

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA: BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Tesis previa a la obtención del título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Piper pubinervulum* C. DC
PROVENIENTE DE MACAS, ECUADOR.**

AUTORES:

JUAN CAMILO ABAD DÁVILA

DIANA PATRICIA CABEZAS VELASCO

DIRECTOR:

PACO NORIEGA

Quito, enero del 2014

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Nosotros Juan Abad y Diana Cabezas autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de Juan Abad y Diana Cabezas.

Quito, enero del 2014.

Juan Camilo Abad Dávila

CI: 171662198-0

Diana Patricia Cabezas Velasco

CI: 172193423-8

DEDICATORIA

A dios, por darme la oportunidad de gozar una vida llena de salud y felicidad.

A mis padres, Gina y German, por su apoyo incondicional, por enseñarme a luchar hasta alcanzar mis sueños y sobre todo por el amor que me han brindado.

A mis hermanos, por sus sabios consejos en los momentos más difíciles y creer siempre en mí.

A mi sobrina que ha llenado de alegrías nuestro hogar y que con sus locuras siempre nos hace sonreír.

A Diany, por estar conmigo siempre, por creer en mí y por brindarme su apoyo incondicional.

Juan Camilo Abad Dávila

A Dios quien nos dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo.

A mis dos angelitos que desde el cielo me envían luz protectora que guía mi camino.

A mis padres quienes son el pilar más importante de mi vida demostrándome siempre su amor y apoyo incondicional. Son mi ejemplo a seguir.

A mi hermano y hermana quienes han sido mis amigos fieles en los que siempre he podido confiar

Y Angie porque con su sonrisa me recuerda que todos tenemos nuestro niño interior.

Diana Patricia Cabezas Velasco

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana que en el transcurso de nuestra carrera nos ha dado la oportunidad de estudiar y ser excelentes profesionales.

A nuestro director de tesis, Paco Noriega por ofrecernos su valioso tiempo, su apoyo incondicional, todos sus conocimientos, consejos y opiniones compartidos ayudando a la culminación de este trabajo.

A nuestro lector Wilson Tapia por sus ilustraciones y ayuda desinteresada que enriquecieron nuestros conocimientos en este trabajo.

Al CIVABI por facilitarnos los laboratorios y equipos.

A los profesores María Belén Aldás, Patricio Yáñez, Diana Calero, Tatiana Mosquera y María Elena Maldonado por haber aportado con un granito de arena a nuestra formación, durante el desarrollo de la tesis y toda la carrera universitaria.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
ANTECEDENTES.....	2
1.1. Justificación.....	2
1.2. Hipótesis.....	2
1.3. Objetivos	3
1.4. Variables	4
1.5. Indicadores	4
1.6. Población y Muestra.....	5
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. “Uunt tunchi tunchi”, <i>Piper pubinervulum</i> C. DC.....	6
2.1.1. Generalidades	6
2.1.2. Distribución geográfica	6
2.1.3. Descripción.....	7
2.1.4. Uso.....	7
2.1.5. Aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i>	7
2.1.5.1. Características del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i>	7

2.2.	Actividad Antioxidante	9
2.2.1.	Actividad antioxidante de los aceites esenciales	10
2.2.2.	Métodos para medir la capacidad antioxidante	10
2.2.2.1.	Ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH •)	10
2.2.2.2.	Ensayo 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS•+).	12
2.2.2.3.	La fotoquimioluminiscencia (PCL)	13
2.2.3.	Localización de compuestos activos antioxidantes	15
2.2.3.1.	Método TLC – DPPH	15
2.3.	Actividad antimicrobiana	15
2.3.1.	Microorganismos de estudio.....	15
2.3.2.	Bacterias gram positivas.....	16
2.3.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.3.2.2.	<i>Streptococcus mutans</i>	18
2.3.3.	Gram negativas	20
2.3.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	20
2.3.3.2.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	21
2.3.4.	Hongos.....	23
2.3.4.1.	<i>Candida albicans</i>	23
2.3.4.2.	<i>Candida tropicalis</i>	24

2.3.5. Metodología para evaluar la actividad antimicrobiana	25
2.3.5.1. Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos	25
2.3.5.2. Difusión en agar con discos	26
2.3.5.3. Técnicas de recuento microbiano	26
2.3.6. Localización de los compuestos activos	27
2.3.6.1. Bioautografía	27
2.3.6.2. Sales de Tetrazolio	27
CAPÍTULO III	29
MARCO METODOLÓGICO	29
3.1. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).	29
3.1.1. Preparación del reactivo DPPH	31
3.1.2. Preparación de las soluciones de aceite de <i>Piper pubinervulum</i>	31
<i>Piper pubinervulum</i>	31
3.1.3. Lectura de las soluciones.	32
3.2. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS)	32
3.2.1. Preparación de la solución madre de ABTS	34
3.2.2. Preparación de la solución de $K_2S_2O_8$	34

3.2.3.	Preparación del ABTS radicalizado	34
3.2.4.	Preparación de las soluciones.....	34
3.2.5.	Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas.....	35
3.2.6.	Lectura del blanco	35
3.2.7.	Lectura de las soluciones.....	35
3.3.	Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método de fotoquimioluminiscencia (PCL)	36
3.3.1.	Preparación de la muestra por el método lipofílico (ACL)	36
3.4.	Identificación de los compuestos con actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método TLC-DPPH	36
3.4.1.	Preparación de aceite para inyectar	38
3.4.2.	Elaboración de la fase móvil	38
3.4.3.	Preparación de la placa TLC	38
3.4.4.	Revelado de la placa.....	38
3.4.5.	Revelado con DPPH.....	38
3.5.	Evaluación la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> en 2 bacterias gram positivas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i>), 2 bacterias gram negativas (<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) y en 2 levaduras (<i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>) por medio de difusión en disco.	39
3.5.1.	Revitalización de las cepas KWIK-Stik TM	40
	Figura 15. Proceso de revitalización de las cepas KWIK-Stik TM	41

3.5.2.	Almacenamiento.....	41
3.5.3.	Elaboración de las soluciones de aceite esencial.....	43
3.5.4.	Elaboración del inóculo microbiano.....	43
3.5.5.	Inoculación en las placas	44
3.5.6.	Medición de halos.....	46
3.6.	Identificación de los compuestos con actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica de bioautografía en cromatografía de capa fina (TLC).	47
3.6.1.	Preparación de aceite para inyectar	48
3.6.2.	Elaboración de la fase móvil	48
3.6.3.	Preparación de la placa TLC	49
3.6.4.	Revelado de la placa.....	49
3.6.6.	Dilución en agar.	49
3.6.7.	Elaboración de la placa TLC-Agar.....	49
CAPÍTULO IV.....		51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		51
4.1.	Estudio de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC	51
4.1.1.	Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC por el método DPPH.....	51
4.1.2.	Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC por el método ABTS	55

4.1.3. Valoración de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método de fotoquimioluminiscencia (PCL).	59
4.1.4. Identificación de los compuesto con actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método TLC-DPPH	60
4.2. Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC	65
4.2.1. Actividad antibacteriana por el método de difusión con discos en agar	65
4.2.1.1. Análisis de varianza de dos vías del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC bacterias	69
4.2.1.2. Concentración mínima inhibitoria	72
4.2.2. Actividad antimicótica por el método de difusión con discos en agar	73
4.2.2.1. Análisis de varianza de dos vías del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC	76
4.2.2.2. Concentración mínima inhibitoria	78
4.2.3. Identificación de los compuesto con actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i>	79
4.2.3.1. Bioautografía (TLC) de <i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739™.....	79
4.2.3.2. Bioautografía (TLC) de <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> ATCC* 6538P™*	81
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	85
LISTA DE REFERENCIAS	86
ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis de <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC* 6538P™*	93
Anexo 2. Certificado de análisis de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™	94
Anexo 3. Certificado de análisis de <i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739™	95
Anexo 4. Certificado de análisis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027™	96
Anexo 5. Certificado de análisis de <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*	97
Anexo 6. Certificado de análisis de <i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*	98
Anexo 7. Pasos para preparar las placas de TLC en el equipo CAMAG Linomat 5 utilizando el software winCATS.....	99
Anexo 8. Documentación de la identificación botánica de <i>Piper pubinervulum</i>	102
Anexo 9. Documentación del proceso de destilación de <i>Piper pubinervulum</i>	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables, indicadores y unidades.....	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica.....	6
Tabla 3. Compuestos químicos del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i>	8
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Tabla 5. Infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	17
Tabla 6. Descripción de <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC* 6538P™*. 17	
Tabla 7. Clasificación taxonómica de <i>Streptococcus mutans</i>	18
Tabla 8. Descripción de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....	19
Tabla 9. Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	20
Tabla 10. Descripción de <i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739™.....	20
Tabla 11. Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Tabla 12. Especificaciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027™	22
Tabla 13. Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i>	23
Tabla 14. Descripción de <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*.....	23
Tabla 15. Clasificación taxonómica de <i>Candida tropicalis</i>	24
Tabla 16. Descripciones de <i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*	25
Tabla 17. Medios de cultivo y de incubación para los microorganismos	45
Tabla 18. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de inhibición del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC y <i>Thymus vulgaris</i>	52

Tabla 19. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de inhibición del aceite esencial de las hojas de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC y <i>Thymus vulgaris</i>	56
Tabla 20. Análisis ACL.....	59
Tabla 21. Rf de las fracciones aisladas con actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i>	61
Tabla 22. Estructura de los compuestos con actividad antioxidante.....	62
Tabla 23. Bandas con actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	64
Tabla 24. Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> detectados por cromatografía de gases.....	64
Tabla 25. Diámetro de los halos obtenidos en mm de las concentraciones de aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC de bacterias gram positivas	65
Tabla 26. Diámetro de los halos obtenidos en mm de los blancos positivos y negativos de las bacterias gram positivas.....	66
Tabla 27. Diámetro de los halos de inhibición obtenidos en mm de las concentraciones de aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC en bacterias gram negativas.....	67
Tabla 28. Diámetro de los halos obtenidos en mm de los blancos positivos y negativos de las bacterias gram negativas.....	68
Tabla 29. Promedio del diámetro de los halos obtenidos en mm del blanco positivo natural (<i>Thymus vulgaris</i>)	68
Tabla 30. Promedio del diámetro (mm) de los halos de inhibición de bacterias gram positivas y gram negativas	69
Tabla 31. Análisis de varianza de dos vías con Statistix 8.0.....	70

Tabla 32. Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test de datos para concentración	71
Tabla 33. Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test de datos para bacterias.....	72
Tabla 34. Concentración mínima inhibitoria en bacterias expresada en mg / mL	72
Tabla 35. Diámetro de los halos obtenidos en mm de las concentraciones de aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> C. DC de levaduras.....	73
Tabla 36. Diámetro de los halos obtenidos en mm de los blancos positivos y negativos de las bacterias gram negativas.....	75
Tabla 37. Promedio del diámetro de los halos obtenidos en mm del blanco positivo natural (<i>Thymus vulgaris</i>)	75
Tabla 38. Promedio del diámetro (mm) de los halos de inhibición de levaduras del aceite esencial de <i>P. puvinervulum</i>	76
Tabla 39. Análisis de varianza de dos vías con Statistix 8.0.....	76
Tabla 40. Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test de datos para concentración	77
Tabla 41. Concentración mínima inhibitoria de levaduras expresada en mg / mL....	78
Tabla 42. Localización de la zona de inhibición de <i>Escherichia coli</i> en la placas TLC con el aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i>	79
Tabla 43. Localización de zona de inhibición de blanco positivo (<i>Thymus vulgaris</i>)	80
Tabla 44. Localización de la zona de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i>	81
Tabla 45. Localización de zona de inhibición del blanco positivo (<i>Thymus vulgaris</i>)	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Piper pubinervulum</i> C. DC.	7
Figura 2. Estructura de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH •).....	11
Figura 3. Oxidación de persulfato de 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfónico) (ABTS2-)	13
Figura 4. Mecanismo de acción de PCL	14
Figura 5. <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC* 6538P™*	18
Figura 6. <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....	19
Figura 7. <i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739™.....	21
Figura 8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027™	22
Figura 9. <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*	24
Figura 10. <i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*	25
Figura 11. Cloruro de tetrazolio	27
Figura 12. Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....	30
Figura 13. Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> mediante el método ABTS	33
Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de difusión en disco según Kirby-Bauer .	40
Figura 15. Proceso de revitalización de las cepas KWIK-Stik ™	41
Figura 16. Tubos de cryobanks con microorganismos.....	41

Figura 17. Diagrama de almacenamiento en cryobanks	42
Figura 18. Revitalización de las cepas del cryobank	42
Figura 19. Concentraciones de aceite esencial.....	43
Figura 20. Elaboración del inóculo bacteriano	44
Figura 21. Inoculación de los microorganismos ATCC en las placas	46
Figura 22. Diagrama de flujo del proceso de localización de los compuestos activos con la técnica Bioautografía TLC.	48
Figura 23. Diagrama de elaboración de la placa de TLC con agar	50
Figura 24. Absorbancia del DPPH frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i>	52
Figura 25 Absorbancia del DPPH frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	53
Figura 26. Porcentaje de inhibición del DPPH vs concentración de aceite esencial de <i>Piper Pubinervulum</i>	53
Figura 27. Porcentaje de inhibición del DPPH vs la concentración de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	54
Figura 28. Comparación de la actividad antioxidante del aceite de <i>Piper pubinervulum</i> y aceite de <i>Thymus vulgaris</i>	55
Figura 29. Absorbancia del ABTS vs concentración del aceite esencial de <i>Piper Pubinervulum</i>	56
Figura 30. Absorbancia del ABTS vs concentración del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	57

Figura 31. Porcentaje de inhibición del ABTS vs la concentración del aceite del aceite esencial de <i>Piper Pubinervulum</i>	57
Figura 32. Porcentaje de inhibición del ABTS vs la concentración del aceite del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	58
Figura 33. Comparación de la actividad antioxidante del aceite de Piper pubinervulum y aceite de Thymus vulgaris	59
Figura 34. TLC-DPPH del aceite esencial de <i>Piper pubinervulum</i> y del control positivo <i>Thymus vulgaris</i>	60
Figura 35. <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> ATCC* 6538P™*	66
Figura 36. <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™	66
Figura 37. <i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739™.....	67
Figura 38. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027™	68
Figura 39. <i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*	74
Figura 40. <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*	74
Figura 41. Bioautografía (TLC) de <i>Escherichia coli</i>	80
Figura 42. Bioautografía (TLC) de <i>Staphylococcus aureus</i>	82

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Calculo de porcentaje de inhibición del DPPH	12
Ecuación 2. Calculo de porcentaje de inhibición del ABTS	13
Ecuación 3. IC ₅₀ del aceite de <i>Piper pubinervulum</i> por el método DPPH.....	54
Ecuación 4. IC ₅₀ del aceite de <i>Thymus vulgaris</i> por el método DPPH.....	54
Ecuación 5. IC ₅₀ del aceite de <i>Piper pubinervulum</i> del ABTS	58
Ecuación 6. IC ₅₀ del aceite del aceite de <i>Thymus vulgaris</i> del ABTS.....	58

RESUMEN

La presente investigación determinó la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* proveniente de Macas, Ecuador. Mediante los métodos de inhibición del radical libre DPPH y ABTS se obtuvo un IC₅₀ igual a 20,399 µg / mL y 0,416 µg / mL respectivamente, que al compararlos con los IC₅₀ del aceite de *Thymus vulgaris* con 0,414 µg / mL y 0,231 µg / mL, demuestra una actividad antioxidante menor del aceite en estudio. Además se realizó el método de fotoquimioluminiscencia con una capacidad antioxidante de 1,8 µmol Trolox / g.

También se determinó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar con discos. Entre las bacterias ensayadas, *Escherichia coli* ATCC* 8739™ y *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* ATCC* 6538P™ fueron las más susceptibles al presentar una MIC de 6,08 y 3,09 mg / mL respectivamente y entre las levaduras ensayadas, *Candida albicans* ATCC 10231™ fue la más susceptible al presentar una MIC de 0,3909 mg / mL.

Mediante el método de TLC – DPPH y autobiográfico se determinaron las sustancias que poseen actividad antioxidante y antimicrobiana que al compararlos con la investigación de Coronel y Piedra (2014) de la que se adoptó la metodología de las placas TLC, se concluye que los compuestos son: Elemicin, nerolidol, gamma-assaron, assarone e, dimethoxy 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, bisabolol, geranyl linalool, Isoeugenol metil éter, Beta-Caryophyllene, alpha-Humulene, (+)-beta-Selinene y Bicyclogermacrene.

PALABRAS CLAVE: antimicrobiana, antioxidante, *Piper pubinervulum*, DPPH, ABTS, fotoquimioluminiscencia.

ABSTRACT

The following investigation determinate the activity antioxidant of essential oil of leaves of *Piper pubinervulum* which comes from the city Macas, Ecuador. Using methods of free radical inhibition DPPH y ABTS can obtain a IC₅₀ equal to 20,399 µg / mL y 0,416 µg / mL as result, at the moment of compare with IC₅₀ the oils of *Thymus vulgaris* with 0,414 µg / mL y 0,231 µg / mL, shows an antioxidant activity less than the oil in study. Using the fotoquimioluminiscencia method with an antioxidant capacity of 1,8 µmol Trolox / g.

It was also determined antimicrobial activity by the agar diffusion with disks method. Between the batteries in the assay, *Escherichia coli* ATCC* 8739™ y *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* ATCC* 6538P™ which was the most susceptible with a result of MIC of 6,08 y 3,09 mg / mL between of the assay yeast, *Candida albicans* ATCC 10231™ was the most susceptible showing a MIC of 0,3909 mg / mL.

Using the method of TLC – DPPH and autobiographic were determined substances that have antioxidant and antimicrobial activity that was compared on the investigation of Coronel & Piedra (2014) from which the methodology of TLC plates was adopted, it is concluded that compounds are Elemicin, nerolidol, gamma-assaron, assarone e, vinyl 1,2 dimethoxy 5 benzodioxide 4-6, bisabolol, geranyl linalool, Isoeugenol methyl ether, beta-Caryophyllene, alpha-Humulene, (+)-beta-Selinene and Bicyclogermacrene.

KEYWORDS: antimicrobial, antioxidant, *Piper pubinervulum*, DPPH, ABTS, photochemiluminescence.

INTRODUCCIÓN

El saber ancestral, relacionado con la etnomedicina usada por los indígenas está fundamentado en una concepción particular de salud. En este sentido, se debe resaltar que a través de la historia se puede comprobar que los conocimientos prácticos de la etnomedicina se transmiten de manera oral de generación en generación (Maldonado & Dacarro, 2007).

La familia Piperaceae en la actualidad presenta gran cantidad de estudios realizados por Pino, (2008); Regasini, (2008); Pinto, (2007) citados por Pérez, García, Martínez, & Soto, (2006); aunque en nuestro país no son muchas las investigaciones realizadas en especies pertenecientes a esta familia las cuales poseen según creencias ancestrales numerosas propiedades medicinales.

El estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de la hojas de *Piper pubinervulum* C. DC proveniente de Macas, implica procedimientos que inician con la identificación de la planta de la cual se extrae el aceite esencial.

De las técnicas de DPPH, ABTS y fotoquimioluminiscencia se determina la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* frente al aceite de *Thymus vulgaris* al obtener el IC₅₀.

Mediante el antibiograma, lo que se logra obtener son halos de inhibición; indicadores de presencia de actividad antimicrobiana a determinadas concentraciones de aceite esencial sobre las cepas ATCC a ser utilizadas.

Finalmente se utilizaron los métodos de TLC – DPPH y bioautográfico para identificar los compuestos que poseen actividad antioxidante y antibacteriana.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Justificación

En Ecuador es indiscutible el papel que desempeña la etnomedicina relacionado con la naturaleza, en especial por las aportaciones en el desarrollo sostenible del país a diferencia de los países desarrollados (Ríos, 2008).

El siguiente trabajo se presenta ante la necesidad de investigar la capacidad antioxidante del aceite esencial de la especie *Piper pubinervulum*, con el fin de aprovechar los recursos naturales como alternativa de salud frente a los antioxidantes artificiales, cuyos efectos secundarios han producido diversos problemas como daño de la pared vascular y en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Lima, Cardoso, Andrade, Guimaraes, Bastidas, & Nelson, 2011). Además investigar la actividad biológica del aceite y determinar la inhibición del crecimiento de un grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en el hombre, las plantas y los animales, siendo particularmente útiles como antimicóticos y antibacterianos (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009).

En la actualidad para impedir que desaparezca el saber ancestral es necesario la colaboración de investigadores mediante aportaciones de análisis fitoquímicos y actividad biológica de las plantas medicinales que son usadas por varios pueblos indígenas, tanto para promover su uso como para determinar su valor económico, puesto que puede representar en el futuro una fuente de ingresos (Ríos, 2008).

1.2. Hipótesis

Hipótesis Alternativa

- Al menos una de las concentraciones del aceite esencial de *Piper pubinervulum* presenta una actividad antimicrobiana diferente a las demás.

- Existe al menos una bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y una levadura (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) experimental cuyo desempeño biológico es diferente al de los demás.

Hipótesis Nula

- Ninguna concentración del aceite esencial de *Piper pubinervulum* presenta actividad antimicrobiana diferente a las demás.
- Ninguna bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), ni levadura (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) experimental presenta un desempeño biológico diferente a las demás.

1.3. Objetivos

General

Estudiar la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC proveniente de Macas, Ecuador.

Específicos

- Determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), el método 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS) y el método de fotoquimioluminiscencia (PCL).
- Identificar los compuestos con actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* C. DC mediante el método TLC-DPPH.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper pubinervulum* en microorganismos certificados, 2 bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*), 2 bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y en 2 levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) por medio de difusión en disco.

- Identificar los compuestos con actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper pubinervulum* en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la técnica de bioautografía en cromatografía de capa fina (TLC).

1.4. Variables

Variable independiente

Aceite esencial de Uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum*).

Variable dependiente

Inhibición de crecimiento en bacterias y levaduras.

1.5. Indicadores

Halo de inhibición.

Concentración del aceite esencial

Tabla 1. Variables, indicadores y unidades

Variable	Indicador	Unidad
V.I Aceite esencial	Concentración del aceite esencial	μL / mL
V.D Inhibición de crecimiento en bacterias y levaduras	Halo de inhibición	mm

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

1.6. Población y Muestra

Población

En el presente estudio, consideramos como población a la especie *Piper pubinervulum* C. DC de la familia Piperaceae, proveniente de la provincia de Morona Santiago, en la ciudad Macas; de la cual se determinó la actividad biológica en 2 bacterias gram positivas, 2 bacterias gram negativas y en 2 levaduras.

Muestra

La muestra está conformada por 8 concentraciones de aceite esencial de *Piper pubinervulum* las cuales se ensayaron en microorganismos certificados 2 bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*), 2 bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y en 2 levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*), realizando 5 repeticiones para cada concentración obteniendo un total de 240 pruebas de las cuales se obtendrán los resultados para determinar la actividad antimicrobiana.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. “Uunt tunchi tunchi”, *Piper pubinervulum* C. DC

Tabla 2. Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
Clase:	Spermatopsida
Orden:	Piperales
Familia:	Piperaceae
Género:	<i>Piper</i>
Especie:	<i>pubinervulum</i> C.DC.

Fuente: Stang, 2013

2.1.1. Generalidades

Nombre común: Uunt tunchi tunchi (Ankuash, 2013)

Hábito arbusto (Morrison, 2013)

Origen: nativa. (Morrison, 2013)

2.1.2. Distribución geográfica

Piper pubinervulum tiene un rango altitudinal de 1900 m – 2300 m, se distribuye a lo largo de la Cordillera Oriental de Ecuador en diversos puntos de la provincia de Napo, (Estación Biológica Yanayacu y el Centro para Estudios Creativos, Yanayacu Mirador, El Chaco, Pumayacu, Isla de Gran Canaria) hasta el norte de Perú (Morrison, 2013).

2.1.3. Descripción

Piper pubinervulum puede alcanzar una altura de 3 m, es perenne, con tallo de nudos engrosados, posee grandes hojas lanceoladas e infrutescencias verdes pendientes (Morrison, 2013).

Figura 1. *Piper pubinervulum* C. DC.



Fuente: Morrison, 2013

2.1.4. Uso

Medicinalmente se usa para tratar la gastritis, las hojas calientes se aplican sobre las piernas para tratar reumatismo, dolores y enfriamientos; también en el tratamiento de mordeduras de serpientes (Ankuash, 2013).

2.1.5. Aceite esencial de *Piper pubinervulum*

Para la obtención del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* se usó la técnica de destilación con vapor de agua en un destilador de 100 litros perteneciente a la Fundación Chankuap.

2.1.5.1. Características del aceite esencial de *Piper pubinervulum*

El aceite esencial de *Piper pubinervulum* tiene una coloración amarillenta y una densidad relativa de 0,9652 g/ml a 25 °C.

La composición química del aceite esencial de *Piper pubinervulum* se describen en la Tabla 3, además se indica los Rf (Rf: relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen) del perfil de huella cromatográfica en capa fina (Coronel & Piedra, 2014)

Tabla 3. Compuestos químicos del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum*

#	Nombre del Compuesto	Porcentaje identificado	Método	Fracciones activas				
				Rf1 = 0,55	Rf2 = 0,64	Rf3 = 0,74	Rf4 = 0,85	Rf5 = 0,98
1	alpha-Pinene	0,104 ±0,21%	GC-MS					
2	beta-Pinene	0,295 ±0,38%	GC-MS					
3	Linalool	1,557 ±0,15%	GC-MS					
4	(-)-alpha-copaene	1,933 ±0,38%	GC-MS					
5	beta-Cubebene	0,062 ±0,12%	GC-MS					
6	(-)-beta-Elemene	1,870 ±0,17%	GC-MS					
7	(-)-alpha-Gurjunene	0,096 ±0,19%	GC-MS					
8	beta-Caryophyllene	15,322 ±2,57%	GC-MS RMN-1H					x
9	beta-Copaene	0,135 ±0,27%	GC-MS					
10	alpha-Humulene	1,518 ±0,31%	GC-MS					x
11	(-)-allo-Aromadendrene	0,153 ±0,31%	GC-MS					
12	(+)-gamma-Murolene	0,130 ±0,26%	GC-MS					
13	germacrene D	3,630 ±0,41%	GC-MS					
14	(+)-beta-Selinene	1,387 ±0,12%	GC-MS					x
15	(E)-Muurolo-4-(14),5-diene	0,166 ±0,19%	GC-MS					
16	Bicyclogermacrene	3,557 ±0,30%	GC-MS					x
17	(+)-alpha-muuroloene	0,177 ±0,35%	GC-MS					
18	Isomethyleugenol	8,102 ±0,78%	GC-MS		x			
19	(-)-alpha-Bulsenene	3,042 ±0,45%	GC-MS					x
20	(-)-7-epi-alpha-selinene	0,391 ±0,54%	GC-MS					x
21	(-)-delta-Cadinene	3,373 ±0,27%	GC-MS					x
22	Elemicin	0,257 ±0,51%	GC-MS	x				
23	(E)-Nerolidol	10,099 ±1,28%	GC-MS RMN-1H	x				
24	gamma-Asarone	9,619 ±0,86%	GC-MS	x				
25	Spathulenol	2,663 ±0,24%	GC-MS					
26	Caryophyllene oxide	5,563 ±0,68%	GC-MS					
27	N.I.		GC-MS					
28	Globulol	0,210 ±0,27%	GC-MS					
29	N.I.		GC-MS			x		

30	Humulene epoxide II	0,488 ±0,66%	GC-MS					
31	N.I.		GC-MS					
32	N.I.		GC-MS					
33	10-epi-.alpha.-Muurolol	1,379 ±1,03%	GC-MS					
34	N.I.		GC-MS					
35	Dimethoxy-5-vinyl-1,2-benzodioxide <4,6->	7,843 ±1,04%	GC-MS	x				
36	τ-Cadinol	1,941 ±0,23%	GC-MS				x	
37	N.I.		GC-MS					
38	N.I.		GC-MS					
39	Asarone	3,954 ±0,65%	GC-MS RMN-1H	x				
40	(-)-alpha-Bisabolol	0,270 ±0,32%	GC-MS	x				
41	N.I.		GC-MS					
42	Thujopsene <-cis>	0,097 ±0,19%	GC-MS					
43	(E)-geranyl linalool	4,741 ±1,00%	GC-MS	x				
44	N.I.		GC-MS					

Fuente: Coronel & Piedra, 2014

Nota: El signo x representa los compuestos que se encuentran en un Rf determinado.

2.2. Actividad Antioxidante

Halliwell y Gutteridge (1998), definieron como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con el radical libre, (en adelante RL), le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes.

Los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación) (Halliwell, 1999).

2.2.1. Actividad antioxidante de los aceites esenciales

La actividad antioxidante es expresada como la capacidad de inhibir la peroxidación del ácido linoleico y atrapar los RL (Capecka, Mareczek, & Leja, 2005).

El mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con toda certeza. Sin embargo, en un estudio realizado por Foti e Ingold (2003) se sugiere que el γ -terpineno, presente en varios aceites esenciales, actúa como antioxidante al retardar la peroxidación del ácido linoleico, porque los radicales peroxilo formados a partir de éste ($\text{HOO}\bullet$) reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del ácido linoleico. De tal forma que se disminuye la concentración de los radicales peroxilo del ácido linoleico en el estado estacionario. Adicionalmente, autores como Puertas, Hillebrand, Stashenko y Winterhalter (2002), han mostrado que algunos aceites esenciales y sus fitoconstituyentes poseen la capacidad de atrapamiento del catión-radical 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) ABTS⁺ y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH igual o superior a la de antioxidantes sintéticos como la vitamina E, el trolox y el ácido ascórbico.

2.2.2. Métodos para medir la capacidad antioxidante

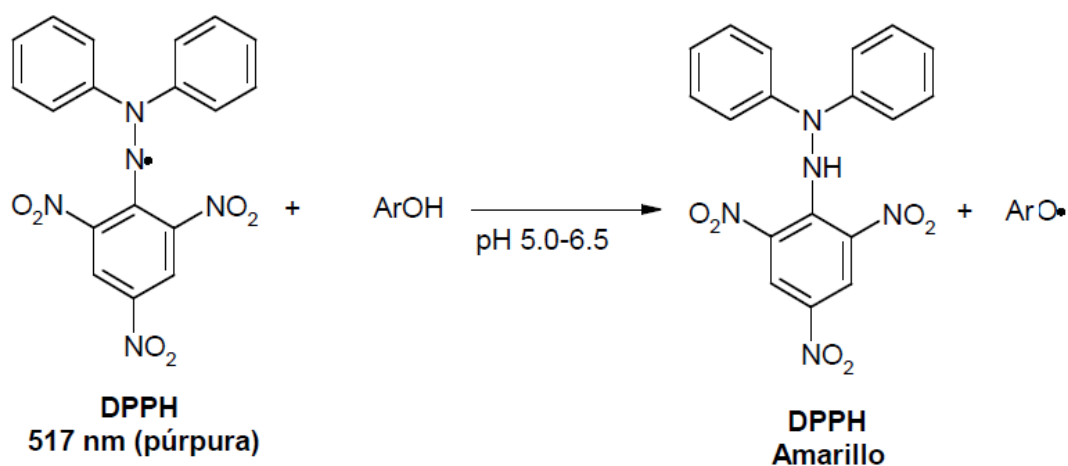
Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Salinas, 2009).

2.2.2.1. Ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH •)

El método que se empleó en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995), método de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), que nos permite evaluar la actividad de sustancias frente al radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•). El radical libre DPPH• como se aprecia en la

Figura 2 se reduce a la correspondiente hidrazina cuando reacciona con donantes de hidrógeno (Sánchez-Moreno, 2002). Recientemente, esta reacción se ha evaluado mediante el ensayo de decoloración, donde se mide la disminución en la absorbancia a 515-528 nm producidos por la adición del antioxidante a DPPH • en metanol o etanol. (De la Rosa, Alvarez, & González, 2010).

Figura 2. Estructura de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH •).



Fuente: Gutiérrez *et al*, 2008

El método de DPPH es un ensayo colorimétrico simple basado en la disminución de la absorbancia del radical DPPH. Se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm (Molyneux, 2004). Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R.) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia. Los resultados obtenidos por este método se reportan como porcentaje de inhibición.

Ecuación 1. Calculo de porcentaje de inhibición del DPPH

$$\%I_{DPPH} = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

A partir del gráfico de este porcentaje de inhibición versus la concentración de la muestra se obtiene el IC₅₀ definido como la cantidad de la muestra necesaria para disminuir en un 50 % la inhibición , es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de reducir el 50 % del radical DPPH. (Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008).

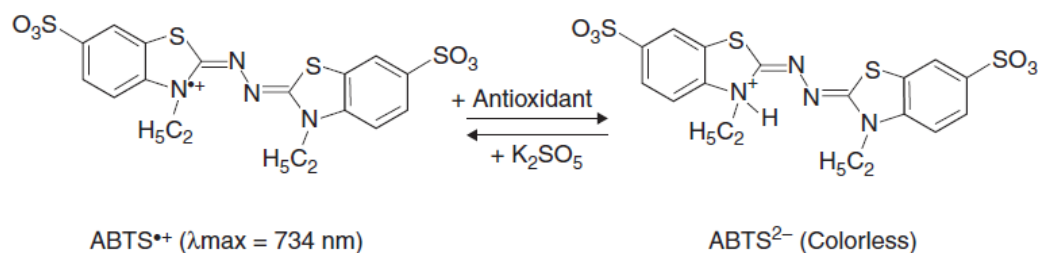
2.2.2.2. Ensayo 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS•+).

El método ABTS es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante de un material biológico, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica. Involucra un compuesto coloreado de naturaleza radical (radical ABTS•+), con el fin de simular especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; de esta manera la presencia del antioxidante conduce a la desaparición de este radical coloreado.

El radical ABTS•+ debe ser generado mediante reacciones químicas (dióxido de manganeso, persulfato de sodio) como se muestra en la Figura 3 o enzimáticas (peroxidasa, mioglobina). Dicho radical, tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y orgánicos. El radical ABTS•+ es el más indicado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos coloreados, como en el caso de las antocianinas, por presentar una absorbancia máxima próxima a la región infrarroja (754 nm), reduciendo así, las posibilidades de interferencias de compuestos colorados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de reacciones secundarias.

El radical ABTS•+, ha sido validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente a otros métodos de evaluación de capacidad antioxidante (Kuskoski, Asueroro, Troncoso, Garcia-Parilla, & Fett, 2004)

Figura 3. Oxidación de persulfato de 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfónico) (ABTS2-)



Fuente: Gutiérrez *et al.*, 2008

Los resultados obtenidos por este método se reportan como porcentaje de inhibición

Ecuación 2. Calculo de porcentaje de inhibición del ABTS

$$\%I_{ABTS} = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

A partir del gráfico de este porcentaje de inhibición versus la concentración de la muestra se obtiene el IC₅₀, definido como la cantidad de la muestra necesaria para disminuir en un 50 % la inhibición, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de reducir el 50 % del radical ABTS. (Gutiérrez *et al.*, 2008).

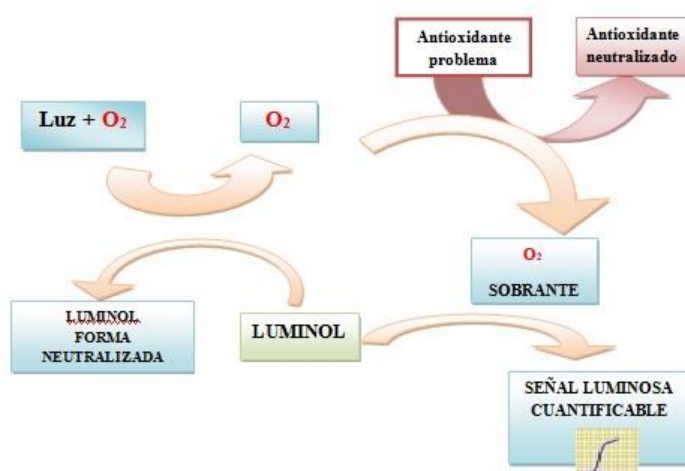
2.2.2.3. La fotoquimioluminiscencia (PCL)

La fotoquimioluminiscencia (PCL), permite la cuantificación de la capacidad antioxidante de las sustancias puras hidrófilas o lipófilas; es la medición de la capacidad antioxidante en la fase lipídica (ACL) y en la fase acuosa (ACW) de matrices complejas de diverso origen: sintética, vegetal, animal, humano (AmbrosiaLab, 2013).

Con este método, las propiedades antioxidantes de las sustancias en cuestión se pueden determinar de una manera rápida y eficaz, lo que limita las pérdidas de las actividades relacionadas con degradación (Popov & Lewin, 1996) (Lewin & Popov, 1994).

Basado en el método de la fotoquimioluminiscencia (PCL) que combina la rápida generación de radicales libres con la alta sensibilidad para su detección lumínica. Método que mide la capacidad de los antioxidantes de unirse al radical superóxido tanto en ambientes liposolubles como hidrosolubles. La excitación mediante irradiación (UV) de la sustancia fotosintetizadora (luminol) produce radicales libres (radical superóxido), radicales que serán parcialmente eliminados al reaccionar con los antioxidantes presentes en la muestra. El resto de los radicales libres producen luminiscencia al reaccionar con el luminol (doble papel), luminiscencia que se mide en el detector presente en el equipo (tubo fotomultiplicador) por tanto cuanto más luminiscencia sea detectada menor será la capacidad antioxidante (ICTAN, 2013).

Figura 4. Mecanismo de acción de PCL



Fuente: ICTAN, 2013

En el sistema de medida por PCL existen dos tipos básicos de radicales: el radical superóxido y el radical luminol. Estos radicales son eliminados parcialmente por reacción con los antioxidantes presentes en la muestra. El luminol actúa como fotosensibilizador y también como reactivo para la detección del radical oxígeno (Vertuani, Braccioli, Buzzoni, & Manfredini, 2002).

El ácido ascórbico y el Trolox son los reactivos utilizados para cuantificar la capacidad antioxidante hidrofílica (ACW) y lipofílica (ACL), respectivamente (Prior *et al.*, 2005).

2.2.3. Localización de compuestos activos antioxidantes

2.2.3.1. Método TLC – DPPH

La TLC combinada con la detección de radical DPPH• de los antioxidantes in situ se introdujo por primera vez por Glavind & Holmer (1967). Un método similar tanto en fase normal (Cavin, Hostettmann, Dyatmyko, & Potterat, 1998) y en fase inversa Yrjonen, *et al.* (2003) citado por Shikov *et al.*, (2011) confirma que las placas de TLC se utilizó para la detección de antioxidantes presentes en extractos de plantas. Pero estos métodos no ofrecen una estimación cuantitativa de la actividad antirradical de cada sustancia después de la separación del extracto directamente sobre la placa de TLC (Shikov *et al.*, 2011).

2.3. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se da por sustancias químicas que, a bajas concentraciones, actúan contra los microorganismos destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento. Algunos ejemplos de antimicrobianos dirigidos a las bacterias son los antibióticos que actúan contra las infecciones humanas o animales (GreenFacts, 2012), además en diversos estudios han demostrado que aceites procedentes de plantas de la familia Piperaceae poseen actividad antimicrobiana y varias aplicaciones farmacológicas (Pino, 2008).

2.3.1. Microorganismos de estudio

En esta investigación se utilizaron cepas ATCC (American Type Culture Collection) que es una colección certificada de microorganismos que determina un cultivo puro y mantienen sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes con el fin de demostrar la trazabilidad (Montoya, 2012). Se describen a continuación las bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras.

2.3.2. Bacterias gram positivas

2.3.2.1. *Staphylococcus aureus*

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>aureus</i>

Fuente. Boderó, 2010

De acuerdo a su descripción microscópica tienen tendencia a agruparse en racimos, de forma esférica con un diámetro de alrededor de una micra. Mientras que en su descripción macroscópica *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir del crema al amarillo. La producción de pigmento se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente. En cuanto a su forma de obtener energía es a través de la fermentación y la respiración; sus requerimientos de cultivo son no exigentes desde el punto de vista nutricional, creciendo en medios pobres y simples. En relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos (Seija, 2000).

S. aureus produce infecciones de dos maneras:

1. En forma directa, por invasión y posterior destrucción tisular local (proceso supurado), o luego de haberse diseminado por vía sanguínea.
2. A través de efectos de toxinas.

Tabla 5. Infecciones producidas por *S. aureus*

Invasión directa
Superficial
• Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia
• Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, celulitis, etc.
Profunda
Artritis séptica y osteomielitis
Diseminación por vía sanguínea
Bacteriemia con o sin shock o falla multiorgánica
Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado)
Enfermedades mediadas por toxinas
• Síndrome de piel escaldada
• Intoxicación alimentaria

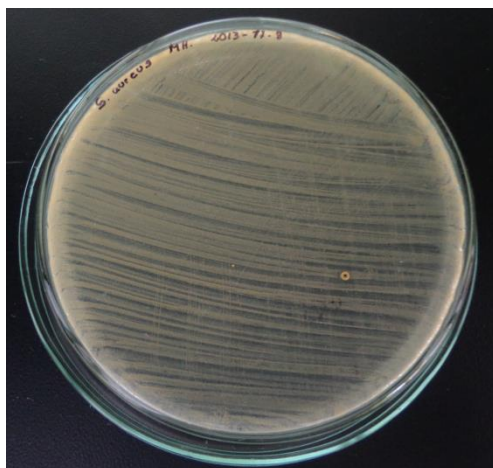
Fuente: Seija, 2000

Tabla 6. Descripción de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC* 6538P™*

Localización	Piel humana, las membranas mucosas, orificios nasales. Puede causar enfermedad o intoxicación por alimentos.
Características fenotípicas	Descritas en el Anexo 1.
Crecimiento	Agar tripticasa de soja, agar sangre de carnero, agar nutriente y agar cuenta de placa estándar, 35 °, 24 horas.

Fuente: Microbiologics, 2009

Figura 5. *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC* 6538P™*



Fuente. Juan Abad y Diana Cabezas

2.3.2.2. *Streptococcus mutans*

Tabla 7. Clasificación taxonómica de *Streptococcus mutans*

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Lactobacillales
Familia:	Streptococcaceae
Género:	<i>Streptococcus</i>
Especie:	<i>mutans</i>

Fuente. Vargas Chávez, Treviño, & Soto Sarellano, 2011

Su característica microscópica es que son pequeños cocos gram positivos, células ovoides pueden estar solos o en parejas y principalmente en cadenas, presentar un diámetro de 0.5 a 0.75 milimicras. En su característica macroscópica se puede observar colonias de dos tipos: la primera es pequeña circular, en forma de cúpula, borde completo, de color blanco, mientras que la segunda es pequeña, circular y translúcida. Es anaeróbica facultativa (puede usar para su metabolismo oxígeno si se

encuentra presente en el medio ambiente, pero puede también sobrevivir en ausencia total del O₂), pero su crecimiento óptimo ocurre bajo condiciones de anaerobiosis (Figueroa, 2008).

Como parte de la flora oral microbiana es la causante de endocarditis al penetrar al sistema circulatorio; caries provocando sensibilidad dental y mal aliento; daños en la placa dental adhiriéndose al diente además de permitir invasión de otros microorganismos (Velazquez, 2008).

Tabla 8. Descripción de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™

Localización	Saliva humana, esputo y en la placa dental.
Características fenotípicas	Descritas en el Anexo 2.
Crecimiento	Agar tripticasa de soja, agar sangre de carnero, agar nutriente y agar cuenta de placa estándar, 35 °, 24 horas.

Fuente. Microbiologics, 2009

Figura 6. *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

2.3.3. Gram negativas

2.3.3.1. *Escherichia coli*

Tabla 9. Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

Reino	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>coli</i>

Fuente: Vizcaína, 2012

Esta bacteria es de tamaño mediano a grande, gris, convexa; bacilo gram negativo rectangular en forma de varilla que posee cierta movilidad gracias a una serie de flagelos que rodean su estructura. Este microorganismo anaerobio facultativo, capaz de emplear como fuente de carbono y energía azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos lo que le da la capacidad de fermentar glucosa y lactosa. Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos provocando infecciones del aparato digestivo y urinario (Vizcaína, 2012).

Tabla 10. Descripción de *Escherichia coli* ATCC* 8739™

Localización	Intestino grueso de los animales de sangre caliente.
Características fenotípicas	Descritas en el Anexo 3.
Crecimiento	Agar tripticasa de soja, agar sangre de carnero, agar nutriente y Cuenta de placa estándar de agar, 35 °, 24 horas.

Fuente: Microbiologics, 2009

Figura 7. *Escherichia coli* ATCC* 8739™



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

2.3.3.2. *Pseudomona aeruginosa*

Tabla 11. Clasificación taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Pseudomonas</i>
Especie:	<i>aeruginosa</i>

Fuente. Ecured, 2013

P. aeruginosa es un bacilo gram negativo aerobio con un flagelo polar que secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo). Se asocia frecuentemente a

infecciones de los tractos urinario y respiratorio en la especie humana. Los factores que contribuyen a la patogénesis y virulencia incluyen adherencia, daño e invasión con acción directa de toxinas o exoenzimas y persistencia por adaptación al medio (Madigan, 1999).

Tabla 12. Especificaciones de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 9027™

Localización	Ambientes húmedos como los desagües y las verduras. Puede causar infecciones en: heridas, quemaduras y del tracto urinario.
Características fenotípicas	Descrita en el Anexo 4.
Crecimiento	Agar tripticasa de soja, agar sangre de carnero, agar nutriente y Cuenta de placa estándar de agar, 35 °, 24 horas.

Fuente. Microbiologics, 2009

Figura 8. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 9027™



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

2.3.4. Hongos

2.3.4.1. *Candida albicans*

Tabla 13. Clasificación taxonómica de *Candida albicans*

Reino:	Fungi
Clase:	Hemiascomycetes
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<i>Candida</i>
Especie:	<i>albicans</i>

Fuente. Berkhout, 2002

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 µm). Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared, situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados. En medio de cultivo presenta colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis también puede que afectar a piel, uñas y mucosas (Berkhout, 2002).

Tabla 14. Descripción de *Candida albicans* ATCC® 10231™*

Localización	Tracto digestivo. Puede causar infecciones oportunistas como la candidiasis y la candidiasis vaginal.
Características fenotípicas	Descritas en el Anexo 5.
Crecimiento	Sabouraud Dextrosa Agar Emmons, agar nutriente, Patata Dextrosa Agar, Cuenta de placa estándar de agar, 25 °, 4-6 días.

Fuente: Microbiologics, 2009

Figura 9. *Candida albicans* ATCC® 10231™*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

2.3.4.2. *Candida tropicalis*

Tabla 15. Clasificación taxonómica de *Candida tropicalis*

Reino:	Fungi
Clase:	Hemiascomycetes
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<i>Candida</i>
Especie:	<i>tropicalis</i>

Fuente: The University of Adelaide, 2013

Las colonias en agar dextrosa de sabouraud son medianas, blancas, opacas, convexas, y circulares. Su morfología microscópica muestra una forma esférica, 3 - 5,5 μm x 4-9 μm de tamaño. Es una de las principales causas de la candidiasis diseminada y septicemia, especialmente en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes (The University of Adelaide, 2013).

Tabla 16. Descripciones de *Candida tropicalis* ATCC® 13803™*

Localización	tracto pulmonar y urinario
Características fenotípicas	Descritas en el Anexo 6.
Crecimiento	Sabouraud Dextrosa Agar Emmons, Agar Sabouraud dextrosa, agar nutriente, agar de soja Tripticasa, Patata Dextrosa Agar, Cuenta de placa estándar de agar, no selectivo Sheep Agar, 25 °, 4-6 días.

Fuente: Microbiologics, 2009

Figura 10. *Candida tropicalis* ATCC® 13803™*



Fuente. Juan Abad y Diana Cabezas

2.3.5. Metodología para evaluar la actividad antimicrobiana

2.3.5.1. Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos

Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un agente antibacteriano están basadas en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente. No todos los microorganismos presentan la misma

sensibilidad a los distintos antibióticos, de allí la importancia de esta determinación. (Gamazo, López-Goñi, & Díaz, 2005)

La sensibilidad de una bacteria a un determinado antimicrobiano viene dado por la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana. (Gamazo *et al.*, 2005).

Para la evaluación de la MIC se empleó la técnica descrita por Kirby-Bauer, que es el recomendado por la Food and Drug Administration (FDA) y el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), pero con algunas variaciones.

2.3.5.2. Difusión en agar con discos

Este sistema permite probar la eficacia de varios antibióticos al mismo tiempo. Sobre la superficie de una placa de agar se realiza la siembra de una suspensión bacteriana calibrada y a continuación se depositan sobre ella discos de papel de filtro impregnados de antimicrobianos. Tan pronto como el disco toma contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel de filtro y el antibiótico difunde hacia el medio circundante creando así concentraciones progresivamente decrecientes. Se observa como a medida que la distancia al disco aumenta hay una reducción de la concentración del antibiótico. Así, al cabo de 18 horas de incubación, en aquella zona donde el antibiótico es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria aparece un halo alrededor del disco: halo de inhibición (López & Torres, 2006).

2.3.5.3. Técnicas de recuento microbiano

La concentración de una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración de células en un cultivo, por lo que para estimar el número de bacteria presentes en un cultivo se lo hace mediante la medida de la turbidez mediante el espectrofotómetro. Pero hay que tener en cuenta que un cultivo con concentraciones inferiores a 10^6 UFC / mL no presenta turbidez detectable (Gamazo *et al.*, 2005).

2.3.6. Localización de los compuestos activos

2.3.6.1. Bioautografía

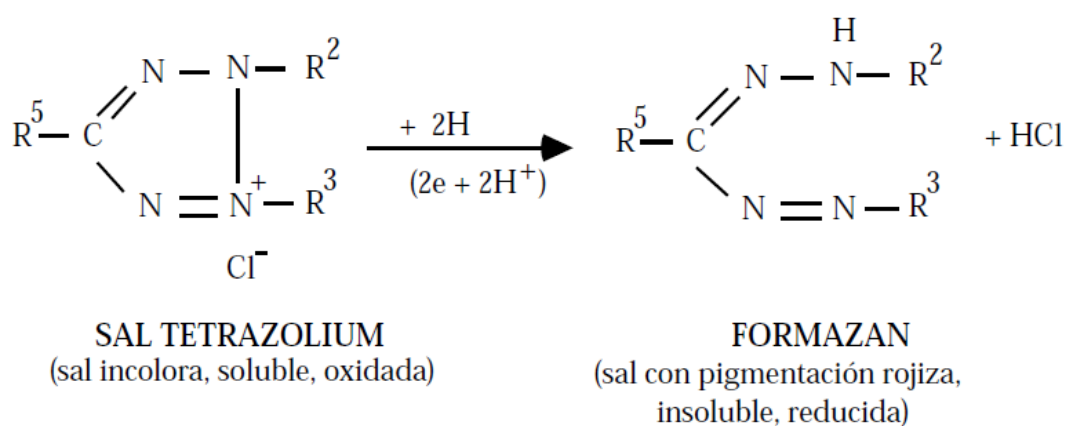
De acuerdo a Betina (1973) citada por Padrón Marquez (2010) la bioautografía es el método más importante de detección para compuestos nuevos o no identificados; ésta se basa en los efectos biológicos de las sustancias bajo estudio. Está basada en la técnica de difusión en agar donde el compuesto antibacterial es transferido de la capa cromatográfica a una de agar inoculado. Las zonas de inhibición pueden ser visualizadas después del período de incubación por detección con reactivos detectores de la actividad dehidrogenasa.

2.3.6.2. Sales de Tetrazolio

El uso de sales de tetrazolio provee de métodos alternos indirectos para medir actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de electrones.

La reducción de una sal de tetrazolio causa la formación de un precipitado insoluble de coloración intensa, conocido con el nombre de formazán. Hoy día su utilización se extiende a: pruebas de viabilidad de semillas, presencia y enumeración de bacterias y detección de sistemas enzimáticos de deshidrogenasas, la reacción se muestra en la Figura 11 (Pérez L. , 2005).

Figura 11. Cloruro de tetrazolio



Fuente: Castro, 2006

La sal de tetrazolio 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) se utiliza para diferenciar entre los tejidos metabólicamente activos e inactivos. El compuesto blanco se reduce enzimáticamente para TPF rojo (1,3,5-triphenylformazan) en los tejidos vivos debido a la actividad de diversas enzimas deshidrogenasas (importantes en la oxidación de compuestos orgánicos y por lo tanto el metabolismo celular), mientras que se mantiene como blanco TTC en las zonas de la necrosis ya que éstas enzimas han sido desnaturalizadas o degradadas. (Castro, 2006).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Este ensayo se basa en la habilidad “captadora de los radicales libres” de los antioxidantes sobre el radical DPPH, habilidad que se evalúa por la medida del decrecimiento de su absorbancia a 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995).

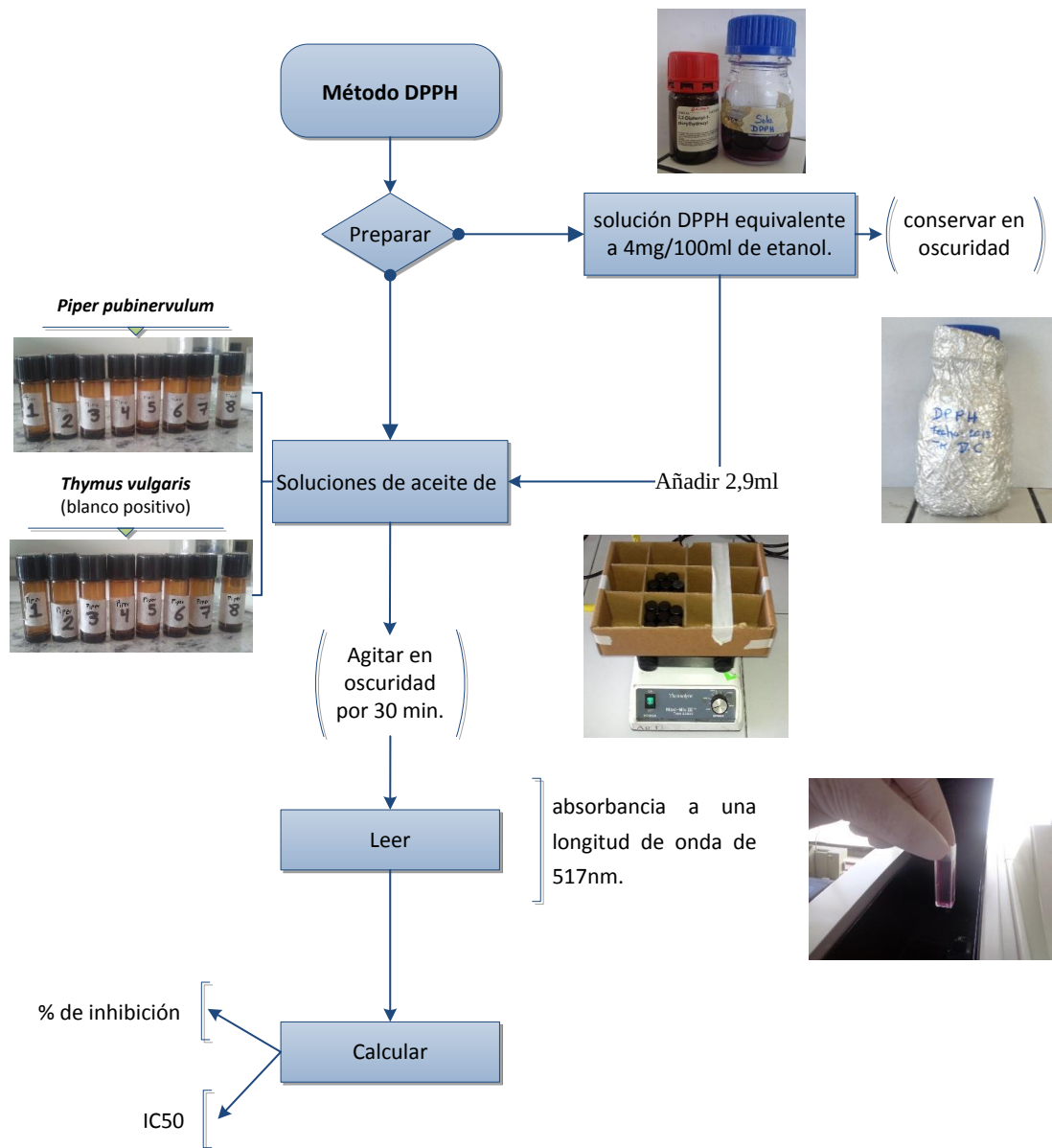
Materiales y Equipos

- Balones aforados de 100, 10 mL, viales ámbar, vasos de precipitación de 50 y 250 mL, frasco boeco de 250 mL, varilla de agitación
- Micro pipeta de 1000 µL regulable
- Macro pipeta de 5 mL regulable
- Celdas plásticas
- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01
- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini – 1240
- Vórtex MIXER modelo VM – 300
- Agitador orbital Thermolyne Maxi-Mix III modelo 65800

Reactivos

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Etanol
- Agua destilada
- Aceite esencial de uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum* C. DC.)
- Aceite esencial de timo (*Thymus vulgaris*) (blanco positivo)

Figura 12. Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).



Fuente. Juan Abad y Diana Cabezas

3.1.1. Preparación del reactivo DPPH

Se preparó el reactivo DPPH pesando exactamente 4 mg por cada 100 mL de etanol y se conservó en la oscuridad.

3.1.2. Preparación de las soluciones de aceite de *Piper pubinervulum*

Piper pubinervulum

- a) 100 µL de aceite puro
- b) 50 µL de aceite puro + 50 µL de DMSO
- c) 20 µL de aceite puro + 80 µL de DMSO
- d) 10 µL de aceite puro + 90 µL de DMSO
- e) 5 µL de aceite puro + 95 µL de DMSO
- f) 2 µL de aceite puro + 98 µL de DMSO
- g) 1 µL de aceite puro + 99 µL de DMSO
- h) 100 µL de DMSO

Tomillo (*Thymus vulgaris*). Control positivo

- a) 10 µL de ae de timo + 90 µL de DMSO
- b) 5 µL de ae de timo + 95 µL de DMSO
- c) 2 µL de ae de timo + 98 µL de DMSO
- d) 1 µL de ae de timo + 99 µL de DMSO
- e) 0,5 µL de ae de timo + 99,5 µL de DMSO
- f) 0,2 µL de ae de timo + 99,8 µL de DMSO
- g) 0,1 µL de ae de timo + 99,9 µL de DMSO
- h) 100 µL de DMSO

A cada solución se añadió 2,9 mL de reactivo DPPH y se agitó en la oscuridad por 30 minutos.

3.1.3. Lectura de las soluciones.

Se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, cada una de las soluciones se leyó por quintuplicado obteniéndose así 40 datos de *Piper pubinervulum* y 40 datos de *Thymus vulgaris*.

3.2. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS).

El método descrito por Kuskoski (2004), se basa en el uso de un compuesto radicalizable el ABTS. Inicialmente el ABTS radicalizado es de un color azul oscuro y la adición de un agente antioxidante determina su decoloración.

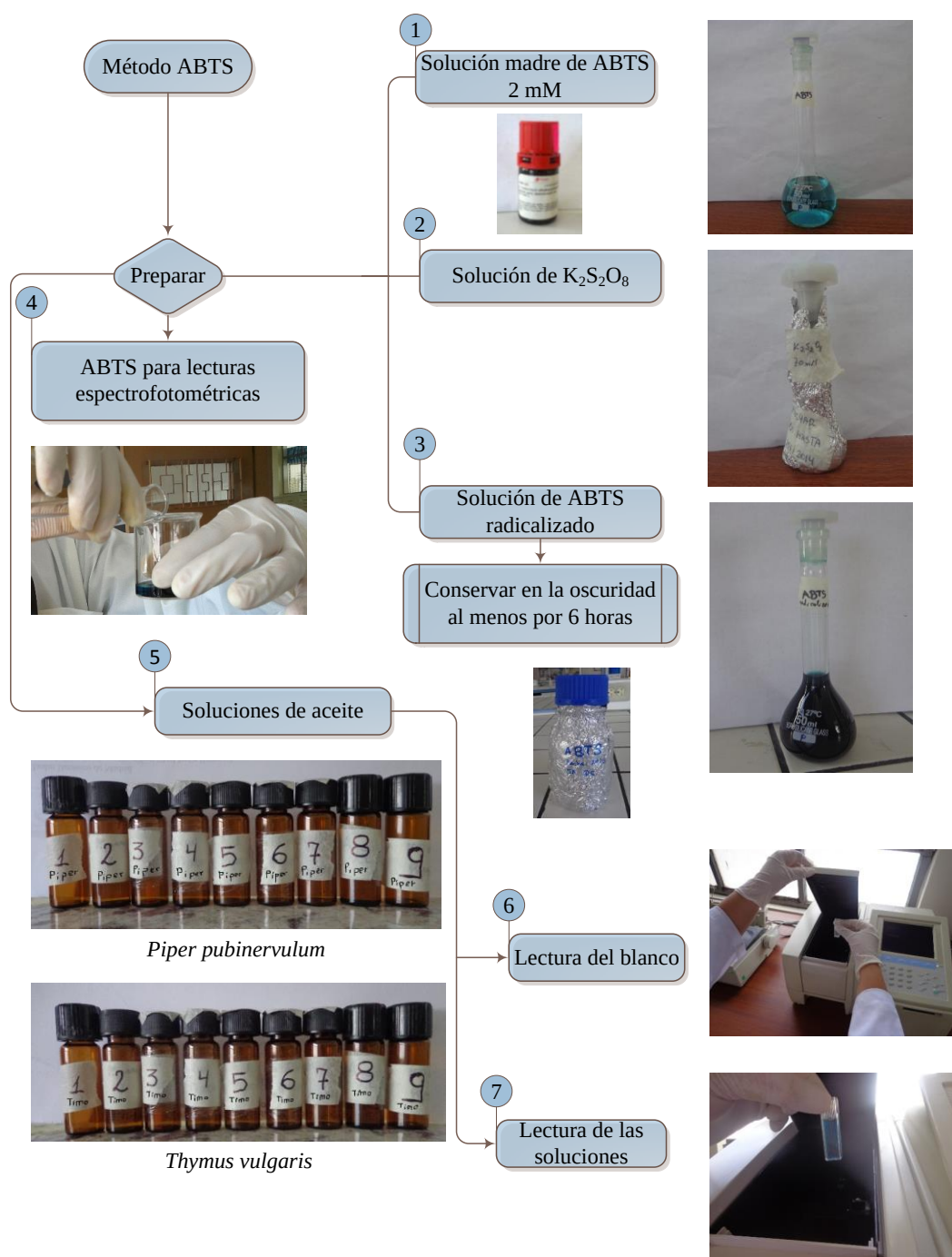
Materiales y Equipos

- Balones aforados de 100, 10 mL, viales ámbar, vasos de precipitación de 50 y 250 mL, frasco boeco de 250 mL, varilla de agitación, celdas plásticas
- Micro pipeta de 1000 µL regulable y macro pipeta de 5 mL regulable
- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01
- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini – 1240
- Vórtex MIXER modelo VM – 300

Reactivos

- 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)
- Dimetil sulfoxido (DMSO), etanol, agua bidestilada
- Aceite esencial de uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum* C. DC.)
- Aceite esencial de timo (*Thymus vulgaris*) (blanco positivo)

Figura 13. Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método ABTS



Fuente. Juan Abad y Diana Cabezas

3.2.1. Preparación de la solución madre de ABTS

Se preparó una solución madre de ABTS 2 mM, disolviendo exactamente 0,0275 g de ABTS en 25 mL de agua bidestilada.

3.2.2. Preparación de la solución de K₂S₂O₈

Se preparó una solución de 70 mM de K₂S₂O₈, disolviendo 0,1882 g de K₂S₂O₈ en 10 mL de agua bidestilada.

3.2.3. Preparación del ABTS radicalizado

A la solución de ABTS madre se añadió 250 µL de solución de K₂S₂O₈, se agitó y se conservó en la oscuridad por 24 horas para permitir la radicalización. La solución dura 2 días y permanece azulada.

3.2.4. Preparación de las soluciones

Piper pubinervulum

- Sn 1) 150 µL de aceite esencial+ 150 µL de DMSO
- Sn 2) 100 µL de aceite esencial + 200 µL de DMSO
- Sn 3) 50 µL de aceite esencial + 250 µL de DMSO
- Sn 4) 20 µL de aceite esencial + 280 µL de DMSO
- Sn 5) 10 µL de aceite esencial + 290 µL de DMSO
- Sn 6) 5 µL de aceite esencial + 290 µL de DMSO
- Sn 7) 2 µL de aceite esencial + 298 µL de DMSO
- Sn 8) 1 µL de aceite esencial + 299 µL de DMSO
- Sn 9) 300 µL de DMSO

Tomillo (*Thymus vulgaris*). Control positivo

- Sn 1) 15 µL de aceite esencial + 285 µL de DMSO
- Sn 2) 10 µL de aceite esencial + 290 µL de DMSO
- Sn 3) 5 µL de aceite esencial + 295 µL de DMSO
- Sn 4) 2 µL de aceite esencial + 298 µL de DMSO
- Sn 5) 1 µL de aceite esencial + 299 µL de DMSO
- Sn 6) 0,5 µL de aceite esencial + 299,5 µL de DMSO
- Sn 7) 0,2 µL de aceite esencial + 299,8 µL de DMSO
- Sn 8) 0,1 µL de aceite esencial + 299,9 µL de DMSO
- Sn 9) 300 µL de DMSO

3.2.5. Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas.

Se tomó 2 mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25 mL de etanol hasta que se obtuvo una absorbancia $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$.

3.2.6. Lectura del blanco

Se tomó 2,7 mL de ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3 mL de etanol, en la cubeta se agitó por un minuto y se procedió a leer la absorbancia.

3.2.7. Lectura de las soluciones

Se tomó 2,97 mL de ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,03 mL de cada solución de aceite esencial. Se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm por quintuplicado de cada una de las soluciones obteniéndose 40 datos de *Piper pubinervulum* y 40 datos de *Thymus vulgaris*.

3.3. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método de fotoquimioluminiscencia (PCL)

Materiales y equipos

- Photochem instrument, Analytik Jena AG

Reactivos

- Reactivo 1: disolvente (metanol), Analytik Jena AG
- Reactivo 2: solución amortiguadora, (pH=10.5), Analytik Jena AG
- Reactivo 3: fotosensibilizador (luminol), Analytik Jena AG
- Aceite esencial de uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum* C. DC.)
- Aceite esencial de timo (*Thymus vulgaris*) (blanco positivo)

3.3.1. Preparación de la muestra por el método lipofílico (ACL)

Se mezcló 2.3 mL del reactivo 1 con 200 µL del reactivo 2 y 25 µL del reactivo 3 para la medida del blanco.

Posteriormente se añaden a esta mezcla 25 µL de las muestras diluidas (1:3, v/v) con el reactivo 1. Cada medida se realiza por triplicado.

3.4. Identificación de los compuestos con actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método TLC-DPPH

El ensayo de depuración de radicales se llevó a cabo por el método modificado descrito previamente por (Cavin et al., 1998).

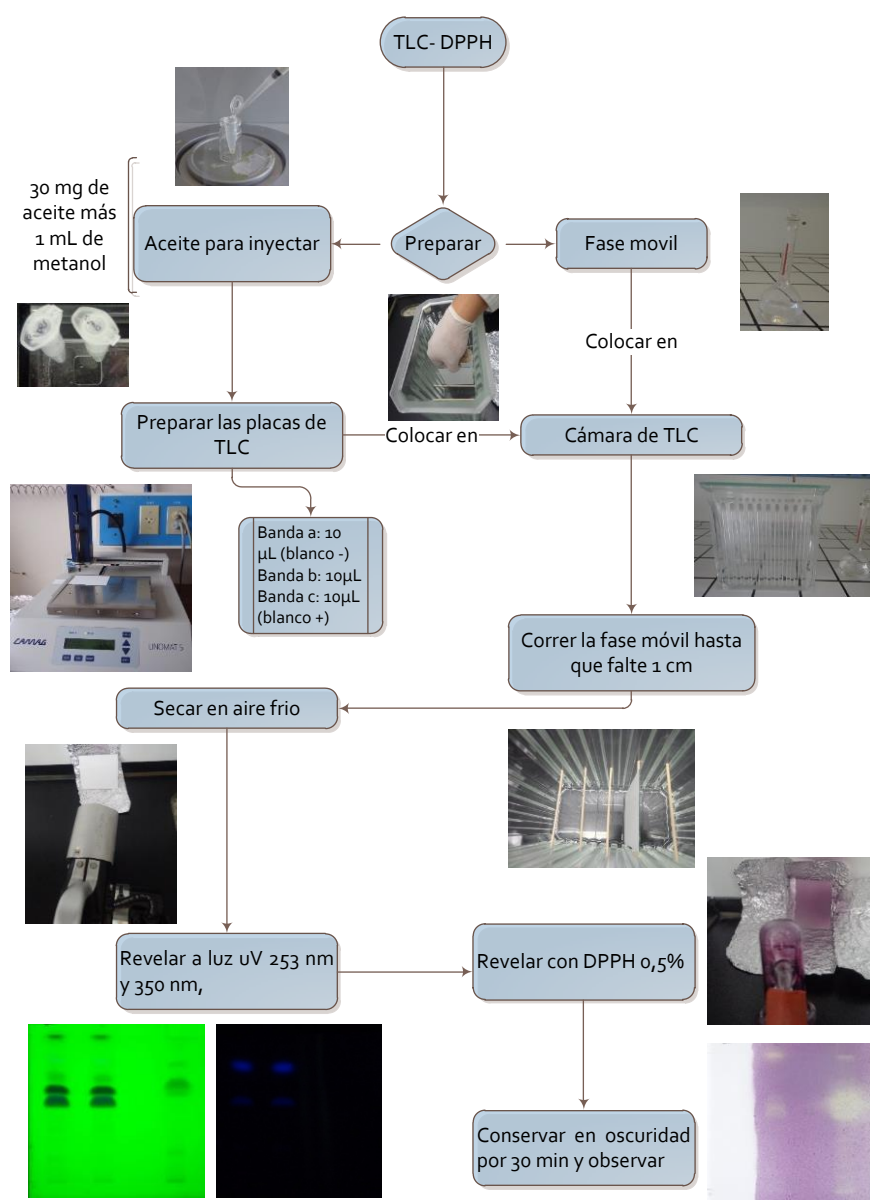
Materiales y equipos

- Micro pipeta de 1000 µL regulable
- Cámara de TLC, tubos eppendorf, balón aforado de 100 mL, pie de rey
- Placas de cromatografía de capa fina con sílica gel de 8 x 10 cm.
- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01.

- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini – 1240.
- Linomat 5 CAMAG modelo 181039.
- Secadora industrial MASTERFLOW modelo AH-301
- Sorbona ESCO modelo frontier junior

Reactivos

- Metanol, tolueno, éter de petróleo y acetato de etilo
- Aceite esencial de uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum* C. DC.)
- Aceite esencial de timo (*Thymus vulgaris*) (blanco positivo)



Fuente. Juan Abad y Diana Cabezas

3.4.1. Preparación de aceite para inyectar

- Se pesó 30 mg de aceite de *Piper pubinervulum* en un tubo eppendorf de 1 mL, a éste se le adicionó 1 mL de metanol grado HPLC.

3.4.2. Elaboración de la fase móvil

- Se midió con ayuda de una probeta 93 mL de tolueno, 7 mL de acetato de etilo y 20 mL de éter de petróleo, se mezcló todo en un balón aforado de 250 mL y se conservó en refrigeración.

3.4.3. Preparación de la placa TLC

- Se realizó la siembra del aceite para inyectar en la placa TLC según la metodología descrita en el Anexo 7.
- Se añadió la fase móvil en la cámara de TLC aproximadamente 1 cm de altura y se dejó en reposo de 1 a 2 min hasta que se sature.
- Posteriormente se colocó la placa en la cámara de TLC y se corrió la fase móvil hasta 1 cm antes del borde superior de la placa.
- Se dejó secar en aire frío hasta que la placa no tenga olor.

3.4.4. Revelado de la placa

- Se reveló a luz UV 253 nm y 350 nm con ayuda del revelador CAMAG.

3.4.5. Revelado con DPPH

- Se preparó una solución de DPPH 0,5%.
- Se dispersó la solución de DPPH hasta que cubra toda la superficie de la placa.
- Se conservó en oscuridad por 30 minutos, posteriormente se procedió a observar la decoloración del DPPH.
- Se calculó los R_f donde hubo decoloración.

3.5. Evaluación la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper pubinervulum* en 2 bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*), 2 bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y en 2 levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) por medio de difusión en disco.

Materiales

- Tubos de ensayo de 10 y 15 mL, cajas petri estériles, vasos de precipitación 100 y 250 mL.
- Gradilla, celdas plásticas para espectrofotómetro, pinzas estériles, asas plásticas desechables estériles, hisopos de algodón estériles, micropipeta graduada, puntas de plástico para micropipeta estériles, roll of pack, regla pie de rey.
- Discos de papel para antibiograma estériles (6 mm de diámetro), discos de isoconazol y gentamicina (6 mm de diámetro).
- Cepas bacterianas KWIK-STIK™ de Microbiologics (*Staphylococcus aureus subsp. Aureus* ATCC* 6538P™*, *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, *Escherichia coli* ATCC* 8739™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 9027™, *Candida tropicalis* ATCC® 13803™* y *Candida albicans* ATCC® 10231™*), cryobank.

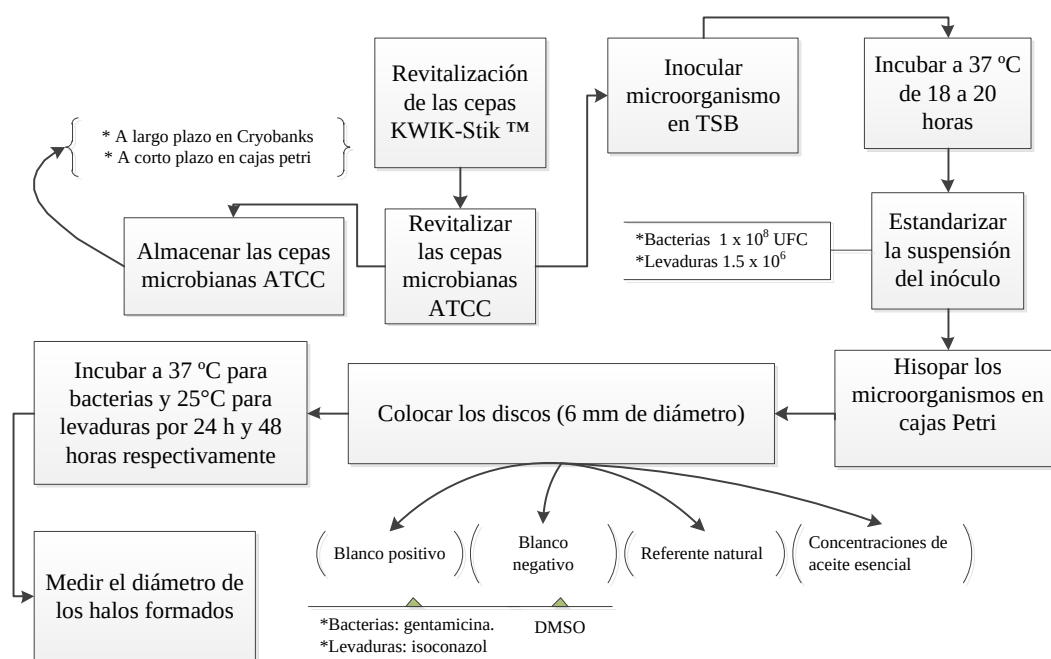
Equipos

- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01.
- Incubadora SHEL – LAB modelo 120VAC.
- Vórtex MIXER modelo VM – 300.
- Cámara de flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845.
- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini – 1240.
- Centrifugadora SELECTA modelo 540.
- Autoclave TUTTNAVER modelo 3870 M.

Reactivos

- Aceite esencial de uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum* C. DC.).
- Caldo tripticasa soja (TSB), agar tripticasa soya (TSA), agar nutriente (CM3), sabouraud dextrosa agar (SDA), *Mueller Hinton* Agar (MH), dimetilsulfóxido (DMSO), suero fisiológico estéril.

Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de difusión en disco según Kirby-Bauer

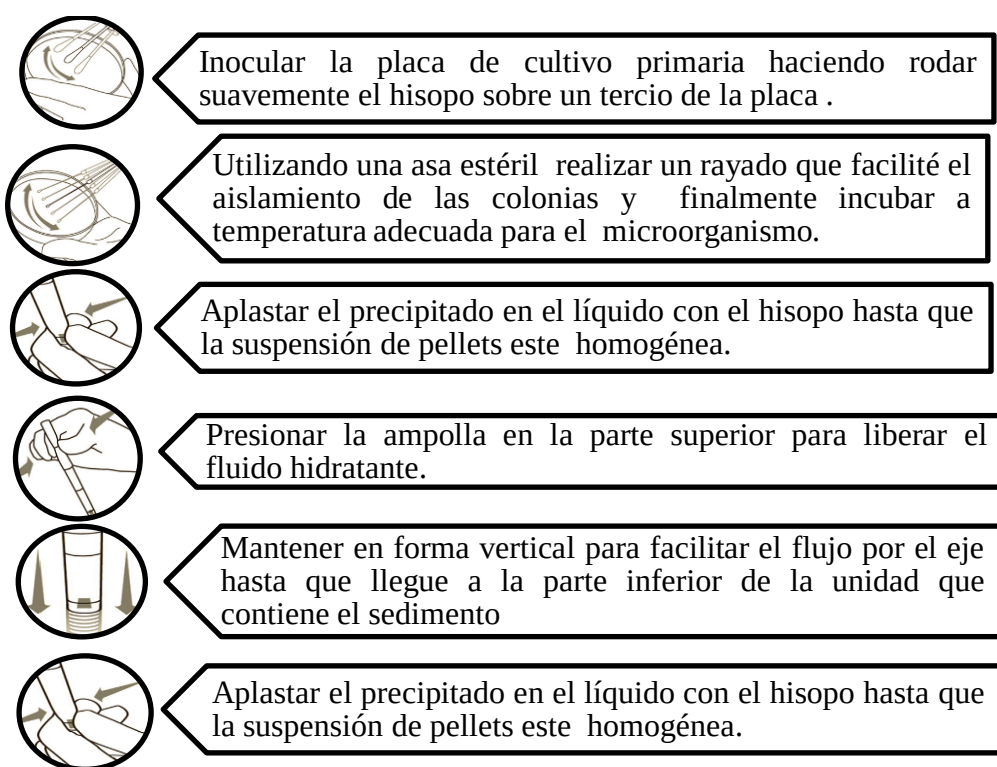


Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

3.5.1. Revitalización de las cepas KWIK-Stik™

Se obtuvieron dispositivos KWIK-Stik™ que son utilizados para pruebas de sensibilidad microbiana y control de calidad, cuenta con un pellet liofilizado, un depósito de fluido hidratante y un hisopo de inoculación. Para garantizar el uso de los dispositivos se incluye el procedimiento de forma ilustrativa por Microbiologics, (2010).

Figura 15. Proceso de revitalización de las cepas KWIK-Stik™

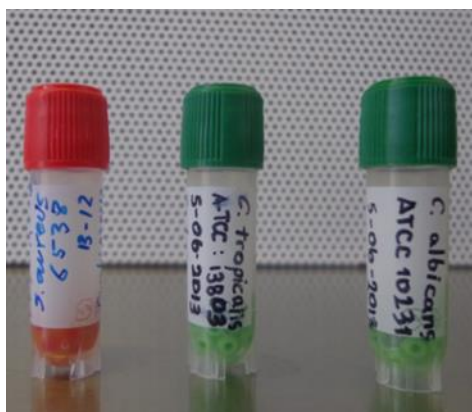


Fuente: Microbiologics, 2010

3.5.2. Almacenamiento

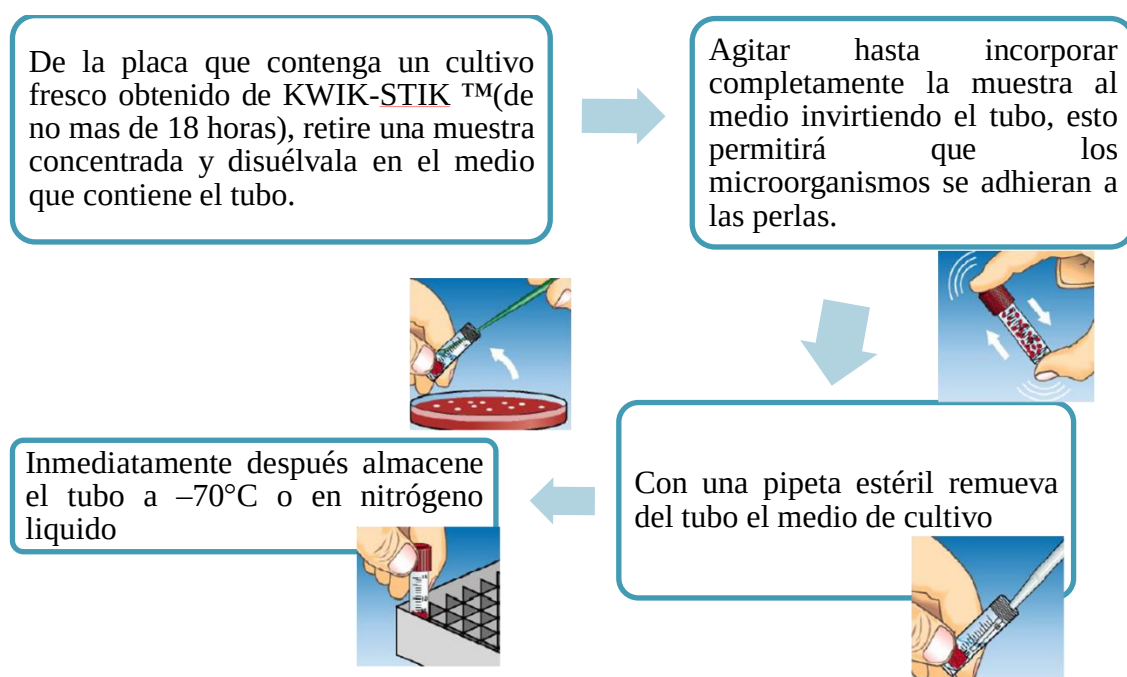
Para evitar la variación en la multiplicación repetida de subcultivos de los microorganismos se utilizaron cryobanks, que contiene perlas suspendidas en una solución criogénica especial, de esta manera se pudo obtener cultivos nuevos.

Figura 16. Tubos de cryobanks con microorganismos



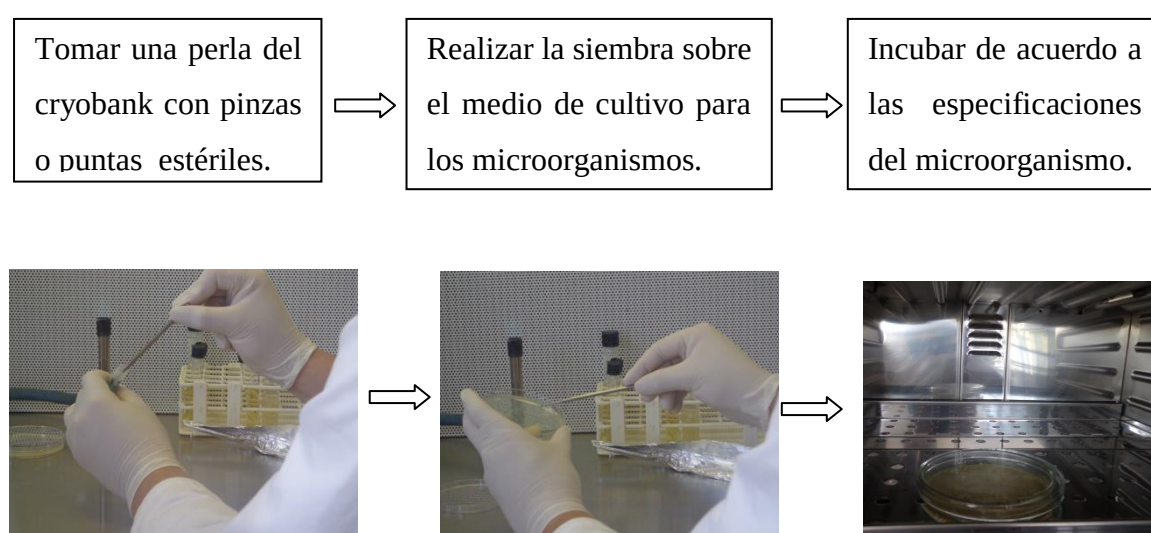
Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 17. Diagrama de almacenamiento en cryobanks



Fuente: Microbiologics, 2010

Figura 18. Revitalización de las cepas del cryobank

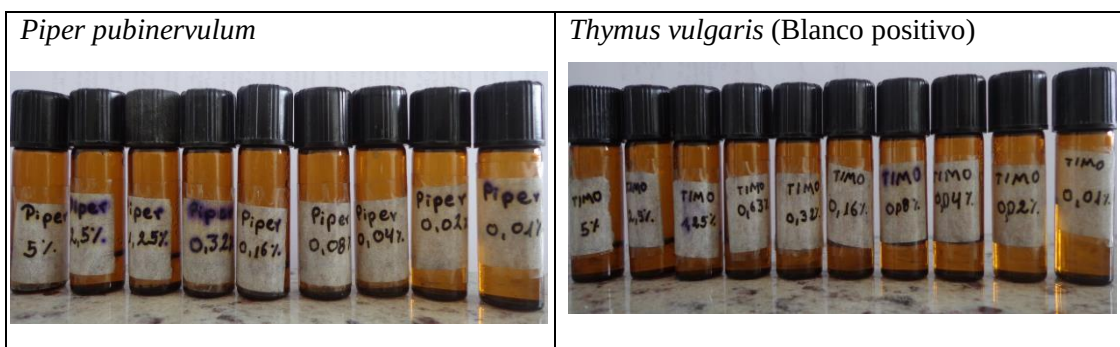


Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

3.5.3. Elaboración de las soluciones de aceite esencial

Se prepararon 10 mL de cada una de las soluciones de aceite esencial de *Piper pubinervulum* y del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (referente positivo natural) utilizando como solvente DMSO en concentraciones de 5%, 2.5%, 1.25%, 0.63%, 0.32%, 0.16%, 0.08%, 0.04%, 0.02% y 0.01%.

Figura 19. Concentraciones de aceite esencial

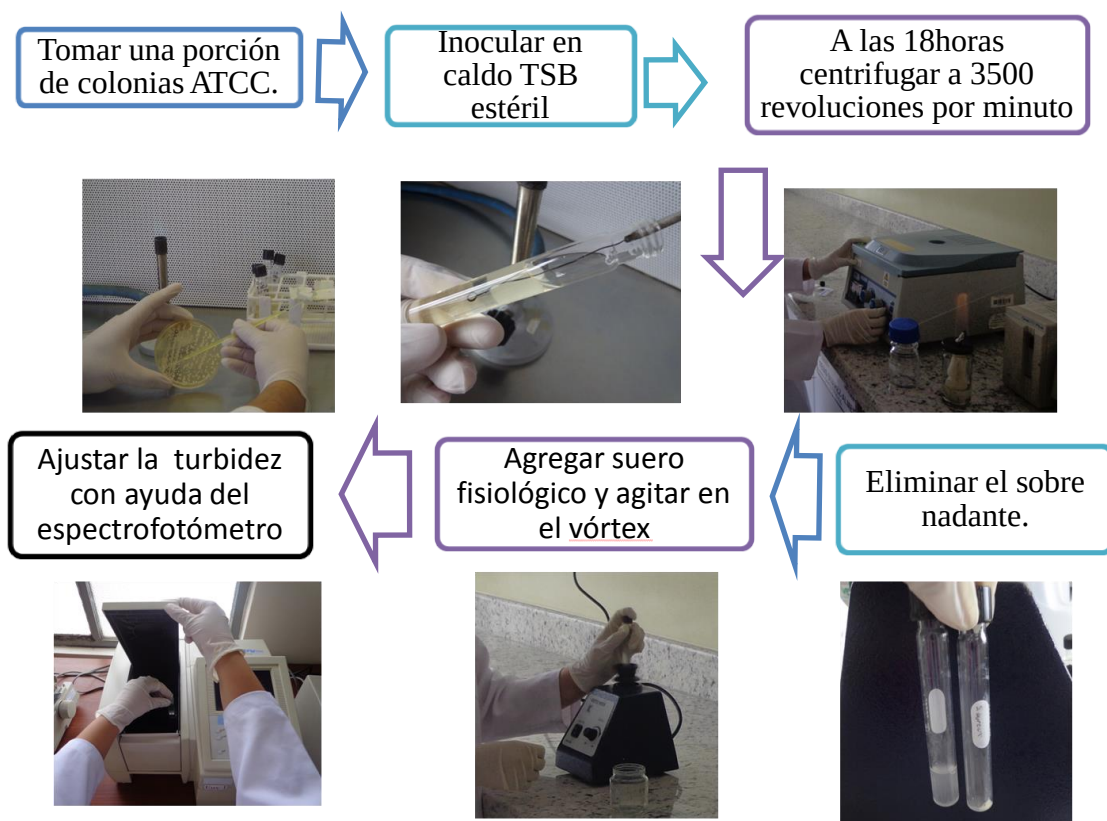


Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

3.5.4. Elaboración del inóculo microbiano

- De un cultivo revitalizado se tomó una porción de colonias para inocularlas en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo TSB estéril para incubarlo por aproximadamente 18 a 20 horas a 37 °C.
- Trascurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto, durante 20 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante para obtener un pellet microbiano al que se le re-suspendió en 4 mL de solución fisiológica (0,9 % NaCl), y se agitó en el vórtex hasta obtener una turbidez uniforme.
- Se agregó de a poco el suero fisiológico estéril para ajustar a una turbidez similar a 0,200 de absorbancia en una longitud de onda de 655 nm para bacterias y a 0,15 de absorbancia en una longitud de onda de 530 nm para levaduras, de esta manera se obtuvo un inóculo de 1×10^8 UFC para bacterias y 1.5×10^6 UFC para levaduras.

Figura 20. Elaboración del inóculo bacteriano



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

3.5.5. Inoculación en las placas

Este procedimiento está basado en la metodología de Gamazo, López-Goñi, y Díaz (2005).

- Luego de haber ajustado la turbidez del inóculo se agitó la suspensión del microorganismo para asegurarse que está bien mezclada con ayuda del vórtex.
- Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión.
- Se inoculó en las cajas petri que contenían medio para cada microorganismo (ver Tabla 17), empezando la siembra en la parte superior de la placa frotando de ida y vuelta de un borde al otro cubriendo toda la superficie del agar, luego se rota haciendo giros de aproximadamente 60°.

- Se colocaron los discos de papel para antibiograma previamente estériles, los discos del blanco positivo se lo colocaron directamente (10 mcg de gentamicina).
- Una vez colocados los discos en las cajas petri, con una micropipeta graduada se colocaron 10 µL en cada disco de las diferentes concentraciones tanto del aceite esencial de *Piper pubinervulum*, del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y del blanco negativo (DMSO).
- Finalizadas las cajas petri se las incubó de forma invertida de acuerdo al requerimiento de los microorganismos descritos en la Tabla 17.

Tabla 17. Medios de cultivo y de incubación para los microorganismos

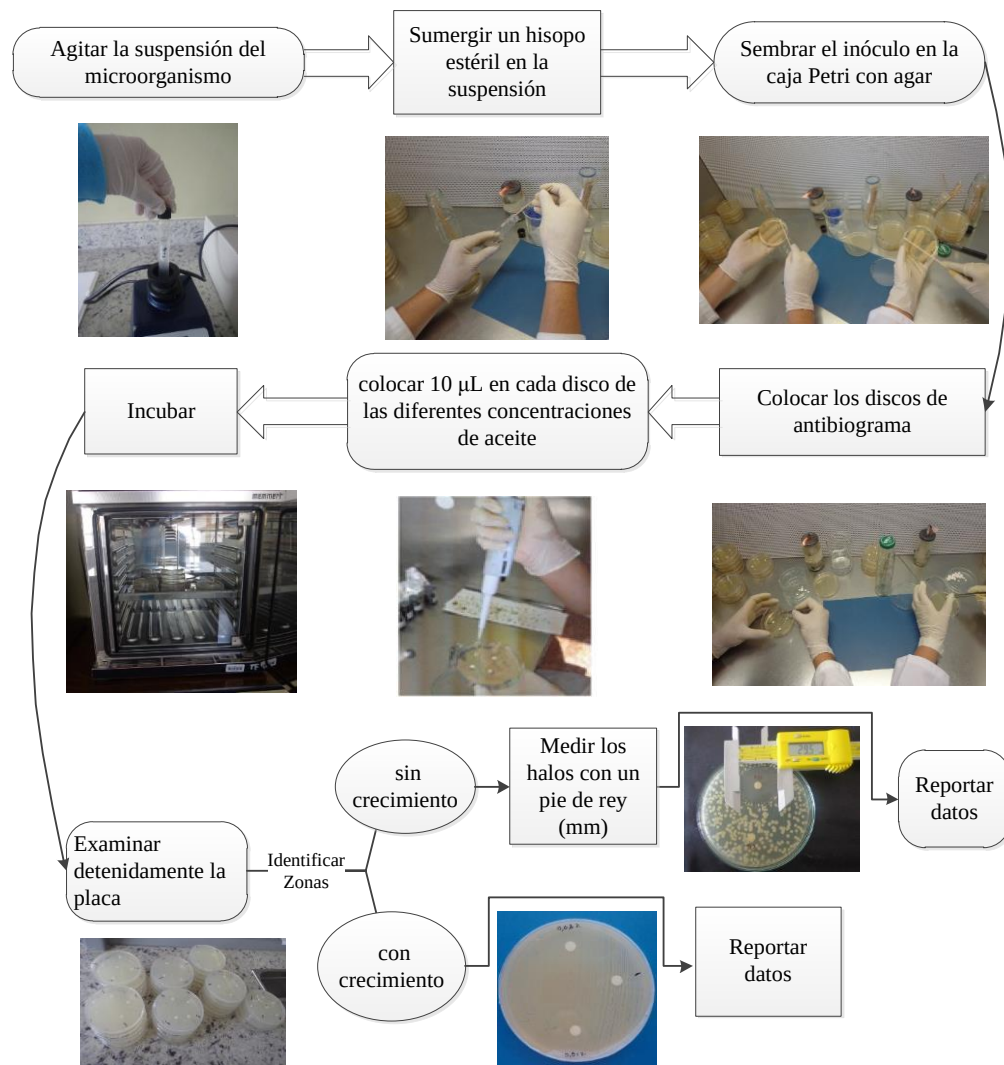
	Microorganismo	Medio de cultivo	Incubación		
			T °C	Tiempo / h	Requerimiento
Gram positivos	Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC* 6538P™*	TSA	37	24	O ₂
	Streptococcus mutans ATCC® 25175™	Mueller Hinton Agar	37	24	CO ₂ 5%
Gram negativos	Escherichia coli ATCC* 8739™	CM3	37	24	O ₂
	Pseudomonas aeruginosa ATCC* 9027™	Mueller Hinton Agar	37	24	O ₂
Levaduras	Candida tropicalis ATCC® 13803™*	SDA	25	48	O ₂
	Candida albicans ATCC® 10231™*	SAD	25	48	O ₂

Fuente: Microbiologics, 2009

3.5.6. Medición de halos

- Después de retirar la placa de la incubadora se la examinó detenidamente para verificar que el crecimiento fue uniforme de tal modo que se pueda identificar zonas sin crecimiento microbiano.
- Se midió el diámetro (mm) de los halos formados con un pie de rey.

Figura 21. Inoculación de los microorganismos ATCC en las placas



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

3.6. Identificación de los compuestos con actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper pubinervulum* en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la técnica de bioautografía en cromatografía de capa fina (TLC).

Materiales

- Tubos de ensayo de 10 y 15 mL, cajas petri estériles, vasos de precipitación 100 y 250 mL.
- Gradilla, celdas plásticas para espectrofotómetro, pinzas estériles, asas plásticas desechables estériles, hisopos de algodón estériles, micropipeta graduada, puntas de plástico para micropipeta estériles, roll of pack, regla pie de rey.
- Placas de cromatografía de capa fina con sílica gel de 8 x 10 cm.
- Cepas bacterianas KWIK-STIK™ de Microbiologics (*Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* ATCC* 6538P™*, *Escherichia coli* ATCC* 8739™).

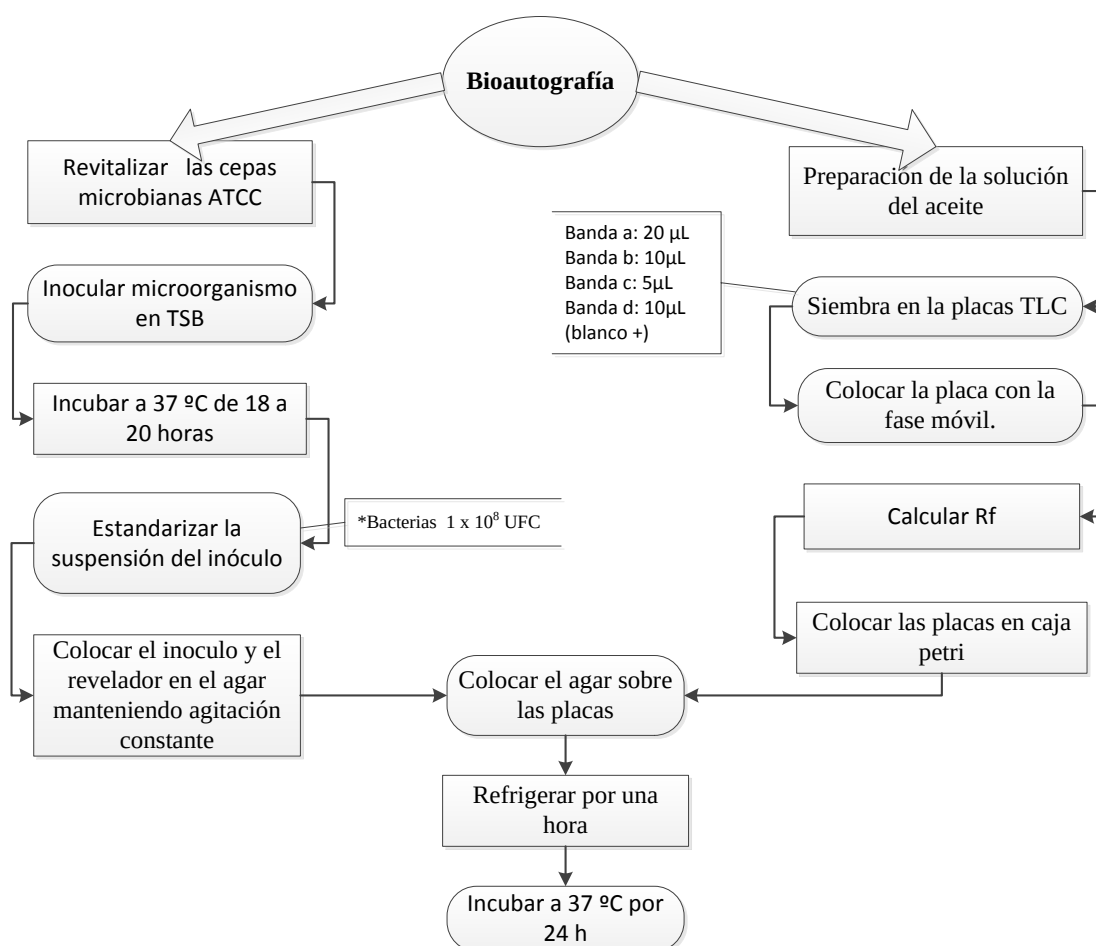
Equipos

- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01.
- Incubadora SHEL – LAB modelo 120VAC.
- Vórtex MIXER modelo VM – 300.
- Cámara de flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845.
- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini – 1240.
- Centrifugadora SELECTA modelo 540.
- Autoclave TUTTNAVER modelo 3870 M.
- Linomat 5 CAMAG modelo 181039.

Reactivos

- Aceite esencial de uunt tunchi tunchi (*Piper pubinervulum* C. DC.).
- Caldo tripticasa soja (TSB), agar tripticasa soya (TSA), agar nutriente (CM3), mueller hinton Agar (MH), suero fisiológico, metanol, tolueno, acetato de etilo, éter de petróleo.

Figura 22. Diagrama de flujo del proceso de localización de los compuestos activos con la técnica Bioautografía TLC.



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

3.6.1. Preparación de aceite para inyectar

- Se pesó 30 mg de aceite de *Piper pubinervulum* en un tubo eppendorf de 1 mL, a este se le adicionó 1 mL de metanol grado HPLC.

3.6.2. Elaboración de la fase móvil

- Se midió con ayuda de una probeta 93 mL de tolueno, 7 mL de acetato de etilo y 20 mL de éter de petróleo, se mezcló todo en un balón aforado de 250 mL y se conservó en refrigeración.

3.6.3. Preparación de la placa TLC

- Se realizó la siembra del aceite para inyectar en la placa TLC según la metodología descrita en el Anexo 7.
- Se añadió la fase móvil en la cámara de TLC aproximadamente 1 cm de altura y se dejó en reposo de 1 a 2 min hasta que se sature.
- Posteriormente se colocó la placa en la cámara de TLC y se corrió la fase móvil hasta 1 cm antes del borde superior de la placa.
- Se dejó secar en aire frío hasta que la placa no tenga olor.

3.6.4. Revelado de la placa

- Se reveló a luz UV 253 nm y 350 nm con ayuda del revelador CAMAG.

3.6.5. Elaboración del inóculo microbiano

Se sigue la metodología descrita en la Figura 20, pág. 44.

3.6.6. Dilución en agar.

Este procedimiento está basado en Ncube, Afolayan, & Okoh, (2008).

- Preparar agar esterilizado con pH de 7,4.
- Colocar 0,25 mL de inóculo estandarizado en CM3 para *Escherichia coli* ATCC* 8739TM, y en MH para *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* ATCC* 6538PTM* evitando que se solidifique el agar.
- Añadir 0,5 mL de revelador TTC al 1 % y mantener en constante agitación.

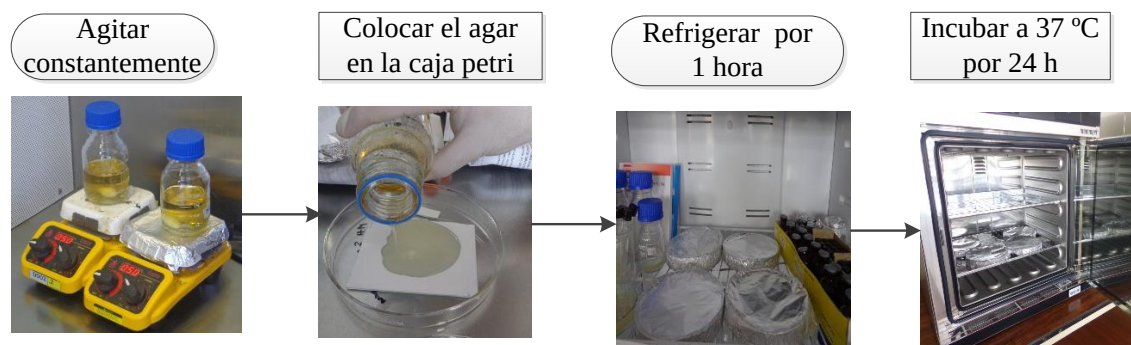
3.6.7. Elaboración de la placa TLC-Agar

- Colocar la placa TLC en la caja petri junto a otra placa de 3 cm x 1 cm utilizada como blanco negativo.

- Agitar constantemente el agar en la estufa para evitar que se solidifique.
- Añadir 50 mL de agar sobre la placa TLC de manera uniforme evitando que se formen burbujas de aire.
- Refrigerar por 1 h.
- Incubar a 37 °C por 24 h.

Las muestras de bioautografía en TLC inoculadas con *E. coli* y *S. aureus* se las realizó por duplicado, para verificar su reproducibilidad.

Figura 23. Diagrama de elaboración de la placa de TLC con agar



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC

Dada la complejidad química de los AE, el ensayo de actividad antioxidante puede arrojar resultados dispersos dependiendo del test empleado. Por lo tanto, es aconsejable un enfoque con múltiples ensayos. Entre la lista de métodos que pueden usarse para la evaluación de la actividad antioxidante (TEAC, DPPH, PCL) muy pocos de ellos son útiles para determinar la actividad de ambas especies (hidrofílica y lipofílica) y asegurar de este modo, una mejor comparación de los resultados. (Granados, Yáñez, & Santafé Patiño, 2012)

4.1.1. Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC por el método DPPH

En la Tabla 18, se describe las concentraciones de aceite en las soluciones, expresada en $\mu\text{g} / \text{mL}$ y la absorbancia media obtenida de las repeticiones de las lecturas, así como las del blanco positivo. Además el porcentaje de inhibición calculado con la Ecuación 1.

$$\%I_{DPPH} = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

Donde: A= Absorbancia DPPH

A_1 = absorbancia media de la muestra

Tabla 18. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC y *Thymus vulgaris*

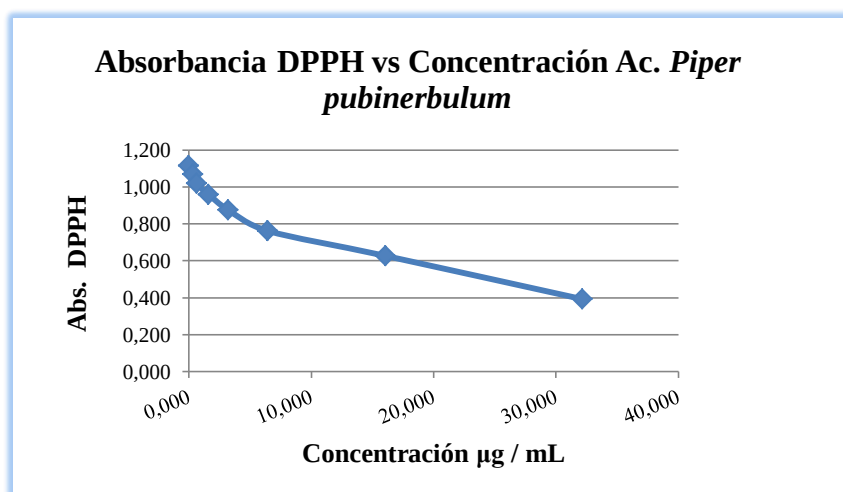
<i>Piper pubinervulum</i>			<i>Thymus vulgaris</i>		
Concentración µg / mL	ABS media	% de inhibición	Concentración µg / mL	ABS media	% de inhibición
*0	*1,12	*0	*0	*1,12	*0
0,32	1,07	4,04	0,03	0,97	13,05
0,64	1,02	8,65	0,06	0,93	16,66
1,61	0,96	13,99	0,15	0,83	25,88
3,22	0,88	21,56	0,31	0,71	36,18
6,44	0,76	31,67	0,61	0,55	51,21
16,09	0,63	43,86	1,53	0,29	74,02
32,17	0,39	64,87	3,06	0,05	95,11

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Nota: el signo * representa a los datos de blanco negativo

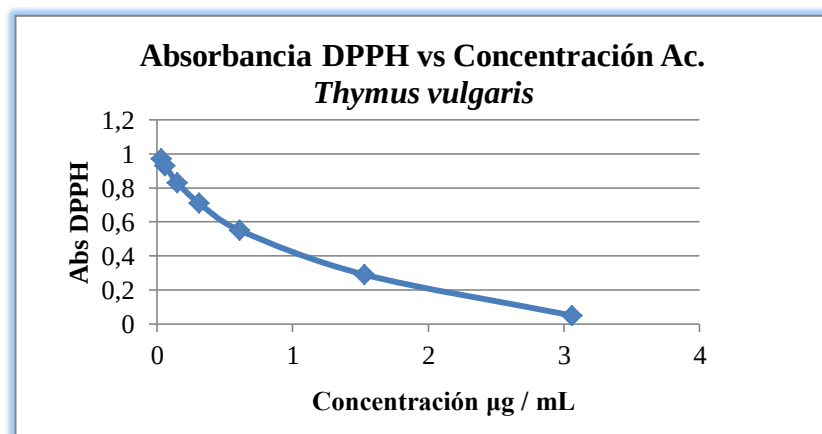
La Figura 24 y la Figura 25 muestran una asociación negativa entre los datos de absorbancia y la concentración de los aceites mostrando una relación inversamente proporcional, es decir que a mayor concentración de los aceites menor es la absorbancia obtenida.

Figura 24. Absorbancia del DPPH frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Piper pubinervulum*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

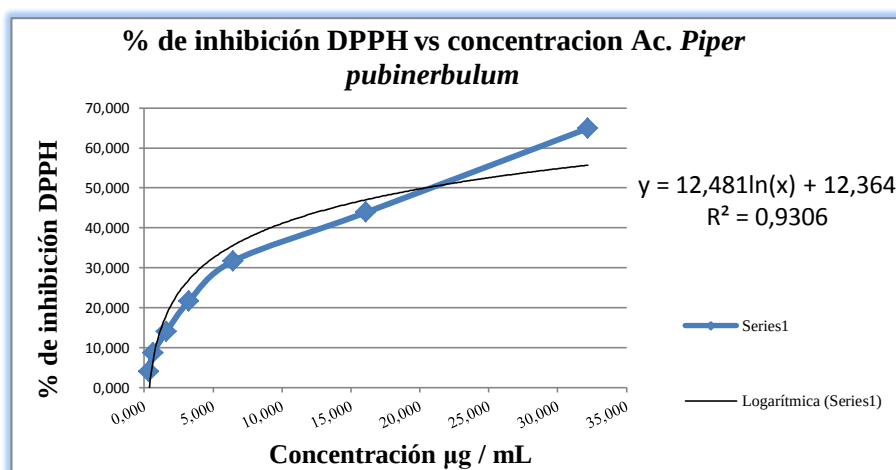
Figura 25 Absorbancia del DPPH frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

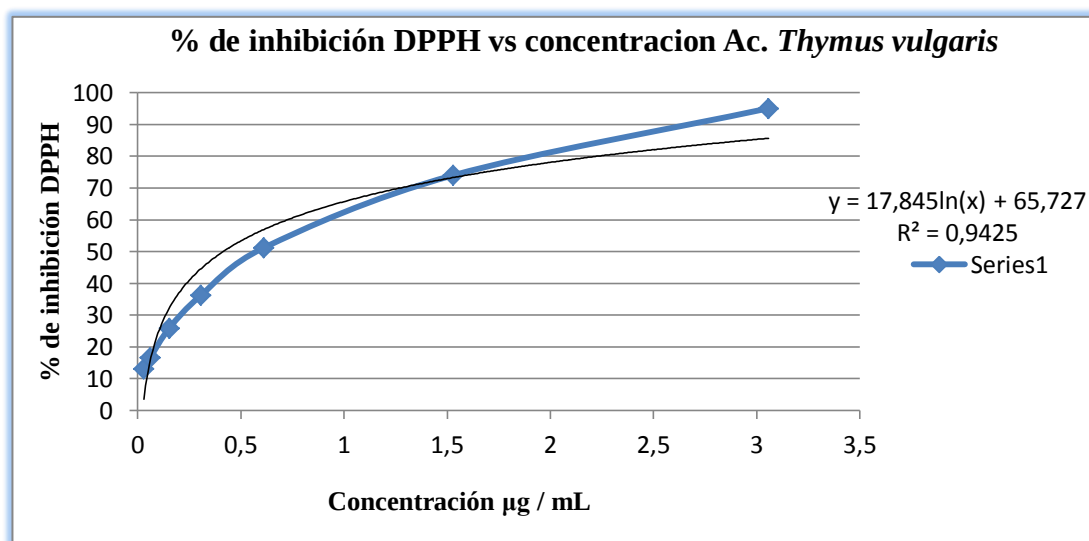
De la Figura 26 y Figura 27 donde se muestran los porcentajes de inhibición versus la concentración de los aceites, se obtuvo la ecuación logarítmica al tener una relación geométrica entre las variables.

Figura 26. Porcentaje de inhibición del DPPH vs concentración de aceite esencial de *Piper Pubinervulum*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 27. Porcentaje de inhibición del DPPH vs la concentración de aceite esencial de *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Para determinar la actividad antioxidante del método DPPH los resultados se expresan como IC₅₀, el cual se calculó despejando (x) de la ecuación obtenida en la regresión logarítmica y reemplazando (y) por 50 correspondiente al 50 % de inhibición del radical DPPH.

De tal manera tenemos que:

Ecuación 3. IC₅₀ del aceite de *Piper pubinervulum* por el método DPPH

$$y = 12,481\ln(x) + 12,364$$

$$x = e^{\left(\frac{50-12,364}{12,481}\right)}$$

$$x = 20,399$$

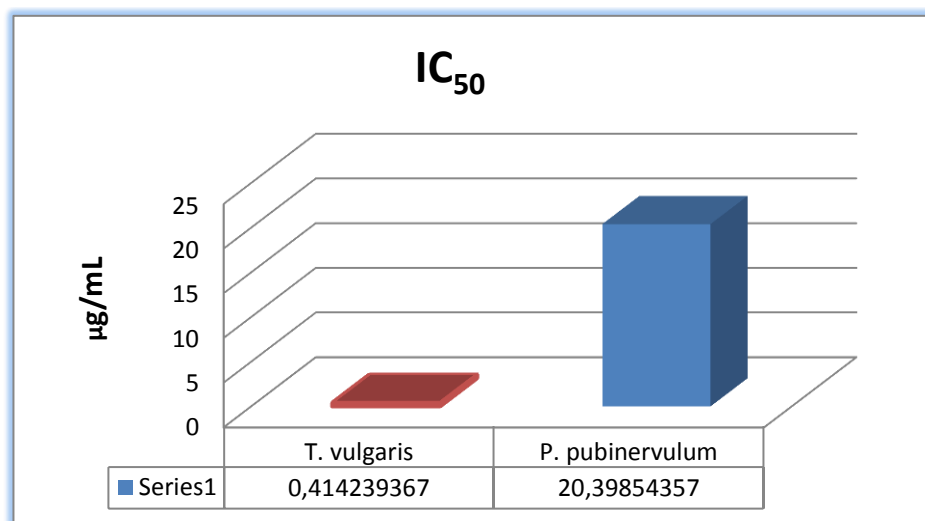
Ecuación 4. IC₅₀ del aceite de *Thymus vulgaris* por el método DPPH

$$y = 17,845\ln(x) + 65,727$$

$$x = e^{\left(\frac{50-65,727}{17,845}\right)}$$

$$x = 0,414$$

Figura 28. Comparación de la actividad antioxidante del aceite de *Piper pubinervulum* y aceite de *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

En la Figura 28 se indica el IC₅₀ del aceite esencial de *P. pubinervulum* y *T. vulgaris* (blanco positivo) correspondiente a 20,399 µg / mL y 0,414 µg / mL respectivamente, mostrando que el aceite esencial de *P. pubinervulum* tiene una menor actividad antioxidante que el *T. vulgaris* ya que a valores más bajos de IC₅₀ mayor la actividad antioxidante. (Padilla, Rincón, & Bou-Rached, 2008)

4.1.2. Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC por el método ABTS

En la Tabla 19 se describe las concentraciones de aceite de las soluciones expresada en µg / mL y la absorbancia media obtenida de las repeticiones de las lecturas, así como las del blanco positivo. Además el porcentaje de inhibición calculado con la Ecuación 1.

$$\%I = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

Donde: A= Absorbancia ABTS

A₁= absorbancia media de la muestra

Tabla 19. Concentración, absorbancias medias y porcentaje de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC y *Thymus vulgaris*

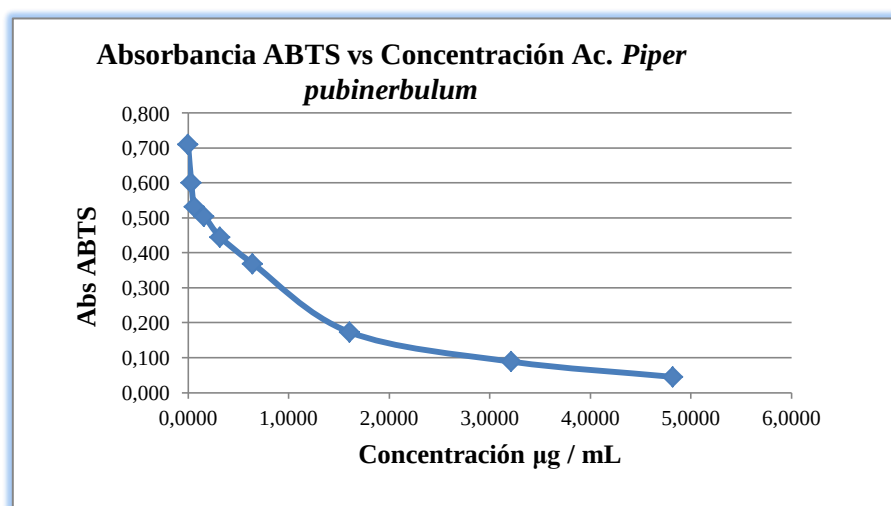
<i>Piper pubinervulum</i>			<i>Thymus vulgaris</i>		
Concentración μg / mL	ABS /media	% de inhibición	Concentración μg / mL	ABS /media	% de inhibición
*0	*0,71	*0	*0	*0,74	*0
0,03	0,6	15,47	0	0,7	4,9
0,06	0,52	25,08	0,01	0,69	6,15
0,16	0,49	28,82	0,02	0,61	17,41
0,32	0,43	37,35	0,03	0,56	23,58
0,64	0,38	48,05	0,06	0,51	30,62
1,61	0,17	75,71	0,15	0,42	43,5
3,22	0,08	87,58	0,31	0,34	53,95
4,83	0,04	93,71	0,46	0,28	62,78

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Nota: el signo * representa a los datos de blanco negativo

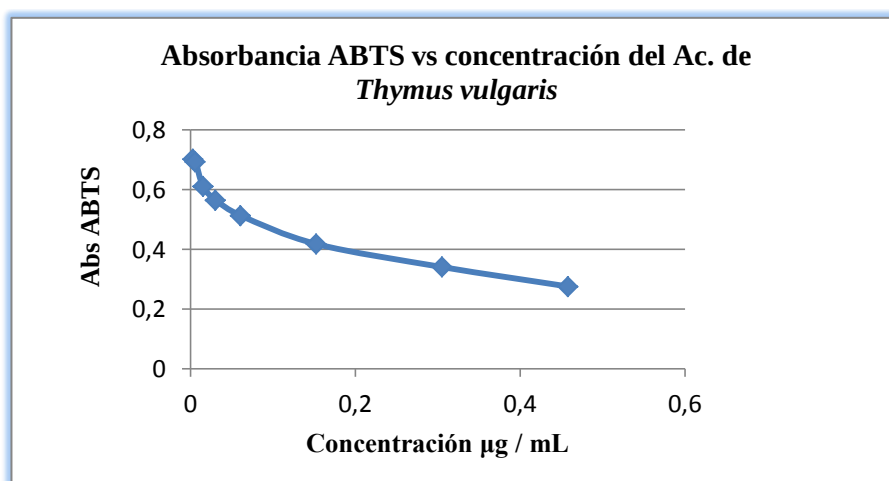
A partir de la Figura 29 y Figura 30 muestran una asociación negativa entre los datos de absorbancia y la concentración de los aceite mostrando una relación inversamente proporcional, es decir que a mayor concentración de los aceites menor es la absorbancia obtenida.

Figura 29. Absorbancia del ABTS vs concentración del aceite esencial de *Piper Pubinervulum*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

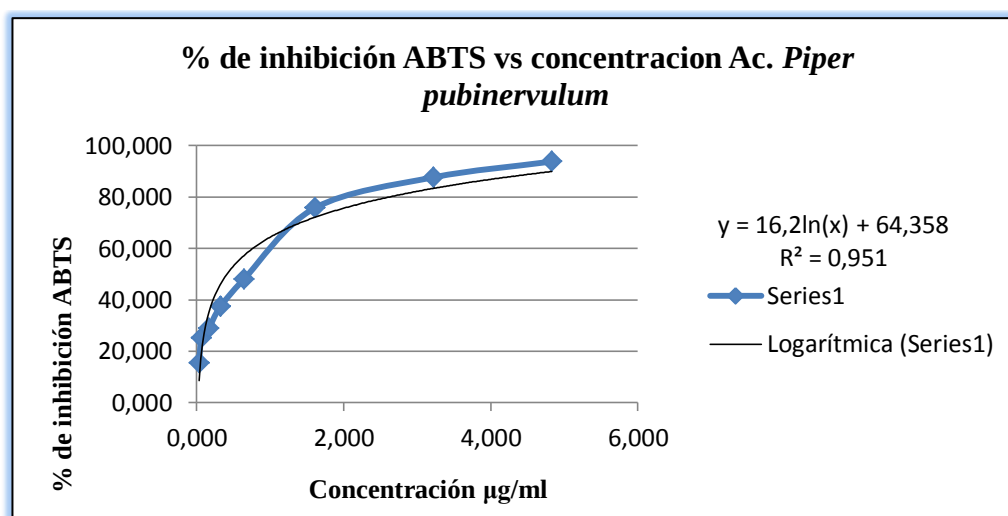
Figura 30. Absorbancia del ABTS vs concentración del aceite esencial de *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

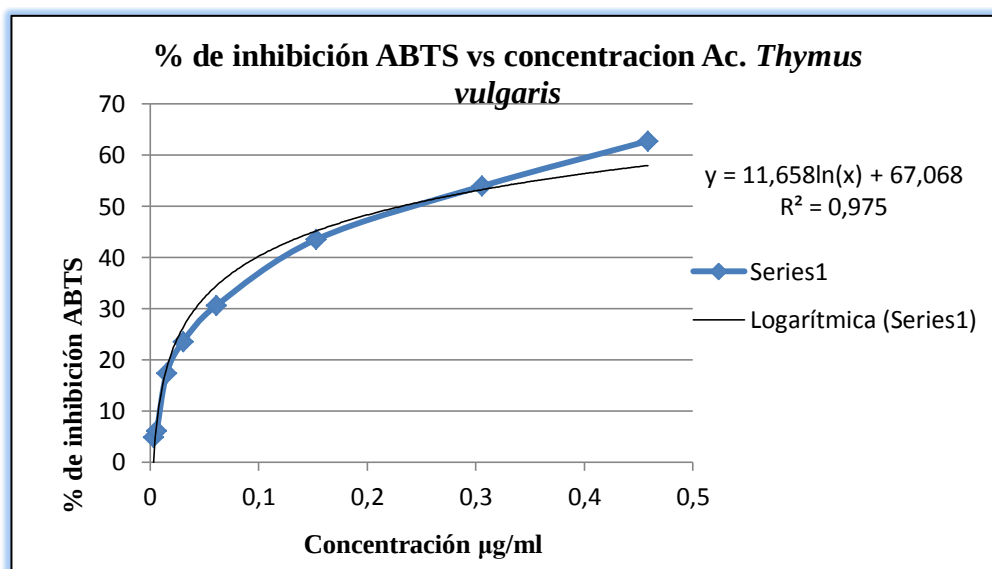
De la Figura 31 y Figura 32, donde se muestran los porcentajes de inhibición versus la concentración del aceite, se obtuvieron las ecuaciones logarítmicas al tener una relación geométrica entre las variables que son necesarias para los cálculos del IC₅₀.

Figura 31. Porcentaje de inhibición del ABTS vs la concentración del aceite del aceite esencial de *Piper Pubinervulum*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 32. Porcentaje de inhibición del ABTS vs la concentración del aceite del aceite esencial de *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Para determinar la actividad antioxidante del método ABTS los resultados se expresan como IC_{50} , el cual se determinó despejando (x) de la ecuación obtenida en la regresión logarítmica y remplazando (y) por 50 correspondiente al 50 % de inhibición del radical DPPH.

De tal manera tenemos que:

Ecuación 5. IC_{50} del aceite de *Piper pubinervulum* del ABTS

$$y = 16,2 \ln(x) + 64,358$$

$$x = e^{\left(\frac{50 - 64,358}{16,2}\right)}$$

$$x = 0,416$$

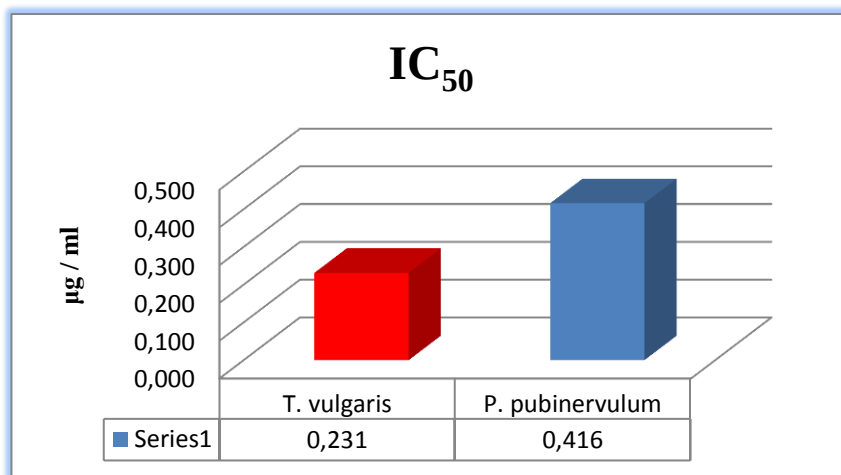
Ecuación 6. IC_{50} del aceite del aceite de *Thymus vulgaris* del ABTS

$$y = 11,658 \ln(x) + 67,068$$

$$x = e^{\left(\frac{50 - 67,068}{11,658}\right)}$$

$$x = 0,231$$

Figura 33. Comparación de la actividad antioxidante del aceite de *Piper pubinervulum* y aceite de *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

En la Figura 33 se indica el IC₅₀ del aceite esencial de *P. pubinervulum* y *T. vulgaris* (blanco positivo) correspondiente a 0,416 µg / mL y 0,231 µg / mL respectivamente, mostrando que el aceite esencial de *P. pubinervulum* tiene una menor actividad antioxidante que el *T. vulgaris*.

4.1.3. Valoración de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método de fotoquimioluminiscencia (PCL).

La Tabla 20 indica el valor de la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* y *Thymus vulgaris* (blanco positivo) correspondiente a 1,8 µmol Trolox / g y 272,0 µmol Trolox / g respectivamente. Presentando el aceite en estudio una capacidad antioxidante menor al timo ya que a mayor valor de µmol Trolox / g de muestra mayor es la capacidad antioxidante.

Tabla 20. Análisis ACL

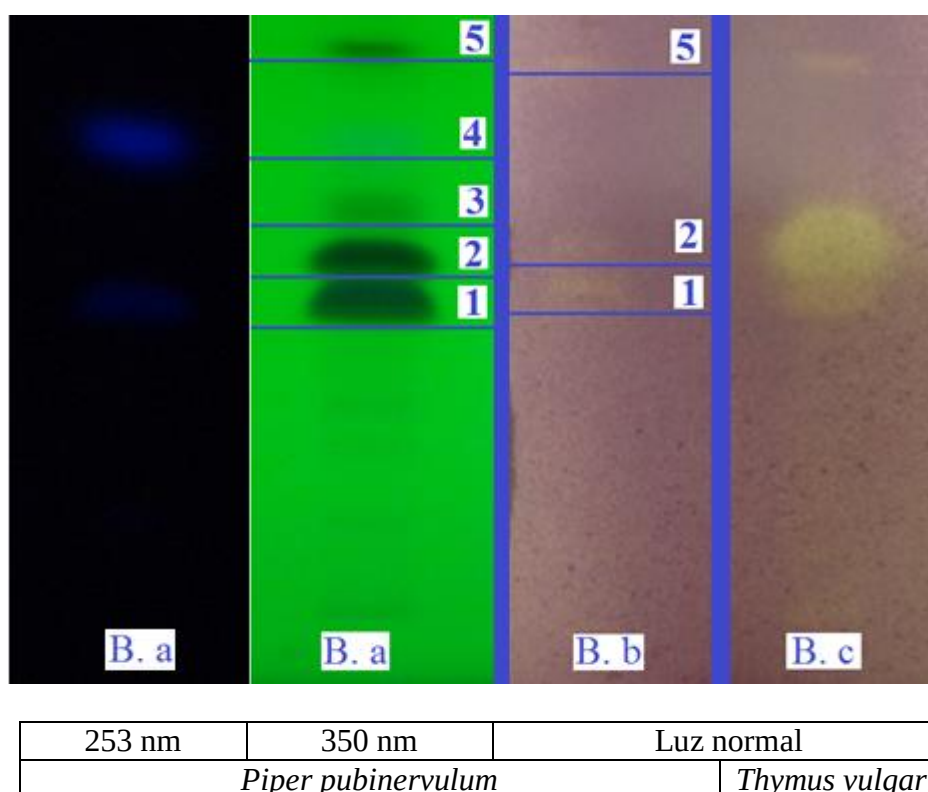
Muestra	µmol Trolox / g
<i>Piper pubinervulum</i>	1,8
<i>Thymus vulgaris</i>	272,0

Fuente: AmbrosiaLab, 2013

4.1.4. Identificación de los compuesto con actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum* mediante el método TLC-DPPH

Con el fin de comprobar y establecer la presencia de fracciones más activas del aceite esencial de *Piper pubinervulum* se realizó el ensayo TLC-DPPH, en la que se observó la decoloración de rojizo - violeta a blanco, encontrando tres áreas ($Rf_5 = 0,98 > Rf_2 = 0,68 > Rf_1 = 0,5$) evidenciando actividad.

Figura 34. TLC-DPPH del aceite esencial de *Piper pubinervulum* y del control positivo *Thymus vulgaris*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Donde: B. a = Aceite de *Piper pubinervulum* (control negativo); B.b = Aceite de *Piper pubinervulum* + revelador DPPH; B. c = Aceite de *Thymus vulgaris* + revelador DPPH (Control positivo).

En la Figura 34, se observa que la banda (a) revelada a 253nm y 350 nm posee cinco Rf correspondientes a la composición del aceite esencial de *P. pubinervulum*, mientras que en la banda (b) con el revelador DPPH se obtuvo tres Rf que

corresponden a los compuestos con actividad antioxidante mencionados en la Tabla 21. La banda (c) representa el control positivo que evidencia la validez del revelador DPPH.

Tabla 21. Rf de las fracciones aisladas con actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper pubinervulum*

<i>Piper pubinervulum</i>	Distancia mm					Frente mm
	1	2	3	4	5	
B. a	42,3	55,6	61,52	69,83	82,1	83,2
B. b	42,3	55,6	-	-	82,1	83,2
Rf	0,5	0,66	0,73	0,83	0,98	

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

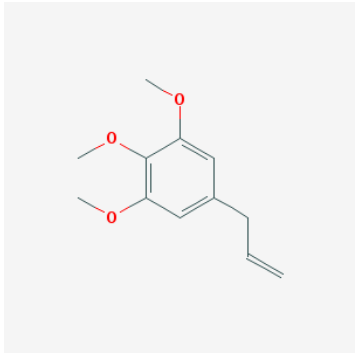
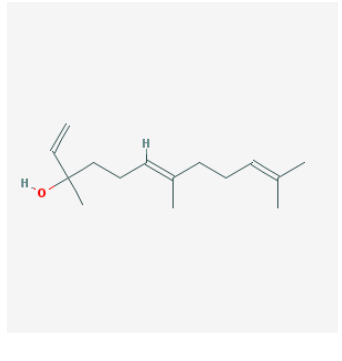
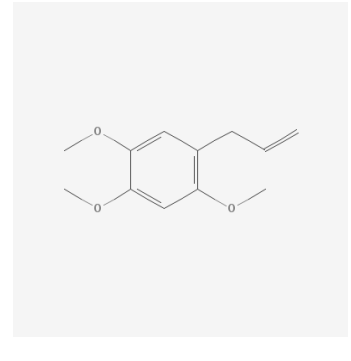
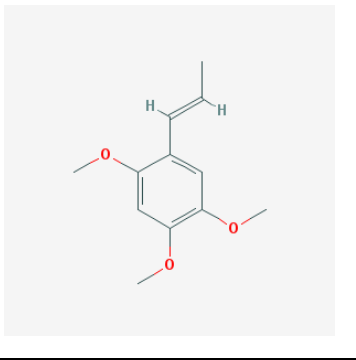
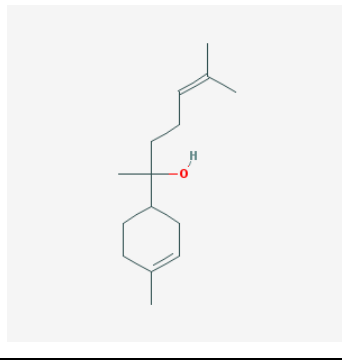
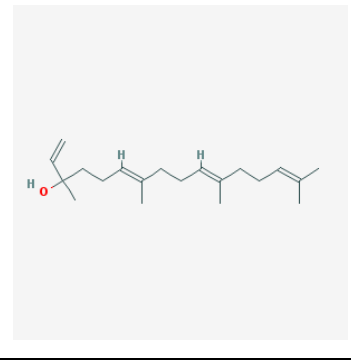
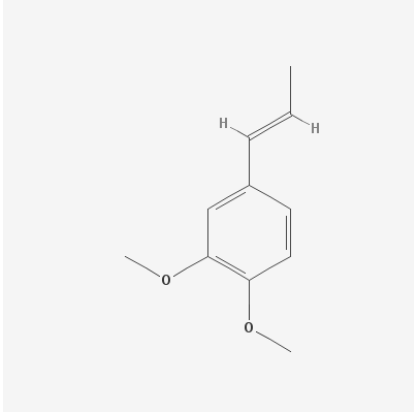
Donde: B. a = Aceite de *Piper pubinervulum* (control negativo), B.b = Aceite de *Piper pubinervulum* + revelador DPPH, Rf = frente de referencia.

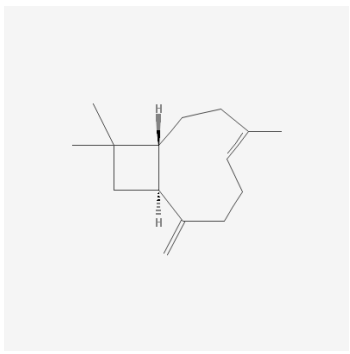
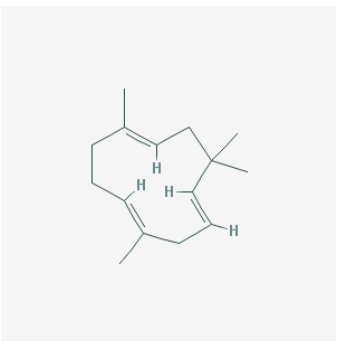
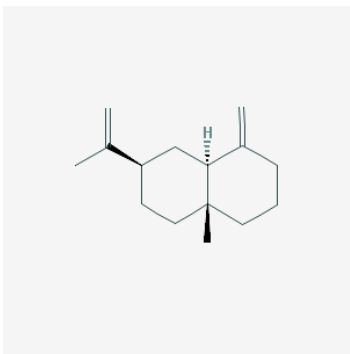
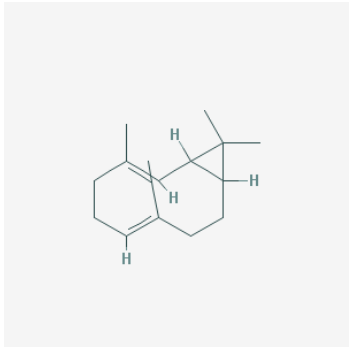
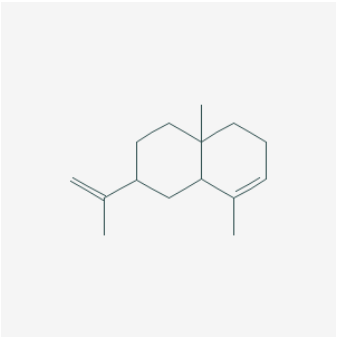
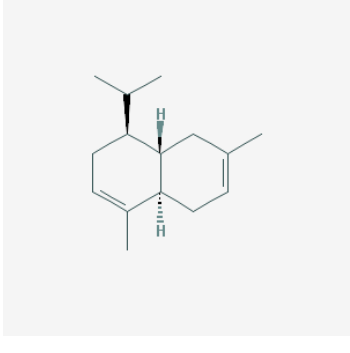
Nota: el signo – representa fracciones sin actividad antioxidante.

La actividad antioxidante del aceite de *P. pubinervulum* depende de la localización de las zonas decoloradas, en este caso la identificación de los compuestos activos están determinados por los $Rf_5 = 0,98 > Rf_2 = 0,68 > Rf_1 = 0,5$ de acuerdo a la investigación de Piedra & Coronel (2014) los compuestos para cada uno de estos son:

- Rf_1 : Elemicin, (E)-nerolidol, gamma-assaron, assarone e, dimethoxy 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, bisabolol $\langle\alpha\rangle$, geranyl linalool
- Rf_2 : Isoeugenol metil éter
- Rf_5 : β -cariophyllene, humulene $\langle\alpha\rangle$, β -selinene, bicyclogermacrene, alpha-bulsene, 7-epi-.alpha.-selinene, delta cadinene.

Tabla 22. Estructura de los compuestos con actividad antioxidante

Compuestos responsables de actividad antioxidante de Rf 1		
Molécula de Elemicin	Molécula de Nerolidol (E)	Molécula de Gamma-asarona
		
Molécula de Asarone (E)	Molécula de alpha-Bisabolol	Molécula de Geranyl linalol
		
Compuesto responsable de actividad antioxidante de Rf 2		
Molécula de iso-eugenol metil éter		
		

Compuestos responsables de actividad antioxidante de Rf 5		
Molécula de β cariofileno	Molécula de Humulene	Molécula de delta-Selinene
		
Molécula de Bicyclogermacrene	Molécula de 7-epi.-alpha.-Selinene	Molécula de beta-Cadinene
		

Fuente: (National Center for Biotechnology Information)

De los compuestos activos para $Rf_5 = 0,98 > Rf_2 = 0,68 > Rf_1 = 0,5$ se puede determinar según Murillo, García, & Carrasquero, (2013) que por la presencia de dobles enlaces y grupos funcionales OH que presentan sus estructuras, poseen capacidad antioxidante.

En estudios de actividad antioxidante realizados por Delgado & Cuca (2007), Morais et al. (2007) y Guerrini et al. (2009) han sido mencionados previamente en la composición química de los aceites del género Piper, los compuestos elemicin, linalool, isoeugenol, beta cariofileno, alpha humuleno y delta- cadineno, que al compararlos con nuestra investigación podemos sugerir que son los responsables de esta actividad.

Tabla 23. Bandas con actividad antioxidante del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

<i>Thymus vulgaris</i>	Distancia mm				Frente mm
	1	2	3	4	
Medida de las bandas	48,7	56,6	70,8	82.1	83,2
B. c = Ac. Tomillo + DPPH (Blanco positivo)	48,7	56,6	-	82.1	83,2
Rf	0,58	0,68	0,85	0,98	

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Nota: el signo – representa fracciones sin actividad antioxidante.

La actividad antioxidante del aceite de *Thymus vulgaris* depende de la localización de las zonas decoloradas, en este caso la identificación de los compuestos activos está determinado por los $Rf_4 = 0,98 > Rf_2 = 0,68 > Rf_1 = 0,58$ de la Tabla 23 y los compuestos por los que está conformado el aceite se expresa en la Tabla 24, atribuyendo su actividad antioxidante al timol, *p*-cimeno, γ -terpineno y acetato de bornilo – carvacrol según (Acevedo, Castañeda, Blanco, Cardenas, Reyes, & Kouznetsov, 2007).

Tabla 24. Componentes mayoritarios del aceite esencial de *T. vulgaris* detectados por cromatografía de gases

Nombre	%	Índice de Retención (Adams, 2011)	Tiempo de retención (minutos)
p cimeno	24.81	1020	13.91
alfa terpineno	6.62	1054	16.50
Linalool	1.19	1095	20.44
Timol	32.62	1289	42.22
Carvacrol	0.78	1298	43.07
trans cariofileno	4.37	1417	51.32
óxido de cariofileno	2.51	1582	57.50
1,2- ácido dicarboxibenzenico (2-etil hexil) mono ester	9.21	No reportado	76.08

Fuente: (Escobar, Molina, & Zapata, 2013)

4.2. Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Piper pubinervulum* C. DC

Para determinar la actividad antimicrobiana se seleccionó la técnica de difusión con discos en agar para obtener los diámetros de halos de inhibición en bacterias y levaduras, además se realizó la bioautografía para determinar los compuestos con actividad antimicrobiana.

4.2.1. Actividad antibacteriana por el método de difusión con discos en agar

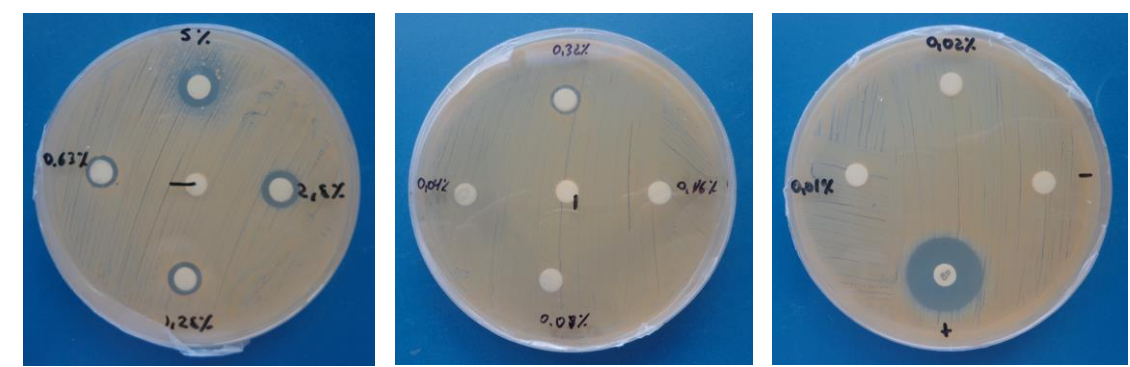
Tabla 25. Diámetro de los halos obtenidos en mm de las concentraciones de aceite esencial de *Piper pubinervulum* C. DC de bacterias gram positivas

Bacterias	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> ATCC* 6538P™*					<i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
48,25	9,4	8,7	8,6	10,2	10,1	9	8,7	-	8,4	9
24,13	8,7	8,2	-	9,4	9,1	8,2	7,5	7,5	7,8	8,6
12,06	8,7	-	8,9	8,9	8,1	8,1	6,9	7,4	6,5	7,6
6,08	8,2	8,2	8,1	8,2	8,3	6,5	6,6	6,6	6,6	6,6
3,09	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	6,2	6,3	6	6	6
1,54	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,77	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,39	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,19	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

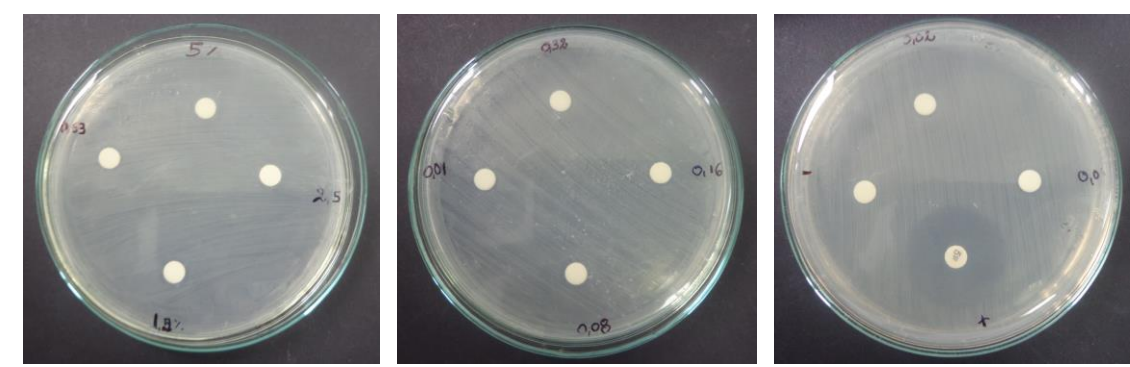
Nota: el signo – representa que son datos descartables ya que según la técnica se necesitan 4 repeticiones mínimas con halos medibles.

Figura 35. *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* ATCC* 6538P™*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 36. *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Tabla 26. Diámetro de los halos obtenidos en mm de los blancos positivos y negativos de las bacterias gram positivas

	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i> ATCC* 6538P™*					<i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Gentamicina +	20	19,5	19,5	20,3	19,8	27	27,9	27,9	27,2	27,2
DMSO -	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Tabla 27. Diámetro de los halos de inhibición obtenidos en mm de las concentraciones de aceite esencial de *Piper pubinervulum* C. DC en bacterias gram negativas.

Bacterias	<i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739 TM					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027 TM				
Concentración mg / mL	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
48,25	8	8,1	8,7	8,3	8,1	8,8	7,9	8,8	8	-
24,13	7,5	7,6	7,5	7,9	7,6	7,7	8	7,5	7,7	7,5
12,06	7,1	7	6,8	7	7,3	6	6	6	6	6
6,08	6,8	6,7	6,5	6,6	6,7	6	6	6	6	6
3,09	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
1,54	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,77	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,39	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,19	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

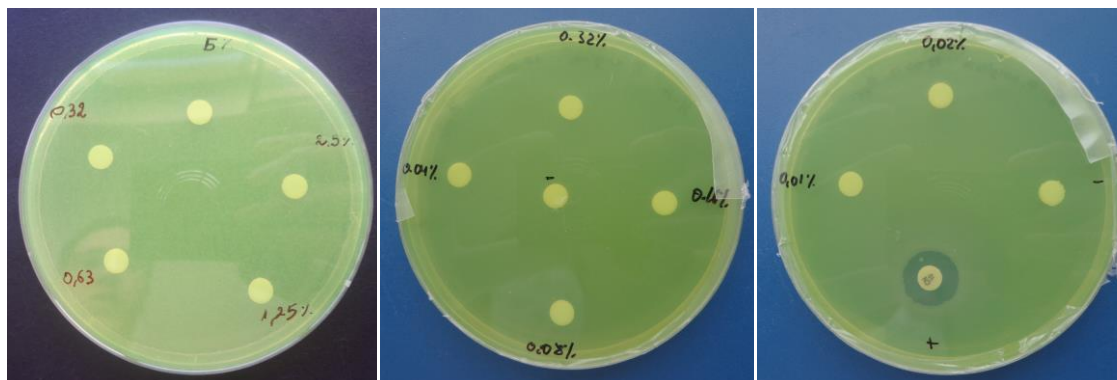
Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 37. *Escherichia coli* ATCC* 8739TM



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 38. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 9027™



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Tabla 28. Diámetro de los halos obtenidos en mm de los blancos positivos y negativos de las bacterias gram negativas

	<i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739™					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027™				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Gentamicina +	14	14,9	14,7	14,6	14,5	-	16,9	17,2	18,8	18,4
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Nota: el signo – representa que son datos descartables ya que según la técnica se necesitan 4 repeticiones mínimas con halos medibles.

Tabla 29. Promedio del diámetro de los halos obtenidos en mm del blanco positivo natural (*Thymus vulgaris*)

Concentración mg / mL	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
48,25	11,25	8,97	9,70	11,43
24,13	9,95	8,27	9,10	9,75
12,06	9,28	8,13	7,58	8,70
6,08	8,93	7,67	7,33	8,18

3,09	8,53	7,43	6,68	6
1,54	7,58	6,60	6,45	6
0,77	6	6	6,33	6
0,39	6	6	6,28	6
0,19	6	6	6	6
0,10	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

4.2.1.1. Análisis de varianza de dos vías del aceite esencial de *Piper pubinervulum* C. DC bacterias

Para el análisis de varianza de dos vías se ingresaron el promedio de los datos obtenidos hasta la concentración de 1,54 mg / mL ya que a concentraciones menores a 0,77 mg / mL existe resistencia de los microorganismos.

Tabla 30. Promedio del diámetro (mm) de los halos de inhibición de bacterias gram positivas y gram negativas

Concentración mg / mL	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
48,25	9,4	8,66	8,24	8,375
24,13	8,6	7,92	7,62	7,68
12,06	8,48	7,3	7,04	6
6,08	8,2	6,58	6,66	6
3,09	8,1	6	6	6
1,54	6	6	6	6
0,77	6	6	6	6
0,39	6	6	6	6
0,19	6	6	6	6
0,10	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Tabla 31. Análisis de varianza de dos vías con Statistix 8.0

Analysis of Variance Table for DATOS

Source	DF	SS	MS	F	P
CONCENTRA	5	18.9539	3.79078	18.30	0.0000
BACTERIAS	3	7.3773	2.45910	11.87	0.0003
Error	15	3.1077	0.20718		
Total	23	29.4389			

Grand Mean 7.2023 CV 6.32

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	0.00181	0.00181	0.01	0.9292
Remainder	14	3.10589	0.22185		

En la prueba de análisis de varianza de dos vías se calculó el (F) que es igual a 18,30 para las concentraciones del aceite de *P. pubinervulum* y 11,87 para las bacterias.

En el caso de las concentraciones debido a que el valor tabulado de (F) es menor al valor calculado de (F) ($2,90 < 18,30$) con un alfa de 0,05, se acepta la hipótesis alternativa en la que al menos una de las concentraciones del aceite esencial de *P. pubinervulum* presenta promedios de halo de inhibición diferente de los demás.

Para las bacterias debido a que el valor tabulado de (F) es menor al valor calculado de (F) ($3,29 < 11,87$) con un alfa de 0.05, se acepta la hipótesis alternativa en la que al menos una bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) experimental presenta promedios de halo de inhibición diferente de los demás.

Para establecer si hay una o varias concentraciones diferentes a las demás y desempeño biológico diferente, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se comparan los promedios de todos los pares posibles (Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test), uno para concentraciones y otro para bacterias.

Tabla 32. Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test de datos para concentración

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of DATOS for CONCENTRA

CONCENTRA	Mean	Homogeneous Groups
C1	8.6687	A
C2	7.9550	AB
C3	7.2050	BC
C4	6.8600	CD
C5	6.5250	CD
C6	6.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3219
 Critical Q Value 4.595 Critical Value for Comparison 1.0457
 Error term used: CONCENTRA*BACTERIAS, 15 DF
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Donde: C1 = 48,25 mg / mL; C2 = 24,13 mg / mL; C3 = 12,06 mg / mL; C4 = 6,08 mg / mL; C5 = 3,09 mg / mL; C6 = 1,54 mg / mL

De acuerdo a la Tabla 32 existen cuatro grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí y donde la concentración (C6) es el punto de quiebre de los datos al no existir inhibición y la concentración (C1) es la que presenta mayor inhibición.

Estos grupos son:

- Grupo A: 48,25 mg / mL y 24,13 mg / mL
- Grupo B: 24,13 mg / mL y 12,06 mg / mL
- Grupo C: 12,06 mg / mL, 6,08 mg / mL y 3,09 mg / mL
- Grupo D: 6,08 mg / mL, 6,08 mg / mL, 3,09 mg / mL y 1,54 mg / mL

La concentración que sobresale de los grupos que se formaron es de 24,13 mg / mL al no tener diferencia estadísticamente significativa con la concentración de 48, 25 mg / mL. Por lo que se asume que a esta concentración presenta los mejores halos de inhibición.

Tabla 33. Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test de datos para bacterias

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of DATOS for BACTERIAS

BACTERIAS	Mean	Homogeneous Groups
S aureus	8.1300	A
S mutans	7.0767	B
E coli	6.9267	B
P aerugino	6.6758	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2628
Critical Q Value 4.077 Critical Value for Comparison 0.7575
Error term used: CONCENTRA*BACTERIAS, 15 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

De acuerdo a la Tabla 33 existen dos grupos de bacterias, cada uno estadísticamente afín entre sí, siendo estos:

- Grupo A: *S. aureus*
- Grupo B: *S. mutans*, *E. coli* y *P.aeruginosa*

El microorganismo que sobresale de los dos grupos que se formaron es *S. aureus* al tener el rango superior de 8,13 frente a los demás. *S. aureus* se caracterizó por tener el halo de inhibición de mayor diámetro (9.4 mm) y el único con actividad en la concentración de (3,09 mg / mL) por lo que es el microorganismo más sensible de las bacterias utilizadas.

4.2.1.2. Concentración mínima inhibitoria

Al haber determinado el comportamiento de las concentraciones del aceite con las bacterias mediante el análisis estadístico, se obtuvo MIC de cada una de las bacterias.

Tabla 34. Concentración mínima inhibitoria en bacterias expresada en mg / mL

BACTERIA	<i>Piper pubinervulum</i> C. DC
Bacterias Gram -	
<i>Escherichia coli</i> ATCC* 8739 TM	6,08 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC* 9027 TM	24,13 mg/mL
Bacterias Gram +	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC* 6538P ^{TM*}	3,09 mg/mL
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175 TM	6,08 mg/mL

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

De acuerdo a la Tabla 34 el microorganismo más sensible dentro del grupo de las bacterias gram negativas es *E. coli* al presentar actividad en la concentración de 6,08 mg / mL y de las gram positivas es *S. aureus* en una concentración de 3,09 mg / mL; a la vez que este mismo microorganismo es el más sensible de todas las bacterias utilizadas ya comprobado estadísticamente. Sin embargo el microorganismo con menor sensibilidad es *P. aeruginosa* al presentar una actividad hasta la concentración de 24,13 mg / mL que es una de las más altas concentraciones.

4.2.2. Actividad antimicótica por el método de difusión con discos en agar

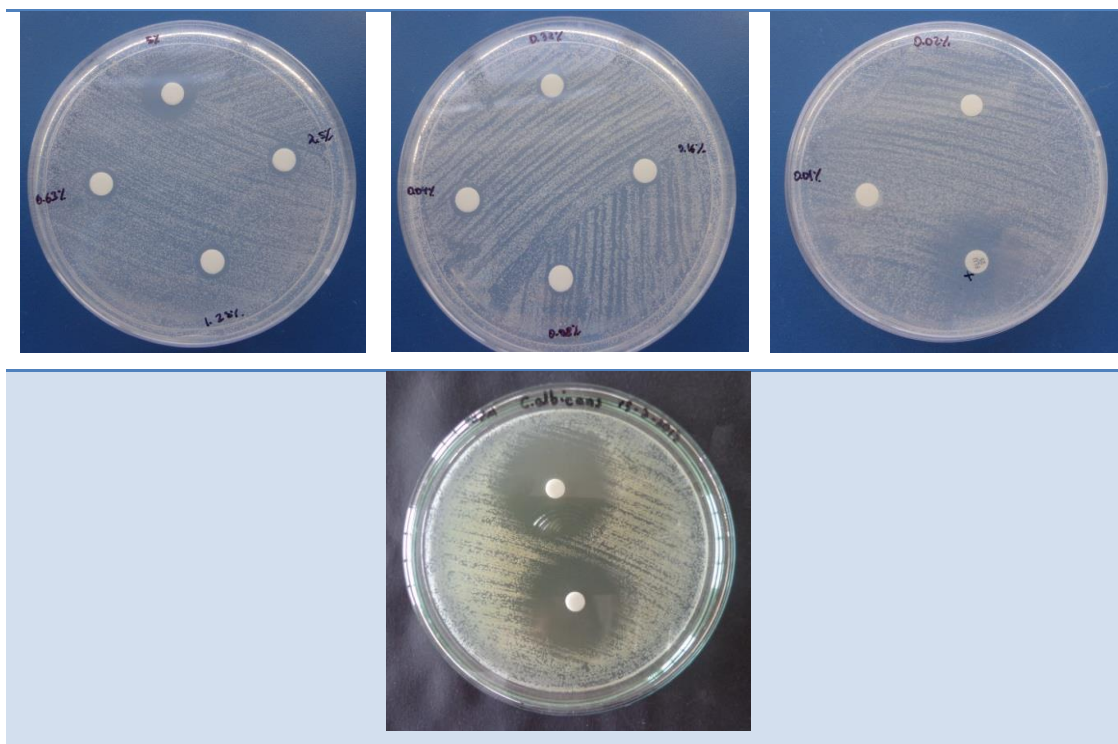
Tabla 35. Diámetro de los halos obtenidos en mm de las concentraciones de aceite esencial de *Piper pubinervulum* C. DC de levaduras

Levaduras	<i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*					<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
48,25	10,4	10,6	10,5	10,9	10,8	10,2	10,2	10,1	10	-
24,13	-	9,8	9,6	9,5	9,8	9,8	9,5	9,3	9,4	9,6
12,06	8,6	9,2	9,2	9,2	9,5	9,5	9,1	8,9	-	9,3
6,08	8,4	8,9	9	8,9	9	9,2	8,7	8,5	8,5	8,8
3,09	8,8	8,6	-	8,7	8,7	8,4	8,4	8,3	8,3	8,6
1,54	8,4	8,4	8,4	8,5	8,3	8,2	8,1	8	8,1	8,1
0,77	8	8,1	8,1	8,2	8	8	-	8	7,6	8
0,39	6	6	6	6	6	8	8	8	7,1	7,8
0,19	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

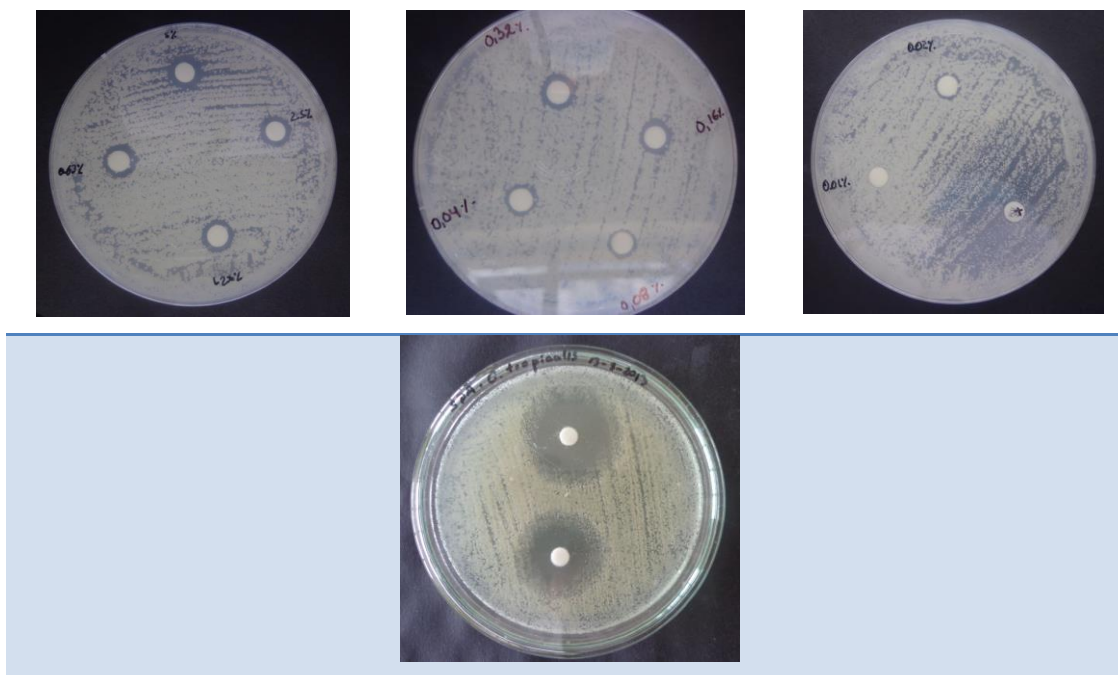
Nota: el signo – representa que son datos descartables ya que según la técnica se necesitan 4 repeticiones mínimas con halos medibles.

Figura 39. *Candida tropicalis* ATCC® 13803™*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Figura 40. *Candida albicans* ATCC® 10231™*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Tabla 36. Diámetro de los halos obtenidos en mm de los blancos positivos y negativos de las bacterias gram negativas

	<i>Candida albicans</i> ATCC® <i>10231</i> ^{TM*}					<i>Candida tropicalis</i> ATCC® <i>13803</i> ^{TM*}				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Isoconazol	28,2	28	28,5	28,2	28,4	20,8	20	20	21	20,8
DMSO -	6	6	6	6	6	-	6	6	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Nota: el signo – representa que son datos descartables ya que según la técnica se necesitan 4 repeticiones mínimas con halos medibles.

Tabla 37. Promedio del diámetro de los halos obtenidos en mm del blanco positivo natural (*Thymus vulgaris*)

Concentración mg / mL	<i>Candida tropicalis</i> ATCC® <i>13803</i> ^{TM*}	<i>Candida albicans</i> ATCC® <i>10231</i> ^{TM*}
48,25	13,03	10,95
24,13	10,23	9,90
12,06	9,35	9,43
6,08	8,80	9,08
3,09	8,50	8,83
1,54	8,30	8,45
0,77	8,25	8,25
0,39	6	8,05
0,19	6	6
0,1	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

4.2.2.1. Análisis de varianza de dos vías del aceite esencial de *Piper pubinervulum* C. DC

Tabla 38. Promedio del diámetro (mm) de los halos de inhibición de levaduras del aceite esencial de *P. puvinervulum*

Concentración mg / ml	<i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*	<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*
48,25	10,64	10,1
24,13	9,54	9,52
12,06	9,14	9,16
6,08	8,84	8,74
3,09	8,68	8,4
1,54	8,4	8,1
0,77	8,08	7,92
0,39	6	7,78
0,19	6	6
0,1	6	6

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Para el análisis de varianza de dos vías se ingresaron los promedios de los datos obtenidos hasta la concentración de 0,19 mg / mL porque es el punto de quiebre de la actividad inhibitoria. La concentración de 0,10 mg / mL no presenta formación de halos de inhibición por lo que no ingresa en el análisis estadístico.

Tabla 39. Análisis de varianza de dos vías con Statistix 8.0

Analysis of Variance Table for DATOS

Source	DF	SS	MS	F	P
LEVADURAS	1	0.0089	0.00889	0.04	0.8484
CONCENTRA	8	28.2278	3.52847	15.48	0.0004
Error	8	1.8235	0.22794		
Total	17	30.0602			

Grand Mean 8.3911 CV 5.69

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	0.49152	0.49152	2.58	0.1520
Remainder	7	1.33199	0.19028		

En la prueba de análisis de varianza de dos vías se calculó el valor de (F) que es igual a 0,04 para levaduras y 15,48 para las concentraciones del aceite de *P. pubinervulum*.

Para las levaduras debido a que el valor tabulado de (F) es mayor al valor calculado de (F) ($5,32 > 0,04$) con un alfa de 0,05, se acepta la hipótesis nula en la que ninguna de las levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) experimentales presentan un desempeño biológico diferente, porque los promedios de los halos de inhibición son similares.

Para las concentraciones a causa de que el valor tabulado de (F) es menor al valor calculado de (F) ($3,29 < 15,48$) con un alfa de 0,05, se acepta la hipótesis alternativa en la que al menos una de las concentraciones de aceite de *Piper pubinervulum* presenta actividad antimicótica diferente de los demás.

Para la determinación de los diferentes grupos significativos se realizó una prueba *a posteriori* en la que se comparan los promedios de todos los pares posibles de las concentraciones del aceite esencial de *Piper pubinervulum*.

Tabla 40. Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test de datos para concentración

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of DATOS for CONCENTRA

CONCENTRA	Mean	Homogeneous Groups
C1	10.370	A
C2	9.530	AB
C3	9.150	AB
C4	8.790	ABC
C5	8.540	ABC
C6	8.250	BC
C7	8.000	BC
C8	6.890	CD
C9	6.000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4774
Critical Q Value 5.767 Critical Value for Comparison 1.9469
Error term used: CONCENTRA*LEVADURAS, 8 DF
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Donde: C1 = 48,25 mg / mL; C2 = 24,13 mg / mL; C3 = 12,06 mg / mL; C4 = 6,08 mg / mL; C5 = 3,09 mg / mL; C6 = 1,54 mg / mL; C7 = 0,77 mg / mL; C8 = 0,39 mg / mL; C9 = 0,19 mg / mL.

De acuerdo a la Tabla 40 existen cuatro grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí y donde la concentración (C9) es el punto de quiebre de los datos al no existir inhibición y la concentración (C1) es la que presenta mayor halo de inhibición. Los grupos formados son:

- Grupo A: 48,25 mg / mL, 24,13 mg / mL, 12,06 mg / mL, 6,08 mg / mL y 3,09 mg / mL
- Grupo B: 24,13 mg / mL, 12,06 mg / mL, 6,08 mg / mL, 3,09 mg / mL, 1,54 mg / mL y 0,77 mg / mL
- Grupo C: 6,08 mg / mL, 3,09 mg / mL, 1,54 mg / mL, 0,77 mg / mL y 0,39 mg / mL
- Grupo D: 0,39 mg / mL y 0,19 mg / mL

La concentración de 48,25 mg / mL presentó mayor actividad con un diámetro de inhibición superior al tener una mayor rango de 10,37, mientras que la concentración más baja en la que existió actividad antimicótica es la de 0,39 mg / mL sobre *C. albicans* con un halo de 7,78 mm.

4.2.2.2. Concentración mínima inhibitoria

Una vez ya aceptadas las hipótesis se determinó la concentración mínima inhibitoria de las levaduras.

Tabla 41. Concentración mínima inhibitoria de levaduras expresada en mg / mL

Levaduras	<i>Piper pubinervulum</i> C. DC
Aceite esencial	
<i>Candida tropicalis</i> ATCC® 13803™*	0,77 mg / mL
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™*	0,39 mg / mL

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Como se indica en la Tabla 41 la levadura más sensible al aceite de *P. pubinervulum* es *C. albicans* al mostrar actividad a una concentración de 0,39 mg / mL.

4.2.3. Identificación de los compuesto con actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper pubinervulum*.

En esta investigación no se tomó en cuenta el porcentaje de composición de cada uno de los compuestos del aceite esencial porque de acuerdo a Laura Herrera, (2011), la explicación de la actividad biológica de los AE en muchas ocasiones pareciera estar definida por un componente mayoritario, sin embargo, los estudios han establecido que el efecto de un AE es el resultado de la actividad de sus componentes.

Los resultados de actividad antibacteriana por el método de bioautografía puede detectar al compuesto responsable de la actividad biológica y se observa a simple vista la zona de inhibición por tener una coloración blanquecina a diferencia de los compuestos no activos que mantienen una coloración rojiza-violeta.

4.2.3.1. Bioautografía (TLC) de *Escherichia coli* ATCC* 8739™

Del aceite esencial de *P. pubinervulum*, se observan tres Rf ($Rf_5 = 0,98 > Rf_2 = 0,68 > Rf_1 = 0,5$) que poseen compuestos con actividad antibacteriana descritos en la Tabla 42, el blanco negativo presenta una coloración rojiza-violeta, mientras que el blanco positivo presenta una zona de inhibición con decoloración detallado en la Tabla 43.

Tabla 42. Localización de la zona de inhibición de *Escherichia coli* en la placas TLC con el aceite esencial de *Piper pubinervulum*

Rep 1	Distancia mm					Frent	Rep 2	Distancia mm					Frent
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
B. a	48,2	58,1	-	-	85,5	87	B. a	42,3	55,6	-	-	82,1	83,2
B. b	-	58,1	-	-	85,5	87	B. b	42,3	55,6	-	-	82,1	83,2
B. c	-	-	-	-	-	87	B. c	-	-	-	-	-	83,2
Rf	0,55	0,66	-	-	0,98		Rf	0,5	0,66	-	-	0,98	-

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Donde: B. a = Banda con 20 µL de muestra, B. b = Banda con 10 µL de muestra, B. c = Banda con 5 µL de muestra, Rep = repetición, Frent = Frente de eluyente, Rf = frente de referencia.

Nota: el signo – representa que son datos no medidos por no existir una decoloración.

Tabla 43. Localización de zona de inhibición de blanco positivo (*Thymus vulgaris*)

REP 1	Distancia mm	Frent	REP 2	Distancia mm	Frent
1B. d	49,7	87	B. d	48,8	83,2
Rf	0,571		Rf	0,58	

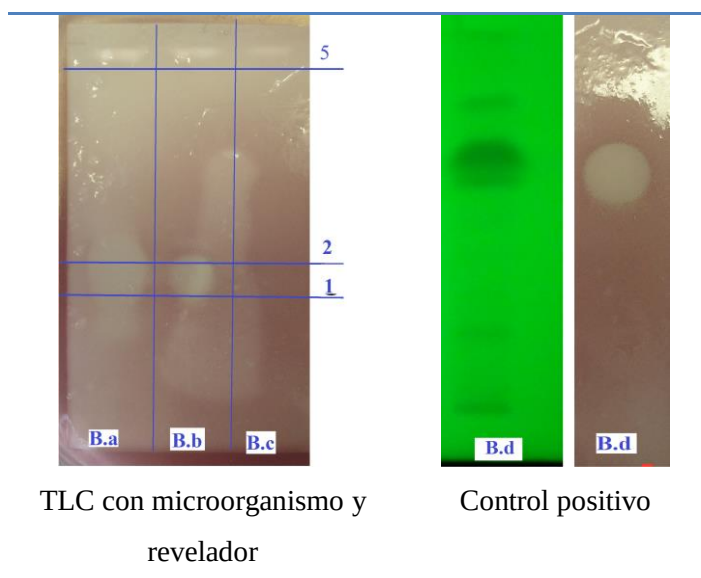
Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Donde: B. d = Banda con 10 µL, Frent = Frente de eluyente, Rf = frente de referencia,

Se obtuvo los compuestos que poseen actividad antibacteriana con sus respectivos Rf de acuerdo a la investigación realizada por Piedra & Coronel (2014):

- Rf₁: Elemicin, (E)-nerolidol, gamma-assaron, assarone e, dimethoxy 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, bisabolol α y geranyl linalool
 - Rf₂: Isoeugenol metil éter
 - Rf₅: Beta-Caryophyllene, alpha-Humulene, beta-Selinene, Bicyclogermacrene, alpha-Bulsenene, 7-epi-alpha-selinene, delta-Cadinene
- 1989 095812366

Figura 41. Bioautografía (TLC) de *Escherichia coli*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

4.2.3.2. Bioautografía (TLC) de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* ATCC* 6538P™*

Los Rf obtenidos se detallan en la

Tabla 44, el blanco negativo presenta una coloración rojiza-violeta, mientras que el blanco positivo presenta una sola zona de inhibición que se detalla en la Tabla 45.

Tabla 44. Localización de la zona de inhibición de *Staphylococcus aureus*

Rep 1	Distancia mm					Frent	Rep 2	Distancia mm					Frent
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	2	
B. a	49,1	-	-	-	84,8	86,4	B. a	49,1	-	-	-	86,4	88,4
B. b	49,1	-	-	-	84,8	88,4	B. b	49,1	-	-	-	86,4	88,4
B. c	-	-	-	-	-	88,4	B. c	-	-	-	-	86,4	88,4
Rf	0,55	-	-	-	0,98	-	Rf	0,55	-	-	-	0,98	-

Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Donde: B. a = Banda con 20 µL de muestra, B. b = Banda con 10 µL de muestra, B. c = Banda con 5 µL de muestra, Rep = repetición, Frent = Frente de eluyente, Rf = frente de referencia

Nota: el signo – representa que son datos no medidos por no existir una decoloración.

Tabla 45. Localización de zona de inhibición del blanco positivo (*Thymus vulgaris*)

M.1	Distancia mm	Frente	M. 2	Distancia mm	Frente
B. d	48,9	86,4	B. d	49,9	88,4
Rf	0,565		Rf	0,564	

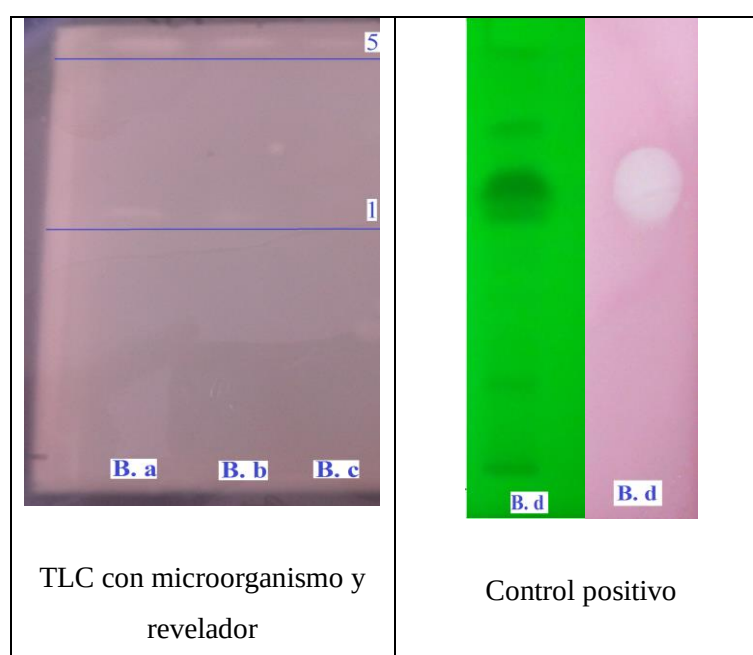
Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

Donde: B. d = Banda con 10 µL, Frent = Frente de eluyente, Rf = frente de referencia

En la inhibición con *S. aureus* los compuestos activos se determinaron con los Rf obtenidos que son:

- Rf1: Elemicin, (E)-nerolidol, gamma-assaron, assarone e, dimethoxy 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, bisabolol α , geranyl linalool
- Rf5: Beta-Caryophyllene, alpha-Humulene, (+)-beta-Selinene, Bicyclogermacrene, (-)-alpha-Bulsenene, (-)-7-epi-alpha-selinene, (-)-delta-Cadinene

Figura 42. Bioautografía (TLC) de *Staphylococcus aureus*



Fuente: Juan Abad y Diana Cabezas

En el estudio realizado por Herrera, (2011), el beta-cariofileno, eugenol y linalol estudiados como moléculas aisladas presentan alta bioactividad, que concuerdan con los resultados obtenidos en este ensayo.

En estudios realizados por Pino, Méndez & Stashenko, (2009) y Heredia *et al.*, (2011) con resultados positivos de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales pertenecientes a la familia Piperaceae, tienen compuestos como: γ -cadineno, beta-selineno, α -humuleno y beta-cariofileno similares al de esta investigación, por lo que se sugiere que son los compuestos responsables de la bioactividad de estos aceites.

La actividad biológica del aceite esencial del timo está relacionada con sus principales componentes, denominados timol y carvacrol. El timol tiene efectos antibacterianos, antifúngicos y antihelmínticos. En cuanto al carvacrol ha sido estudiado por sus efectos bactericidas. Todos estos efectos del aceite esencial del tomillo fueron demostradas por diversos estudios como Higes y Llorente (1996), Daferera *et al.* (2000), Bagamboula *et al.* (2004), Novacosk y Torres (2006), Soković *et al.* (2009) y Centeno *et al.* (2010) citados por Aspurz, (2011).

CONCLUSIONES

- De acuerdo a los datos del IC₅₀ obtenidos mediante los métodos DPPH y ABTS del aceite esencial de *Piper pubinervulum* y al existir una relación inversamente proporcional, se concluye que el aceite esencial evaluado presentó una baja actividad captadora del radical DPPH y ABTS (20,399 µg / mL) y (0,416 µg / mL) respectivamente, en comparación con el aceite esencial de *T. vulgaris* (0,414 µg / mL) y (0,231 µg / mL) respectivamente.
- Además mediante el método de fotoquimioluminiscencia se concluyó que el aceite esencial de *P. pubinervulum* presenta una menor actividad antioxidante que el aceite esencial de *T. vulgaris* ($1,8 < 272,0$ µmol trolox / g), por lo tanto no presenta una actividad antioxidante significativa.
- El ensayo de TLC- DPPH evidenció que el aceite de *P. pubinervulum* contiene al menos tres sustancias responsables de la actividad antioxidante de acuerdo a los R_f calculados.
- Mediante la técnica de antibiograma se comprobó que el aceite esencial de *Piper pubinervulum* posee actividad antimicrobiana frente a las cepas de estudio en concentraciones desde 24,13 mg / mL, siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria más sensible al presentar un halo de inhibición en la concentración de 3,09 mg / mL y *Candida albicans* la levadura más sensible al presentar un halo de inhibición en la concentración 0,39 mg / mL, presentando actividad antimicótica significativa.
- Mediante el método TLC – DPPH y de Bioautografía antibacteriana se determinaron los compuestos que poseen la actividad antibacteriana y antioxidante, entre ellos están: Beta-Caryophyllene, alpha-Humulene, (+)-beta-Selinene, Bicyclogermacrene, (-)-alpha-Bulsenene, (-)-7-epi-alpha-selinene, (-)-delta-Cadinene, Elemicin, (E)-nerolidol, gamma-assaron, assarone e, dimethoxy 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, bisabolol <α>, geranyl linalool.

RECOMENDACIONES

- Evaluar otras partes de la planta para determinar si presentan mayor actividad antimicrobiana y antioxidante, además de comparar la cantidad de concentración de los compuestos activos.
- Aislar los compuestos que presentaron actividad antibacteriana para continuar con estudios citotóxicos y futuras aplicaciones medicinales.
- El aceite esencial de *Piper pubinervulum* presenta buena actividad antimicótica por lo que se debería continuar la investigaciones con otros microorganismos para trabajar en alternativas como formulación de fitofármacos.

LISTA DE REFERENCIAS

- Acevedo, A., Castañeda, M., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J., & Kouznetsov, V. y. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol *Scientia et Techn. Scientia et Technica*, 33, 125-128.
- AmbrosiaLab. (2013). *Determinazione della capacita' antiossidante mediante fotochemiluminescenza (PCL)*. Universidad de Ferrara, Ferrara.
- Ankuash, E. (2013). Tecnólogo en Biotecnología de los RRNN. (I. Coronel, Entrevistador)
- Aspurz, J. (2011). Obtencion de curvas de secado de tomillo (*Thymus vulgaris*), Tesis UPNA Facultad de Industrias Agrarias y Alimentarias. Brasil.
- Berkhout, R. (2002). *Candida albicans*. *Iberoam Micol* , 25-26.
- Bodero, M. (2010). Recuperado el 6 de septiembre de 2012, de <http://dspace.esPOCH.edu.ec>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, 28, 25-30.
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93, 223-226.
- Castro, S. (2006). *Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de Isertia laevis empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos*. Recuperado el 24 de Septiembre de 2013, de <http://www.javeriana.edu.co>
- Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., & Potterat, O. (1998). Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med*, 64, 393 - 396.
- Coronel, I., & Piedra, S. (2014). Estudio de las propiedades físicas y composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Peperomia inaequalifolia*

- Ruiz y Pav. y Piper pubinervulum C. DC., y del rizoma de Renealmia thyrsoides subsp. thyrsoides. *Tesis de pregrado no publicada. UPS, Quito, Ecuador.*
- De la Rosa, L., Alvarez, E., & González, G. (2010). *Fruit and Vegetable Phytochemicals, Chemistry nutritional value and stability* (Vol. 1). New Delhi, India: Blackwell Publishing.
- Delgado, W., & Cuca, L. (2007). Composición química del aceite esencial de los frutos de Piper hispidum Kunth. *Productos Naturales*, 5-8.
- Ecured. (Agosto de 2013). *Pseudomona Aeruginosa (Bacilo Piocianico)*. Recuperado el 6 de Septiembre de 2013, de http://www.ecured.cu/index.php/Pseudomona_aeruginosa
- Escobar, A., Molina, C., & Zapata, G. (2013). Comparación de la actividad acaricida entre Ocimum basilicum, Coriandrum sativum y Thymus vulgaris contra el ácaro Tetranychus urticae. *Tesis de posgrado. UPS, Quito, Ecuador.*
- Figuerola, P. (Enero de 2008). Efecto de uso de productos dentales que contienen xilitol durante ocho semanas en UFC de estreptococos del grupo mutans en saliva de niños y del Patronato Municipal “San Pedro de Riobamba”. Quito, Ecuador.
- Foti, M., & Ingold, F. (2003). Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2758-2763.
- Gamazo, C., López-Goñi, I., & Díaz, R. (2005). Manual Práctico de Microbiología. Barcelona: Masson.
- Granados, C., Yáñez, X., & Santafé Patiño, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de Calycolpus moritzianus y Minthostachys mollis de Norte de Santander. *Bistua*, 12-23.
- GreenFacts. (2012). *Efectos de los biocidas en la resistencia a los antibióticos*. Recuperado el 20 de Enero de 2012, de <http://www.greenfacts.org>

- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., y otros. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ toxicol pharmacol*, 38-48.
- Gutiérrez, D., Ortiz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología*, (págs. 1-5). Santiago de Querétaro, México.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1998). *Free radicals in Biology and Medicine* (Tercera ed.). Oxford: Oxford Science Publications.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant Defense Mechanisms: From The Beginning To The End (of the beginning). *Free Radic Res*(31), 61-72.
- Heredia, S., Paulo, L., Estivaleti, T., Días, B., Vataru, C., & Souza, A. (2011). Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1001–1006.
- Herrera, L. (2011). Evaluación de la actividad de componentes de aceites esenciales de plantas colombianas frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. Tesis de masterado. Universidad Industrial de Santander.
- ICTAN. (2013). Recuperado el 15 de Diciembre de 2013, de <http://www.ictan.csic.es/>
- Kuskoski, E., Asueroro, A., Troncoso, A., Garcia-Parilla, M. C., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Bras. Ciênc. Tecnol. Alim*, 24, 691-693.
- Lewin, G., & Popov, I. (1994). Photochemiluminescent detection of antiradical activity III: a simple assay of ascorbate in blood plasma. *J Biochem Biophys Methods*, 28, 277-282.
- Lima, R., Cardoso, M., Andrade, M., Guimaraes, P., Bastidas, L., & Nelson, D. (2011). Bactericidal and antioxidant activity of essential oils. *Springer*, 523-528.

- López, L., & Torres, C. (2006). *Determinación de la actividad antimicrobiana*. Recuperado el 20 de Enero de 2013, de <http://www.biologia.edu.ar>
- Madigan, M. M. (1999). *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Prentice Hall Iberia.
- Maldonado, M., & Dacarro, C. (2007). Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, y evaluación de su actividad biológica. *La Granja*, 6, 17-24.
- Microbiologics. (7 de Mayo de 2009). *Microorganisms for Education*. Recuperado el 8 de Febrero de 2012
- Microbiologics. (2010). *Illustrates instructions*. Recuperado el 10 de Febreo de 2013, de <http://microbiologics.com/Support-Center/Illustrated-Instructions>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Montoya, M. (2012). *Las cepas ATCC. Herramienta indispensable en el control de Calidad Interno en Microbiología*. Recuperado el 18 de febrero de 2013, de <http://www.google.com.ec>
- Morais, S., Facundo, V., Medeiros, L., Barreira, E., & Anjos, J. (2007). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochem*, 670-675.
- Morrison, C. (26 de marzo de 2013). *Plant caterpillar parasitoid*. Recuperado el 26 de Septiembre de 2013, de <http://caterpillars.lifedesks.org>
- Murillo, J., García, L., & Carrasquero, A. (1 de Diciembre de 2013). Aplicación de la quimioluminiscencia luminol – perborato- Co (II) para la enseñanza de las relaciones estructura – reactividad en las moléculas orgánicas. *PARADIGMA*, XXXIV(2), 93 - 108.

National Center for Biotechnology Information, U. (s.f.). *NCBI*. Recuperado el 18 de 01 de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Padilla, F., Rincón, A., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 14-15.

Padrón Marquez, B. (Diciembre de 2010). *Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2013, de http://eprints.uanl.mx/2710/1/tesis_doctorado_BPM.pdf

Pérez, L. (Abril de 2005). Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del noreste de México con actividad contra cepas *Streptococcus pneumoniae*. *Tesis de doctorado no publicado*. UANL, Nuevo León, México.

Pérez, R., García, R., Martínez, M., & Soto, M. (enero-junio de 2006). Actividad citotóxica y antioxidante de *Petiveria alliacea* L. (U. A. Chapingo, Ed.) *Chapingo*, vol. 12(número 001).

Pino, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del genero *Piper*. *Revista Institucional Universidad Tecnológica Del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 67-75.

Pino, N., Melendez, E., & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Redalib*, 301-304.

Popov, I., & Lewin, G. (1996). Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. *J Biochem Biophys Methods*, 31, 1-8.

Prior, L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Agricultural Food Chemistry*, 76, 245-256.

- Puertas, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., & Winterhalter, P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare*) essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 380-392.
- Ríos, M. (2008). Plantas útiles del Ecuador: uso y abuso. En R. d. M. Ríos, *Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador: saberes y prácticas* (págs. 7-27). Quito, Ecuador: IEPI y ABYA-YALA.
- Salinas, M. A. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 89-101.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, T., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís) (CENSA). *Protección: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria*.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int*, 8(3), 121-137.
- Seija, V. (2000). *Staphylococcus aureus*. Recuperado el 23 de Mayo de 2013, de Bacteriología y virología: <http://www.higiene.edu.uy>
- Shikov, A., Ivanova, S., Pozharotskaya, O., & Makarov, V. (2011). *Free radical scavenging activity of sea urchins pigments by HPTLC - DPPH• method. International Symposium for TLC*. Recuperado el 1 de Octubre de 2013, de <http://www.hptlc.com>
- The University of Adelaide. (9 de Mayo de 2013). *Candida tropicalis*. Recuperado el 16 de agosto de 2013, de <http://www.mycology.adelaide.edu.au>
- Vargas Chávez, N., Treviño, A., & Soto Sarellano, R. (16 de Diciembre de 2011). *Universidad Juárez de Estado de Durango*. Recuperado el 18 de Julio de 2013, de Microbiología.
- Velazquez, L. (23 de Octubre de 2008). *Sreptococcus mutans*. Recuperado el 7 de Agosto de 2013, de <http://www.slideshare.net>

Vertuani, S., Braccioli, E., Buzzoni, V., & Manfredini, S. (2002). Antioxidant capacity of *Adansonia digitata* fruit pulp and leaves. *Acta Phytotherapeutica*, 26, 654-666.

Vizcaína, C. (13 de Marzo de 2012). *Escherichia coli*, características generales , taxonomía y cepas virulentas. Recuperado el 13 de Julio de 2013, de <http://www.unlugarecologico.com>

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC* 6538P™*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-138 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2013/12 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2012/2/8	
Performance			
Macroscopic Features:		Medium:	
Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.		SBAP	
Microscopic Features:		Method:	
Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.		Gram Stain (1)	
Vitek GP (1)		Other Features/ Challenges: Results	
Phenotypic Features	Results	(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive	
D-AMYGDALIN	-	(1) Coagulase (rabbit plasma-tube): positive	
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	(1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative	
D-XYLOSE	-		
ARGININE DIHYDROLASE 1	+		
BETA-GALACTOSIDASE	-		
ALPHA-GLUCOSIDASE	-		
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-		
CYCLODEXTRIN	-		
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-		
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-		
ALPHA-MANNOSIDASE	-		
PHOSPHATASE	+		
Leucine ARYLAMIDASE	-		
L-Proline ARYLAMIDASE	-		
BETA GLUCURONIDASE	-		
ALPHA-GALACTOSIDASE	-		
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+		
BETA-GLUCORONIDASE	-		
Alanine ARYLAMIDASE	-		
Tyrosine ARYLAMIDASE	-		
D-Sorbitol	-		
UREASE	-		
POLYIMXIN B RESISTANCE	+		
D-GALACTOSE	+		
D-RIBOSE	-		
L-LACTATE alkalization	+		
LACTOSE	+		
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+		
D-MALTOSE	-		
BACITRACIN RESISTANCE	+		
NOVOBIOCIN RESISTANCE	+		
GROWTH IN 6.5% NaCl	+		
D-MANNITOL	+		
D-MANNOSE	+		
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	-		
PULLULAN	-		
D-RAFFINOSE	-		
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+		
SALICIN	-		
SACCHAROSE/SUCROSE	+		
D-TREHALOSE	+		
ARGININE DIHYDROLASE 2	+		
OPTOCHIN RESISTANCE	+		

Anexo 2. Certificado de análisis de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-19 Reference Number: ATCC® 25175™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2014/09 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2012/12/5																																																																																								
Performance																																																																																										
Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.		Medium: SBAP																																																																																								
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains		Method: Gram Stain (1)																																																																																								
Vitek GP (1) <table border="1"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td>+</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 1</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Pyruoydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCORONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>POLYMIXIN B RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td>-</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td>+</td></tr> <tr><td>PULLULAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RAFFINOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>+</td></tr> <tr><td>SALICIN</td><td>+</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 2</td><td>-</td></tr> <tr><td>OPTOCHIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> </tbody> </table>		Phenotypic Features	Results	D-AMYGDALIN	+	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	D-XYLOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE 1	-	BETA-GALACTOSIDASE	+	ALPHA-GLUCOSIDASE	+	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	CYCLODEXTRIN	-	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-	ALPHA-MANNOSIDASE	-	PHOSPHATASE	-	Leucine ARYLAMIDASE	+	L-Proline ARYLAMIDASE	-	BETA GLUCURONIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	+	L-Pyruoydonyl-ARYLAMIDASE	-	BETA-GLUCORONIDASE	-	Alanine ARYLAMIDASE	+	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	D-SORBITOL	+	UREASE	-	POLYMIXIN B RESISTANCE	+	D-GALACTOSE	+	D-RIBOSE	-	L-LACTATE alkalization	-	LACTOSE	+	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	D-MALTOSE	+	BACITRACIN RESISTANCE	+	NOVOBIOCIN RESISTANCE	+	GROWTH IN 6.5% NaCl	-	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+	PULLULAN	-	D-RAFFINOSE	+	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	SALICIN	+	SACCHAROSE/SUCROSE	+	D-TREHALOSE	+	ARGININE DIHYDROLASE 2	-	OPTOCHIN RESISTANCE	+	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative
Phenotypic Features	Results																																																																																									
D-AMYGDALIN	+																																																																																									
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-																																																																																									
D-XYLOSE	-																																																																																									
ARGININE DIHYDROLASE 1	-																																																																																									
BETA-GALACTOSIDASE	+																																																																																									
ALPHA-GLUCOSIDASE	+																																																																																									
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																									
CYCLODEXTRIN	-																																																																																									
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-																																																																																									
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-																																																																																									
ALPHA-MANNOSIDASE	-																																																																																									
PHOSPHATASE	-																																																																																									
Leucine ARYLAMIDASE	+																																																																																									
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																																									
BETA GLUCURONIDASE	-																																																																																									
ALPHA-GALACTOSIDASE	+																																																																																									
L-Pyruoydonyl-ARYLAMIDASE	-																																																																																									
BETA-GLUCORONIDASE	-																																																																																									
Alanine ARYLAMIDASE	+																																																																																									
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																																									
D-SORBITOL	+																																																																																									
UREASE	-																																																																																									
POLYMIXIN B RESISTANCE	+																																																																																									
D-GALACTOSE	+																																																																																									
D-RIBOSE	-																																																																																									
L-LACTATE alkalization	-																																																																																									
LACTOSE	+																																																																																									
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+																																																																																									
D-MALTOSE	+																																																																																									
BACITRACIN RESISTANCE	+																																																																																									
NOVOBIOCIN RESISTANCE	+																																																																																									
GROWTH IN 6.5% NaCl	-																																																																																									
D-MANNITOL	+																																																																																									
D-MANNOSE	+																																																																																									
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+																																																																																									
PULLULAN	-																																																																																									
D-RAFFINOSE	+																																																																																									
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+																																																																																									
SALICIN	+																																																																																									
SACCHAROSE/SUCROSE	+																																																																																									
D-TREHALOSE	+																																																																																									
ARGININE DIHYDROLASE 2	-																																																																																									
OPTOCHIN RESISTANCE	+																																																																																									



Brad Goskowicz, President
AUTHORIZED SIGNATURE

Microbiologics®

Vitek GN (1)					
Phenotypic Features		Results			
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-				
ADONITOL	-				
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-				
L-ARABITOL	-				
D-CELLOBIOSE	-				
BETA-GALACTOSIDASE	+				
H ₂ S PRODUCTION	-				
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-				
Glutaryl Arylamidase pNA	-				
D-GLUCOSE	+				
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-				
FERMENTATION/GLUCOSE	+				
BETA-GLUCOSIDASE	+				
D-MALTOSE	+				
D-MANNITOL	+				
D-MANNOSE	+				
BETA-XYLOSIDASE	-				
BETA-Alanine arylamidase pNA	-				
L-Proline ARYLA MIDASE	-				
LIPASE	-				
PALATINOSE	-				
Tyrosine ARYLA MIDASE	+				
UREASE	-				
D-SORBITOL	+				
SACCHAROSE/SUCROSE	-				
D-TAGATOSE	-				
D-TREHALOSE	+				
CITRATE (SODIUM)	-				
MALONATE	-				
5-KETO-D-GLUCONATE	-				
L-LACTATE alkalization	+				
ALPHA-GLUCOSIDASE	+				
SUCCINATE alkalization	+				
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-				
ALPHA-GALACTOSIDASE	+				
PHOSPHATASE	+				
Glycine ARYLA MIDASE	-				
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-				
LYSINE DECARBOXYLASE	+				
L-HISTIDINE assimilation	-				
COURMARATE	+				
BETA-GLUCURONIDASE	+				
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+				
Glu-Gly-Arg-ARYLA MIDASE	-				
L-MALATE assimilation	+				
ELLMAN	+				
L-LACTATE assimilation	-				

Microbiologics®

Specifications Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-262 Reference Number: ATCC® 9027™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2014/03 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2012/5/2	
Performance			
Macroscopic Features:		Medium:	
Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen. A second colony type may also be present as small, round, shiny colonies.		SBAP	
Microscopic Features:		Method:	
Straight or slightly curved gram negative rod.		Gram Stain (1)	
Vitek GN (1)		Other Features/ Challenges: Results	
Phenotypic Features	Results		
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	(1) Oxidase(Kovacs); positive	
ADONITOL	-	(1) Motility B Medium: positive	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	Pseudomonas P Agar: positive (blue-green color diffusing into the agar)	
L-ARABITOL	-	Growth at 42 C: positive	
D-CELLOBIOSE	-		
BETA-GALACTOSIDASE	-		
H2S PRODUCTION	-		
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-		
Glutaryl Arylamidase pNA	-		
D-GLUCOSE	+		
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+		
FERMENTATION/GLUCOSE	-		
BETA-GLUCOSIDASE	-		
D-MALTOSE	-		
D-MANNITOL	+		
D-MANNOSE	+		
BETA-XYLOSIDASE	-		
BETA-Alanine arylamidase pNA	+		
L-Proline ARYLAMIDASE	+		
LIPASE	-		
PALATINOSE	-		
Tyrosine ARYLAMIDASE	+		
UREASE	-		
D-SORBITOL	-		
SACCHAROSE/SUCROSE	-		
D-TAGATOSE	-		
D-TREHALOSE	-		
CITRATE (SODIUM)	+		
MALONATE	+		
5-KETO-D-GLUCONATE	-		
L-LACTATE alkalization	+		
ALPHA-GLUCOSIDASE	-		
SUCCINATE alkalization	+		
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-		
ALPHA-GALACTOSIDASE	-		
PHOSPHATASE	+		
Glycine ARYLAMIDASE	+		
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-		
LYSINE DECARBOXYLASE	-		
L-HISTIDINE assimilation	-		
COURMARATE	+		
BETA-GLUCORONIDASE	-		
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+		
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	+		
L-MALATE assimilation	+		
ELLMAN	-		
L-LACTATE assimilation	+		
		 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE	

Anexo 5. Certificado de análisis de *Candida albicans* ATCC® 10231™*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

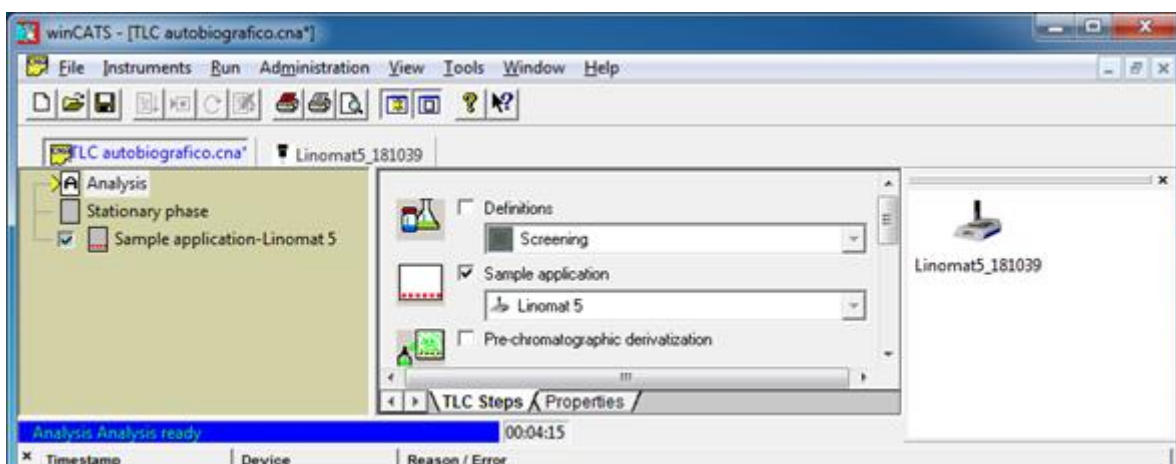
[illegible]

Microbiologics®

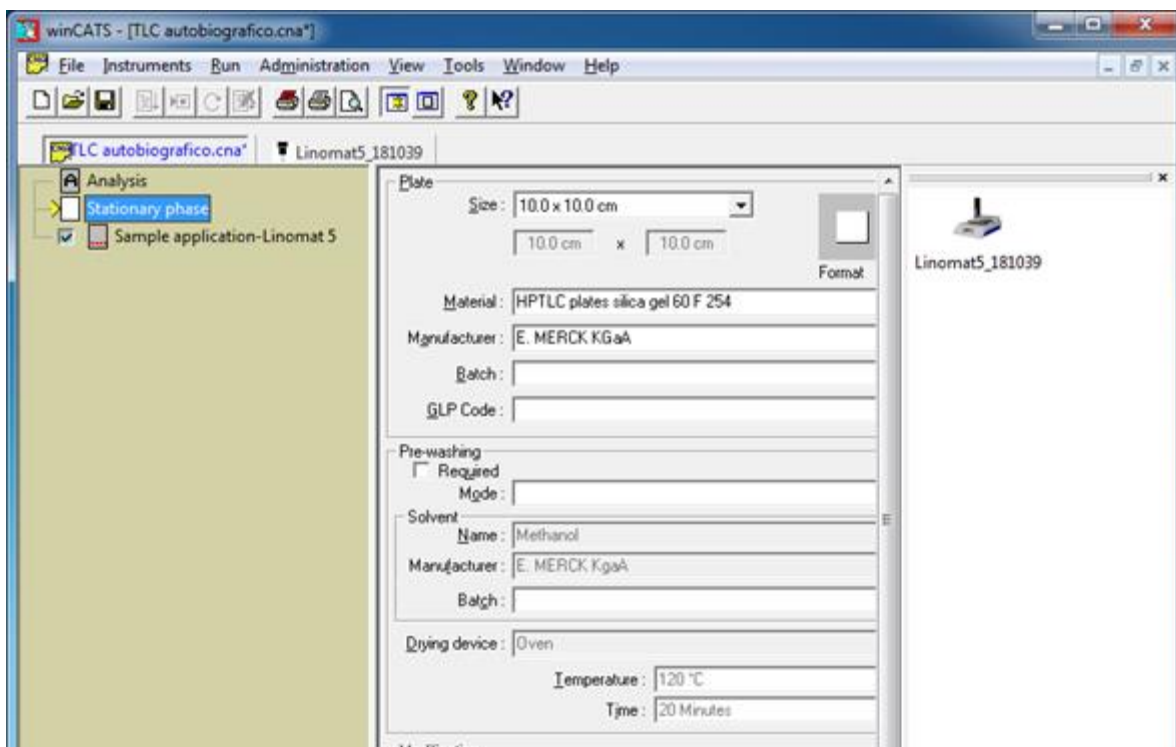
[illegible]

Anexo 7. Pasos para preparar las placas de TLC en el equipo CAMAG Linomat 5 utilizando el software winCATS.

- File
New: (Poner un nombre)
Description: (Poner una descripción)
Dar click sobre el botón OK
- Seleccionar con el cursores la opción Sample application.

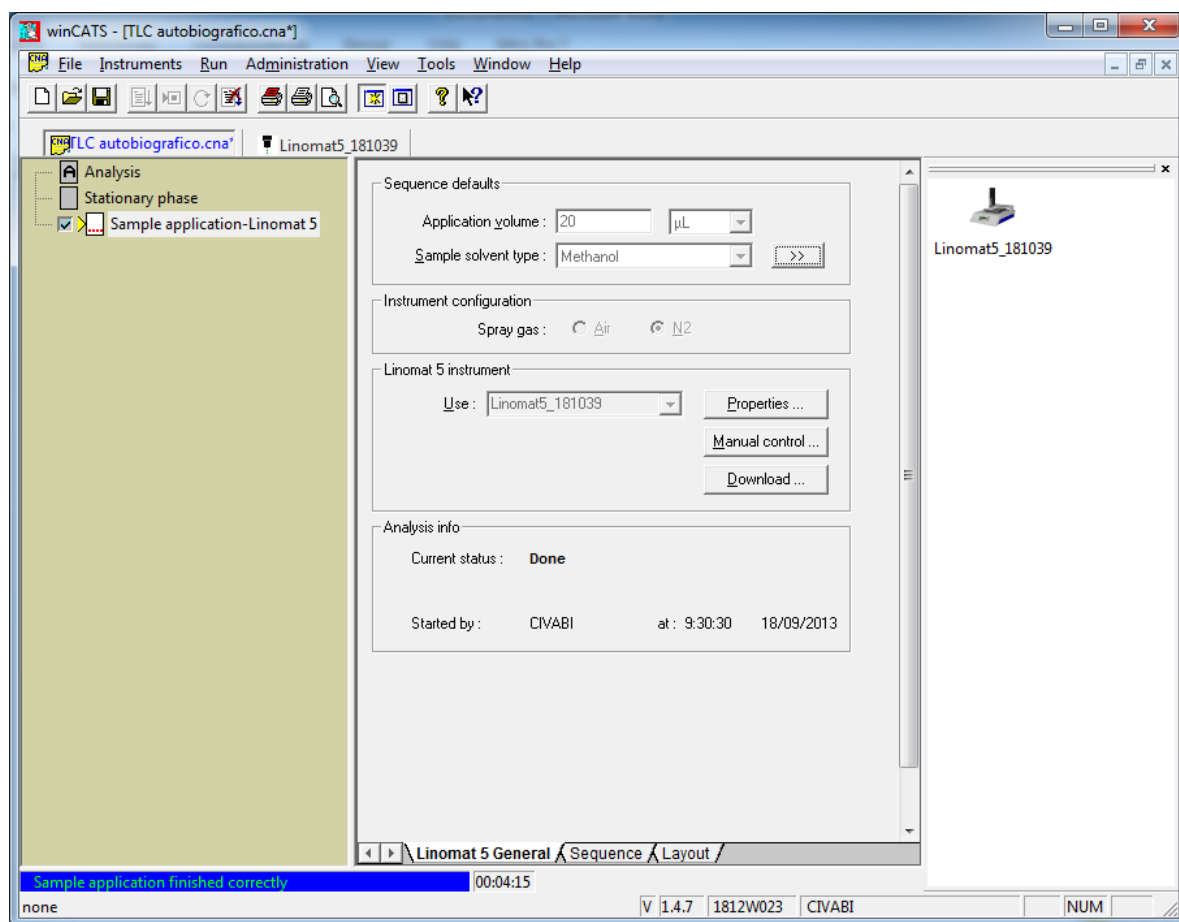


- Seleccionar la opción Stationary Phase .
Aquí definir los parámetros: Size: 10.0 x 10.0 cm



- Seleccionar la opción Sample application - Linomat 5
Aquí definir los parámetros:

Application volumen: 20ul
Sample solvent type: Methanol
Spray gas: N2



- Seleccionar la opción Sequence
Aquí definir los parámetros:

Syringe size: 100ul

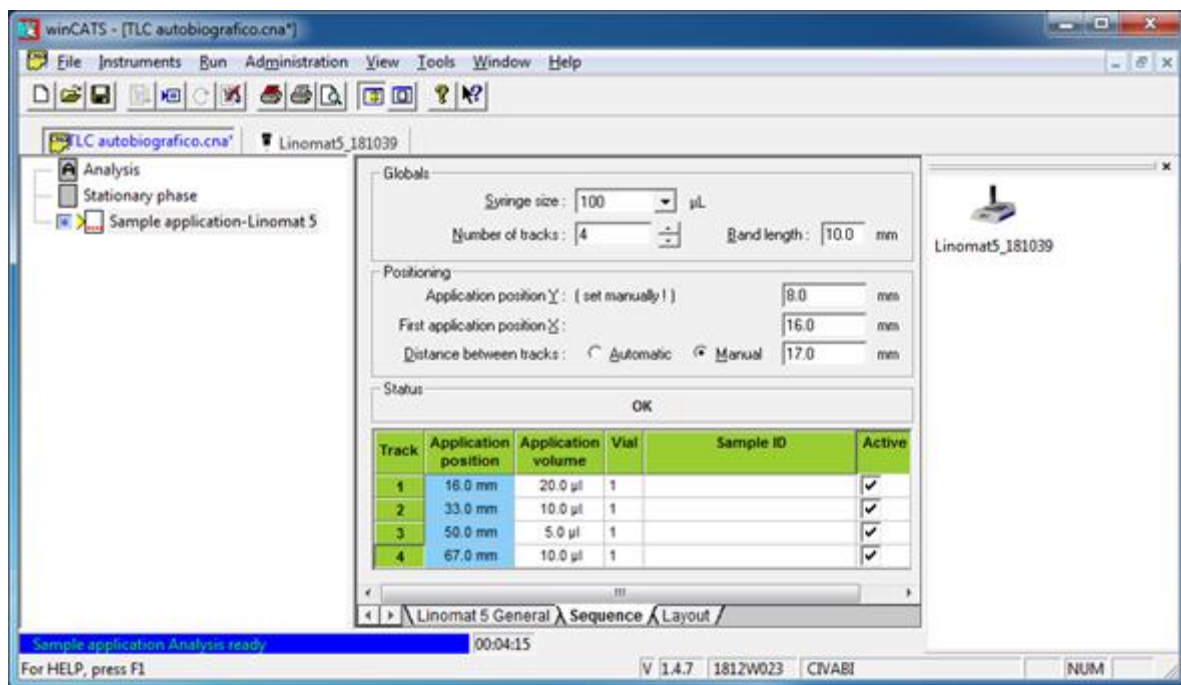
Number of tracks: 4

Band length: 10.0 mm

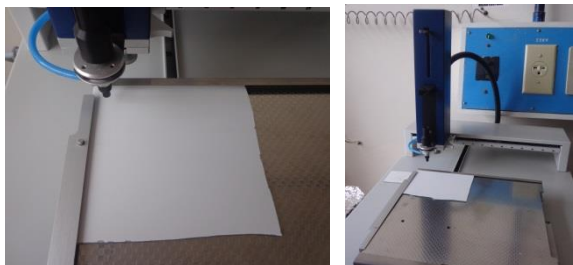
Application position Y: (Set manually) 8.0 mm

First application position X: 16.0 mm

Distance between tracks: 17.0 mm



- Dar click derecho sobre Stationary Phase y seleccionar la opción execute next step.
- Colocar la placa cromatográfica sobre el equipo



- Colocar la jeringa con el aceite para inyectar.



- Presionar Enter en el equipo.

Anexo 8. Documentación de la identificación botánica de *Piper pubinervulum*



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Quito, 01 de marzo de 2013

Solicitud: Identificación taxonómica de una planta.

Solicitante: Señorita Diana Cabezas

Muestra: Segmento de rama

Resultado:

Familia: PIPERACEAE

Especie: *Piper* aff. *pubinervulum* C. DC.

Nombre común referido por el solicitante: Uunt tunchi tunchi

Atentamente

Dra. Consuelo Montalvo A.
INVESTIGADORA

Ciudad Universitaria — Telefax: 3216-975 — Teléfono: 2523-710 — Apartado: 17-03-1369
E-mail: investigacionyposgrado.fcq@uce.edu.ec
institutopostgrado@gmail.com



Anexo 9. Documentación del proceso de destilación de *Piper pubinervulum*



FUNDACIÓN CHANKUAP'
Recursos para el Futuro
Macas - Ecuador



PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Aceite de <i>Hojas Tunchi Tunchi</i>	Destilador de 250 litros ✓	(1)	(2)
Fechas de Destilación:			

Lote de entrada	Cantidad de Mat. prima (Kilos)	Lugar:	Lote de transformación	Fresco	Semiseco	Seco	Cantidad en Libras
010113.	21,6.	SAN LOB.	010113.	X			47,6.
PROCEDIMIENTO							HORA
Limpiar bien la cámara del destilador colocándola posteriormente sobre la cocina. Poner la malla metálica. Rellenar con agua hasta al nivel de la malla En la destilación de Cúrcuma y Jengibre poner la tela sobre la malla metálica, evitando el paso de los rizomas al fondo del destilador.							7h15.
Poner la materia prima sin dejar paso para el vapor, poner la segunda malla metálica y comprimir. Poner la tapa con el refrigerante sobre el cilindro y cerrar. Comprobar las conexiones de agua, la entrada abajo y la salida arriba. Revisar la manguera de retorno de agua al destilador y llenar con un litro de agua la bureta.							7h30.
Encender el fuego y abrir el agua de enfriamiento. Controlar la destilación hasta que no se separa mas aceite esencial.							7h35.
Apagar el fuego recoger el contenido de la bureta en un embudo separador y separar el aceite esencial en un vaso de vidrio.							4h35.
Recoger el aceite esencial en un cilindro graduado (probeta) para calcular cantidad y rendimiento.							4h40.
Medir parámetros de calidad							4h43.
Poner el aceite esencial en un frasco de vidrio oscuro limpio, con etiqueta y número de lote.							✓

FICHA DE CONTROL

PARÁMETROS	RANGO	CONTROL EN FASE DE PROCESO	CONTROL FINAL	CONTROL DE CALIDAD
Aspecto	Líquido	CONF.		
Color	Amarillo	CONF.		
Olor	Amarillo Oscuro	✓		
Envase	Limpio y lotizado			

Cantidad producida: (ml)	Rendimiento ml/kg:	Nota:
11 ml.	0,5.	
	Tiempo minutos	
	540.	

MANUEL KUY.
Responsable Producción

Control de Calidad

Contabilidad

CENTRO DE ACOPIO