sugiere la necesidad de emplear concentraciones superiores para lograr un efecto bacteriostático en esta cepa Gram-positiva.

4.9. Valores de controles

El control natural (Terpineol 20%) confirmó la sensibilidad del método al mostrar una inhibición efectiva hasta la Fila C en ambos microorganismos. Esto significa que el Terpineol, en concentraciones de 0.3846% para *E. coli* y 0.3333% para *S. aureus*, logró

detener el crecimiento bacteriano. De este modo, se evidencia una potencia superior respecto al aceite esencial, especialmente en términos de amplitud del espectro de dilución.

En cuanto al control sintético (Ampicilina 5%), su comportamiento fue semejante al del aceite de *Piper tuberculatum*, ya que inhibió el crecimiento únicamente en la Fila A (0.3846% para *E. coli*). Este hallazgo permite considerar al aceite esencial como un agente con potencial bioactivo equiparable al de un fármaco sintético de referencia, al menos bajo las condiciones evaluadas.

En conclusión, se determinó que *E. coli* presenta una mayor sensibilidad al aceite de *Piper tuberculatum*, mientras que *S. aureus* muestra una resistencia marcada dentro del rango evaluado. Se presume que, al emplear concentraciones superiores a las utilizadas, se puede alcanzar un efecto bacteriostático en esta cepa Gram-positiva.

Para interpretar la bioactividad del aceite esencial de *P. tuberculatum* Jacq., se aplicaron los criterios de clasificación establecidos por (Balouiri et al., 2016), el cual, según este enfoque la potencia antibacteriana se determina a partir de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): es considerada fuerte cuando los valores son menores a 0.5 mg/mL, moderada entre 0.6 y 1.5 mg/mL, y débil cuando superan los 1.6 mg/mL. De esta manera, los resultados frente a *E. coli* y *S. aureus* pueden ubicarse dentro de un marco comparativo estandarizado.

4.9.1. Relación entre los compuestos mayoritarios y la actividad antimicrobiana.

Característica	<i>P. arboreum</i> (EOPar)	<i>P. aduncum</i> (EOPad)	<i>P. gaudichaudianum</i> (EOPg)	<i>P. tuberculatum</i> (EOPt)
Rendimiento de aceite	0.23%	0.35%	0.56%	0.30%
Componente Principal	β-copaen-4-α-ol (31.38%)	Espatulenol (25.92%)	Germacreno B (21.53%)	β-cis-ocimene (28.22%)
Perfil Químico	Predominan sesquiterpenos oxigenados (44.57%).	Predominan sesquiterpenos no oxigenados (45.45%).	Predominan sesquiterpenos no oxigenados (67.26%).	Predominan los monoterpenos (80.14%)
Otros compuestos relevantes	Muurola-4,10-(14)-diene-1- β -ol (17.32%).	B macrocarpeno (9.52%) y α -humuleno (5.33%).	α -copaeno (9.39%) y β -elemeno (6.1%).	Croweacin (15.64%) Germacra-4(15),5,10,(14)-trien-1- α -ol 15.60

Tabla 12. Matriz comparativa de análisis de componentes químicos encontrados en especies de *Piper*.

Elaborado por: Autores, 2026.

Contrastar los perfiles químicos y la eficacia antibacteriana obtenidos con reportes previos en la literatura para establecer el potencial fitofarmacéutico de la especie estudiada.

Por parte de *P. tuberculatum*, el análisis del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió la identificación de los principales compuestos volátiles presentes en la muestra, considerando las condiciones analíticas empleadas. La identificación se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y de los índices de retención calculados con valores reportados en la literatura

de acuerdo con (Adams, 2012), observándose una adecuada concordancia entre los índices experimentales y los de referencia.

Los compuestos identificados corresponden en su mayoría a monoterpenos y derivados oxigenados, previamente vinculados con diversas actividades biológicas. En este sentido, su presencia podría explicar la actividad observada en el aceite esencial, particularmente su efecto antibacteriano. Por lo tanto, no se descarta que otros componentes presentes en bajas concentraciones, los cuales no fueron detectados bajo las condiciones experimentales aplicadas, también contribuyan a dicha actividad.

La diversidad química presente en *Piper tuberculatum* coincide con hallazgos que la señalan como una fuente destacada de metabolitos secundarios con elevada bioactividad. De acuerdo a (Gaspar et al., 2025), se han identificado hasta 41 compuestos diferentes, entre los cuales sobresalen alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos. Esto resulta clave para comprender su acción antimicrobiana.

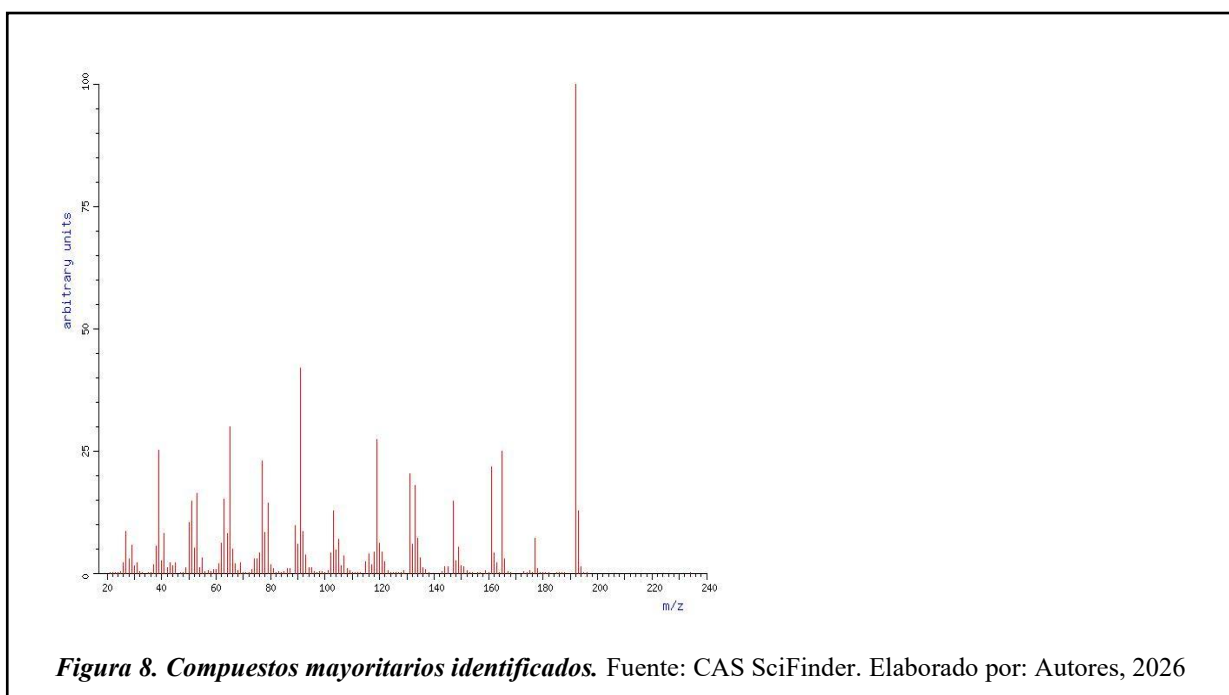


Figura 8. Compuestos mayoritarios identificados. Fuente: CAS SciFinder. Elaborado por: Autores, 2026

Mientras que autores como (Ramos Perfecto et al., 2025) concluyeron que el efecto antimicrobiano de especies como *P. callosum* y *P. divaricatum* no tienen actividad antimicrobiana ante ciertos microorganismos, En comparativa con *P. tuberculatum* que logran inhibir el crecimiento de *E. coli*. De este modo, se asocia que la presencia y concentración de compuestos bioactivos varía según el origen geográfico y el método de extracción utilizado.

Discusiones

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antibacteriano del aceite esencial de *Piper tuberculatum* Jacq. frente a bacterias de relevancia clínica, como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En este contexto, los resultados obtenidos evidencian que el método de destilación por arrastre de vapor con trampa de Clevenger resulta eficiente y viable, mostrando ventajas técnicas y metodológicas frente a otros sistemas de extracción, como el Soxhlet. Fundamentamos esto en base a la capacidad del Clevenger para aislar selectivamente las fracciones volátiles, evitando extraer compuestos no deseados como ceras o resinas, los cuales suelen ser arrastrados por solventes orgánicos en el Soxhlet, por lo que el uso de hidrodestilación garantiza un extracto de mayor pureza (Fagbemi et al., 2021).

Se determina que ubicación geográfica de Ecuador constituye un factor determinante en la calidad de los aceites esenciales obtenidos de sus plantas. De acuerdo con (Shirley et al., 2021) las condiciones particulares de altitud y humedad favorecen la producción de una mayor cantidad de metabolitos activos, lo que se traduce en aceites más

potentes en comparación con los de países vecinos, lo que se afirma con la potencia de los aceites de *Piper* evaluadas.

La posible aplicación farmacológica de los aceites esenciales teniendo su actividad antibacteriana evaluada, radica en sus compuestos. De acuerdo a (Oliveira et al., 2018) los frutos de *Piper tuberculatum* han evidenciado que tanto los extractos crudos como sus fracciones y compuestos aislados no provocan hemólisis en eritrocitos humanos, incluso cuando se emplean concentraciones de hasta 100µg/mL. Teniendo esto en cuenta, podemos presumir que los derivados de *P. tuberculatum* se perfilan como candidatos seguros para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas futuras, lo cual refuerza la pertinencia de analizar su potencial antibacteriano.

Se destaca que existen especie de *Piper*, como la *Piper perlatum*, las cuales su aceite esencial logra inhibir de forma efectiva a *S. aureus* y *Bacillus subtilis*,(Isabella Oenning Ribeiro et al., 2020) sugiriendo que en bacterias Gram positivas su efecto logra alterar la membrana celular.

En el apartado clínico se contrasta la efectividad del aceite de *P. tuberculatum* con la realidad clínica descrita en el estudio de (Galgano et al., 2022), donde aislados reales de *E. coli* #462/20 y *S. aureus* #463/20 mostraron una resistencia total a antibióticos de uso común como la ampicilina y la oxacilina. Por lo que, usando aceites esenciales como alternativa, en este caso *Piper*, son una vía efectiva contra esta resistencia.

Conclusiones

Se determina que el aceite esencial de *P. tuberculatum* posee propiedades antibacterianas frente a bacterias de importancia clínica. Los resultados nos permiten concluir que el aceite actúa como un inhibidor eficaz del crecimiento bacteriano, siendo β -cis-ocimene es el compuesto mayoritario del aceite esencial de *Piper tuberculatum*, junto a esto, los compuestos que predomina son los monoterpenos, con un 80.14%, seguido de monoterpenos oxigenados con 4.46%, sesquiterpenos 8.45% y sesquiterpenos oxigenados 0.51%.

Un aspecto relevante de este estudio fue que *E. coli* presentó una sensibilidad superior a *S. aureus*, Esto contrasta con la tendencia habitual en la que las bacterias Gram-negativas suelen mostrar mayor resistencia. De modo que, se sugiere que el aceite de *Piper tuberculatum* contiene compuestos químicos capaces de atravesar eficazmente la membrana externa, neutralizando así las defensas naturales de dicha bacteria.

Mediante el método de microdilución se determinó que la efectividad del aceite esencial se conserva incluso en bajas concentraciones. No obstante, es importante recordar que el perfil químico varía según la especie, ya que factores como el momento de colecta, la zona geográfica y las partes utilizadas influyen directamente en la diversidad observada, tal como señalan los autores citados.

Recomendaciones

Se recomienda ampliar el número de réplicas experimentales, para obtener datos más representativos. Con esto se reduce la variabilidad de resultados y detecta diferencias significativas.

Se sugiere aumentar los microorganismos a comparar para mejorar el espectro de resultados enfocados a un grupo más extenso. Teniendo así condiciones como concentración y parámetros ambientales como factores a tomar en cuenta.

Se recomienda emplear diferentes metodologías para evaluar actividad inhibitoria, como un antibiograma, para obtener una medición precisa y estandarizada de efecto antibacteriano

Bibliografía

- Adams, R. P. . (2012). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Business Media.
- Akram, M., Solosky, G., & Ali, A. (2024). Phytochemistry and pharmacology of *Piper nigrum*. *Comparative Clinical Pathology*, 33(2), 337–341. <https://doi.org/10.1007/s00580-023-03536-4>
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraión-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021a). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraión-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021b). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Chen, S., Li, Z., Gu, Z., Ban, X., Hong, Y., Cheng, L., & Li, C. (2023). A new micro-agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentration of essential oils against microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 211, 106791. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106791>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (CLSI Standard M07).

Costa, G. M., Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Nakamura, T. U., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2016). Antimicrobial effects of *Piper hispidum* extract, fractions and chalcones against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(3), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.002>

da Silva, A. C. A., Matias, E. F. F., Rocha, J. E., Araújo, A. C. J. de, de Freitas, T. S., Campina, F. F., Costa, M. do S., Silva, L. E., Amaral, W. do, Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., Bezerra, C. F., Iriti, M., & Coutinho, H. D. M. (2021). Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) characterization and evaluation of antibacterial bioactivities of the essential oils from *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0045>

da Silva, L. Y. S., Paulo, C. L. R., Moura, T. F., Alves, D. S., Pessoa, R. T., Araújo, I. M., de Morais Oliveira-Tintino, C. D., Tintino, S. R., Nonato, C. de F. A., da Costa, J. G. M., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H. D. M., Kowalska, G., Mitura, P., Bar, M., Kowalski, R., & Menezes, I. R. A. de. (2023). Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Piper tuberculatum* Jacq. Fruits against Multidrug-Resistant Strains: Inhibition of Efflux Pumps and β -Lactamase. *Plants*, 12(12), 2377. <https://doi.org/10.3390/plants12122377>

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38(6), 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>

Fagbemi, K. O., Aina, D. A., & Olajuyigbe, O. O. (2021). Soxhlet Extraction versus Hydrodistillation Using the Clevenger Apparatus: A Comparative Study on the Extraction of a Volatile Compound from *Tamarindus indica* Seeds. *The Scientific World Journal*, 2021, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/5961586>

Galgano, M., Capozza, P., Pellegrini, F., Cordisco, M., Sposato, A., Sblano, S., Camero, M., Lanave, G., Fracchiolla, G., Corrente, M., Cirone, F., Trotta, A., Tempesta, M., Buonavoglia, D., & Pratelli, A. (2022). Antimicrobial Activity of Essential Oils Evaluated In Vitro against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070979>

Gaspar, Y. M. dos S., Silva, Á. A. R., Porcari, A. M., & Araújo, F. D. da S. (2025). Herbicidal Activity and Metabolic Profiling of *Piper tuberculatum* Jacq. Leachates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(14), 8160–8171. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c11286>

Glicerio León Méndez, Q., del Rosario Osorio Fortich, M., & Sonia Ruby Martínez Useche, E. (2015). Comparison of two methods for extraction of essential oil from *Citrus sinensis* L. En *Revista Cubana de Farmacia* (Vol. 49, Número 4). <http://scielo.sld.cu>

Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>

Harvey, D. J. (2005). GAS CHROMATOGRAPHY | Mass Spectrometry. En *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 106–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00223-5>

- Hulankova, R. (2024a). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils In Vitro—A Review. *Plants*, 13(19), 2784. <https://doi.org/10.3390/plants13192784>
- Hulankova, R. (2024b). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils In Vitro—A Review. *Plants*, 13(19), 2784. <https://doi.org/10.3390/plants13192784>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Isabella Oenning Ribeiro, B., Caroline Pascoli, I., Cristina Castro, J., Maria dos Anjos Szczerepa, M., Prado Dias Filho, B., Vataru Nakamura, C., & Alves de Abreu Filho, B. (2020). Rev Bras Plantas Med / Braz. *J Med Plants*, 22, 145–149. https://doi.org/10.1590/1983-084X/20_02_018
- Iskandar, K., Ahmed, N., Paudyal, N., Ruiz Alvarez, M. J., Balasubramani, S. P., Saadeh, D., Ullah Baig, S., Sami, H., Hammoudi Halat, D., Pavlović, N., Roques, C., Rizvi, M., Salameh, P., Hamed, F., & Van Dongen, M. (2025). Essential Oils as Antimicrobial Agents Against WHO Priority Bacterial Pathogens: A Strategic Review of In Vitro Clinical Efficacy, Innovations and Research Gaps. En *Antibiotics* (Vol. 14, Número 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antibiotics14121250>
- Jaime-Carvajal, J., Pesántez, N., Ballesteros, J., Morocho, V., & Malagón, O. (2025). Chemical Composition and Selective Bioactivities of Piper platylobum Sodiro Essential Oil. *Plants*, 14(21), 3287. <https://doi.org/10.3390/plants14213287>
- Liu, T., Wang, J., Gong, X., Wu, X., Liu, L., & Chi, F. (2020). Rosemary and Tea Tree Essential Oils Exert Antibiofilm Activities In Vitro against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Journal of Food Protection*, 83(7), 1261–1267. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-337>

Loayza Maturrano, E. F. (2021). El fichaje de investigación como estrategia para la formación de competencias investigativas. *EDUCARE ET COMUNICARE: Revista de investigación de la Facultad de Humanidades*, 9(1), 67–77. <https://doi.org/10.35383/educare.v9i1.594>

Marie-Stéphanie Samain, G. M. S. W. C. N. & P. G. (2008). Verhuellia revisited—unravelling its intricate taxonomic history and a new subfamilial classification of Piperaceae. *TAXON*, 57(2), 583-587.

Moncayo, S., Rondón, M., Araujo, L., Rojas, L., Cornejo, X., Guamán, W., & Jaramillo, S. (2021). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 63(1), 14–24. <https://doi.org/10.53766/REFA/2021.63.01.02>

Mora, F. D., Peña, J., Rojas, L. B., Usubillaga, A., Meléndez, P., & Maracaibo, V. (2008). Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L.C. Rich. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Mérida, Venezuela. En *Scientific Journal of the Experimental Faculty of Sciences* (Vol. 16, Número 3).

Mosquera, O. M., Ramirez-Rueda, R. Y., & Blandon, A. M. (2020). Antimicrobial activity of seven *Piper* species from Colombian coffee-growing Eco-region against multidrug resistant bacteria. *Medicinal Plant Communications*, 3(3), 33–37. <https://doi.org/10.37360/mpc.20.3.3.8>

Muñoz-Acevedo, A., González, M. C., De Moya, Y. S., & Rodríguez, J. D. (2023). Volatile Metabolites of *Piper eripodon* (Miq.) C.DC. from Northern Region of Colombia and Assessment of In Vitro Bioactivities of the Leaf Essential Oil. *Molecules*, 28(6). <https://doi.org/10.3390/molecules28062594>

- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- NaturMed Scientific. (2024, febrero 20). *A Comprehensive Guide to Essential Oil Extraction Methods*. NaturMed Scientific.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Ngamsurach, P., & Praipipat, P. (2022). Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* of extracted *Piper betle* leaf materials by disc diffusion assay and batch experiments. *RSC Advances*, 12(40), 26435–26454. <https://doi.org/10.1039/D2RA04611C>
- Noriega, P., Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Ankuash, E., & Manfredini, S. (2019). Chemical Composition and Biological Activity of Five Essential Oils from the Ecuadorian Amazon Rain Forest. *Molecules*, 24(8), 1637. <https://doi.org/10.3390/molecules24081637>
- Noriega Rivera, P. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *La Granja*, 10(2), 3. <https://doi.org/10.17163/lgr.n10.2009.01>
- Oliveira, F. A. de S., Passarini, G. M., Medeiros, D. S. S. de, Santos, A. P. de A., Fialho, S. N., Gouveia, A. de J., Latorre, M., Freitag, E. M., Medeiros, P. S. de M. de, Teles, C. B. G., &

Facundo, V. A. (2018). Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from *Piper tuberculatum* Jacq fruits. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(3), 382–386. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0309-2017>

Organization, W. Health. (2025). *Global Antibiotic Resistance Surveillance Report 2025 WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS)*. World Health Organization.

Pasachova Garzón, J., Ramirez Martinez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*. *Nova*, 17(32), 25–38. <https://doi.org/10.22490/24629448.3631>

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*, 4(2), 89–96.

Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H., Martínez Cadillo, E., Mendoza Rojas, A., Villavicencio Gastelú, J., Castro Luna, A., & Chuquillanqui Salas, C. (2025). Composición Química, Actividad Antioxidante, Anticolagenasa y Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Piper* spp Sobre Microorganismos Bucales Chemical Composition, Antioxidant Activity, Anticollagenase and Antimicrobial Effect of *Piper* spp Essential Oil on Oral Microorganisms. En *Int. J. Odontostomat* (Vol. 19, Número 2). Oliveira.

Ravindra B. Malabadi, Sadiya MR, Kiran P. Kolkar, & Raju K. Chalannavar. (2024). Pathogenic *Escherichia coli* (E. coli) food borne outbreak: Detection methods and controlling measures. *Magna Scientia Advanced Research and Reviews*, 10(1), 052–085. <https://doi.org/10.30574/msarr.2024.10.1.0003>

Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., Khan, T., Sharifi-Rad, J., Ozleyen, A., Turkdonmez, E., Valussi, M., Tumer, T. B., Monzote Fidalgo, L., Martorell, M., & Setzer, W. N. (2019). Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*, 24(7), 1364. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>

Shirley, M., María, R., Liliana, A., Luis, R., Xavier, C., Walter, G., & Soraya, J. (2021). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Piper marginatum* Jacq. and *Piper tuberculatum* Jacq. from Ecuador. En *Moncayo y cols. / Rev Fac Farm* (Vol. 63, Número 1).

Solis, M. B., Romo, S., Granja, M., Sarasti, J. J., Paz y Miño, A., & Zurita, J. (2022). Infección comunitaria del tracto urinario por *Escherichia coli* en la era de resistencia antibiótica en Ecuador. *Metro Ciencia*, 30(1), 37–48. <https://doi.org/10.47464/MetroCiencia/vol30/1/2022/37-48>

Stuper-Szablewska, K., Szablewski, T., Przybylska-Balcerek, A., Szwajkowska-Michalek, L., Krzyżaniak, M., Świerk, D., Cegielska-Radziejewska, R., & Krejpcio, Z. (2022). Antimicrobial Activities Evaluation and Phytochemical Screening of Some Selected Plant Materials Used in Traditional Medicine. *Molecules*, 28(1), 244. <https://doi.org/10.3390/molecules28010244>

Universidad de El Salvador. (2022, noviembre 8). *Piper tuberculatum* Jacq. Subunidad Ambiental - UES.

- Urbaniak, A., Głowacka, A., Kowalczyk, E., Lysakowska, M., & Sienkiewicz, M. (2014). [The antibacterial activity of cinnamon oil on the selected gram-positive and gram-negative bacteria]. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 66(2), 131–141.
- Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2020). Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>
- Yasir, B., Mus, S., Rahimah, S., Tandiongan, R. M., Klara, K. P., Afrida, N., Nisaa, N. R. K., Risna, R., Jur, A. W., Alam, G., & Rohman, A. (2024). Antimicrobial Profiling of *Piper betle* L. and *Piper nigrum* L. Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Integrative Analysis of Bioactive Compounds Based on FT-IR, GC-MS, and Molecular Docking Studies. *Separations*, 11(11), 322. <https://doi.org/10.3390/separations11110322>

Anexos

Anexo 1. Recolección de muestras de *Piper tuberculatum* Jacq.

Fuente: Autores, 2026.

Anexo 2. Muestras de *Piper tuberculatum* secas y rotuladas.

Fuente: Autores, 2026.

Anexo 3. Demostración del proceso de armado del equipo de Hidrodestilación.

Fuente: Autores, 2026.

Anexo 4. Pesaje y llenado de los balones con la muestra material vegetal.

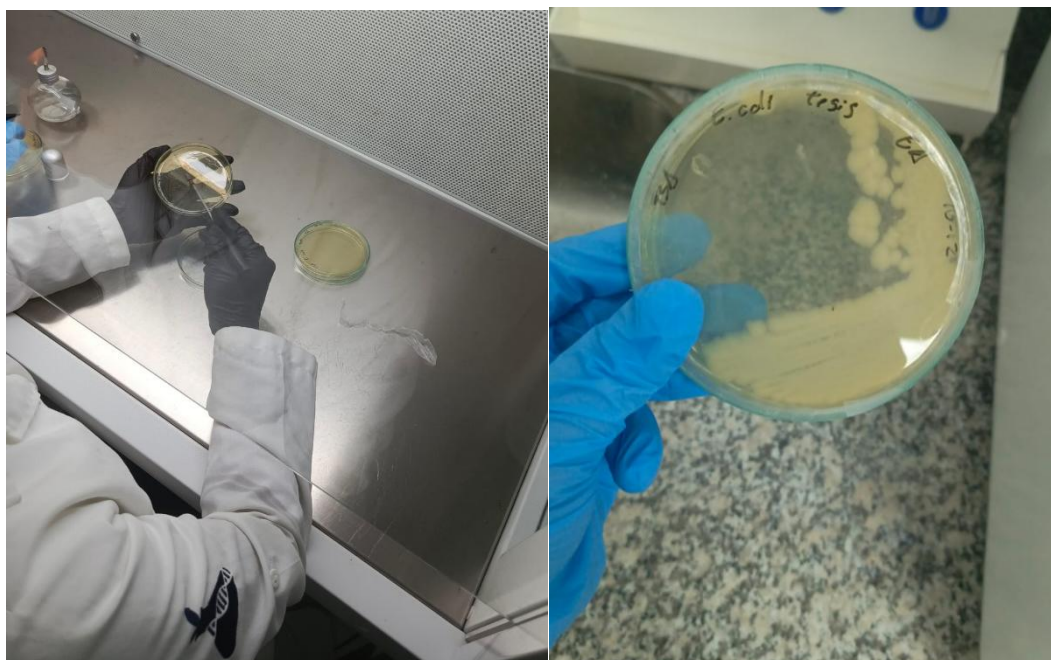
Fuente: Autores, 2026.

Anexo 5. Proceso de extracción por hidrodestilación.

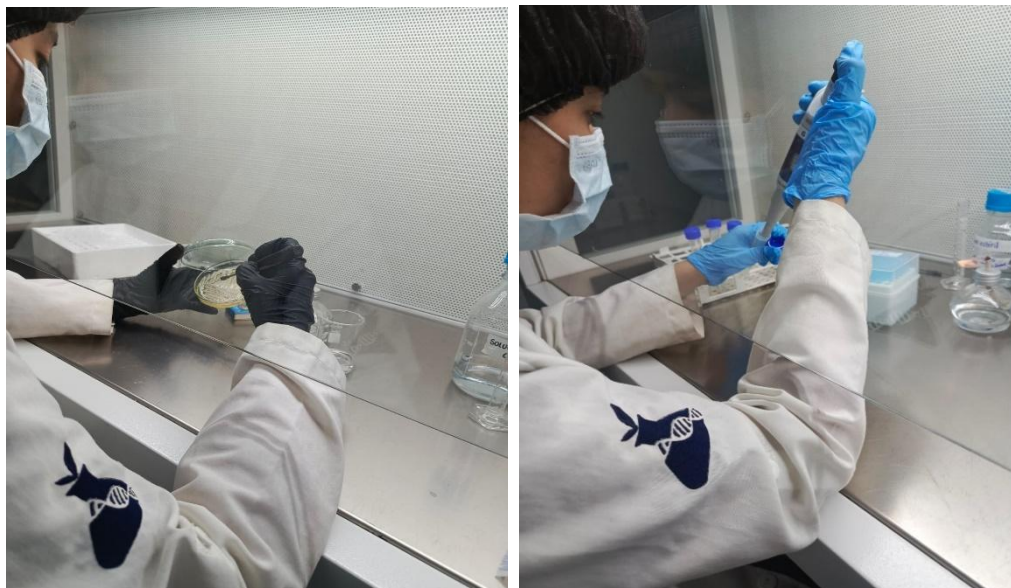
Fuente: Autores, 2026.

Anexo 6. Recolección del aceite esencial extraído.

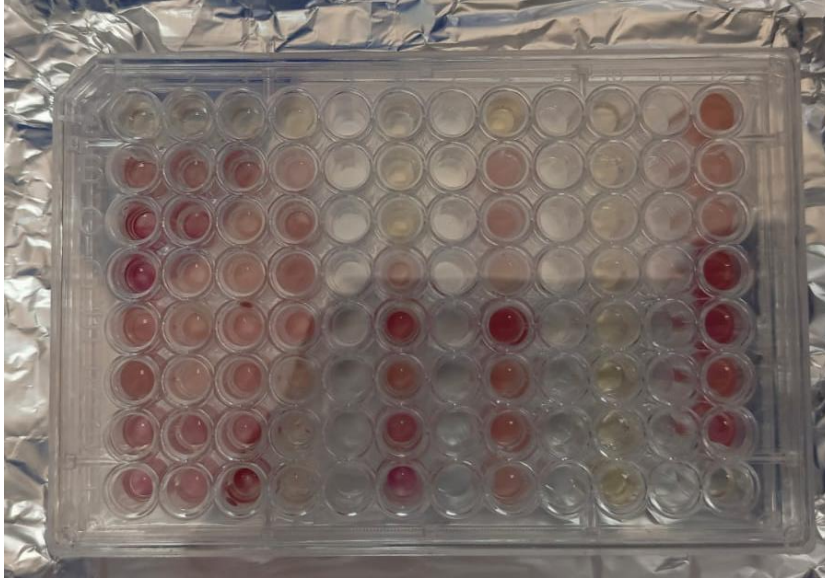
Fuente: Autores, 2026.

Anexo 7. Inoculación de cepas.

Fuente: Autores, 2026.

Anexo 8. Preparación de diluciones seriadas.

Fuente: Autores, 2026.

Anexo 9. Prueba piloto placa de microdilución de 96 pocillos.

Fuente: Autores, 2026

Anexo 10. Técnica de microdilución en pocillos.

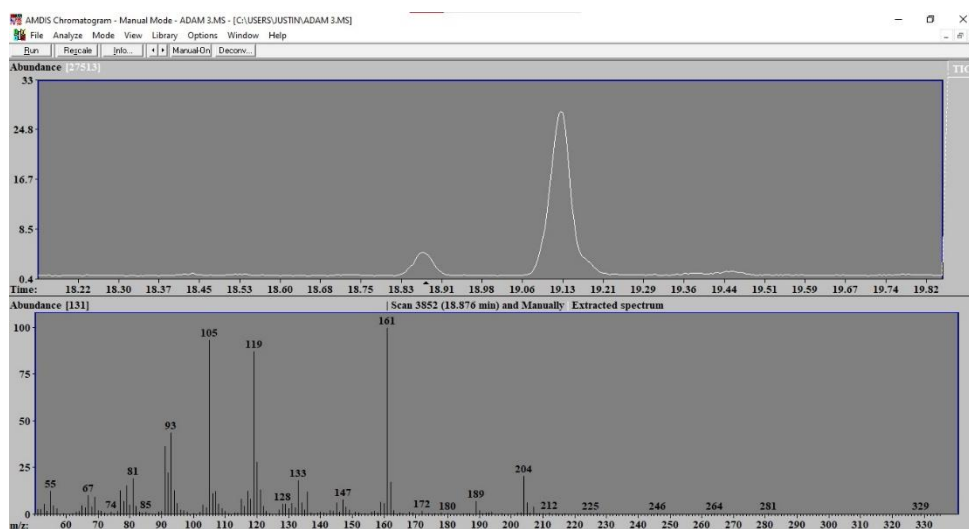
Fuente: Autores, 2026.

Anexo 11. Proceso de lectura de absorbancia en lector de microplacas (ELISA) tras el periodo de incubación.



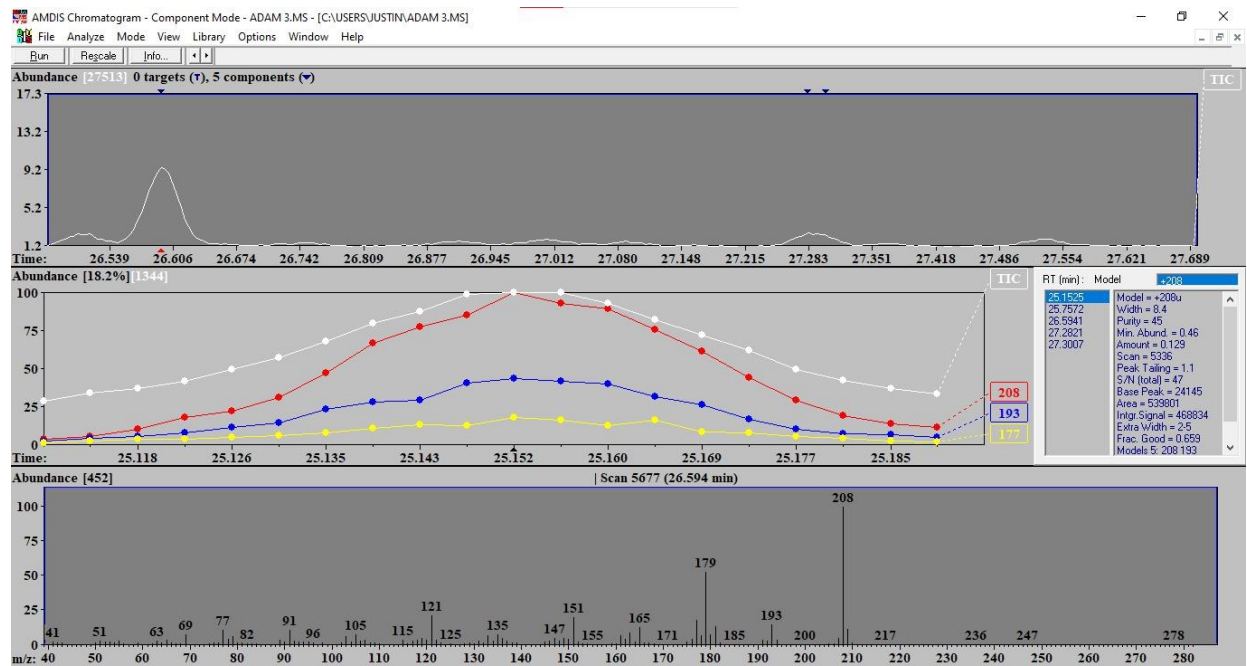
Fuente: Autores, 2026.

Anexo 12. Cromatograma de gases y espectro de masas obtenido mediante el software AMDIS para la identificación de metabolitos.



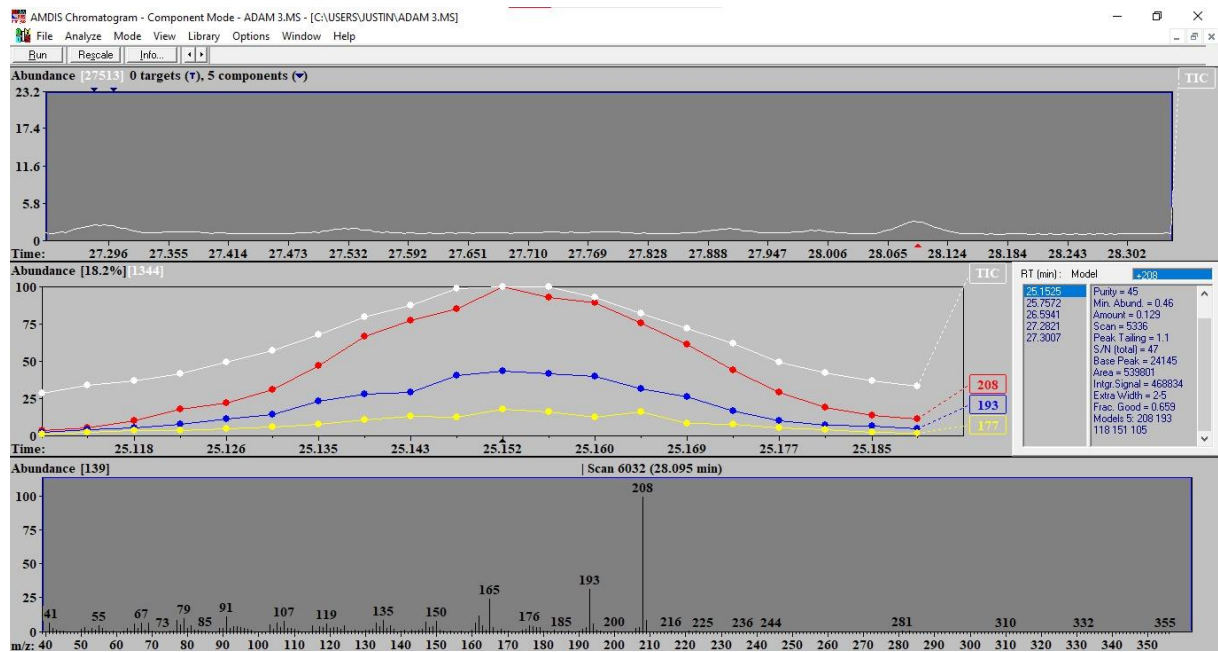
Fuente: Autores, 2026.

Anexo 13. Identificación de Elemicina en programa AMDIS.



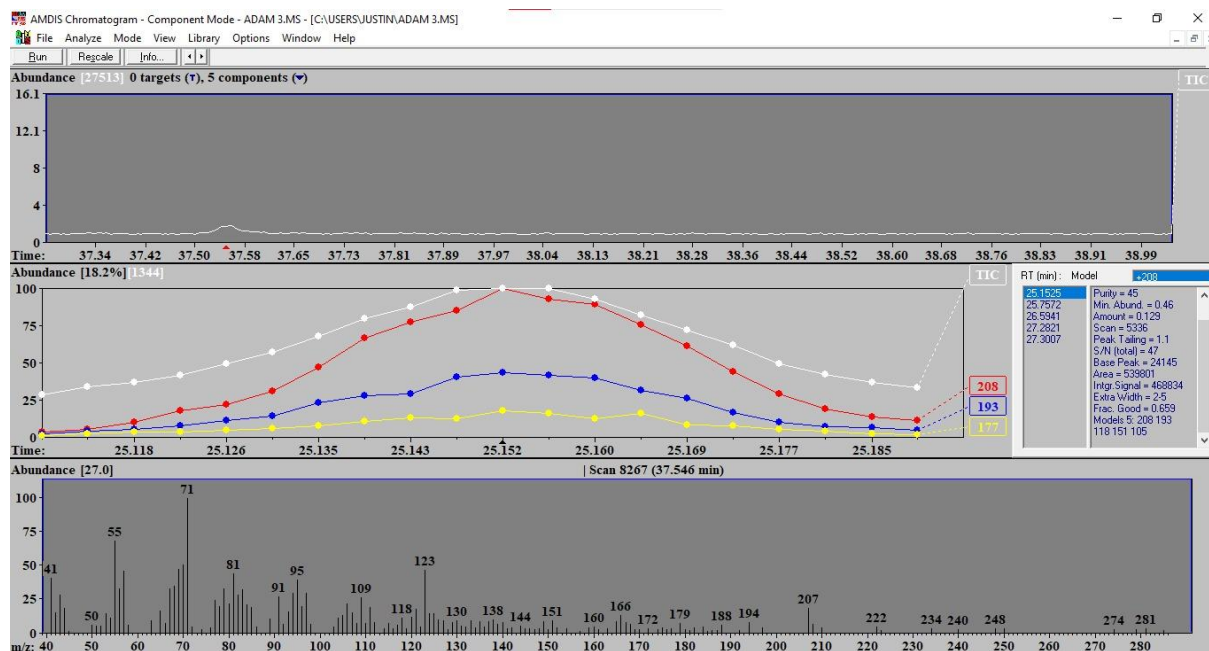
Fuente: Autores;2026

Anexo 14. Identificación de Isoelemicina en programa AMDIS..



Fuente: Autores; 2026.

Anexo 15. Identificación de Agglomerone en programa AMDIS.

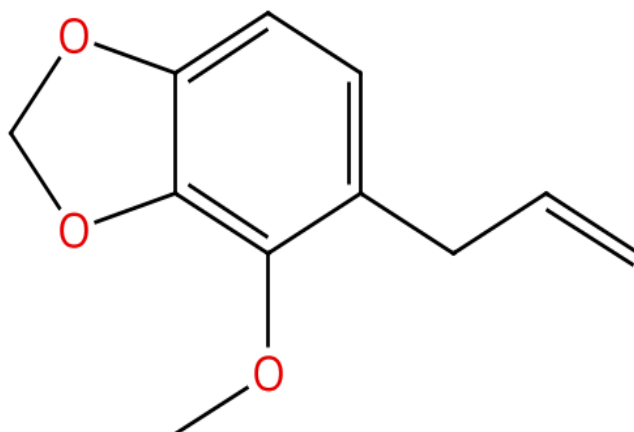


Fuente: Autores; 2026.

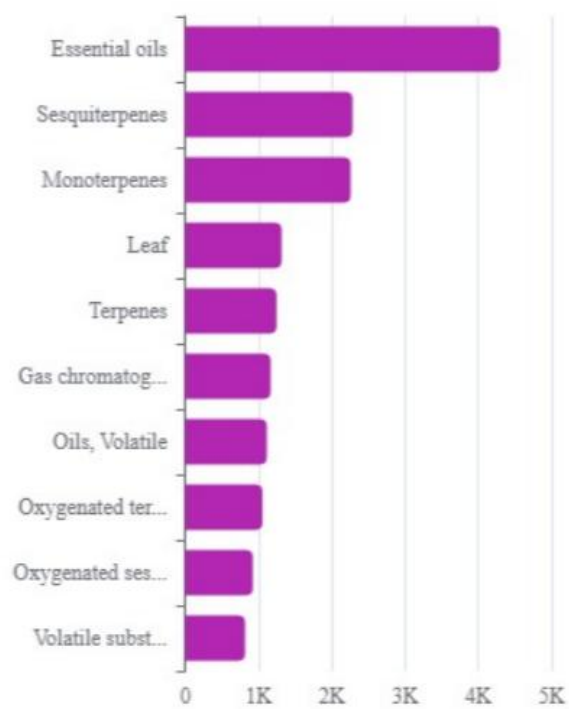
Anexo 16. Viales ámbar con el aceite extraído.



Fuente: Autores; 2026.

Anexo 17. β -cis-ocimene de aceite *Piper tuberculatum*.

Fuente: CAS Sciender

Anexo 18. Compuestos mayoritarios de aceite *Piper tuberculatum*

Fuente: CAS SciFinder