



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigación



**Actividad antimicrobiana y composición
química del aceite esencial y extractos de
Piper aduncum (Piperaceae).**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis.

Tutor:

Yndra Cordero de Rojas.

Co-tutor

Luis Rojas Fermín.

Integrantes:

Br. Isveli Farías D.

Br. José A. Linares

Mérida, Diciembre 2015.

Dedicatoria.

A mi madre, a la Virgen del Valle y a toda mi familia por ser siempre mi apoyo incondicional, por ustedes he podido lograr las metas que me he propuesto. Gracias los amo.

Isve

A dios todo poderoso, a mis padres, mi Hermano, y a toda mi familia por el apoyo recibido durante todo este tiempo, gracias por creer y confiar siempre en mí, los quiero.

Ale

Agradecimientos.

En primer lugar a Dios todopoderoso ya que sin su ayuda nada sería posible, por darnos fuerza espiritual y física para seguir adelante en los momentos más difíciles.

A nuestros padres por creer y confiar siempre en nosotros, por darnos siempre una palabra de aliento y motivarnos para completar nuestros estudios, con sus ánimos y entusiasmo nos han ayudado y apoyado incondicionalmente.

A la ilustre Universidad de Los Andes que nos ha abierto sus puertas para llenarnos de conocimiento, gracias por toda la formación académica recibida.

A nuestra tutora, profesora Yndra Cordero de Rojas y a nuestro cotutor, profesor Luis Rojas, gracias por guiarnos a lo largo de esta investigación. Les deseamos mucho éxito en su vida y trabajo.

A las profesoras Clarita Díaz, María Eugenia Lucena, Rosa Aparicio, Johanna Hernández y Nurbys Ríos, mil gracias por su ayuda en cada etapa de este Trabajo de Grado y por tener sus conocimientos siempre disponibles para nosotros.

Y a todas las personas que aunque no mencionamos y que de alguna forma u otra hicieron posible el logro de esta meta. Nuestra eterna gratitud por su cooperación.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	5
I.1. Justificación de la investigación.	8
I.2. Formulación del problema.	9
I.3. Antecedentes de la hipótesis.....	10
I.4. Hipótesis.....	14
I.5. Objetivos.	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos.	15
II. ANTECEDENTES TEÓRICOS.....	16
II.1 Familia Piperaceae.....	16
II.1.1 Descripción botánica del género <i>Piper</i>	16
II.1.2 Distribución del género <i>Piper</i> en Venezuela.	18
II.1.3 Clave para las variedades de <i>Piper aduncum</i>	19
II.1.4 Distribución del <i>Piper aduncum</i> en el Estado Mérida Venezuela..	19
II.2. Aceites esenciales.....	20
II.2.1. Componentes en general de los aceites esenciales.	22
II.2.1.1. Monoterpenos	22
II.2.1.2. Sesquiterpenos	22
II.2.1.3. Serie de compuestos aromáticos derivados del fenilpropano	23
II.2.1.4. Serie por degradación de ácidos grasos	23
II.2.2. Localización de los aceites esenciales en las plantas.	23
II.2.3. Obtención de los aceites esenciales.....	24
II.2.3.1. Extracción por destilación con vapor de agua.	24
II.2.3.2. Extracción por disolventes orgánicos.	24
II.2.3.3. Método de enflorado o enfleurage.....	25
II.2.3.4. Por expresión.	25
II.2.4. Análisis de los aceites esenciales.....	25

II.2.4.1. Cromatografía en capa fina.....	25
II.2.4.2. Cromatografía de gases.....	26
II.2.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.	27
II.2.4.4. Cálculo de índice de retención de Kováts.	27
II.2.5. Importancia de los aceites esenciales.	27
II.2.6. Actividad farmacológica de los aceites esenciales.	28
II.2.6.1. Poder antiséptico	28
II.2.6.2. Propiedad espasmolítica y sedante.....	28
II.2.6.3. Propiedad irritante	29
II.3. Extractos Vegetales.....	29
II.3.1. Obtención de los extractos vegetales.	30
II.3.2. Aplicaciones de los extractos vegetales.	30
II.4. Bacterias.	31
II.4.1. Características generales de las bacterias usadas en este estudio.	32
II.4.1.1. Microorganismos Grampositivos (Gram+).....	32
II.4.1.2. Microorganismos Gramnegativos (Gram-).	34
II.4.2. Enfermedades causadas por las cepas bacterianas usadas en el presente estudio.	35
II.5. Fungí.	37
II.5.1. Género <i>Candida</i>	39
II.5.2. Candidiasis.	39
II.5.3. Epidemiología.	41
II.6. Antibióticos.	42
II.6.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular:.....	42
II.6.2. Antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas.....	42
II.6.3. Antibióticos que inhiben la síntesis del ARN.....	43
II.6.4. Antibióticos que inhiben la síntesis de ADN.....	43
II.6.5. Antibióticos que inhiben la actividad enzimática	43

II.6.6. Antibióticos que alteran la integridad de la membrana	44
II.7. Actividad Antifúngica	44
II.8. Métodos para determinar actividad antimicrobiana	45
II.8.1. Método de difusión del disco en agar (prueba de kirby-bauer)	45
II.8.2. Método de dilución en caldo o agar	45
II.9. Métodos para extracción de aceite esencial y extractos de <i>Piper aduncum</i>	46
II.9.1. Método de extracción por Hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger.	46
II.9.2. Método de Lixiviación o Extracción solido-liquido en columna. ...	47
II.10. Componente mayoritario del aceite esencial y extractos de <i>Piper aduncum</i> : Dilapiol.....	48
III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
III.1. Recolección y Preparación del Material Vegetal.	49
III.2. Extracción y aislamiento del aceite.	49
III.3. Separación e identificación de los componentes químicos del aceite esencial.....	49
III.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de Masas:.	49
III.3.2. Cálculo de los índices de Kovats:	50
III.4. Obtención y aislamiento de los extractos	50
III.5. Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial y los extractos de <i>Piper aduncum</i>	51
III.5.1. Microorganismos utilizados:.....	51
III.5.2. Preparación de los inóculos	51
III.6. Determinación de la actividad antifúngica por el método de difusión en agar.	51
III.6.1. Preparación de los discos.....	51
III.6.2. Preparación de las placas e inoculación.....	52
III.6.3. Colocación de los discos impregnados.....	52
III.6.4. Preincubación e incubación de las placas	52
III.6.5. Lectura de las pruebas	52

III.7. Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencia y los extractos de <i>Piper aduncum</i>	53
III.7.1. Microorganismo a utilizar	53
III.7.2. Preparación de los inóculos.....	53
III.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB).....	54
III.9. Camino metodológico.....	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
V. CONCLUSIONES.....	69
VI. REFERENCIAS.....	71

www,bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla 2. Componentes del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i>	57
Tabla 3. Componentes del extracto acetona de <i>Piper aduncum</i>	60
Tabla 4. Componentes del extracto etanol de <i>Piper aduncum</i>	60
Tabla 5. Tabla componentes del extracto hexano de <i>Piper aduncum</i>	61
Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial y extractos de <i>Piper aduncum</i> con bacterias grampositivas.....	67
Tabla 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial y extractos de <i>Piper aduncum</i> con bacterias gramnegativas.....	67

www,bdigital.ula.ve

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Relación de extracción de dilapiol con los solventes empleados (hexano, acetona y etanol).	62
--	----

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad antifúngica del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> contra <i>Candida albicans</i>	63
Figura 2. Actividad antifúngica del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> contra <i>Candida krusei</i>	63
Figura 3. Actividad antifúngica de los extractos de <i>Piper aduncum</i> contra <i>Candida albicans</i>	64
Figura 4. Actividad antifúngica de los extractos de <i>Piper aduncum</i> contra <i>Candida krusei</i>	65

www,bdigital.ula.ve

RESUMEN

La especie *Piper aduncum* ha sido empleada en la medicina natural por mucho tiempo. Se le conocen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, estimulantes, digestivas, antiulcerosas, dermatológicas, antidiarreicos, antihelmínticas y bactericidas entre otras. El objetivo de esta investigación es describir los componentes químicos y determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y de los extractos del *Piper aduncum* encontrada en Mérida, Venezuela; los cuales fueron obtenidos por hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger. La actividad antifúngica se evaluó contra *Cándida albicans* y *Cándida krusei*, por medio del método de difusión en agar. Por otra parte, la actividad antibacteriana fue contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas auriginosa*, evaluándose por el método de microdilución en caldo. En el caso de la actividad antifúngica el aceite y los extractos indicaron no tener ninguna actividad contra ambas levaduras. Sin embargo, en la actividad antibacteriana se pudo determinar CMI y CMB de todas las bacterias mencionadas, siendo los extractos acetona y etanol contra *Staphylococcus aureus* los que demostraron resultados significativos.

Palabra Claves: *Piper aduncum*; actividad antimicrobiana; aceite esencial; extractos.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, nuestros antepasados se han encargado de estudiar el presente de las plantas medicinales como drogas crudas que presentan propiedades biológicas potenciales, así como una fuente para los compuestos naturales que actúan como agentes nuevos contra las infecciones. En pasadas décadas, la búsqueda de dichos elementos contra las infecciones ha ocupado a muchos grupos de investigación en el campo de la etnofarmacología. ⁽¹⁾

Las plantas medicinales elaboran productos llamados metabolitos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tienda a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes. Estas plantas medicinales también están conformadas por plantas aromáticas, cuyos principios activos están constituidos total o parcialmente, por esencias. ⁽¹⁾

Las plantas elaboran en su metabolismo sustancias como vitaminas y antibióticos, así como también concentran elementos minerales, es decir, que utilizan los cuatro elementos fundamentales: agua, tierra, aire y energía solar; para elaborar los principios inmediatos o alimenticios como proteínas, glúcidos, lípidos, ácidos orgánicos, vitaminas, y todos los metabolitos. ⁽¹⁾

Un área importante de estudio de las plantas se centra en la determinación de la actividad antimicrobiana de sus extractos, aceites esenciales o compuestos, tales como: alcaloides, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, diterpenos o naftoquinonas, entre otros. Estos compuestos son obtenidos para determinar su actividad antimicrobiana.

En la actualidad, el mercado mundial de los aceites esenciales (AE) ha experimentado un aumento como consecuencia del cambio de patrones en el consumo, debido a la tendencia de la utilización de productos naturales. Los términos aceite esencial (AE) o esencia, son utilizados para referirse a sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, (productos de composición generalmente muy complejas que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación), las cuales presentan características lipofílicas, pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas que son obtenidos a partir de diferentes partes de la misma a través de métodos como la destilación en corriente de vapor de agua, y llevan en sí misma la huella, olor y sabor del material vegetal del que proceden. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. ⁽²⁾

La mayoría de los componentes que hacen parte de los AE, pertenecen a una familia de sustancias químicas llamada “terpenos” o “terpenoides”, cuya característica estructural los distingue de otros productos naturales es la unidad isopreno C₅ en el esqueleto hidrocarbonado, así como también el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, mucho menos frecuentes. ⁽³⁾

Los AE poseen una química que consiste en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente. Estos aceites forman partes de las plantas ya que representan las esencias o constituyentes activos de las mismas. Por lo general los aceites volátiles son incoloros, en especial si son frescos, con el tiempo pueden oxidarse y resinificarse, su color se oscurece y por esta razón deben almacenarse en

lugares frescos y secos, y en recipientes de vidrio color ámbar, llenos en su totalidad y herméticamente cerrados. ⁽²⁾

Según la familia de plantas que se trate, los aceites esenciales están en estructuras secretorias especializadas, como pelos glandulares (Labiadas), células modificadas del parénquima (Piperáceas), tubos oleíferos, llamados vitas (Umbelíferas), o canales lisígenos o esquizógenos (Pináceas, Rutáceas). Pueden formarse directamente en el protoplasma, por descomposición de la capa resinosa de la pared celular, o por hidrólisis de ciertos glucósidos. ⁽²⁾

El género *Piper* tiene más de 700 especies que están distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; muchas de estas especies tienen aplicación en la medicina tradicional como antisépticos y anti-infecciosos. ⁽⁴⁾

Una revisión de la composición química del género *Piper*, agrupa en general a sus metabolitos secundarios, en 7 clases: amidas, lignanos y neolignanos, flavonoides, cavalactonas, alcaloides, ciclohexano oxigenados y aceites esenciales entre otros. ⁽⁵⁾

En la actualidad no sólo las bacterias han adquirido resistencia a través de los años, los hongos también han desarrollado mecanismos de resistencia a los principales grupos antifúngicos ⁽⁶⁾. Esta puede ser debido a una resistencia intrínseca a la cepa o adquirida durante el tratamiento, o a una resistencia clínica; esta última se asocia con numerosos factores relacionados con el huésped, el agente antifúngico o la cepa responsable de la infección. ⁽⁷⁾

Debido a esto, la incidencia de las infecciones bacterianas y fúngicas han crecido significativamente en el paso de las décadas, particularmente entre individuos inmunocomprometidos. El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Enterococcus* multirresistente continúan siendo un problema en la infección nosocomial y han surgido nuevos retos en su

control. Por otro lado *Candida albicans* continúa siendo la especie más comúnmente implicada en la forma invasiva y no invasiva de Candidiasis, el número de infecciones humanas causadas por *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* ha incrementado en los años recientes. ⁽⁸⁾

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales aislados de ciertas plantas, el objetivo de este trabajo es describir los componentes químicos y determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y los extractos del *Piper aduncum* encontrada en la Facultad de Ciencias Ambientales y Forestales de la Universidad de Los Andes del Edo Mérida, Venezuela; contra las especies *Cándida albicans*, *Cándida krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

www.bdigital.ula.ve

I. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Las especies pertenecientes a la familia Piperaceae frecuentemente son arbustos aromáticos, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Hojas alternas, enteras a menudo lobuladas en la base, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta. Inflorescencias terminales, opuestas y solitarias, raramente axilares y en grupo sobre un eje común ramificado simulando umbelas o panículas, las flores forman bandas alrededor de la espiga; el fruto al madurar es ligeramente distorsionado por compresión de los frutos adyacentes. La familia Piperaceae comprende 10 géneros y aproximadamente 1.400 a 2.000 especies, distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta. En Guatemala, están descritas aproximadamente 88 especies de *Piper*, la flora de Guatemala informa de 11 especies distribuidas en 7-9 departamentos, 24 con una distribución media en 2-9 departamentos y 53 con una distribución escasa, de las cuales 45 son endémicas. Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuyen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, carminativas, estimulantes, digestivas, antiulcerosas, dermatológicas, antidiarreicos, antihelmínticas, antiflogísticas y bactericidas. ⁽⁹⁾

Por otra parte, los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias de variadas funciones químicas. Constituidas principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, que están asociados a otros componentes generando un olor característico del vegetal. Dichos aceites se encuentran en una gran variedad de plantas incluidas las Piperáceas, Familia a la cual pertenece el *Piper aduncum*. Una cualidad de las plantas de este género es la de poseer aromas y compuestos que son característicos de la región y de cada especie.

Los principales métodos de extracción de estos aceites son: métodos directos (compresión, raspado, lesiones mecánicas de la corteza), destilación (hidrodestilación, destilación con agua y vapor, destilación con vapor seco), extracción (con solventes volátiles, con solventes no volátiles, con fluidos supercríticos), enfluerage (adsorción sólido-líquido y/o sólido-gas), headspace (purga y trampa simultáneas, purga y extracción con solvente simultáneas).⁽¹⁰⁾

En referencia a la clasificación anterior, Morton (1981) recopiló una serie de usos que se le dan en la medicina popular de América: en Guatemala y México, la planta tiene valor como astringente, estimulante digestivo y diurético. En Cuba se utiliza además como hemostático y como remedio para las hemorroides, gonorrea, leucorrea, para las hemorragias menstruales y para el tratamiento de varias dolencias externas. En Islas Vírgenes se toma la decocción de la planta como sedante, laxante y bebida refrescante.⁽¹¹⁾ En América Central y Brasil, tiene usos semejantes. En Brasil se usa además contra la diarrea y la disentería, para dolores de muela, carminativo y antiulceroso.⁽¹²⁾

Desde el punto de vista químico, se encuentran en la literatura estudios acerca de la identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de esta especie y de algunas variedades recolectadas en diversas partes del mundo. Smith y Kassim (1979) informaron que los constituyentes principales del aceite obtenido por destilación al vapor de hojas frescas recolectadas en las Islas Fiji son dilapiol (58%) y piperitona (4%). Gottlieb y otros (1981) estudiaron los componentes principales de las variedades brasileñas *P. aduncum* Var. *aduncum* y *P. aduncum* Var. *cordulatum* encontrando dilapiol (74,5% y 88,4% respectivamente) y trazas de alcanfor en la primera. Gupta y otros (1983) investigaron la composición del aceite

esencial de las hojas frescas de la planta recolectada en Panamá encontrando dilapiol (90%) como componente mayoritario, pero no encontraron piperitona ⁽¹²⁾. El aceite esencial obtenido de 4 diferentes variedades en la región amazónica tiene como componente mayoritario al dilapiol en un rango desde 3,4 a 12 %. Cabe destacar que la mayoría de los estudios realizados con piperáceas reportan el método de hidrodestilación para la extracción de su aceite esencial ⁽¹³⁾. Cabe agregar que, Díaz y otros (1984), identificaron de la planta recolectada en Colombia (en la zona de Santandercito, Cundinamarca), como constituyentes mayoritarios dilapiol, miristicina y piperitona. ⁽¹⁰⁾

Así mismo, se obtuvieron los aceites esenciales de las hojas y espigas de *Piper aduncum*, recolectadas en dos localidades diferentes de Costa Rica. La composición del aceite se estudió utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron cerca de 50 constituyentes, siendo el compuesto mayoritario el dilapiol (32,9-37,1%) y encontrándose entre otros: piperitona (11,1-13,5%), 4-terpineol (4,4-5,4%) y sesquiterpeno cariofileno (4,0-5,3%). ⁽¹⁴⁾

El dilapiol, uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Piper aduncum*, reduce el crecimiento de larvas de pestes de insectos, incluida la larva de la mayor peste de maíz en Norte América, *Ostrinia nubilalis* ⁽¹⁴⁾; la miristicina se comporta como sustancia oxiótica, actúa como inhibidor de la monoaminoxidasa comportándose como antidepresivo; ambos componentes, el dilapiol y miristicina, son conocidos por su actividad insecticida y su uso como sinergistas de insecticidas organofosforados y carbonados. ⁽¹⁵⁾

I.1. Justificación de la investigación.

Hoy día, conociendo la clasificación de las plantas y teniendo el hombre la capacidad de identificarlas por sus características, recurre a ellas para mejorar su salud, debido a que son: económicas, efectivas de fácil manejo, de uso popular y fuente histórica de principios activos con actividad biológica.

Actualmente las plantas medicinales son utilizadas en muchos hogares venezolanos de todas las clases sociales, sin embargo; éstas no siempre tienen el poder terapéutico que se cree. Por lo tanto, es necesario confirmar la actividad farmacológica para tener una mejor utilización de la planta, así como también es importante investigar si el material vegetal con efecto terapéutico ya justificado con bases científicas, posee otras propiedades medicinales para obtener un beneficio mayor

Las enfermedades causadas por microorganismos son de alta incidencia en nuestro país, principalmente entre personas de los núcleos marginados de la sociedad, y esto ha llevado al uso y abuso de antibióticos en nuestro medio provocando que cada día aparezcan nuevas cepas resistentes que pueden ocasionar epidemias difíciles de controlar en el futuro.

Debido a que la incidencia de infecciones causadas por bacterias y hongos ha aumentado significativamente en los últimos años, en gran parte por el desarrollo de mecanismo de resistencia a los agentes terapéuticos, surge la necesidad de realizar esta investigación con el fin de estudiar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta *Piper aduncum* de la familia Piperaceae, ya que podrían ser fuentes de elaboración de diferentes fármacos contra enfermedades infecciosas y de patologías presentes en el ser humano.

I.2. Formulación del problema.

- 1.- ¿Cuál es la composición química del aceite esencial de *Piper aduncum*, (Piperaceae) que crece en Mérida-Venezuela?
- 2.- ¿Posee actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la especie *Piper aduncum* perteneciente a la familia Piperaceae?

www.bdigital.ula.ve

I.3. Antecedentes de la hipótesis.

Debido a las investigaciones que se han realizado durante las últimas décadas, se ha confirmado que algunas especies del género *Piper* han presentado cierta actividad antimicrobiana. Algunos autores hablan que “plantas del género *Piper*, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales, como antimicrobiano y citotóxico.”⁽¹⁶⁾

Por otro lado, los aceites esenciales (AE) de *Piper* spp. inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en humanos como el *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y los hongos *Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans*, *A. flavus* y *A. fumigatus*.⁽¹⁶⁾

En el mismo orden de ideas, el aceite esencial de *Piper aduncum* en concentración de 20 mg/mL presenta una marcada actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Mycobacterium smegmatis* y una débil actividad contra *Aspergillus flavus* y *Trichophyton mentagrophytes*⁽¹³⁾.

De la misma forma, se investigó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cuatro plantas del nor-oriental peruano: *Cassia reticulata* (planta entera), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Piper lineatum* (hojas) perteneciente a la familia Piperaceae, y *Terminalia catappa* (hojas). Las especies fueron recolectadas en el departamento de Cajamarca, excepto *Terminalia catappa* (Amazonas). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar. Los microorganismos utilizados fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y

Escherichia coli; y los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporium canis*. De doce extractos investigados, ocho (67%) presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y uno (8%) frente a *Escherichia coli*, diez (83%) presentaron actividad significativa frente a *Candida albicans*, y seis (50%) contra *Microsporium canis*. Los extractos con la mejor actividad antimicrobiana fueron los tres extractos del *Piper lineatum*; el extracto hidroalcohólico de *Cassia reticulata* y el hidroalcohólico de *Terminalia catappa*⁽¹⁷⁾.

Con referencia a lo anterior, los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de las hojas de *Piper lineatum* (luto) mostraron actividad significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cándida albicans* y *Microsporium canis*. Los extractos no muestran actividad significativa contra el resto de microorganismos ensayados. Es importante destacar la muy buena actividad contra el *Microsporium canis* con un halo de inhibición de 50 mm, por parte del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Piper lineatum*. Para esta especie es la primera vez que se reportan las actividades citadas; sin embargo, este género es conocido por su actividad antimicrobiana. Así tenemos resultados similares en cuanto a la actividad antibacteriana contra Gram positivos del extracto de las partes aéreas del *Piper aduncum*, del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Piper regnellii* y del extracto metanólico de *Piper solmsianum*⁽¹⁷⁾.

De igual manera, se estudió la relación de la actividad antifúngica y composición de los extractos no fraccionados de varias especies de *Piper* en Colombia, obteniéndose que las plantas pertenecientes al género *Piper* están ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y también se sabe que producen metabolitos con actividad biológica contra agentes infecciosos, así como antitumoral y con propiedades antioxidantes. Su fitoquímica ha sido

ampliamente estudiada para determinar que las especies de este género son ricas en compuestos bioactivos tales como alcaloides, flavonoides y derivados del ácido benzoico. Como parte de la investigación sobre los antifúngicos, se recolectaron partes de ocho especies del género *Piper* (hojas, raíces, tallos e inflorescencias) en el centro de Colombia, se secaron y sometieron a una maceración en etanol. Los extractos resultantes se evaluaron en fenoles totales (entre 0,8 y 4,0 mg GAE / GDE) y total (0,6 a 2,0 mg QE / GDE) contenido de flavonoides, donde hubo actividad antifúngica *in vitro* contra el crecimiento de *Fusarium.oxysporum* (IC50 <10 ppm).⁽¹⁸⁾

En otras investigaciones relacionadas con caracterización química de aceites esenciales de plantas pertenecientes a la familia Piperaceae se han hecho estudios de 14 especies del género *Piper* con actividad antifúngica en donde los extractos de diclorometano de 14 especies vegetales del género *Piper* fueron evaluados *in vitro* por su actividad antifúngica contra *Neurospora crassa* y antiparasitaria contra *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. amazonensis*. Las especies con actividad interesante fueron *Piper aduncum*, *P. elongatum* Vahl, *P. acutifolium*, *P. Pilliraneum* C.DC y *P. hispidum*. Mediante estudios cromatográficos biodirigidos, se han aislado e identificado compuestos responsables de la actividad antifúngica y leishmanicida de *P. aduncum* como 5,7- dihidroxiflavanona, 5,7-dihidroxi 4metoxi-flavanona, Acido 3-(3',7'-dimetil-3',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico. Las estructuras fueron definidas por métodos espectroscópicos, y de RMN- ¹H y ¹³C.⁽¹⁹⁾

En trabajos realizados se investigó la actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum* en Perú. Así tenemos que el extracto crudo de varias especies utilizadas en la medicina tradicional peruana como *Cestrum auriculatum*, *Iryanthera lancifolia* y *Wigandia urens*, entre otras, mostraron actividad inhibitoria sobre *Trycophyton mentagrophytes* y *Microsporium gypseum*, entre otros patógenos. El aceite esencial, constituido

por varios compuestos como β -eudesmol, espatulenol e isocariofileno, entre otros, y extractos crudos de *Cordia curassavica*, mostraron una significativa actividad antibacteriana y antifúngica.⁽²⁰⁾

www.bdigital.ula.ve

I.4. Hipótesis.

Estudios anteriores han demostrado que la familia Piperácea tiene actividad antimicrobiana sobre diversos microorganismos, por esto es de pensar que la especie *Piper aduncum* recolectada en la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes Núcleo Mérida, es de esperar que el aceite esencial y los diferentes extractos obtenidos presenten actividad contra levaduras como *Cándida albicans* y *Cándida krusei*. Así mismo, contra algunas bacterias de interés clínico como son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

www.bdigital.ula.ve

I.5. Objetivos.

Objetivo General

- Analizar la composición química del aceite esencial y los extractos de *Piper aduncum* y comprobar su actividad antimicrobiana.

Objetivos Específicos.

- Recolectar la planta *Piper aduncum* en la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, Núcleo Mérida, Venezuela.
- Obtener por hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger el aceite esencial de *Piper aduncum*.
- Obtener los extractos de acetona, etanol, hexano de los tallos de *Piper aduncum*.
- Identificar los componentes del aceite esencial y los extractos contenidos en las hojas y tallos de *Piper aduncum* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Piper aduncum* por el método de difusión en agar.
- Determinar la actividad antibacteriana por los métodos de difusión en placa y microdilución en caldo de los extractos y aceite esencial de *Piper aduncum*.

II. ANTECEDENTES TEÓRICOS.

II.1 Familia Piperaceae.

Son una familia de angiospermas de los órdenes piperales. Consta de 10 géneros, y posee de 1400 a 3000 especies, que se distribuyen por las regiones tropicales del planeta. La mayoría pertenecen a dos géneros, los cuales son *Piper* y *Peperomia*.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Nombres comunes	Cordoncillo, matico, hierba del soldado, achotlín


Las especies de esta familia producen gran variedad de compuestos químicos, sobre todo derivados de la fenilalanina. Los aceites esenciales contienen monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos a partes más o menos iguales. ⁽²¹⁾

II.1.1 Descripción botánica del género *Piper*.

Son arbustos con tallo estriado, pubescente, con pelos largos simples o segmentados. Pecíolo mide entre 2.5 a 3 cm de largo, vaginado hacia la mitad, pubescente, con pelos simples y segmentados. Hojas alternas, ovado-elípticas, miden entre 11 a 17.5 cm de largo y 6 a 9 cm de ancho, ápice agudo, borde diminutamente aserrado, haz diminutamente pubescente; envés diminutamente puberulento, las nervaduras y nervios son pubescentes; nervadura pinnada. Muestra sin flor ni fruto. ⁽²²⁾

Las especies de este género se encuentran con mayor diversidad en bosques húmedos premontanos y de tierras bajas. Su distribución es en regiones tropicales y subtropicales ⁽²²⁾.

Piper aduncum, llamada popularmente matico, hierba del soldado, achotlín o cordoncillo, es un árbol perenne de 6-7 metros de altura con tallo leñoso, nodoso, ramificado y verde o gris pálido, con hojas de color verde claro, alternas y en forma de lanza con el ápice en punta, de 12-20 cm de largo y 5-8 cm de ancho, presentando la siguiente taxonomía:

Reino: Plantae	
Division: Magnoliophyta	
Clase: Magnoliopsida	
Orden: Piperales	
Familia: Piperaceae	
Género: <i>Piper</i>	
Especie: <i>Piper aduncum</i>	

También, presenta inflorescencia en espiga simple, densa o compuesta con pequeñas flores hermafroditas. Su fruto es una pequeña drupa con semillas negras perteneciente a la familia de la pimienta (Piperaceae). Crece silvestre en costas y selvas de Centroamérica y Suramérica y en los valles interandinos hasta los 3.000 msnm. ⁽²²⁾

Según la leyenda esta planta fue descubierta por un soldado español herido llamado Matico. Es probable que aprendiera su uso de las tribus locales que aplicaban las hojas a las heridas para detener las hemorragias. Fue introducida en la medicina de Europa y Estados Unidos por un médico de Liverpool en 1839, como hemostático y astringente para las

heridas. En textos médicos norteamericanos, la *United States Pharmacopoeia*, de principios del siglo XIX ya aparece citada esta planta.⁽²³⁾

Esta planta contiene numerosos compuestos químicos, como cumarinas, flavonoides, alcaloides, monoterpenos, triterpenos, saponinas, safrol y fenoles. La medicina tradicional le atribuye propiedades variadas. Las hojas en decocción se usan como cicatrizante en el tratamiento de hemorragias, en lavados antisépticos sobre heridas y en infusión para evacuar cálculos biliares, para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, expectorante y antitusígeno), en dolencias gastrointestinales ("empacho", diarreas agudas o crónicas) y tópicamente en infusión de las hojas para hacer gárgaras⁽²¹⁾. Así mismo, en la selva lluviosa amazónica los nativos la usan como antiséptico, en Perú fue utilizado para contener hemorragias y tratar úlceras y en Europa se ha usado para el tratamiento de infecciones genitales y renales⁽²³⁾.

Es usada como emoliente y protector de la piel comercializado en forma de jabón antiséptico. Algunos estudios de laboratorio han confirmado sus propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias y antisépticas e inhibidor de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Trichophyton mentagrophyte*.⁽²³⁾

II.1.2 Distribución del género *Piper* en Venezuela.

El género *Piper* es uno de los miembros más comunes del sotobosque en las regiones boscosas de Venezuela, e igualmente común en áreas cálidas y frías⁽²⁴⁾.

Se encuentra en Bosques húmedos, pluviosos o nublados, bosques secos deciduos, bosques ribereños, matorrales a los lados de los caminos y áreas intervenidas, a través de toda Venezuela desde el nivel del mar hasta 3200 metros sobre el nivel del mar⁽²⁴⁾.

II.1.3 Clave para las variedades de *Piper aduncum*.

Piper aduncum variedad *garcia-barrigae*.

1. Haz foliar más o menos escabro
2. Haz foliar no escabro, glabrescente en la parte superior

Piper aduncum variedad *aduncum*.

1. Tallos glabros, glabrescentes o esparcida o cortamente pubescente, hojas glabrescente o pubescentes en el envés, y con algunos puntos glandulares

Piper aduncum variedad *cordulatum*.

1. Tallos más o menos moderados hasta densamente vellosopubescentes con pelos laxamente extendidos; hojas moderadas densamente suaves vellosas en el envés.

Todas estas variedades de *Piper aduncum* se encuentran ampliamente distribuidas en Venezuela⁽²⁴⁾.

II.1.4 Distribución del *Piper aduncum* en el Estado Mérida Venezuela.

Esta variedad de planta se encuentra ampliamente distribuida en el Estado Mérida: Timotes, carretera Mérida la azulita, hacienda moral en Ejido, entrada al Vallecito, carretera Mérida-Tabay, Las Tapias, Campo de Oro cuesta del matadero entre la Facultad de Farmacia y Bioanálisis al margen derecho del río Chama, en la Facultad de Forestal, carretera al este de Santo Domingo, cerca de los límites del Edo Barinas⁽²⁴⁾.

II.2. Aceites esenciales

Son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales⁽²⁵⁾.

Los aceites esenciales son característicos de los magnoliales, los laurales, los austrobaileyales, y los piperales, y también de algunas familias no emparentadas con estos órdenes, como Myrtaceae, Rutaceae, las familias Lamiaceae, Verbenaceae y Asteraceae. Las plantas elaboran estos aceites con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización⁽²⁵⁾.

Están presentes en distintas partes de la planta:

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

Los aceites esenciales siempre deben de estar protegidos de la luz y mantenerse en botellas de vidrio, de preferencia botellas de color azul, ya que este color es específico para estos aceites, ellos son muy inestables:

volátiles, frágiles, y alterables con la luz. Para obtenerlos de la fuente natural, se utilizan principalmente dos métodos:

- Destilación en corriente de vapor (o por arrastre de vapor).
- Extracción, que puede ser por presión en frío (exprimiendo sin calentar), por *enfleurage*, entre otros. También se pueden extraer aceites esenciales mediante su disolución en aceites vegetales (almendra, durazno, maní, oliva, sapuyul).

Son muy concentrados, por lo que sólo se necesitan pequeñas cantidades para lograr el efecto deseado, también se pueden sintetizar en forma artificial, que es la manera más habitual de obtenerlos, debido a que la gran demanda de estos productos no llega a ser abastecida por las fuentes naturales⁽²⁵⁾.

Así mismo, están formados principalmente por terpenoides volátiles, unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenos) y 15 carbonos (sesquiterpenos). Las sustancias responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, cetonas, ésteres, etc. Cada aceite lo integran compuestos químicos diferentes, clasificados como aldehídos, fenoles, óxidos, ésteres, cetonas, alcoholes y terpenos. También puede haber muchos compuestos aún por identificar.⁽²⁶⁾

Algunos de los aceites esenciales son antisépticos, pero cada uno tiene sus virtudes específicas, por ejemplo pueden ser analgésicos, fungicidas, diuréticos o expectorantes. La reunión de componentes de cada aceite también actúa conjuntamente para dar al aceite una característica dominante.⁽²⁶⁾

En el organismo, los aceites esenciales pueden actuar de modo farmacológico, fisiológico y psicológico. Habitualmente producen efectos

sobre diversos órganos (especialmente los órganos de los sentidos) y sobre diversas funciones del sistema nervioso.⁽²⁶⁾

II.2.1. Componentes en general de los aceites esenciales.

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados; Ej., alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico y se les cataloga como terpenos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos. Es posible encontrar en los aceites, derivados del fenil propano y compuestos formados por la degradación de ácidos grasos.⁽²⁷⁾

II.2.1.1. Monoterpenos: son biogénicamente derivados de dos unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos, plantas, microorganismos e insectos; algunos tienen funciones específicas en el individuo, otros presentan actividades biológicas de distintas maneras.⁽²⁷⁾

Existen varios tipos estructurales de monoterpenos, los esqueletos regulares que son aquellos que siguen la regla del isopreno y los esqueletos irregulares, en los cuales no se mantiene la secuencia de los carbonos que conforman los dos fragmentos de isopreno unidos “cabeza-cola” y se pueden generar por: pérdida de átomos de carbono, reordenamientos del esqueleto y unión anormal de los monómeros.⁽²⁸⁾

II.2.1.2. Sesquiterpenos: son estructuras que contienen solo 15 átomos de carbono, presentan una gran diversidad esquelética como resultado de la facilidad de rearreglarse que tienen estas estructuras. Al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones posteriores, crece de manera

espectacular, lo que explica que estén descritos más de un millar de compuestos, relacionados con una centena de esqueletos.⁽²⁸⁾

II.2.1.3. Serie de compuestos aromáticos derivados del fenilpropano: los compuestos de esta serie, muchos menos frecuentes que los monos y sesquiterpenos, derivan en su mayoría, del fenilpropano C₆-C₃. Estos se forman a través de la ruta del ácido shikimico. Los componentes de esta ruta encontrados en las esencias están formados por un anillo de seis miembros y una cadena de tres carbonos, son los más abundantes dentro de su clase.⁽²⁸⁾

II.2.1.4. Serie por degradación de ácidos grasos: existen ciertos compuestos aromáticos como los aldehídos, cetonas, ácidos o alcoholes con cuatro o cinco átomos de carbono, que son formados por la degradación de ácidos grasos y se encuentran principalmente en los frutos.⁽²⁸⁾

II.2.2. Localización de los aceites esenciales en las plantas.

Los aceites esenciales no se encuentran prácticamente más que en vegetales superiores: existirían, según Lawrence, 17.500 especies aromáticas. Los géneros capaces de elaborar los constituyentes que componen los aceites esenciales están repartidos en un número limitado de familias. Los aceites esenciales pueden almacenarse en todos los órganos vegetales: como en la flores, igualmente en hojas y, menos habitual, en cortezas, leños, raíces, rizomas, frutos, semillas. Aunque todos los órganos de una misma especie pueden contener aceite esencial, la composición de éste puede variar según su localización⁽²⁹⁾.

Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructuras histológicas especializadas, a menudo localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta: células con aceites esenciales Lauraceae o las Zingiberaceae, pelos secretores de las Lamiaceae, glándulas secretoras de las Myrtaceae o las Rutaceae, canales secretores de las Apiaceae o las Asteraceae ⁽²⁹⁾.

II.2.3. Obtención de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se obtienen por los métodos siguientes: destilación en corriente de vapor, extracción con disolventes volátiles, expresión a mano o a máquina y enfleurage, proceso en el cual se utiliza grasa como disolvente. ⁽³⁰⁾

II.2.3.1. Extracción por destilación con vapor de agua.

Permite aislar la esencia con gran rendimiento y puede utilizar gran cantidad de material. Se opera corrientemente sobre el material desengrasado y pulverizado. La operación se verifica en alambiques especiales y se recoge el vapor cargado de esencia en recipientes, que llevan en su parte inferior una tubuladura larga que facilita la separación del agua condensada de la esencia, la cual, por más ligera, sobrenada. ⁽³⁰⁾

II.2.3.2. Extracción por disolventes orgánicos.

Para este método los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos (pentanos, hexanos), hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno) y menos frecuentes los hidrocarburos halogenados. Las soluciones obtenidas se destacan o centrifugan y se concentran, el disolvente recuperado se recicla. Al final de la operación el disolvente que permanece en el residuo, se recupera por inyección de vapor de agua en este. ⁽³⁰⁾

II.2.3.3. Método de enflorado o enfleurage.

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físicos-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa ⁽³¹⁾.

II.2.3.4. Por expresión.

En la expresión el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado ⁽³²⁾.

II.2.4. Análisis de los aceites esenciales.

Los componentes de los aceites esenciales se identifican por:

II.2.4.1. Cromatografía en capa fina.

Es una variante de la cromatografía en columna o en papel; la fase fija está formada por una capa uniforme de adsorbente, que sirve como soporte de la fase estacionaria, es uniformemente esparcida sobre una placa de vidrio, plástico o aluminio sobre la cual es aplicada la muestra y ésta se moverá a través de la placa mediante un disolvente (fase móvil), produciéndose la separación de los componentes según su mayor o menor afinidad por cada una de las fases. Tiene como ventaja la rapidez del desarrollo y versatilidad de las operaciones que sobre el estrato fino pueden hacerse. Se le abrevia como TLC. Por esta técnica pueden ponerse en práctica cromatografía de

intercambio iónico, permeación de gel y la bioafinidad. La fase fija se adhiere a una placa rígida, generalmente de vidrio ⁽³³⁾.

Las placas para capa fina se pueden obtener de fuentes comerciales o preparadas en el laboratorio. El espesor de la capa del disolvente varía entre 100-250µm, con un tamaño de partículas entre 5-20µm. Los sólidos adsorbentes más utilizados son: Silica gel: la cual se emplea para la separación de alcaloides, esteroides, aminoácidos, aniones, cationes inorgánicos, ácidos grasos, etc; alumina: utilizada para alcaloides, esteroides, vitaminas; y otros como polvo de celulosa, almidón, sephadex, etc. ⁽³³⁾.

El tipo de disolvente a usar en la fase móvil es determinante para lograr una buena separación, la regla general a elegir un disolvente de la misma polaridad al de la sustancia a separar. Para facilitar la elección del disolvente, se ha clasificado en una serie eluotrópica, tomando en cuenta su poder de elución, constante dieléctrica y capacidad para formar puentes de hidrogeno. ⁽³³⁾

II.2.4.2. Cromatografía de gases.

En la cromatografía de gases se incluyen todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas (gas portador), siendo la fase estacionaria un líquido o un sólido. Se desarrolla en una columna cerrada en la que se encuentra retenida la fase estacionaria y por la que se hace pasar el gas portador, la técnica de separación es la elución. Iniciado el proceso cromatográfico los componentes de la mezcla se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil; la elución tiene lugar forzando el paso de un gas inerte a través de la columna. La fase móvil no interacciona con el analito y su única misión es la de transportar la muestra ⁽³⁴⁾.

II.2.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.

El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Sin embargo, en el caso de columnas rellenas así como en las columnas megacapilares ha de emplearse un separador de chorro, para eliminar la mayor parte del gas portador que acompaña al analito. En este dispositivo, la salida de gases fluye a través de la boquilla de un separador de chorro de vidrio, el cual aumenta el momento lineal de las moléculas más pesadas del analito, de tal forma que el 50% o más de éstas se desplazan aproximadamente en línea recta hacia el conducto colector de salida. Por el contrario, los átomos de helio ligeros se desvían por el vacío y son succionados hacia el exterior. La mayoría de los espectrómetros de masas cuadrupolo y de sector magnético se suministran con los accesorios necesarios para ser acoplados a un equipo de cromatografía de gases ⁽³⁴⁾.

II.2.4.4. Cálculo de índice de retención de Kováts.

El índice de retención de Kováts o índice de retención es un método de cuantificación de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla. El método aprovecha la relación lineal entre los valores del logaritmo del tiempo de retención, $\log (t_r')$, y el número de átomos de carbono en una molécula. El valor del índice de Kováts suele representarse por (I) en las expresiones matemáticas. Su aplicación se limita a los compuestos orgánicos ⁽³⁵⁾.

II.2.5. Importancia de los aceites esenciales.

La constante búsqueda de sustancias con diferentes actividades biológicas como: antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, en fuentes no tradicionales como las plantas superiores es importante, ya que existe la posibilidad de encontrar principios activos con buenas propiedades, frente a

microorganismos causantes de diversas enfermedades infecciosas, así como patologías presentes en el ser humano⁽²⁵⁾.

Distintos tipos de extractos y aceites han sido utilizado a lo largo de la historia en forma empírica y constituyen la base de numerosas terapias homeopáticas, debido a las propiedades biológicas de sus compuestos que confieren una defensa antimicrobiana, y la capacidad que presenta para corregir una patología en el organismo. Es por ello, que actualmente, numerosos laboratorios se dedican a estudiar las plantas y sus principios activos, ya que estos podrían ser fuente de elaboración de numerosos fármacos⁽²⁵⁾.

Como resultado de estos estudios y observaciones, se nota actualmente un movimiento mundial muy pronunciado por todas estas plantas que fueron ignoradas ayer y que hoy muchas de ellas figuran de nuevo en las prescripciones más sabias de la medicina moderna, quizás dándole otro uso más específico del que anteriormente se le daba⁽²⁶⁾.

II.2.6. Actividad farmacológica de los aceites esenciales.

II.2.6.1. Poder antiséptico: este se manifiesta frente a cepas habitualmente para los antifúngicos, algunos aceites esenciales son activos sobre hongos responsables de micosis y sobre levaduras de *Cándida*. Generalmente las dosis activas son bajas y las que se determinan por experimentación *in vitro* se pueden transponer directamente para su uso por vía externa o como conservador⁽¹⁾.

II.2.6.2. Propiedad espasmolítica y sedante: numerosas drogas con aceites esenciales son catalogadas como eficaces para disminuir los espasmos gastrointestinales. Es frecuente que estimulen la secreción

gástrica, por lo que se han clasificado como digestivas y estomáquicas, con todas las consecuencias que puede resultar de esta eupepsia: mejora insomnios y trastornos psicósomáticos diversos, disminuye el nerviosismo, etc. Estos diversos efectos beneficiosos explican sin duda que las medicinas populares y las terapéuticas suaves y domésticas utilicen ampliamente estas drogas ⁽¹⁾.

II.2.6.3. Propiedad irritante: ciertos productos por vía tópica, provocan aumento de la microcirculación, sensación de calor y, en ciertos casos, ligera acción anestésica local. En la actualidad, son aun numerosas las pomadas, cremas o geles a base de aceites esenciales destinadas a aliviar distensiones, esguinces y otras molestias articulares o musculares ⁽¹⁾.

Otros productos administrados por vía interna desencadenan fenómenos de irritación a diferentes niveles ⁽¹⁾.

II.3. Extractos Vegetales.

Es un preparado que permite extraer de las plantas determinadas sustancias útiles. Estas sustancias pueden tener diferentes efectos, suelen ser: fortificantes, para el control de enfermedades y para el control de plagas. Se extraen de alguna porción de la planta, la raíz, el tallo, las hojas, los frutos y las flores, que al someterse a procesos químicos, permiten aislar compuestos característicos en forma concentrada y con la característica de conservar sus propiedades químicas. ⁽³⁶⁾

II.3.1. Obtención de los extractos vegetales.

Los extractos de plantas completas o partes específicas (flores, hojas, cortezas, tallos y raíces), son obtenidos a partir de especímenes seleccionados, mediante técnicas especializadas de extracción y concentración química, utilizando diversos solventes, de acuerdo a las características de la materia prima, a sus componentes y a sus posibles usos y secados por liofilización o por nebulización, valorados mediante técnicas cromatografías. Los métodos de extracción dependen fundamentalmente de los objetivos del estudio de la planta: Si el trabajo va dirigido al aislamiento de extractos de una muestra sólida (extracción sólido-líquido), se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente (líquido). Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto puede difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido ⁽³²⁻³⁷⁾.

II.3.2. Aplicaciones de los extractos vegetales.

De los extractos presentes en la gran diversidad de plantas estudiadas a lo largo de los años se han reportado usos y aplicaciones de una actividad específica para ese extracto. Podemos señalar:

- Actividad biológica de extractos y sustancias de origen vegetal con énfasis en la familia Piperaceae para el control de arvenses, plagas y enfermedades en el sector agrícola ⁽³⁸⁾.
- Actividad antioxidante ⁽³⁹⁾.
- Actividad antimicrobiana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁴⁰⁾.

II.4. Bacterias.

Son seres vivos unicelulares procariontes que presentan una gran variedad de formas de vida. Hay bacterias fotosintéticas, quimiosintéticas y heterótrofas. Estas pueden ser saprofitas, descomponedores o patógenas, como las que producen la tuberculosis y la sífilis. Carecen de un núcleo delimitado por una membrana, aunque presentan un nucleoide que contiene una molécula circular de ADN, su citoplasma carece de organelos. Allí se pueden apreciar plásmidos (moléculas circulares de ADN que coexisten con el nucleoide, además contiene genes que son usados por estos microorganismos en la conjugación), presentan también vacuolas y ribosomas. La membrana citoplasmática está compuesta de lípidos que rodean al citoplasma. La mayoría de las bacterias presentan una cápsula que le permite protegerse de las células fagocitadoras y de los agentes antibacterianos, otras son capaces de evolucionar a endosporas (estadios latentes capaces de resistir condiciones extremas) ⁽⁴¹⁾.

La clasificación de las bacterias radica en su pared celular, donde se pueden diferenciar por un método tradicionalmente empleado como lo es la coloración de Gram. Las bacterias Grampositivas tienen una pared gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglicano. En cambio las bacterias Gramnegativas tienen la pared relativamente fina, consistente en unas pocas capas de peptidoglicano rodeado por una segunda membrana, lipídica (membrana externa), que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. ⁽⁴²⁾


II.4.1. Características generales de las bacterias usadas en este estudio.

II.4.1.1. Microorganismos Grampositivos (Gram+).

Dentro de los microorganismos Gram (+) existe una gran variedad de géneros, de los cuales hablaremos solo de la especies: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

***Staphylococcus aureus*.**

Taxonomía.


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

El género *Staphylococcus* contiene al menos 30 especies, las tres de importancia clínica son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*. Son células esféricas grampositivas dispuestos en racimos irregulares parecidos a racimos de uva, son inmóviles, aerobios facultativos, catalasa positivo, miden aproximadamente 1 μ m de diámetro y fermentan carbohidratos. El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo del reino protistas ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales, es la única especie que produce enzima coagulasa, el resto de las especies son estafilococos coagulasa negativos, crecen con rapidez sobre muchos tipos de medios y son metabólicamente

activos. Están desprovistos de motilidad y no forman esporas. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y mucosas de los humanos, otros causan supuraciones, forman abscesos, infecciones pirógenas o incluso septicemia mortal. ^{(42), (43)}

Enterococcus faecalis.

Taxonomía.

Reino: Bacteria	
Filo: Firmicutes	
Clase: Bacilli	
Orden: Lactobacillales	
Familia: Enterococcaceae	
Género: <i>Enterococcus</i>	
Especie: <i>faecalis</i>	


El género *Enterococcus* también son microorganismos Gram +, de los cuales existen al menos 12 especies de *Enterococcus*. El *Enterococcus faecalis* es el más común, siendo una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa, fermenta la glucosa sin producir gas y habita en el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos, son capaces de crecer en condiciones extremas y causan del 85 al 90% de las infecciones comprometidas en humanos, se considera una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos, se trasmite de paciente a paciente o por dispositivos médicos. Son resistentes a los antibióticos por presentar resistencia intrínseca, resistencia a aminoglucósidos y producen betalactamasa. ^{(42), (43)}

II.4.1.2. Microorganismos Gramnegativos (Gram-).

Existe una amplia variedad de microorganismos gramnegativos, pero en esta investigación solo nos enfocaremos en los géneros *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

***Escherichia coli*.**


Taxonomía.

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

El género *Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo corto anaerobio facultativo que mide entre 0,5 μm de ancho por 3 μm de largo, no forma spora, son móviles por la presencia de flagelos peritricos, estas bacterias se caracterizan por ser catalasa positivo, oxidasa negativo y por reducir nitratos a nitritos y fermentar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas. Así mismo, este género se encuentra normalmente como flora habitual del tracto gastrointestinal y poseen estructuras antigénicas complejas que producen diferentes toxinas y factores de virulencia, provocando infecciones intestinales y extra intestinales como: infecciones en el aparato excretor, vías urinarias, meningitis, septicemia entre otros. ^{(42), (43)}

Pseudomona aeruginosa

Taxonomía.

Dominio: Bacteria.	
Filo: Proteobacteria.	
Clase: Gammaproteobacteria.	
Orden: Pseudomonadales.	
Familia: Pseudomonadaceae.	
Género: <i>Pseudomona</i> .	
Especie: <i>aeruginosa</i> .	

Pseudomona aeruginosa pertenece a la familia Pseudomonadaceae, son bacilos o diplococos Gram -, aerobios no esporulados y no utiliza los hidratos de carbono, puede tolerar condiciones de alcalinidad y al igual que *Escherichia coli* puede reduce los nitratos a nitritos. En los medios de cultivo se observan colonias lisas, grandes y brillantes, produce pigmentos y tiene olor característico a fruta. Es un patógeno oportunista en inmunocomprometidos produciendo graves infecciones en vías respiratorias, vías urinarias, tejidos y septicemia. ^{(42), (43)}

II.4.2. Enfermedades causadas por las cepas bacterianas usadas en el presente estudio.

Staphylococcus aureus.

- Infecciones que resulta de la contaminación directa de una herida postoperatoria o infección después de un traumatismo (osteomielitis, meningitis)

- Infecciones de la piel y tejidos subcutáneos. Como los abscesos, forúnculos, impétigo y celulitis.
- Síndrome de shock toxico
- Enteritis tóxica
- Bacteriemias
- Endocarditis
- Infecciones urinarias. ⁽⁴²⁾

Enterococcus faecalis.

- Infecciones del tracto urinario
- Bacteriemia
- Infecciones intra-abdominales
- Endocarditis. ⁽⁴²⁾

Escherichia coli.

- Infecciones gastrointestinales
- Infecciones del tracto urinario
- Meningitis neonatal. ⁽⁴²⁾

Pseudomonas aeruginosa.

- Otitis externa
- Infección de heridas (foliculitis)
- Endocarditis

- Neumonía
- Gastroenteritis
- Septicemia.⁽⁴²⁾

II.5. Fungi.

Es un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y bacterias. Los hongos se encuentran en hábitats muy diversos: pueden ser pirófilos (*Pholiota carbonaria*) o coprófilos (*Psilocybe coprophila*). Según su ecología, se pueden clasificar en cuatro grupos: saprofitos, liquenizados, micorrizógenos y parásitos⁽⁴⁴⁾.

Tienen una gran importancia económica: las levaduras son las responsables de la fermentación de la cerveza y el pan, y se da la recolección y el cultivo de setas como las trufas. Desde 1940 se han empleado para producir industrialmente antibióticos, así como enzimas (especialmente proteasas). Algunas especies son agentes de biocontrol de plagas. Otras producen micotoxinas, compuestos bioactivos (como los alcaloides) que son tóxicos para humanos y otros animales. Las enfermedades fúngicas afectan a humanos, otros animales y plantas; en estas últimas, afecta a la seguridad alimentaria y al rendimiento de los cultivos⁽⁴⁴⁾.

Cabe agregar que las micosis más comunes en todo el mundo son ocasionadas por infecciones con hongos superficiales. El clima húmedo, la sobrepoblación y las malas condiciones higiénicas han conducido a un aumento de la prevalencia de estos patógenos, que constituyen un problema de salud pública especialmente en países tropicales⁽⁴⁵⁾.

La incidencia y la morbilidad por hongos han presentado un incremento en los últimos 20 años, en especial por el advenimiento del VIH, la quimioterapia antineoplásica, el uso de fármacos con capacidad inmunosupresora y la resistencia a los antimicóticos ^(46,47).

La resistencia de los hongos a los fármacos antimicrobianos y la toxicidad de ellos, ha producido una intensa búsqueda de moléculas nuevas, obtenidas por fuentes naturales. Una de ellas es la investigación en plantas, la cual se realiza en muchas latitudes con resultados muy promisorios pues se han encontrado, por ejemplo, efectos antimicóticos en muchos extractos vegetales utilizando diversos solventes o en los aceites esenciales ^(48,49).

En la actualidad podemos reconocer unas 200 especies “patógenas” entre aproximadamente 100.000 especies de hongos. Unas 20 de ellas pueden causar infecciones generalizadas, otras 20 se aíslan de manera regular a partir de infecciones cutáneas, y una docena se asocia con enfermedades subcutáneas graves, localizadas ⁽⁵⁰⁾.

Dentro de los hongos *Candida* es uno de los patógenos más comunes y en especial por la presentación de cuadros invasivos en pacientes inmunocomprometidos. De las infecciones nosocomiales la infección por *Candida* corresponde a la cuarta causa de diseminación por vía hematológica de los microorganismos, en especial en aquellos pacientes con factores de riesgo como el uso de catéteres centrales o con antibióticos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral total, procedimientos quirúrgicos o uso de medicamentos inmunosupresores ⁽⁵⁰⁾.

II.5.1. Género *Candida*.

Es un género de hongos unicelulares también llamados levaduras, redondas u ovaladas de 3-7 μm de diámetro, en general algunas levaduras se reproducen por fisión, otras levaduras producen micelio verdadero bajo ciertas condiciones nutricionales y ciertos hongos filamentosos pueden existir en forma unicelular o levaduriforme (dimorfismo). Son heterótrofas, que viven a expensas de otros seres vivos (levaduras parásitas) o sobre materia orgánica muerta (levaduras saprófitas). Están ampliamente distribuidas en la naturaleza; se las encuentra en las frutas, granos, miel y otros alimentos que contienen azúcar, en el suelo, aire, mar, piel y mucosa de mamíferos. Muchas de ellas son útiles para el hombre, como las que se emplean en la producción de cerveza, vino y pan; otras son perjudiciales ya que descomponen alimentos, deterioran fibras textiles o causan enfermedades en las plantas, los animales y el hombre⁽⁵⁰⁾.

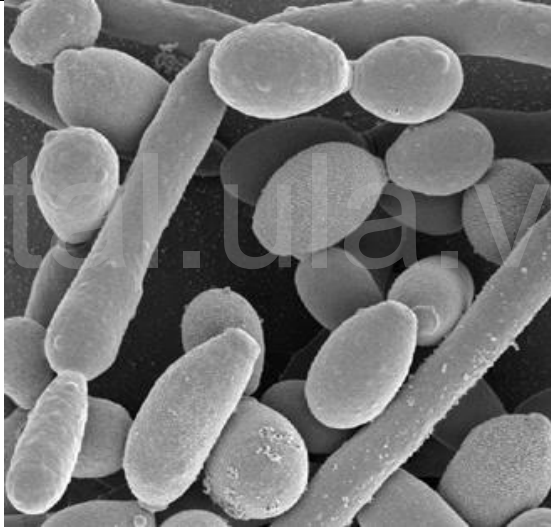
Existen más de 600 especies conocidas de levaduras, distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de las cuales solo unas pocas especies son capaces de producir enfermedades en humanos y animales. Algunas levaduras de este género que han sido aisladas por ser agentes causales de infecciones en el hombre son: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, entre otras⁽⁵⁰⁾.

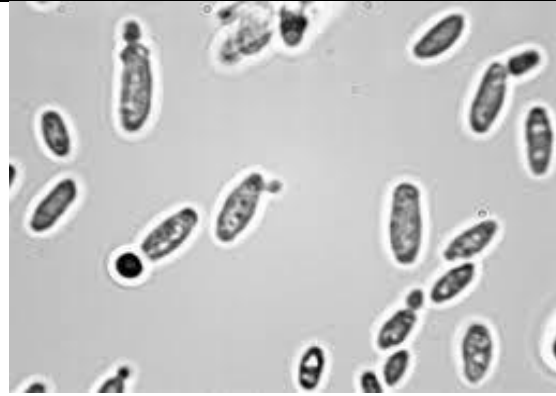
II.5.2. Candidiasis.

La candidosis o también llamada candidiasis, es una infección primaria o secundaria, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones en las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos, tracto

respiratorio alto, tracto genito-urinario y el tracto digestivo, causadas especialmente por la especie *Candida albicans*, estas infecciones se dan en cualquier edad y sexo, aunque algunos tipos particulares de candidosis afectan con mayor frecuencia a determinados grupos de personas, por ejemplo: la candidosis oral más frecuente en los lactantes, la mucocutánea crónica y la granulomatosa se observan preferentemente en preescolares, la candidosis intertriginosa en adultos obesos y diabéticos, siendo la micosis oportunista más frecuente de los seres humanos ⁽⁵⁰⁾.

Taxonomía.

Dominio: Eucaraya	
Reino: Fungi	
División: Eumycota	
Subdivisión: Deuteromycotina	
Clase: Blastomycetes	
Familia: Cryptococaceae	
Género: <i>Candida</i>	
Especie: <i>albicans</i> .	

Dominio: Eucaraya	
Reino: Fungi	
División: Eumycota	
Subdivisión: Deuteromycotina	
Clase: Blastomycetes	
Familia: Cryptococaceae	
Género: <i>Candida</i>	
Especie: <i>krusei</i> .	

La especie de *Candida* más significativa por su importancia clínica es *Candida albicans*. Esta especie es un comensal de las mucosas humanas, sobre todo de la mucosa oral, digestiva y genital ⁽⁵¹⁾.

II.5.3. Epidemiología.

Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuente en seres humanos. Su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. Las levaduras son causantes del 7,45% de las micosis, el 25% de las micosis superficiales y entre el 75 y 88% de las infecciones fúngicas nosocomiales. Afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico. Las levaduras del género *Candida* existen en la naturaleza, en el suelo y agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples. Además, son habitantes habituales del aparato digestivo, respiratorio y regiones mucocutáneas del hombre y animales domésticos. El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de *C. albicans* ⁽⁵¹⁾.

II.6. Antibióticos.

Son sustancias químicas producidas por un ser vivo o derivada sintética de ella que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles. Los antibióticos se utilizan en medicina humana, animal u horticultura para tratar infecciones provocadas por gérmenes ⁽⁴⁸⁾.

Estos compuestos son relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias. Interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado. Desde el descubrimiento de la penicilina, se han encontrado una docena de nuevos tipos de antibióticos y optimizados o sintetizados cerca de una centena ⁽⁴⁸⁾.

Dichos antibióticos pueden clasificarse o agruparse según su mecanismo de acción y espectro de acción, se encuentran los que inhiben la pared celular, proteínas, ácidos nucleicos, actividad enzimática y los que alteran la membrana ⁽⁴⁸⁾.

II.6.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular:

β -lactámicos: Son un grupo de antibióticos de origen animal o semisintéticos que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo β -lactámicos e inhiben la transcripción del péptidoglicano por unión del PBP (proteínas ligadoras de penicilina); esta familia de antimicrobianos es la más usada en la práctica clínica. Ejemplo: penicilinas, cefalosporinas (1^{era}, 2^{da} y 3^{era} generación), carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas. ⁽⁵²⁾

II.6.2. Antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas:

Los que actúan sobre la unidad 30S:

Aminoglucósidos: se unen a la proteína 12S de la subunidad 30S del ribosoma bloqueando así la formación del complejo, lo que produce una lectura errónea del mensaje, originando que la proteína sea defectuosa y el resultado sea la muerte de la bacteria. ⁽⁵²⁾

Tetraciclinas: bloquea la inserción del aminoacil-ARNt. ⁽⁵²⁾

Los que actúan sobre la unidad 50S:

Cloranfenicol: se une a la enzima peptidil transferasa, inhibiendo la acción del enlace peptídico, por lo tanto detiene la síntesis de proteínas⁽⁵²⁾.

Macrólidos y Lincosaminas: inhibe la enzima peptidil transferasa y la translocación, de tal manera que detiene la síntesis de las proteínas⁽⁵²⁾.

II.6.3. Antibióticos que inhiben la síntesis del ARN:

Rifampicina: se une al ARN polimerasa bloqueando la síntesis del ARNm. ⁽⁵²⁾

II.6.4. Antibióticos que inhiben la síntesis de ADN:

Quinolonas: inhiben el ADN girasa. ⁽⁵²⁾

II.6.5. Antibióticos que inhiben la actividad enzimática:

Sulfonamidas y Trimetoprim: intervienen en el metabolismo del ácido fólico, que es un precursor de la síntesis de las purinas, pirimidinas y aminoácidos. Se bloquea la síntesis de ácidos nucleicos y la pared celular.

Además, las sulfonamidas inhiben la enzima dihidropteroato y el trimetoprim inhibe la enzima dihidrofolato reductasa. ⁽⁵²⁾

II.6.6. Antibióticos que alteran la integridad de la membrana:

Polienos: producen poros en la membrana de la bacteria.

Polimixinas: desorganizan la membrana plasmática. ⁽⁵²⁾

II.7. Actividad Antifúngica.

Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro están relacionadas con hongos patógenos. El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico ^(53,54).

Actualmente, es necesario implementar las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos, sobre todo cuando el agente causal involucrado es una levadura de importancia médica, aislada de pacientes críticamente enfermos y con factores de riesgo para el desarrollo de una candidiasis invasora y/o diseminada, con el fin de conocer su comportamiento *in vitro*. Esto permitirá posteriormente establecer pautas terapéuticas que ayuden a minimizar la resistencia en los centros de salud ⁽⁵³⁾.

Existen medicamentos antifúngicos que actúan sobre la membrana celular del hongo, entre los cuales tenemos:

Polienos: Se han desarrollado muchos antifúngicos derivados de los polienos, de los cuales son los más importantes, la anfotericina B y la

nistatina. La anfotericina B, es un derivado de la fermentación del *Streptomyces nodosus* y la nistatina del *Streptomyces noursei*.

Los Azoles: Son antifúngicos de origen sintético que derivan en su gran mayoría del grupo químico imidazol.

Azoles Tópicos: Los azoles tópicos son derivados de los imidazoles y existen muchos de ellos en variadas formulaciones para uso tópico como cremas, cremas vaginales, polvos, lociones, óvulos. Los más importantes de uso en nuestro mercado son: Bifonazol, clotrimazol, Econazol, Flutrimazol, Miconazol, Oxiconazol, Sertaconazol, Tioconazol.

Alilaminas: Son antifúngicos de origen sintético, de los que se han desarrollado dos compuestos; la terbinafina y la naftina⁽⁵³⁾.

II.8. Métodos para determinar actividad antimicrobiana.

II.8.1. Método de difusión del disco en agar (prueba de kirby-bauer): Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica de antimicrobiano, es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. Es un método sencillo y fácil de usar en los laboratorios de rutina, que brinda información cualitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano determinado.⁽⁴³⁾

II.8.2. Método de dilución en caldo o agar: La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la

determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano. Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste. Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos.⁽⁴³⁾

II.9. Métodos para extracción de aceite esencial y extractos de *Piper aduncum*.

II.9.1. Método de extracción por Hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger.

En este método, el material a extraer está completamente sumergido en agua, la cual es calentada hasta ebullición, bien sea a través de fuego directo o a través de algún método de calefacción. En este caso, se ponen en el mismo recipiente el agua y el material a extraer (hojas cortadas), conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va

liberando el aceite esencial contenido en las hojas, y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidroddestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto de salida del hidroddestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental, se utiliza una trampa de clewenger al final del refrigerante permitiendo la separación del aceite esencial del agua condensada, el aceite se va acumulando debido a su inmiscibilidad y diferencia de densidad y viscosidad con el agua facilitando su aislamiento.⁽⁵⁵⁾

II.9.2. Método de Lixiviación o Extracción solido-liquido en columna.

Es un proceso en el que un solvente líquido se pone en contacto con un sólido pulverizado para que se produzca la disolución de los componentes del sólido. Se utiliza una columna de extracción donde se coloca el sólido (tallo pulverizado) y luego se le agrega el solvente, el material vegetal se mantiene en reposo sumergido en el líquido durante un tiempo determinado. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto puede difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido, posteriormente la muestra es filtrada llevándolo a concentrar en un rota vapor a presión reducida lo que permite que el solvente vuelva a ser evaporado obteniéndose los extractos concentrados.⁽⁵⁶⁾

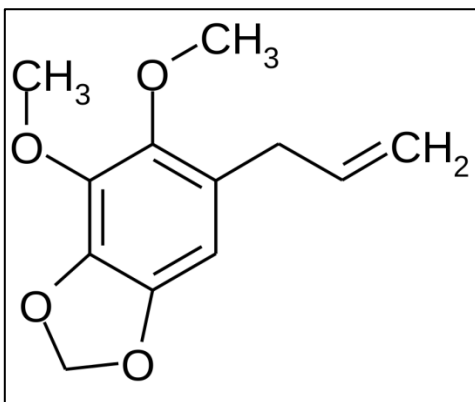
II.10. Componente mayoritario del aceite esencial y extractos de *Piper aduncum*: Dilapiol.

El dilapiol, es un metabolito secundario que está clasificado como un fenilpropanoide, es decir, es un hidrocarburo aromático, siendo su fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_4$. Este compuesto proviene de la ruta del ácido shikímico que son un conjunto de reacciones metabólicas en la biosíntesis de metabolitos secundarios. ^(14,59,64)

Dicho compuesto posee características como que es un líquido oleoso de color amarillento, se consigue en aceites esenciales y es de baja toxicidad, posee una densidad mayor a la del agua, su punto de ebullición es de 285 °C y tiene diversos usos en la medicina natural en diferentes países. ^(14,59,64)

Por otra parte, en otros estudios han demostrado su eficacia en el control de plagas agrícolas, presentando molusquicida, actividad antimicrobiana, plasmodicida, fungicida, insecticida y larvicida. ⁽³⁸⁾ Se proyecta como un compuesto económicamente ventajoso para la industria de los agroquímicos. ⁽⁶⁹⁾ Este género *Piper* es el principal proveedor de este compuesto, la especie *Piper aduncum* es uno de los más utilizados para este fin por su amplia distribución, capacidad de adaptación y posee diversos niveles de dilapiol según la región. ^(13,70)

Estructura química.



III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Recolección y Preparación del Material Vegetal.

El material vegetal utilizado de *Piper aduncum* procede de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Núcleo Mérida, Venezuela; donde se recolectaron aproximadamente dos kilogramos de la misma. La planta fue botánicamente identificada por el Biólogo Gilberto Morillo. La recolección del material vegetal para el análisis se realizó el mes Agosto del 2014.

III.2. Extracción y aislamiento del aceite.

La extracción del aceite esencial se realizó a partir del material vegetal fresco, del cual se separaron las partes aéreas (hojas); estas se licuaron y se sometieron a extracción por el método de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger durante 3 horas, obteniéndose 2ml del aceite. El aceite recolectado fue almacenado a una temperatura de 4-6°C, en un frasco hermético y resguardado de la luz. ⁽⁵⁷⁾

Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

III.3. Separación e identificación de los componentes químicos del aceite esencial.

III.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de Masas: El análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) se realizó en un equipo marca Hewlett Packard 6890 equipado con columna de fenilmetil-polixilosano de 30 m de largo x 0,25 mm de diámetro

(HP-5) y un detector de masas Hewlett Packard MSD 5973. El programa de temperatura que se requirió para este procesamiento es el siguiente: 60°C isotérmico, con un aumento de 4°C/min hasta alcanzar 260 °C. . El inyector se mantendrá a 260°C y el detector a 280°C. El volumen de muestra que se utilizó fue de 0,1µL de aceite puro. La identificación de los componentes se estableció usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición.

III.3.2. Cálculo de los índices de Kovats: Para el cálculo de los índices de Kovats se empleó un cromatografo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosystem, equipado con dos columnas: una de metil-fenil silicona de 60 metros y 0,25 mm de diámetro y otra de carbowax de 60 metros y 0,25 mm de diámetro. Se compararon los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial con patrones de una serie de n-parafinas (C7-C22).

III.4. Obtención y aislamiento de los extractos

Para la preparación de los extractos se separaron 144,0 gr de tallos molidos del material vegetal seco para macerar con el solvente a emplear según el tipo de extracto: acetona, etanol y hexano. Se utilizó una columna de extracción donde se colocó el tallo seco y a su vez se le agrego el solvente. Posteriormente se filtró al vacío el solvente llevándolo a concentrar en un rota vapor a presión reducida, obteniéndose extractos concentrados.

III.5. Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial y los extractos de *Piper aduncum*.

III.5.1. Microorganismos utilizados:

Para la evaluación de la actividad antifúngica se seleccionaron dos especies de hongos de referencia internacional pertenecientes a la colección de cultivos tipo Americano (ATCC), provenientes del cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis del Estado Mérida las cuales son:

- *Candida albicans*. (CDC-385)
- *Candida Krusei*. (ATCC 6258)

III.5.2. Preparación de los inóculos: las cepas a utilizadas se mantuvieron frescas purificadas en un medio de cultivo básico y apto para su crecimiento y con un tiempo de incubación no mayor a 24 horas, luego se tomó una pequeña cantidad de muestra de cada una de las cepas con un asa en aro brevemente estéril y se suspendió dicha muestra en una solución de cloruro de sodio al 0.85% estéril hasta que estos alcancen una turbidez equivalente al patrón 1 de Macfarlán (10^{6-8} UFC/mL).

III.6. Determinación de la actividad antifúngica por el método de difusión en agar.

III.6.1. Preparación de los discos: Se utilizaron discos de papel de filtro (3M) de diámetro 4mm, los cuales fueron impregnados con 10µL en el caso del aceite esencial y 20 µL para los extractos y el concentrado de diluciones 1:10 del aceite esencial de *Piper aduncum* concentrado y sus diferentes extractos, al igual también se utilizaron discos con los solventes acetona,

etanol y hexano para el control negativo en el caso de los extractos. Como control positivo se utilizaron discos de antifúngico comercial que inhibe el crecimiento micótico de las cepas ensayadas, los que se utilizaron fueron: Fluconazol de 100µg de la casa comercial Liofilchem s.r.l para *Candida albicans* y Voriconazol de 400µg/mL de Pfizer para *Candida krusei*.

III.6.2. Preparación de las placas e inoculación: las placas de petri se prepararon colocando 20mL de agar Mueller Hinton modificado estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente. Estas placas fueron inoculadas en forma homogénea con los inóculos micóticos antes preparados.

III.6.3. Colocación de los discos impregnados: en las placas inoculadas debidamente con cada cepa, se colocaron los discos impregnados con el aceite esencial concentrado y los diferentes extractos obtenidos, al igual se colocaron los discos de control positivo y negativo.

III.6.4. Preincubación e incubación de las placas: al ser colocados debidamente los discos impregnados con las muestras y sus respectivos controles en cada una de las placas de agar Mueller Hinton modificado e inoculadas con la cepas de los diferentes hongos a trabajar, estas serán preincubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se incubarán a 37°C por 24 horas.

III.6.5. Lectura de las pruebas: luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas serán revisadas para realizar la lectura de las mismas. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (actividad micótica) cuando se observó un halo de inhibición de crecimiento micótico alrededor del disco, y se consideró como un negativo o resistente (sin actividad micótica) la ausencia de dicho halo.

III.7. Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencia y los extractos de *Piper aduncum*.

III.7.1. Microorganismo a utilizar:

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se seleccionaron 4 especies: 2 especies de bacterias Grampositivas y 2 especies de bacterias Gramnegativas de referencia internacional perteneciente al cepario antes mencionado, las cuales son:

- Cepas Grampositivas:
 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 2. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

- Cepas Gramnegativas:
 1. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853
 2. *Escherichia coli* ATCC

III.7.2. Preparación de los inóculos.

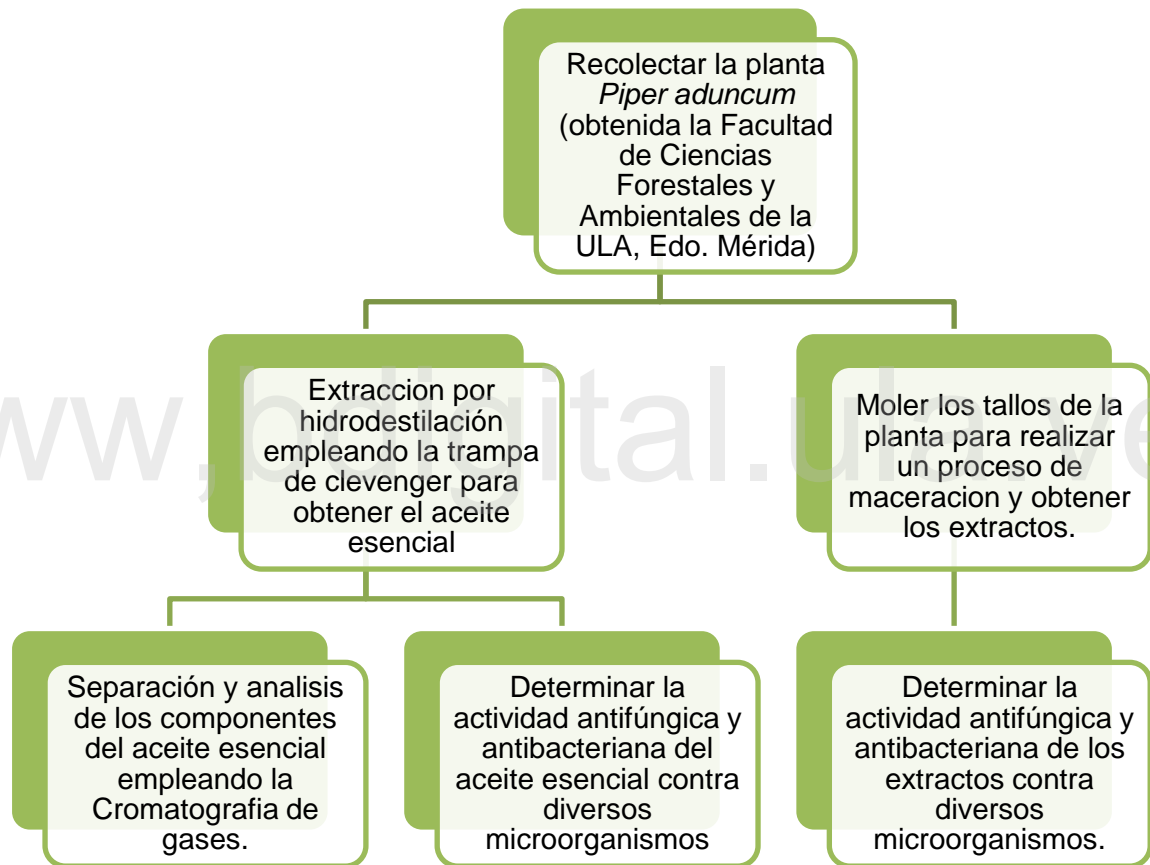
Para la elaboración de los mismos, fue necesario mantener las cepas frescas purificadas en un medio de cultivo básico con un tiempo de incubación de 24 horas. Se prepararon preinóculos con 20ml de caldo nutritivo, los cuales fueron encubados a 37 °C. a partir de estos cultivos se realizaron diluciones en solución salina y en caldo nutritivo para utilizar este último como inóculo y obtener la concentración adecuada de bacteria para el comienzo de cada ensayo, la cual debe estar en un rango de 10^6 - 10^8 UFC/ml.

III.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) fueron determinadas por el método de microdilución en medio líquido en placas de Elisa de 96 pozos, ensayando las muestras a una concentración máxima de 6400 ppm para el aceite y extractos. Para el ensayo se depositaron 200 μ L de cada muestra en caldo nutritivo, a una doble concentración de la requerida para el ensayo en los pozos de la columna 2, y 100 μ L de caldo nutritivo en las restantes para llevar a cabo diluciones seriadas a la mitad. Estas placas fueron inoculadas con 100 μ L de una suspensión de microorganismo a ensayar, realizadas a partir de preinóculos preparados anteriormente. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control se inocularon pozos carentes de muestra y con dimetilsulfóxido a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problemas. El blanco se preparó añadiendo 200 μ L de caldo nutritivo a todos los pozos de la primera columna de la placa. Se tomaron 100 μ L de cada suspensión bacteriana y se agregaron en placas de Petri a fin de conocer su concentración inicial. Tras 24 horas de incubación, a 37 °C en agitación orbital, se determinó la turbidez de los cultivos. De los pozos que mostraron poco crecimiento o turbidez, se tomaron 100 μ L para efectuar un recuento en placas de Petri con agar nutritivo con tiempo de incubación de 24 horas a 37°C, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida.

III.9. Camino metodológico.

La metodología empleada para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y los extractos obtenidos de la especie *Piper aduncum* se muestra de forma esquemática a continuación:



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El *Piper aduncum*, es una especie vegetal recolectada en los Andes Merideños, fue sometida a procesos de extracción con la finalidad de obtener su aceite esencial y extractos de acetona, etanol y hexano

El aceite esencial de *Piper aduncum* se obtuvo a partir de las hojas frescas de la planta, las cuales se sometieron a un proceso de hidroddestilación empleando la trampa de Clevenger. El aceite obtenido presentó las siguientes características físicas y organolépticas (ver tabla 1): aspecto transparente, color amarillo claro, y olor penetrante característico, el rendimiento porcentual fue de 0,33 % de acuerdo el peso en gramos de las hojas, siendo menor a el descrito en la literatura (0,56 %) ⁽⁵⁸⁾. Las diferencias pueden estar dadas, fundamentalmente, por el lugar de recolecta de la muestra, la edad, el estado fenológico de la planta y la variedad empleada para el análisis, el modo de manejo del material vegetal, en este caso seco, y el tiempo de extracción (4 horas).

Tabla 1. Características fitoquímicas.

Características	<i>Piper aduncum</i>
Aspecto	Transparente
Color	Amarillo Claro
Olor	Penetrante Característico
Peso de Hojas	600gr
Volumen del aceite	2ml
Rendimiento del aceite esencial (%)	0,33%

El análisis del aceite esencial de *Piper aduncum* se realizó por medio de un equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), el cual permitió conocer la composición química y la abundancia relativa de los principales componentes (Tabla 2). El componente mayoritario resultó ser el dilapiol (78,62 %). En la literatura se encuentran numerosos estudios acerca de la identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *P. aduncum*, recolectada en diferentes localizaciones geográficas. Trabajos realizados en Islas Fiji, Brasil, Panamá, Colombia, Cuba, Costa Rica, Ecuador y Papua Nueva Guinea, coinciden en la identificación del dilapiol como componente mayoritario (14,59,60,61,62,63,64,65,66), oscilando su abundancia relativa entre un 25,8⁽⁶⁵⁾ y un 90 %⁽⁶¹⁾. Las variaciones en el contenido de este compuesto se informan entre variedades y localidades de un mismo país⁽¹⁴⁾. También se estudiaron los componentes principales de las variedades brasileñas *P. aduncum* var. *aduncum* y *P. aduncum* var. *cordulatum* encontrando 74,5 % y 88,4 % de dilapiol respectivamente y trazas de alcanfor en la primera⁽⁶⁰⁾. Ciccio y Ballester⁽¹⁴⁾ obtuvieron que la composición de los aceites esenciales de *P. aduncum* recolectada en dos localidades de Costa Rica era diferente: dilapiol (32,9-61,8 %), piperitona (2,2-13,5 %), 1,8-cineol (0,1-8,6 %), 4-terpineol (1,6-5,4 %) y el α -cariofileno (4,0-5,3 %).

Tabla 2. Componentes del aceite esencial de *Piper aduncum*.

#	Compuesto	TR	%	IKcal	IKtab
1	2 E-Hexenol	3,56	0,23	861	862
2	2 Z-hexenol	3,69	0,33	871	867
3	beta-pineno	5,93	0,15	969	974
4	cis-ocimeno	7,41	0,82	1015	1037

5	<i>trans</i> -beta-ocimeno	7,70	2,20	1025	1044
6	beta-elemeno	18,47	0,20	1391	1384
7	beta-cariofileno	19,33	3,19	1415	1417
8	alpha-humuleno	20,36	1,27	1451	1452
9	Allo-aromadendreno	20,65	1,68	1462	1460
10	Germacreno_D	21,20	2,24	1481	1485
11	Biciclo-germacreno	21,68	5,14	1497	1500
12	beta-bisaboleno	21,92	0,27	1505	1505
13	delta-amorfene	21,98	0,55	1507	1512
14	Miristicina	22,39	1,45	1520	1517
15	germacreno B	23,44	0,61	1553	1559
16	nerolidol	23,60	0,21	1558	1561
17	Dilapiol	25,61	78,62	1616	1620
18	<i>t</i> -muurolol	26,24	0,26	1642	1640
19	Apiol	26,97	0,24	1672	1677

Tabla 2. Muestra todas las moléculas identificadas en el aceite esencial de *Piper aduncum* por medio de un equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Las discrepancias relacionadas con la composición del aceite, cambios cualitativos y cuantitativos (cantidades relativas obtenidas de diferentes

componentes), pueden ser consecuencia de variaciones en las condiciones ecológicas (clima, tipo de suelo, estación del año, lugar geográfico) en que se desarrolla la planta ⁽⁶⁷⁾.

Por otra parte, de la especie vegetal se separaron los tallos de la planta, los cuales se dejaron secar a la sombra por un periodo de una semana para luego ser molidos y pesados, obteniendo 144 gr. El material vegetal ya molido se sometió a un proceso de extracción por maceración con acetona, etanol y hexano (solventes) por medio de una columna seca a temperatura ambiente en un periodo de tiempo de 48 horas por solvente agregado. Se eluyó utilizando solventes de menor a mayor polaridad (hexano, acetona y etanol). Posteriormente se filtró el solvente en un balón para llevarlo a concentrar en un rota vapor a una temperatura de 40-50°C a 100rpm, obteniéndose extractos concentrados de acetona (500,2 mg), etanol (500,9 mg) y hexano (501,1 mg)

Los extractos fueron sometidos a un proceso de separación de componentes por medio de un equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el cual permitió conocer la composición química y la abundancia relativa de sus componentes principales, logrando separar su componente mayoritario dilapiol predominantes en los tres extractos analizados. Desde el punto de vista químico, se encuentran en la literatura estudios acerca de la identificación del dilapiol como componente mayoritario de las hojas frescas de la planta, pero según la literatura revisada no existen estudios previos como componente mayoritario del tallo de la planta *Piper aduncum* ⁽¹³⁾. En la tabla 3, se observa el resultado obtenido de los componentes del extracto acetona, donde el compuesto Dilapiol se encuentra en un 85,11%, siendo este el compuesto mayoritario de *Piper aduncum*.

Tabla 3. Componentes del extracto acetona de *Piper aduncum*.

#	Compuesto	TR	%
1	Pentadecano	7,562	3,03
2	Dilapiol	9,154	85,11
3	Ácido linoleico	14,674	4,08
4	No identificado	18,191	4,83
5	No identificado	24,425	2,94

Tabla 4. Componentes del extracto etanol de *Piper aduncum*.

#	Compuesto	TR	%
1	5-amino-4-aminocarbonil-1,2,3-thia	3,844	5,55
2	Ester metílico de 3-hidroxi-dodecano	4,721	4,32
3	Dilapiol	9,142	75,43
4	No identificado	11,743	6,09
5	Ácido tetradecanoico	12,494	3,25
6	No identificado	14,673	2,54
7	Acido 9,12-Octadecadienoico	18,707	2,83

En la tabla 4. Se observa el resultado obtenido de los componentes del extracto etanol de *Piper aduncum*, siendo el compuesto mayoritario el dilapiol con un 75,43%.

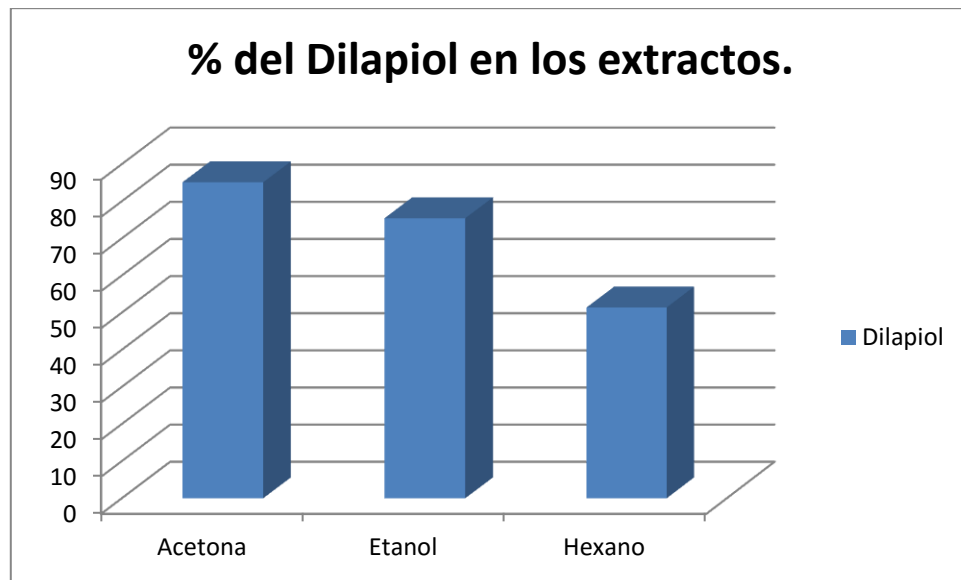
Así mismo, en la tabla 5 se observa el resultado obtenido de los componentes del extracto hexano de *Piper aduncum*, al igual que en el extracto acetona y etanol se encontró el dilapiol como compuesto mayoritario en un 51,39%.

Tabla 5. Tabla componentes del extracto hexano de *Piper aduncum*.

#	Compuesto	TR	%
1	Dilapiol	9,159	51,39
2	Ester isopropilico del ácido palmitico	13,114	4,13
3	Ácido linoleico	14,690	17,55
4	Ester etilico de ácido linoleico	14,753	9,27
5	Campesterol	23,356	3,63
6	Stigmasterol	23,721	5,05
7	No identificado	24,440	8,98

En el siguiente grafico se muestra como con la acetona se logra aislar 85% de dilapiol, mientras que con el hexano solo se logra aislar un 50% del componente y para el etanol 75% (Ver Grafica 1). Es por esto que el mejor solvente para aislar el dilapiol de los tallos es la acetona. La literatura no reporta cual solvente es ideal para aislar este compuesto.

Gráfica 1. Relación de extracción de dilapiol con los solventes empleados (hexano, acetona y etanol).



Actividad Biológica.

Actividad antifúngica.

El estudio de la actividad antifúngica del aceite esencial se realizó mediante el método de difusión del disco en agar utilizando cepas CDC y ATCC de *Candida albicans* y *Candida krusei* respectivamente, donde se observó que el aceite esencial con su componente mayoritario dilapiol (78,62%) no presento ningún tipo de actividad inhibitoria en las mismas lo cual se puede comprobar en la figuras 1 y 2.

Figura 1. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Piper aduncum* contra *Candida albicans*.



En la figura 1, se observa que el aceite esencial de *Piper aduncum* (A), no presenta ninguna actividad contra *Candida albicans*, utilizándose el Fluconazol como control positivo (F).

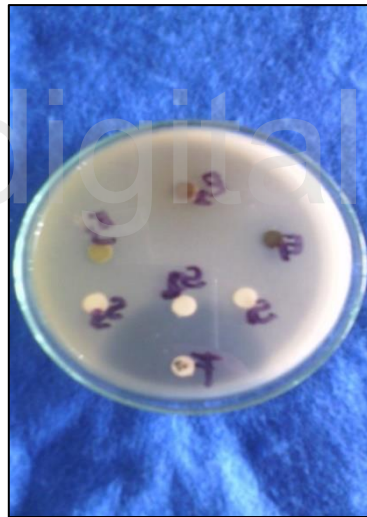
Figura 2. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Piper aduncum* contra *Candida krusei*.



De igual manera, en la figura 2 el aceite esencial de *Piper aduncum* no presenta ninguna actividad con *Candida krusei*, utilizándose el Voriconazol como control positivo (V).

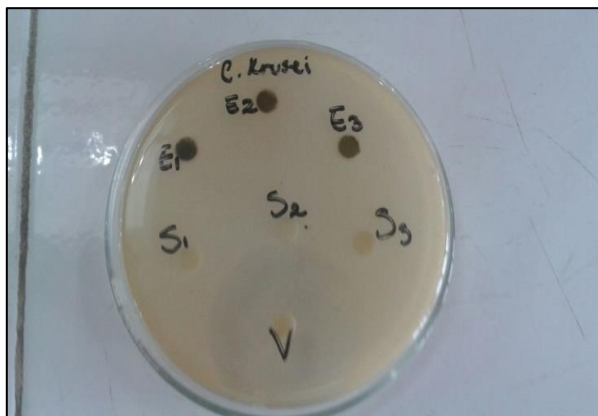
Además, se le realizó la actividad antifúngica a los extractos ensayados a una concentración de: acetona (274 mg/ml), etanol (252 mg/ml) y hexano (373 mg/ml), con la finalidad de determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual no arrojó actividad frente a las cepas de *Cándida albicans* CDC 385 y *Candida Krusei* ATCC 6258. Ver figuras 3 y 4.

Figura 3. Actividad antifúngica de los extractos de *Piper aduncum* contra *Candida albicans*.



En la figura 3, se observa que el extracto acetona (E1), extracto etanol (E2) y extracto hexano (E3) no presentaron actividad contra *Candida albicans*, utilizándose como control positivo Fluconazol (F) y como control negativo los solventes acetona (S1), etanol (S2) y hexano (S3).

Figura 4. Actividad antifúngica de los extractos de *Piper aduncum* contra *Candida krusei*.



En la figura 4, se observa que el extracto acetona (E1), extracto etanol (E2) y extracto hexano (E3) no presentaron actividad contra *Candida krusei*, utilizándose como control positivo Voriconazol (V) y como control negativo los solventes acetona (S1), etanol (S2) y hexano (S3).

Como se indicó anteriormente, estos extractos al igual que el aceite también presentaron dilapiol como componente mayoritario y al comparar estos resultados con otros estudios realizados, se conoce que el aceite esencial y los extractos de *Piper aduncum* presentan una débil actividad contra *Aspergillus flavus* y *Trichophyton mentagrophytes*⁽¹³⁾, de esta misma forma, en la literatura se encuentra que otras especies de *Piper* spp. presentan actividad significativa contra *Candida albicans*⁽¹⁷⁾.

Actividad antibacteriana.

Del mismo modo, se realizó el estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial y los extractos de la especie *Piper aduncum*, mediante el método de microdilución en placa de ELISA, utilizando cepas grampositivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y cepas gramnegativas

como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo todas estas cepas ATCC extraídas del cepario.

Este método de microdilución en placa, es utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración más baja de una sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de ser incubado por 24 horas. Así mismo, se puede determinar la concentración mínima bactericida (CMB), siendo esta la concentración mínima que impide el crecimiento de un microorganismo, siendo capaz de destruir el 99,9% del mismo.⁽⁶⁸⁾ Estas concentraciones son variables que sirven como herramientas de mucha importancia para detectar o confirmar la resistencia de microorganismos a diversos agentes antimicrobianos ya sean nuevos o conocidos.

En el estudio de la actividad antibacteriana se preparó una solución madre a una concentración de 50.000ppm para todas las muestras a estudiar tanto para el aceite esencial y extractos de *Piper aduncum*. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos partiendo de una concentración máxima de 6400ppm, las concentraciones a estudiar fueron 6400, 3200, 1600, 800 y 400; las cuales se mezclaron en los pozos con agar nutritivo y además con cada uno de los microorganismos a investigar, se dejó incubar y posteriormente se observó a simple vista el grado de turbidez presente en cada uno de los pozos con sus respectivas diluciones determinando así la CMI y CMB.

Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial y extractos de *Piper aduncum* con bacterias grampositivas.

Extracto/Bacteria.	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Extracto acetona (ppm).	1600-800	1600	6400-3200	>6400
Extracto etanol (ppm).	1600-800	1600	6400-3200	>6400
Extracto hexano (ppm).	>6400	>6400	>6400	>6400
Aceite esencial (ppm).	>6400	>6400	-	-

-: no se estudió.

Tabla 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial y extractos de *Piper aduncum* con bacterias gramnegativas.

Extracto/Bacteria.	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Extracto acetona (ppm).	-	-	>6400	>6400
Extracto etanol (ppm).	6400-3200	6400	>6400	>6400
Extracto hexano (ppm).	6400-3200	6400	>6400	>6400
Aceite esencial (ppm).	-	-	>6400	>6400

-: no se estudió.

En las tabla 6 y 7, se observan las CMI y CMB de las muestras del aceite esencial y extractos de *Piper aduncum* contra las bacterias grampositivas y gramnegativas de interés clínico utilizadas para la investigación.

www.bdigital.ula.ve

V. CONCLUSIONES.

1. Del aceite esencial de *Piper aduncum* extraído por el método de hidrodestilación, se obtuvo un rendimiento del 0,33% siendo este menor al reportado en otras investigaciones.
2. De acuerdo al análisis con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial se identificaron 19 compuestos, de los cuales los mayoritarios fueron: beta-cariofileno (3,19 %), Biciclo-germacreno (5,14 %) y Dilapiol (78,62 %).
3. Con respecto a los extractos acetona, etanol y hexano se identificó como componente mayoritario el Dilapiol en 85,11 %, 75,43 % y 51,39 % respectivamente. Sin embargo, por los resultados obtenidos se observó que el dilapiol no es el responsable de la actividad, a pesar de su alta concentración, por lo que es probable que alguno de los componentes no identificados sea el causante de este comportamiento.
4. El aceite esencial y los extractos del *Piper aduncum* no presentaron actividad antifúngica contra las levaduras *Candida albicans* y *Candida krusei*.
5. A partir de la CMI y CMB obtenidas de la actividad antibacteriana del aceite esencial y extractos de *Piper aduncum*, se encontró que la mejor respuesta fue con la bacteria *Staphylococcus aureus*, que con los extractos acetona y etanol tiene una CMB de 1600 ppm. Su respuesta fue significativa a comparación de las demás bacterias estudiadas.

6. A partir de los resultados obtenidos, la actividad antibacteriana presentada por la especie *Piper aduncum*, abre la posibilidad que esta planta sea la base para la formulación de fármacos que puedan actuar como tratamiento para atender enfermedades de importancia clínica.

www.bdigital.ula.ve

VI. REFERENCIAS.

1. Ríos J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1-2): pp. 80-84.
2. Bruneton J. *Fitoquímica y Farmacognosia. Plantas medicinales* 2001.
3. Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica*, Publicación del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Litopar, Caracas, Venezuela. 2º Edición. Colección Estudios; 2002. 60-61-558 pp.
4. S. Sengupta, A.B. Ray. "The chemistry of *Piper* species". *Fitoterapia*. 1987; 58 (3).
5. Rorig R, Leonardo, Gilsame Lino VP. Investigación Fitoquímica en especies de Piperaceae. *Revista Brasileira de Farmacia*. 1991; 72(1): pp.15-17.
6. Gualco L, Debbia E, Bandettini R. Antifungal resistance in *Candida* spp. Isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 29(2): pp. 179-184.
7. Evan G. and Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001; 411: pp. 342-348.
8. Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1996. 60: pp. 1-8.
9. Orjala, J., Aduncamide, a Cytotoxic and antibacterial beta-Phenylethylamine-derived amide from *Piper aduncum*. *NatProductLett*. 1993; 23: pp. 231-236.

10. Stashenko E. Plantas aromáticas y aceites esenciales. Bucaramanga (Colombia). Universidad Industrial de Santander. 1995.
11. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1952; 24(3): pp. 275-337.
12. Gupta MP. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Santa fé de Bogotá. Colombia. CYTED-SECAB. 1995.
13. Maia JGS, Zohhbi MGB, Andrade EHA. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. Growing wild in the Amazon region. Flavour and Fragrance Journal. 1998; 13(4): pp. 269-272.
14. Ciccío, J., Ballesteros C., Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (Piperaceae) de Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 1997. 45(2): 783-790.
15. Campos MP, Cechinel FV, Silva RZ. et al. Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper solmsianum* C. DC. VAR. *solmsianum* (Piperaceae). Z Naturforsch C. 2007 Mar-Apr; 62(3-4): pp- 173-8.
16. Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV. et al. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Dec; 98(8): pp. 1115-20.
17. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B. et al. L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. J Ethnopharmacol. 2005 Jun; 99(2): pp. 309-12.
18. Rincon S. Coy-Barrera E. Composition-antifungal activity relationships of unfractionated extracts of several *Piper* species evaluated through metabolic profiling. XXIV Congress SILAE. 2015. Pp. 29

19. Cáceres A, Jáuregui E, López BR. Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala. Universidad de San Carlos. 1992.
20. Palacios Z, Delgado G, Moreno M. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Pipertuberculatum*. Rev. Perú Biol. 2009;16(2): pp. 209–214.
21. Tebbs, MC, Kubitzk, K, Rohwe JG, y otros. The Families and Genera of Vascular Plants II. Flowering Plants – Dicotyledons 1993.
22. Jaramillo MA, Manos PS. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). Revista Americana de la botanica. 2001; 88: pp. 706-716.
23. Taylor, DR. Leslie. Technical Data Report for Matico (*Piper aduncum*, *angustifolium*) (PDF). RaintreeNutrition, Inc. 2006; pp 1-28.
24. Steyermark Julian A. Flora de Venezuela. Volumen II. Lugar: Caracas. Editorial Ed. Especial del Instituto Botánico; 1984: 619 pp.
25. Murillo A, Acevedo R, Peláez J, et al. Actividad antimicótica del aceite esencial a partir de Eucaliptos *tereticomis* sobre el hongo patógeno *Fusarium oxysporum*. Rev Cubana Farm [online] 2011 Abril- Junio. [citado el 12 de Febrero de 2014] 45 (2): pp. 264-274. Disponible desde: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475152011000200011
26. Gil P. Edison. Diseño y montaje de un equipo para la extracción de aceites esenciales a escala piloto. Revista Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. 2008: Junio; (2)
27. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA. et al. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Secondary Plant Compounds. 2002. (2)
28. Tyler V, Brady L, Robbers J. Pharmacognosy. Philadelphia 1988.

29. Dewick, PM. Medicinal Natural Products. 2^o Edition. England: British Library. 2002. 546 pp.
30. Marcano D., Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 1991: 451 pp.
31. Albornoz A. Producto Naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Lugar de publicación: Caracas. Editorial Universidad Central de Venezuela; 1980.
32. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 2da edición. Lugar de publicación: Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A; 2001.
33. UNEDCERVERA.com [Internet]. Barcelona, España: UNED. [actualizado 27 de marzo de 2004; citado 14 de Febrero de 2014]. Disponible en:
http://www.unedcervera.com/c3900038/quimica_ingenieria/cromatografia.ht
34. Skoog D, Holler J, Nieman T. Principios de Análisis Instrumental. 5ta edición. Editorial:Mc Graw Hill.2010.
35. Kováts E. Retentinsindices Aliphatischer Halogenide, alkohole, aldehyde und hetone. Helvetica Chimica Acta XLI, 1915. 1958.
36. Jimenez, G. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. Journal of Ethnopharmacology. 77. 77-83. 2001.
37. Palomino, O. Métodos analíticos para identificación de plantas medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (AEFI). 2001.
38. Celis, A., Mendoza, C., Panchón, M., Cardona, J., Delgado, W., Cuca, L. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. 26(1). Pp 97-106. 2008.

39. Olszewska, M., Michel, P. antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Productos Naturales de Investigación*. 23(16). 1507-21. 2009.
40. Gould, S., Fielder, M., Kelly, A., El Sankary, W., Naughton, D., Antimicrobial pomegranate rind extracts: enhancement by Cu(II) and vitamin C combinations against clinical isolates of *Pseudomona aeruginosa*. *British Journal of Biomedical Science*. 66(3), 129-32. 2009.
41. "Microorganismo". Microsoft® Encarta® 2006 [DVD]. Microsoft Corporation, 2005.
42. Koneman, E., Allen, S., Janda, w., Schreckenberger, P., Win, W. *Diagnostico Microbiologico. Texto y atlas Color. 5ta Edicion.* Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2001.
43. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adelberg.* México DF; 2005.
44. Ainsworth GC. *Introduction to the History of Mycology.* Cambridge, UK: Cambridge UniversityPress; 1996.
45. Martínez A, Torres JM. *Micosis que afectan piel y mucosas.* Barcelona: Ediciones Doyma; 1987:34-71.
46. Horvath R, Collignon P. Control lignintra vascular catheter infections *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003; 26: pp. 41-43.
47. Harris SD. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycology* 50. 2008; (6): pp. 823–32.
48. López H, Towers GHN. Antiviral and antimicrobial activities of colombian medicinal plants *Journal of Ethnopharmacology*. 2001. (77): pp. 189-196.

49. Cracraft J, Grifo FT. The living planet in crisis. *Biodiversityscience and policy*. 1999: pp. 159.
50. Ostrosky - Zeichnerl, Rex JH, Bennett J. Deeply invasive candidiasis. *InfectDisClin N Am*. 2002; 16: pp. 821-25.
51. Llovera V, Fernández C. Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos vaginales de *Candida* frente a clotrimazol y nistatina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2003 Dic; 55 (3): pp. 138-145.
52. Chambers, H. Antimicrobianos, consideraciones generales. Vol II. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Décima edición. McGraw-Hill. México. 2003.
53. Carlos Lumbreras, manuellizasoain, Josemaria Aguado. Antifúngicos de uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2003;21(7): pp. 366-80.
54. Kalembe, D., Kunicka, A. antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10 (10), 813-829. 2003.
55. Ferhat, M.A.; Meklati, B.Y.; Smadja, J.; Chemat, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 112, 2006, 121-126.
56. López, O.; Muñoz, A.; Carmona, R.; Torres, L.; González, M. L.; Varela, A.E.; García, J.M. y Suárez, E. . Obtención y escalado del extracto seco de *C. Officinalis* L. *Rev. Cub. de Química*. XIX (1) p. 71-73. 2007.
57. Acosta M, Gonzalez M, Araque M, Velazco E, Khouri N, Rojas L, Usubillaga A, Composicion química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *pupurensceus*, *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multiresistentes de origen nosocomial. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 2003; 45(1): 19-24.

58. Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa T.M, Demedio J, Sanabria J.L. Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* sp. Ossaunum frente a *Varroa destructor*. Revista de protección vegetal. 2011 Abr; 26(1): 52-61.
59. Smith RM, Kassim H. The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 1979;22:127-128.
60. Gottlieb OR, Koketsum M, Magalhaes MT, Maia JGS, Mendez PH, da Rocha AI, da et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. Acta Amazônica. 1981;11:143-148.
61. Gupta MP, Arias TD, Smith RM. The composition of the essential oil of *Piper aduncum* L. from Panamá. Rev Latinoamer Quím. 1983;14:36-37.
62. Díaz PP, Maldonado E, Ospina E. Aceite esencial de *Piper aduncum* L. Rev Latinoamer Quím. 1984;15:136-138.
63. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli EAM, Tognolini M. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environ Toxicol Pharmacol. 2009;27(1):39-48.
64. Rali T, Wossa SW, Leach DN, Waterman PG. Volatile Chemical Constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. Molecules. 2007;12:389-394.
65. Bottia EJ, Díaz OL, Mendivelso DL, Martínez JR, Stashenko EE. Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultánea. Scientia Et Technica. 2007; XIII(33):193-95.

66. Rafael MS, Hereira-Rojas WJ, Roper JJ, Nunomura SM, Tadei WP. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research* 2008;7(3):772-781.
67. Durán DC, Monsalve LA, Martínez JR, Stashenko EE. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Technica*. 2007;33:435-437.
68. F. McDermott, S. M. Bodeis-Jones, T. R. Fritsche, R. N. Jones, R. D. Walker, "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents." *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 43, pp. 6136, 2005.
69. Fazolin, M.; Estrela, J. L. V.; Catani, V.; Alécio, M. R.; Lima, M. S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L. , 1758. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000100017>
70. GAIA, J. M. D.; MOTA, M. G. C.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; MAIA, J. G. S. Morphologic characterization of spiked pepper's germplasm. *Horticultura Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 162-167, 2011.