



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”**



**Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Piper amalago* L. en
Cepas Gram Positivas y Gram Negativas**

Autor:
Elizabeth Carolina Morales Belandria
C.I: V- 17.831.408
Tutora:
Prof.(a): Diolimar Buitrago

Mérida, Febrero 2023

DEDICATORIA

A Dios: Agradezco cada mañana al despertar, porque me ha permitido vivir, tener un día más para comenzar y hacerlo mejor, por estar conmigo en cada paso que doy, por poner en mi vida aquellas personas que han sido mi enlace y fuerza durante todo este tiempo.

A mi Madre y Padre: A mis padres, quienes han sido mi guía para ser quien soy hoy, por su dedicación, paciencia y amor en su arduo trabajo por hacer de mí una gran persona. Gracias por todo, gracias por sus esfuerzos y consejos, son los responsables de quien soy. Los logros que consiga serán siempre por ustedes, para ustedes y gracias a ustedes.

A mi Hija: Allison, mi princesa con este logro te enseñó que nunca es tarde, que con perseverancia, enfoque y constancia los deseos se hacen realidad, agradezco a Dios por enviarte, eres mi ángel hermoso que lleno mi vida de amor.

A mis Tíos: Luis, José, Bernardo, gracias por su apoyo y ayuda incondicional, fueron parte de este logro, sin ustedes no hubiese sido posible lograrlo, de verdad Dios me premio con ustedes en mi vida.

Morales, B. Elizabeth, C.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Grado se lo dedico primeramente a Dios y al Universo por permitirnos salir adelante en todo momento. Por estar presente en cada paso que daba llenándome de sabiduría, paciencia y de su gran amor.

Este estudio es el resultado de la constancia, perseverancia y esfuerzo en conjunto de todas las personas que hicieron posible obtener el éxito, por tal motivo agradezco a la ilustre Universidad de Los Andes, a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolas Usubillaga del Hierro”, Alma Mater de nuestra profesión por la formación recibida.

A mi tutora, la Profesora Diolimar Buitrago, por compartirme sus amplios conocimientos y experiencia, por su valioso apoyo y orientación sin el cual la culminación del presente Trabajo de Grado no habría sido posible.

A los Miembros del Jurado por la extenuante revisión de estos textos y sus importantes aportes en la realización del mismo, gracias por formar parte de este Trabajo de Grado.

A todos muchas gracias y mil bendiciones.

Morales, B. Elizabeth, C.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
VEREDICTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Objetivos de la Investigación.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
Justificación de la Investigación.....	5
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
Trabajos Previos.....	7
Antecedentes Históricos.....	10
Bases Teóricas.....	12
Aceites Esenciales.....	12
Generalidades de los aceites esenciales.....	12
Clasificación de los aceites esenciales.....	12

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Pág.
Distribución de los aceites esenciales.....	14
Localización de los Aceites Esenciales	15
Propiedades Físicas de los Aceites Esenciales	16
Composición Química de los Aceites Esenciales.....	16
Usos de los Aceites Esenciales.....	19
Obtención de los Aceites Esenciales	21
Bacterias.....	26
Clasificación Bacteriana	27
Generalidades de la Familia Piperaceae	33
Características Botánicas.....	34
Usos de la familia Piperaceae	35
Estudios Químicos de la familia Piperaceae.....	36
Actividades Biológicas de la familia Piperaceae.....	36
Generalidades del Género <i>Piper</i>	36
Distribución Geográfica	36
Composición Química del Género <i>Piper</i>	37
Usos del Género <i>Piper</i>	40
Generalidades de <i>Piper amalago</i> L.....	42
Descripción Taxonómica del <i>Piper amalago</i> L.	42
Descripción Botánica <i>Piper amalago</i> L.....	42
Composición Química de <i>Piper amalago</i> L.	43
Definición Operacional de Términos	48
Operacionalización de las Variables	50
Hipótesis	51
CAPÍTULO III.....	52

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Pág.
MARCO METODOLÓGICO	52
Tipo de Investigación	52
Diseño de la Investigación	52
Población y Muestra	53
Sistema de Variables	54
Instrumento de Recolección de Datos	54
Procedimientos de la Investigación.....	55
Determinación de la actividad antibacteriana por el método de Difusión de Agar en Disco (Kirby – Bauer)	58
Prueba de Susceptibilidad Antibacteriana	58
Método de Difusión en Agar con Discos	59
CAPÍTULO IV	63
RESULTADOS Y DISCUSIONES	63
Obtención del aceite esencial de la especie <i>Piper amalago</i> L	63
Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Piper amalago</i> L.....	63
Discusiones.....	70
CAPÍTULO V	74
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES.....	75
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	76

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág
Tabla 1.	Componentes químicos de los aceites esenciales de algunas especies del género <i>Piper</i>	38
Tabla 2.	Componentes mayoritarios de <i>Piper amalago</i> L.....	44
Tabla 3.	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del aceite esencial <i>Piper amalago</i> L. en cepas Gram positivas y Gram negativas.....	50
Tabla 4.	Operacionalización de la variable independiente: Aceites esenciales de <i>Piper amalago</i> L.....	51
Tabla 5.	Microorganismos de ensayo.....	58
Tabla 6.	Antibióticos de referencia según la bacteria.....	61
Tabla 7.	Resultados de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Piper amalago</i> L.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1.	Estructura química de los terpenoides	18
2.	Distribución geográfica de la familia Piperaceae	34
3.	Estructuras químicas de algunos de los compuestos del Género <i>Piper</i>	39
4.	<i>Piper amalago</i> L.....	43
5.	Algunas estructuras químicas de la especie <i>Piper amalago</i> L.....	47
6.	Técnica de extracción: hidrodestilación.....	56
7.	Actividad antibacteriana obtenida del aceite esencial de las hojas y tallos de <i>Piper amalago</i> L. en cepas grampositivas y gramnegativas.....	65

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº		Pág.
1.	Procedimiento empleado para la obtención y análisis del aceite esencial de <i>Piper amalago</i>	57
2.	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Piper amalago</i> L. por el método de difusión en agar o método de Kirby y Bauer.....	62

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



RESUMEN

Piper amalago L. (Piperaceae) es una planta medicinal que se encuentra en América Central y del Sur que tiene actividades antiinflamatorias, antibacteriana, antilitiasis y se utiliza como agente cicatrizante para heridas, quemaduras, abscesos, furúnculos y picaduras de insectos. El objetivo de este estudio fue analizar la actividad antibacteriana de los compuestos volátiles y los posibles efectos del aceite esencial obtenido de hojas y tallos del *P. amalago* L, utilizando el método de Difusión en Agar (Kirby Bauer). El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y el análisis de actividad antibacteriana se realizó en discos de papel filtro impregnados con aceite esencial puro frente a cepas ATCC: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En el análisis de actividad antibacteriana, el aceite esencial de las hojas y tallos resultó activo frente a cepas de *S. aureus* 18 mm (hojas) y 15 mm (tallos). *E. faecalis* 10 mm (hojas) y 9 mm (tallos). *E. coli* 7 mm en aceite esencial de hojas y 7 mm en aceite esencial de tallos, *K. pneumoniae* 8 mm (hojas) y 8 mm (tallos) y *P. aeruginosa* 7 mm en aceite esencial de hojas y 8 mm en aceite esencial de tallos.

Palabras claves: *Piper amalago* L, hidrodestilación, actividad antibacteriana hojas y tallos.

INTRODUCCIÓN

El hombre se ha visto en la necesidad de buscar alimentos y medicamentos, experimentando con ellos u observando a los animales salvajes cuando discriminaban las plantas, escogiendo las adecuadas y evitando las venenosas. Al comprobar que una especie tenía acción beneficiosa sobre varios individuos, entonces se aceptaba y generalizaba su consumo (Albornoz, 1980).

Debido al aumento en la utilidad terapéutica de las plantas, la industria farmacéutica y la investigación química se han propuesto descubrir los componentes activos de las diferentes especies vegetales con el fin de combatir la gran variedad de enfermedades que hoy afectan a la humanidad (Gallegos, 2017).

Las plantas son capaces de sintetizar compuestos químicos denominados metabolitos secundarios, los cuales han demostrado actividades biológicas y farmacológicas, como por ejemplo los flavonoides considerados como agentes antimicrobianos y antioxidantes; alcaloides, quinonas con potencialidad antimicrobiana; terpenos, esteroides, taninos, saponinas y glucósidos (Avello, 2010; Marcano y Hasegawa, 2002).

Actualmente la familia Piperaceae, presenta un gran número de especies que se localizan en las zonas tropicales y subtropicales del mundo siendo el género *Piper* el más estudiado, ya que cuenta con el mayor número de especies con diferentes actividades biológicas comprobadas, como antifúngica, antibacteriana, antiinflamatorio, anticarcinogénico, antioxidante entre otras. Químicamente, se han encontrado alcaloides, amidas, lignanos, neolignanos y terpenos (Parmar, Jain, Bisht, Jain, Taneja, Jha, Tyagi, Prasad, Wengel, Olsen, y Boll, 1997).

Siendo un problema de salud pública los últimos años la resistencia de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, ha dificultado el tratamiento de ciertas infecciones intrahospitalarias y la reducción de opciones terapéuticas. La importancia de esta investigación radica en el empleo de plantas naturales para el tratamiento de diversas patologías. Las plantas pueden poseer actividad biológica y esto dependerá de los compuestos activos que estén presentes.

El proceso metodológico se basa en determinar la relación que existe entre el aceite esencial obtenido de *Piper amalago* L. y la actividad antibacteriana que presenta frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Dentro de este orden de ideas se darán a conocer los pasos que estructuran el proyecto de investigación: Capítulo I, titulado El Problema, el cual contiene el Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. Capítulo II, titulado Marco Teórico constituido por: Trabajos Previos, Antecedentes históricos o epistemológicos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables y Sistema de Hipótesis. Capítulo III; titulado Marco Metodológico, el cual explica el Tipo de Investigación, Diseño de la misma, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y el Diseño de Análisis. Posteriormente el Capítulo IV titulado, Análisis y Discusión de Resultados, y por último el Capítulo V conformado por Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Las plantas se han empleado durante siglos como agentes terapéuticos por sus compuestos químicos, se han clasificado según su origen, carácter químico, similitud estructural molecular o su acción farmacológica. De las plantas se han encontrado proteínas, vitaminas, carbohidratos, aceites, terpenos, esteroides, alcaloides, flavonoides, fenoles, éteres, saponinas, lactonas, fenilpropanoides, péptidos, nitroderivados. Estas sustancias han permitido el uso terapéutico para trastornos digestivos, febrífugos, antiinflamatorios, colorantes, analgésicos, estimulantes, condimentos, sedantes, perfumes, entre otros. En las últimas décadas, se ha dedicado una larga investigación científica para extraer y separar sustancias con propiedades biológicas o terapéuticas (Albornoz, 1980).

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), está ofreciendo a los países asistencia técnica para que elaboren sus planes de acción nacionales y refuercen sus sistemas de salud y de vigilancia, de modo que puedan prevenir y gestionar la resistencia antibacteriana. Asimismo, está colaborando con los asociados para reforzar las evidencias y formular nuevas respuestas a esta amenaza mundial (OMS, 2017).

Los puntos más resaltantes que dio a conocer la OMS son los siguientes: La resistencia a los antimicrobianos pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos (OMS, 2017).

Cada año, 480000 personas presentan bacterias multirresistentes, y la farmacorresistencia empieza a complicar también la lucha contra el Virus de Inmuno Deficiencia Adquirida (VIH) y el paludismo (OMS, 2017). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas. Están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad (OMS, 2017).

Por estas razones muchos investigadores estudian la actividad antibacteriana que puedan poseer algunas plantas, para optar a nuevas opciones terapéuticas y dar un paso delante de la resistencia de los antibacterianos.

Tomando en cuenta la preocupación mundial que existe por la resistencia antibacteriana, se realizó una revisión de las bases teóricas que sustentan esta investigación y posterior determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial *Piper amalago* L.

Dicho todo esto se formula el siguiente enunciado holopráxico.

¿Cuál será la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L. frente a cepas Gram positivas y Gram negativas?

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L. frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos Específicos

1. Obtener el aceite esencial de las hojas y tallos de *Piper amalago* L. mediante la técnica de hidrodestilación.
2. Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L. en cepas Gram positivas y Gram negativas, mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

Justificación de la Investigación

Los por qué o razones de una investigación son los que justifican el desarrollo de las fases operativas del proceso indagatorio. En tal sentido, las razones han sido categorizadas de manera variada: necesidades, inquietudes, potencialidades, intereses, entre otras (Hurtado, 2010).

En lo que respecta a las necesidades, esta investigación se realizó porque las sustancias que exhiben actividad antibacteriana, son de gran interés ante la comunidad científica para justificar el uso de productos naturales en tratamientos de diversas enfermedades, bien sea por razones económicas o disminución de los efectos, éstos, permiten de alguna manera integrar el conocimiento científico y demostrar la eficacia de la planta con información de calidad y seguridad, para mejorar la calidad de vida y contribuir de alguna manera con el problema de salud pública que se vive día a día en el país debido a la disminución de la presencia de sustancias inhibidoras de

microorganismos patógenos. Asimismo, el uso de estas plantas es de gran importancia dado a su gran variedad de principios activos el cual le confiere de propiedades de defensa que les permiten desarrollar diferentes actividades que les posibilita eliminar patógenos.

Por lo tanto, el estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L. genera nuevos conocimientos y a futuro pueda ser implementado en otro grupo de microorganismos por parte de las generaciones de relevo.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Los alcances de la investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que el autor se propone. En este sentido, el conocimiento que se pretende alcanzar nos permite comprender o confirmar el evento de estudio el cual se pretende reafirmar, y que de esta manera requiere de una explicación previa a una serie de supuestos o hipótesis, que se desean confirmar (Hurtado, 2010).

En cuanto al proceso de realización de este trabajo de investigación, el alcance fue confirmar la relación que existe entre el aceite esencial obtenido de *Piper amalago* L. y la actividad antibacteriana que posee frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Tomando en cuenta a las limitaciones, fueron dos; primero, la constante reprogramación y/o diferimiento de las actividades académicas, y segundo, los detalles técnicos causados por factores negativos y destructivos de tipo políticos-sociales-económicos que afectan la adquisición de los materiales y reactivos necesarios.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

En Brasil Gonçalves, Esmerino, Mroginski, Batista, Torres, Armstrong, y Araujo (2022) realizaron una investigación titulada: Actividad antimicrobiana e insecticida del aceite esencial de *Piper amalago* L. (Piperaceae). La familia Piperaceae tiene muchos géneros y especies de interés biológico, especialmente por su aceite esencial. La especie *Piper amalago* L. (Piperaceae), comúnmente conocida como “jaborandi manso” se ha utilizado para el tratamiento de problemas digestivos, urinarios, quemaduras, actividad antimicrobiana e insecticida. El presente estudio tuvo un carácter exploratorio con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana e insecticida presente en el aceite esencial de *P. amalago*. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y los análisis de actividad antimicrobiana se realizaron mediante la técnica de macrodilución en caldo. Para el estudio de insecticidas, discos foliares de hojas de col portuguesa (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.) se rociaron con el aceite esencial y soluciones hidroalcohólicas del aceite esencial a diferentes concentraciones y se evaluó el efecto de mortalidad y repelencia contra *Plutella xylostella*. La actividad antimicrobiana mostró la concentración inhibitoria 90 (CIM₉₀) más baja para *Enterococcus faecalis* ATCC 25912 a una concentración de 125 µg/mL, seguida de CIM₉₀ para *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Kocuria rizophyla* ATCC 9341, que fueron de 250 µg/mL, seguida de CIM₉₀ para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que fue de 1000 µg/mL. *Escherichia coli* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 10231 las CIM₅₀ fueron 1000 µg/ml. Se observó actividad insecticida a una concentración de 10 mg/mL, con 100 % de muerte (CL100) de larvas de *P. xylostella* y con efecto repelente a una concentración de 25

mg/mL. Se debe considerar el potencial económico del cultivo de la planta medicinal *P. amalago* L. ya que su aceite esencial tiene importantes actividades biológicas, entre ellas actividad insecticida y antimicrobiana de amplio espectro.

Así mismo Santos (2021), en la ciudad de Curitiba-Brasil realizó una investigación titulada: Estudio de la composición química y actividades biológicas de aceites esenciales y extracto crudo obtenido de hojas de *Piper amalago* L. recolectada en Curitiba-Brasil. El objetivo principal fue analizar la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites volátiles y los efectos biológicos inducidos por el extracto acuoso en fibroblastos murinos obtenidos de hojas de *P. amalago* L. En la muestra de aceite esencial analizada por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) se identificaron 28 compuestos que representan el 99,35 % de los constituyentes en relación al total de picos del cromatograma, entre las cuales, 20 son sesquiterpenos. Los resultados encontrados fueron que: el aceite de *P. amalago* L. mostró actividad contra las cepas *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* a una concentración de 10 µg/mL. La especie *S. aureus* se aísla con frecuencia de heridas quirúrgicas infectadas, puede representar focos para el desarrollo de infecciones sistémicas y tiene la capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a los agentes antimicrobianos. Este trabajo se relaciona con esta investigación, ya que se menciona la actividad antibacteriana del *Piper amalago* L. en Brasil.

Con respecto a lo antes mencionado, Moncayo (2021), realizó una investigación que lleva por título: Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de las partes vegetativas de *Piper marginatum* Jacq. y *P. tuberculatum* Jacq., especies

pertenecientes a la familia Piperaceae, colectados en la costa ecuatoriana. Los aceites esenciales fueron extraídos por hidrodestilación y caracterizados mediante CG-EM. La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la técnica de microdilución en caldo frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antioxidante se evaluó empleando el método de DPPH (1,1-difenil-2picril-hidrazil). El componente mayoritario en el aceite esencial de *P. marginatum* fue el curzereno (22,4 %) y el del aceite de *P. tuberculatum* fue el dilapiol (49,15 %). El aceite esencial de *P. tuberculatum* inhibió el crecimiento de *S. aureus* (CMI=50-100 µg/mL) y *E. coli* (CMI= 200-400 µg/mL), mientras que el aceite esencial de *P. marginatum* resultó ser moderadamente activo frente a dichas cepas (CMI= 400-800 µg/mL). Los porcentajes de inhibición del DPPH fueron muy limitados, menores al 50 %. Este es el primer reporte de la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* recolectados en las costas ecuatorianas. Estos resultados indicarían el potencial significativo de los aceites esenciales evaluados para el desarrollo de productos antibacterianos.

No obstante, Guayanlema y Vargas (2017), realizaron una investigación que lleva por título: Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies de la familia Piperaceae recolectadas en la provincia de Guayas-Ecuador, durante el periodo abril-agosto del 2016. El objetivo principal fue determinar la actividad de los aceites esenciales de dos especies vegetales *Piper amalago* L. y *Piper tuberculatum* frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. El procedimiento empleado fue destilación con vapor de agua, permitiendo aislar el aceite esencial con gran rendimiento de 0,4 %. Se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la

concentración mínima bactericida (CMB) frente a *Staphylococcus aureus*, dando una CMI de 200 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL para *P. amalago*, *P. tuberculatum* su CMI es de 400 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL lo que sugiere que los aceites esenciales de *P. amalago*, *P. tuberculatum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*; además la actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue evaluada frente a *Escherichia coli*, la CMI fue de 100 µg/mL y la CMB fue de 200 µg/mL para *P. amalago*, mientras que *P. tuberculatum* su CMI es de 400 µg/mL y la CMB fue de 800 µg/mL, lo que sugiere que los aceites esenciales de *P. amalago*, *P. tuberculatum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Escherichia coli*., por último la actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue evaluada frente a *Enterococcus faecalis*, la CMI fue de 200 µg/mL y la CMB fue de 800 µg/mL para *P. amalago*, mientras que para *P. tuberculatum* su CMI es de 3200 µg/mL y la CMB fue de 3200 µg/mL; lo que sugiere que el aceite esencial de *P. amalago*, presenta una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, mientras que *P. tuberculatum* no presenta ninguna actividad inhibitoria ya que su CMI supera los 1000 µg/mL. Este trabajo se relaciona con esta investigación, ya que se menciona la actividad antibacteriana del *Piper amalago* L. en Ecuador.

Antecedentes Históricos

Piper amalago L., es una planta nativa de Centro y Sur América, extremadamente resistente y de fácil propagación. En relación a su etimología *Piper amalago* L. fue descrita por Carlos Linneo y publicado en Species Plantarum en 1753 (Cardozo, 2006).

Las plantas con atributos medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el

hombre. En los papiros de Ebers, escrito hace unos 3500 años, describe enfermedades e indicaciones para solucionarlas mediante el empleo de especies vegetales (Marinoff, 2006). Hay registros del uso de las hierbas y sus extractos aplicados a la piel en el antiguo Egipto, China, India y en Medio Oriente, las plantas aromáticas, los óleos, las aguas perfumadas y los preparados vegetales eran utilizados en la cocina, en cosmética, en medicina y en las prácticas religiosas. Los romanos utilizaban extractos de limón, rosa, jazmín y sándalo para suavizar la piel (Nadinic, 2015).

Durante los siglos XII y XIII la Escuela Árabe, célebre por sus renombrados médicos, así como la de Salerno en Italia, prescribían numerosas drogas vegetales de las cuales muchas son utilizadas en la actualidad. En la Edad Media, los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria farmacia. Con el desarrollo de la química orgánica en el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos presentes en los extractos vegetales (Marinoff, 2006).

La actividad antibacteriana tiene vinculación con el descubrimiento accidental de la penicilina, el primer antibiótico utilizado en medicina, el cual fue aislado de hongos del género *Penicillium* específicamente de la especie *Penicillium notatum* por el bacteriólogo inglés Alexander Fleming en 1929, y hasta el año 1940, cuando inicio la creación de nuevos antibióticos. En 1942 se acuñó el término antibiótico por Selman Waksman para describir cualquier sustancia producida por un microorganismo que es antagónico al crecimiento de otros microorganismos en la alta dilución. Tres años más tarde se estableció la producción industrial de la penicilina (Wasserman, Busch, Whalen, Crum, y Greveline, 1999).

Bases Teóricas

Aceites Esenciales

Generalidades de los aceites esenciales.

Producto obtenido a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre de vapor, o bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los Citrus, o por destilación en seco. Posteriormente el aceite esencial se separa de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros métodos de obtención; puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos de su composición (por ejemplo, redestilación, aireación) (Bruneton, 2001).

Por tanto, los aceites esenciales de plantas proporcionan una fuente excelente de propiedades naturales biológicamente activos. Una de las características es que son generalmente líquidos aromáticos miscibles con solventes orgánicos, es así como la mayoría de los aceites son volátiles, son menos densos que el agua, inmiscibles con ella, pero suficientemente solubles para impartir su aroma tal como lo describe (Albornoz, 1980).

Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Bruneton, 2001).

Consistencia. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias
- Bálsamos

- Resinas

Las **esencias** fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Los **balsamos** son extractos naturales obtenidos de un arbusto o un árbol. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes ésteres. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.

Origen.

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como: Naturales, Artificiales y Sintéticos. De acuerdo a (Bruneton, 2001):

- Los **naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.
- Los **artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín, enriquecida con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol.
- Los aceites esenciales **sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.)

Naturaleza química

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1 %) mediante extracción, se obtiene en una forma muy

concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente (Bruneton, 2001).

El término quimiotipo llamados también razas químicas alude a la variación en la composición del aceite esencial, incluso dentro de la misma especie. Un quimiotipo es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etc.) que producen poco o ningún efecto a nivel morfológico que sin embargo producen grandes cambios a nivel de fenotipo químico (Bruneton, 2001).

Distribución de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se encuentran prácticamente en vegetales superiores. Los géneros capaces de elaborar los constituyentes que componen los aceites esenciales están repartidos en un número limitado de familias, ej.: Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae, etc. (Bruneton, 2001).

Los aceites esenciales pueden almacenarse en todos los órganos vegetales: por supuesto en las flores (bergamota, nardo), igualmente en hojas (melisa, eucalipto, laurel) y, aunque sea menos habitual, en cortezas (canela), leños (leño de rosa, sándalo), raíces (vetiver), rizomas (cúrcuma, jengibre), frutos (arañuela, anís verde, anís estrellado), semillas (nuez moscada) (Bruneton, 2001).

Aunque todos los órganos de una misma especie pueden contener aceite esencial, la composición de éste puede variar según su localización. Así, por ejemplo, en el caso del naranjo amargo (*C. aurantium* L. ssp. *aurantium*, Rutaceae) la «cáscara», es decir el pericarpio fresco del fruto, proporciona el aceite esencial de naranja amarga o «esencia de Curagao», la flor produce «esencia de Neroli» y la hidrodestilación de la hoja, ramitas y pequeños frutos da lugar a la «esencia de petit grain». La composición de estos tres aceites esenciales es diferente (Bruneton, 2001).

Cuantitativamente, los contenidos en aceite esencial son más bien bajos, frecuentemente inferiores a 10 ml/kg. Contenidos elevados como en los botones florales del clavero (150 ml/kg o más en la droga seca) son excepcionales (Bruneton, 2001).

Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales. Aunque en los aceites esenciales tanto los monoterpenoides, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal (Martínez, 2001).

Localización de los Aceites Esenciales

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 de las 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 (Bruneton, 2001).

Propiedades Físicas de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, volátiles, lo que les diferencia de los aceites «fijos», muy raramente son coloreados. En general, su densidad es inferior a la del agua (los aceites esenciales de sazafrán, clavo o canela constituyen excepciones). Poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada. Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales. Arrastrables en vapor de agua, son muy poco solubles en ella; no obstante, son lo suficientemente solubles como para comunicarle un olor neto. Esta agua es «agua destilada floral». Una preparación semejante se obtiene poniendo una disolución de aromas en agua purificada: se habla entonces de agua aromatizada floral (Bruneton, 2001).

Composición Química de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos caracterizados por orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpenoides por una parte y el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, mucho menos frecuentes, por otra. Pueden también contener diversos productos procedentes de procesos de degradación que afectan a constituyentes no volátiles (Bruneton, 2001).

Terpenoides

En los aceites esenciales se encontrarán únicamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es demasiado elevada: monoterpenos y sesquiterpenos. Como se ha visto anteriormente, la alta

reactividad de las especies catiónicas intermediarias explica la variedad estructural: se han descrito varios millares de compuestos en estas dos series (Bruneton, 2001).

Monoterpenos

Casi siempre se encuentran hidrocarburos. Éstos pueden ser acíclicos (mirceno, ocimenos), monocíclicos (α - y γ -terpineno, p -cimeno) o bicíclicos (pinenos, careno, canfeno, sabineno). A veces constituyen más del 90% del aceite esencial: (Citrus, trementinas) (Bruneton, 2001).

La reactividad de los cationes intermediarios justifica la existencia de numerosas moléculas funcionalizadas de acuerdo a Bruneton, (2001):

- Alcoholes: acíclicos (geraniol, linalol, citronelol), monocíclicos (mentol, α -terpineol, terpinen-4-ol), bicíclicos (borneol, fenchol).
- aldehidos: generalmente acíclicos (geranial, neral, citronelal).
- Cetonas: acíclicas (tagetona), monocíclicas (mentona, isomentona, carvona, pulegona), bicíclicas (alcanfor, fenchona, tuyonas).
- Ésteres: acíclicos (acetato o propionato de linalilo, acetato de citronelilo), monocíclicos (acetato de mentilo, acetato de α -terpinilo), bicíclicos (acetato de isobornilo).
- Éteres: 1,8-cineol (llamado también eucaliptol), *dill*-éter, igualmente éteres cíclicos, tetrahidrofuránicos o di- y tetrahidropiránicos que, para algunos, juegan un papel principal en el aroma de los frutos (óxidos de linalol, óxidos de rosa).
- Peróxidos: ascaridol.
- Fenoles: timol, carvacrol.

Sesquiterpenos.

Las variaciones estructurales en esta serie son de la misma naturaleza que en el caso precedente: siendo los más frecuentes hidrocarburos, alcoholes y cetonas. Conviene señalar que el alargamiento de la cadena (FPP) aumenta el número de ciclaciones posibles, de ahí la gran variedad de estructuras conocidas (se han descrito más de una centena de esqueletos diferentes). A continuación se citarán algunos ejemplos de sesquiterpenos característicos de aceites esenciales: hidrocarburos mono y policíclicos (β -bisaboleno, β -cariofileno, longifoleno), alcoholes (farnesol, carotol, (β -santalol, patchulol), cetonas (nootkatona, *cis*-longipinano-2,7-diona, β -vetivona), aldehidos (sinensales), ésteres (acetato de cedrilo) (Bruneton, 2001).

Algunas estructuras de la composición química de los aceites esenciales se muestran en la figura 1.

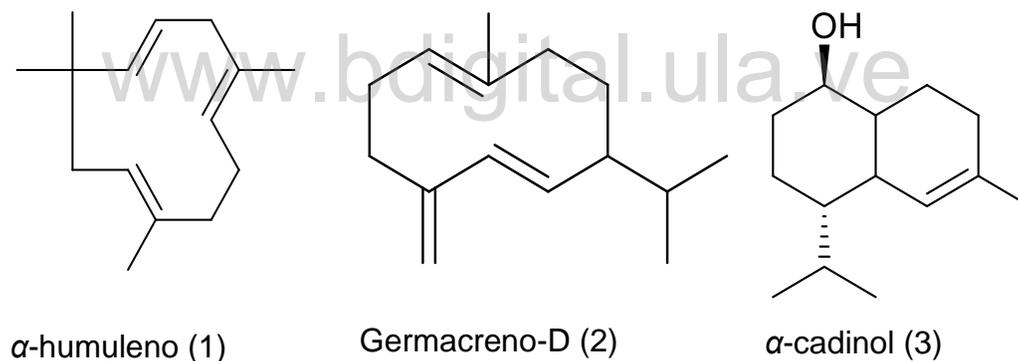


Figura 1. Estructura química de los terpenoides.

Compuestos aromáticos

Los derivados del fenilpropano son mucho menos frecuentes. Se tratan generalmente de alil y propenilfenoles (Bruneton, 2001).

Compuestos diversos

Se trata de compuestos que resultan de la transformación de moléculas no volátiles. Contribuyen a los aromas de los frutos (Bruneton, 2001).

Usos de los Aceites Esenciales

Industria Alimentaria

Aunque algunas drogas se utilizan al natural (especias y aromáticas), otras lo son en forma de aceites esenciales o de resinoides -y de oleorresinas- en dispersión, encapsuladas, en forma de complejos. Aunque, durante los últimos decenios, la refrigeración ha sustituido a las especias para asegurar la conservación de los alimentos, el desarrollo de nuevas prácticas culinarias (platos preparados, preparaciones congeladas industriales, etc.), el gusto por el exotismo (y el marketing), las cualidades gustativas (!) de los productos de una agricultura intensiva y otros factores conducen a un rápido aumento del consumo de estos aromatizantes naturales. Todos los sectores alimentarios son consumidores: alcoholes, bebidas no alcohólicas, confitería, productos lácteos, productos cárnicos, sopas, salsas, snack, productos de panadería, sin olvidar la nutrición animal (Bruneton, 2001).

Industria Farmacéutica

En su mayor parte, se utilizan estas drogas al natural, en especial para la preparación de infusiones (menta, melisa, verbena, flores de azahar, etc.) y bajo la forma de preparaciones galénicas simples. También se utilizan para la obtención de aceites esenciales, algunos de los cuales pueden tener interés medicamentoso (especialmente en el campo de los antisépticos externos) pero que, mayoritariamente, se utilizan para la aromatización de las formas

medicamentosas destinadas a la vía oral. Los aceites esenciales constituyen igualmente el soporte de una práctica de cuidados especial: la aromaterapia (Bruneton, 2001).

Industria de Perfumería

Es el mercado principal para los aceites esenciales, concretas, absolutas y otros resinoides producidos por estas drogas. También son consumidores la industria de los cosméticos y el sector de los productos de higiene, aunque el coste generalmente elevado de los productos naturales, haga que en ocasiones se prefiera, para las formulaciones de gran difusión, los productos sintéticos (Bruneton, 2001).

En el límite de la farmacia y los productos de higiene, se señalará la presencia de aceites esenciales en preparados para baños (baños «calmantes» o «relajantes»). Se indicará que existe la posibilidad de absorción percutánea de los constituyentes terpénicos (Bruneton, 2001).

Diversas Industrias

Sobre todo químicas, que utilizan todavía junto a productos de síntesis compuestos aislados: pinenos de la trementina, esclarecí, citral de *Litsea cubeta* procedente de la República Popular China, geraniol del aceite esencial de palmarrosa (*Cymbopogon martinii* [Roxb.] W. Watson [Poaceae]), (+)- y (-)-linalol, (+)-citronelal, eugenol, safrol, etc. Estas moléculas constituyen las materias primas para la síntesis de principios activos medicamentosos, vitaminas, sustancias olorosas, etc. Ej.: utilización del safrol (extraído de *Ocotea* brasileñas o de especies de *Cinnamomum* de China) para la síntesis de heliotropina utilizada en perfumería o la del butóxido de piperonilo, un sinérgico de los piretrinoideos (Bruneton, 2001).

Obtención de los Aceites Esenciales

Por Arrastre en Vapor de Agua

La **hidrodestilación simple** consiste en sumergir directamente el material vegetal a tratar (intacto u ocasionalmente triturado [turbodestilación]) en un alambique lleno de agua que a continuación se somete a ebullición. Los vapores heterogéneos se condensan sobre una superficie fría y el aceite esencial se separa por diferencia de densidad. En una variante del proceso el material vegetal se tritura *in situ* (turbo-extractor) (Bruneton, 2001).

En la **destilación con vapor saturado**, el vegetal no está en contacto con el agua: el vapor de agua se inyecta a través de la masa vegetal dispuesta sobre placas perforadas. Para acortar el tiempo de tratamiento, limitar la alteración de los constituyentes del aceite esencial y economizar energía, se puede trabajar a sobrepresión moderada (1 a 3 bar). Como consecuencia de la sobrepresión existe un aumento de la temperatura y puede sufrir la calidad del producto (Bruneton, 2001).

La **hidrodifusión** consiste en impulsar el vapor de agua a muy baja presión (0,02-0,15 bar) a través de la masa vegetal, de arriba a abajo. La composición de los productos obtenidos es desde un punto de vista cualitativo, sensiblemente diferente de lado los productos obtenidos por los métodos clásicos. El procedimiento permite ganar tiempo y energía (Bruneton, 2001).

Por expresión de los epicarpios de Citrus

El principio del método es muy simple: las «cáscaras» se dilaceran y el contenido de las glándulas secretoras que se han roto se recupera por un procedimiento físico. El procedimiento clásico consiste en ejercer, bajo una corriente de agua, una acción abrasiva sobre la superficie del fruto. Después

de eliminar los desechos sólidos, el aceite esencial se separa de la fase acuosa por centrifugación. Otros procedimientos rompen las glándulas por depresión y recogen directamente el aceite esencial, lo que evita las degradaciones debidas a la acción del agua. La mayor parte de las instalaciones permiten, de hecho, la recuperación simultánea o secuencial de zumos de frutos y de aceite esencial, siendo éste recogido mediante un chorro de agua después de la abrasión (ralladuras, punzones) antes o durante la expresión del zumo del fruto. Un tratamiento enzimático de las aguas residuales puede permitir reciclarlas y aumentar sensiblemente el rendimiento final en aceite esencial. Los aceites esenciales de Citrus se obtienen también directamente a partir de los zumos de frutos (ej.: obtención por vacío) (Bruneton, 2001).

Otros procedimientos

Desde hace algunos años, se asiste a un desarrollo de nuevas tecnologías. Este es el caso particular de la hidrodestilación por microondas a vacío. En este procedimiento, la planta se calienta selectivamente por una radiación microondas en un recinto cuya presión se reduce de forma secuencial: el aceite esencial es arrastrado en la mezcla azeotrópica formada con el vapor de agua propio de la planta tratada (sin añadir agua para los productos tratados en fresco). Es un proceso muy rápido y consume poca energía, proporciona un producto que, generalmente, es de calidad superior a la del producto de hidrodestilación tradicional (el tiempo de trabajo se reduce entre 5 y 10 veces y temperatura más baja) (Bruneton, 2001).

Disolución en Grasa (enfleurage)

Los aceites son solubles en grasas y alcoholes de alto %. Sobre una capa de vidrio se coloca una fina película de grasa y sobre ella los pétalos de flores extendidas. La esencia pasa a la grasa, así hasta saturación de la grasa.

Posteriormente con alcohol de 70°, se extrae el aceite esencial. Se emplea para flores con bajo contenido en esencias pero muy preciadas (azahar, rosa, violeta, jazmín) (Martínez, 2001).

Extracción con Disolventes Orgánicos

Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característico de muchos disolventes orgánicos volátiles (Martínez, 2001).

Extracción con Gases en Condiciones Supercríticas

Más allá del punto crítico, un fluido puede tener la densidad de un líquido y la viscosidad de un gas, por tanto una buena capacidad de difusión en los sólidos y un buen poder disolvente. Aunque en teoría se pueden utilizar varios gases, el interés se centra casi exclusivamente en el dióxido de carbono lo que se explica si se consideran sus ventajas: producto natural, químicamente inerte, ininflamable, estrictamente atóxico, fácil de eliminar totalmente, fácilmente disponible, selectivo, poco reactivo químicamente y poco costoso. Aunque los inconvenientes tecnológicos no sean despreciables (el punto crítico se sitúa a $P = 73,8$ bares y $T = 31,1^{\circ}\text{C}$) las ventajas son numerosas: capacidad de proporcionar extractos de composición muy próxima a la de los productos naturales, posibilidad de hacer variar la selectividad, la viscosidad, etc. variando la temperatura y la presión (extracción y fraccionamiento simultáneos), ausencia de hidrólisis y de reagrupamientos. Estas ventajas

explican el desarrollo actual de este procedimiento, a pesar de la lentitud de las investigaciones (Bruneton, 2001).

Método para la Determinación de la Composición Química del Aceite Esencial por Cromatografía de Gases (CG) acoplada a Espectrometría de Masas (EM)

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente Helio). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. Actualmente, las más empleadas son las columnas capilares (Gutiérrez y Droguet, 2002).

La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Existen tres técnicas básicas de inyección de muestras (líquidas o gaseosas) en columnas capilares: split, split-less y on column. Las dos

primeras consisten en inyectar y vaporizar la muestra en una cámara de vaporización. El sistema split desvía la mayor parte de la muestra fuera del sistema cromatográfico y envía sólo una pequeña fracción a la columna. El método split-less dirige toda la muestra a la columna, por lo que resulta más adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles. La inyección on column se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los compuestos termolábiles (Gutiérrez y Droguet, 2002).

En ocasiones, por ejemplo, en el caso de muestras de tejidos, se desean analizar los componentes volátiles contenidos en muestras sólidas. En tal caso, es necesario efectuar una extracción previa con un disolvente adecuado e inyectar el extracto en la columna. La extracción de espacio en cabeza (HS: "head-space") es una alternativa más rápida a la extracción en Soxhlet, que además evita la pérdida de los componentes más volátiles (Gutiérrez y Droguet, 2002).

En este método, la muestra sólida se coloca en un vial sellado con un septum y se calienta durante un tiempo determinado a la temperatura fijada. Durante esta operación, la mayor parte de los compuestos volátiles se transfieren al aire del vial, denominado espacio de cabeza. Se calienta el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio. Seguidamente, con una jeringa se toma una alícuota del aire del vial y se inyecta en el cromatógrafo. La aguja de la jeringa debe calentarse a la misma temperatura que la muestra para evitar condensaciones sobre la misma (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Los detectores espectrométricos de masas tienen por lo común varias formas de presentación de datos, que se agrupan en dos categorías: De tiempo real y reconstruido por ordenador. Dentro de cada una de estas categorías se puede elegir entre los cromatogramas que registran la intensidad

de todos los iones (una representación de la suma de las intensidades de todos los iones en función del tiempo), los cromatogramas que registran la intensidad de un ión seleccionado (una representación de la intensidad para uno o unos pocos iones en función del tiempo), y los espectrómetros de masas de diversos picos. Los espectrómetros de masa a tiempo real se presentan en la pantalla de un osciloscopio equipada con marcadores de masas; el cromatograma de masas puede presentarse en la pantalla del osciloscopio o como un gráfico a tiempo real (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

Después de completarse la separación, los cromatogramas reconstruidos por ordenador pueden presentarse en la pantalla o pueden imprimirse. Los espectros de masas reconstruidos para cada pico también se pueden presentar en pantalla o imprimir. Algunos instrumentos están equipados además con colección de espectros para la identificación de los compuestos que presenta la planta (Skoog y cols, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Bacterias

Las bacterias son algo complejas y poseen tanto ARN como ADN, una maquinaria metabólica para la autoreplicación y una pared celular de estructura más compleja. Son microorganismos procariotas, es decir, microorganismos unicelulares simples sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi o retículo endoplásmico, y se reproducen mediante división asexual (Murray, 2018).

La característica clave para clasificar la mayoría de las bacterias es sus propiedades tincionales, siendo las más importantes la tinción de Gram y las tinciones ácido-alcohol resistentes. La mayoría de las bacterias son grampositivas con una capa gruesa de peptidoglucanos (se tiñen de azul) o gramnegativas con una capa delgada de peptidoglucanos y una membrana

externa de recubrimiento (se tiñen de rosado) estas bacterias se subdividen en función de:

- Tamaño (1 a 20 μm o mayor)
- Su forma (esférica, cocos, bacilos o espiral)
- Disposición espacial de las células (unicelulares, pares, cadenas o agrupadas)
- Propiedades de crecimiento específicas: aerobias (precisan oxígeno), anaerobias (no pueden crecer en presencia de oxígeno), anaerobias facultativas (crecen en ambas atmósferas)
- Si forman o no esporas resistentes (únicamente los bacilos grampositivos son formadores de esporas) (Murray, 2018).

Clasificación bacteriana

Bacterias Gram negativas

Su pared celular es más compleja (tanto desde el punto de vista estructural como químico). Desde el punto de vista estructural, la pared celular contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática, además esta pared no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (Murray, 2018). La membrana externa de las bacterias gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos. Un ejemplo claro es *Pseudomonas aeruginosa* que presenta diferencias en la composición del lipo polisacárido y el contenido de cationes, esta bacteria presenta porinas pequeñas que impiden el paso por difusión de ciertas sustancias (Cabrera, Gomez y Zuñiga, 2007).

Escherichia coli

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

Klebsiella pneumoniae

Es una bacteria de forma bacilar, Gram negativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. La tasa de detección de adultos portadores de *K. pneumoniae* en materia fecal es de 5-38 %, y en nasofaringe entre 1 y 6 %; en los niños el estado de portador fecal puede alcanzar el 100 %. Al respecto, es importante señalar que la tasa de colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, en forma directamente proporcional a la duración de la estancia y, especialmente, a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora comensal. Es así como se han informado los siguientes porcentajes de colonización en pacientes hospitalizados: en materia fecal: 77 %; en la faringe: 19 %, y en las manos: 42 %. Esta alta frecuencia de colonización intrahospitalaria está definitivamente asociada con el uso de antibióticos de amplio espectro más que con factores asociados al cuidado de la salud (Echeverri, Rueda, Maya, Agudelo y Ospina, 2012).

Pseudomonas aeruginosa

Son bacilos Gram negativos pequeños que se disponen habitualmente en parejas. Aerobio obligado; oxidador de glucosa, requerimientos nutricionales sencillos. Las enfermedades incluyen infecciones respiratorias que comprenden desde irritación leve de los bronquios (traqueobronquitis) hasta necrosis del parénquima pulmonar (bronconeumonía necrosante), urinarias (infecciones oportunistas en pacientes con sondas urinarias permanentes y exposición a antibióticos de amplio espectro), de piel y tejidos blandos (infecciones oportunistas de heridas existentes por ejemplo quemaduras) hasta infecciones localizadas de los folículos pilosos (por ejemplo asociadas a la inmersión en aguas contaminadas como jacuzzis) oculares (infecciones oportunistas de córneas expuestas que presentan alguna lesión leve), auditivas que comprenden desde una irritación leve del oído externo (oído de nadador) hasta la destrucción invasiva de los huesos craneanos adyacentes del oído infectado, bacteriemias. Diseminación de las bacterias desde el foco de infección primaria por ejemplo pulmonar hasta otros órganos y tejidos; pueden caracterizarse por la presencia de lesiones cutáneas necróticas y endocarditis (Murray, 2018).

Bacterias Gram positivas

Posee una pared celular gruesa constituida por varias capas, formada principalmente por péptido glucano que rodea la membrana citoplasmática.

El péptido glucano es un esqueleto con forma de malla y muy poroso permitiendo la difusión de los metabolitos hacia la membrana plasmática y es considerado elemento clave para la estructura, replicación y supervivencia de las células en condiciones hostiles en las que proliferan las bacterias (Murray, 2018).

Staphylococcus aureus

Es un coco Gram positivo, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm no móvil. Agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Murray, 2018).

Enterococcus faecalis

Son cocos Gram positivos que típicamente se disponen en parejas y en cadenas cortas los cocos crecen de forma aerobia y anaerobia en un amplio intervalo de temperaturas (10-45 °C), en una amplia gama de valores de pH (4,6 a 9,9) y en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y de sales biliares. Es una bacteria inmóvil anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. No presenta una reacción con la catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno, puede producir una reacción pseudocatalasa si se cultiva en agar sangre, sin embargo esta es muy débil (Murray, 2018).

Antibióticos

Los antibióticos son moléculas derivadas del metabolismo de bacterias y hongos principalmente, pero también pueden ser compuestos obtenidos por síntesis química, para inhibir el crecimiento o destruir a microorganismos

causantes de infecciones. Actúan a bajas concentraciones y no son tóxicos para el hospedero (De La Fuente, Villareal, Díaz y García, 2015).

Los antibióticos se pueden clasificar, en dependencia de los efectos sobre las bacterias, en bacteriostáticos si inhiben el crecimiento bacteriano (efecto reversible) o bactericidas los que producen muerte o lisis bacteriana (Quiñonez, 2017).

Mecanismo de acción de los antibióticos

Los antibióticos se encuentran formados por distintos compuestos, inhiben varios procesos metabólicos o actúan sobre partes específicas de la célula bacteriana (Silva, 2018).

Entre los principales mecanismos de acción de antibióticos tenemos:

- a. Inhiben la síntesis de la pared bacteriana.
- b. Afectan la permeabilidad de la membrana celular y permiten la fuga de compuestos intracelulares.
- c. Afectan la función de las subunidades ribosomales 30 S o 50 S causando inhibición reversible de la síntesis proteínica.
- d. Perjudican el metabolismo del ácido nucleico al bloquear las enzimas bacterianas que son esenciales para la síntesis de ADN y así impiden la replicación del ADN bacteriano (Silva, 2018).

Resistencia bacteriana

Es la capacidad de las bacterias para contrarrestar el efecto de algún antibiótico; esta resistencia sobreviene cuando la bacteria sufre algún cambio que reduce o elimina la efectividad de antibiótico, compuestos químicos o cualquier otro agente destinado para curar o prevenir alguna infección. La resistencia puede ser una consecuencia evolutiva vía la selección natural, pero

también es causada por el uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos (De La Fuente, Margarita, Villareal, Diaz, y Garcia, 2015).

Es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie (Moreno, Gonzales, y Beltran, 2009).

Los fenómenos de resistencia son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales:

- **Enzimas hidrolíticas:** las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo (Moreno y cols., 2009).
- **Modificación del sitio blanco:** la modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano (Moreno y cols., 2009).
- **Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano:** cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria (Moreno y cols., 2009).
- **Bombas de eflujo:** transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antibacteriana (Moreno y cols., 2009).

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se refiere a una serie de acciones que una determinada sustancia o antibiótico puede ejercer en contra de los microorganismos. Estas acciones pueden eliminar o inhibir el desarrollo de los microorganismos patógenos. Las sustancias que presentan dicha actividad pueden ser utilizadas en terapéutica por vía general para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, por su eficacia y su ausencia de toxicidad (Pedraza y Castellano, 2009).

Existen hoy en día métodos para determinar la susceptibilidad de la actividad antibacteriana. Entre los cuales podemos mencionar: el método de difusión en disco de agar (prueba de Kirby-Bauer), método de tiras Epsilon (Etest) y el método de dilución en caldo o en agar (Concentración Inhibitoria Mínima) (García, 2000).

Difusión en Agar con Discos

Con esta técnica se dispersa el microorganismo a ensayar previamente estandarizado sobre el agar, seguidamente se colocan los discos ya impregnados con la sustancia a evaluar (antibiótico) sobre el agar ya inoculado. Transcurrida la incubación del microorganismo, se observará el área de inhibición del crecimiento que rodea a los discos. El tamaño del área de inhibición corresponderá a la actividad ejercida por el antimicrobiano, entre más susceptible sea el microorganismo mayor será el área (Murray, 2018).

Generalidades de la Familia Piperaceae

Características botánicas

La familia Piperaceae, está constituida por más de 1000 especies, las cuales se caracterizan por ser hierbas terrestres o epifitas, arboles pequeños en raras ocasiones bejucos o arbustos, de sexualidad hermafrodita, polígamos

o dioicos. Sus tallos tienen forma de nudos abultados, sus hojas segregan aceites esenciales gracias a que poseen unas células secretoras, sus flores son pequeñas, bracteadas y sus inflorescencias son en forma de espigas flexibles, poseen un ovario unicelular con un ovulo que se desarrolla en forma de fruto en baya (Paredes y Ruíz, 2014).

Distribución geográfica

Es Pantropical. La familia apenas se extiende más allá de los trópicos (Smith, Mori, Henderso, Stevenson, y Heald, 2004) Refieren que su distribución principalmente se encuentra en Centro y Sur América, pero también se puede encontrar en algunos países de Asia y África tropicales, ver figura 2. En Venezuela se encuentra distribuida en todo el territorio nacional.

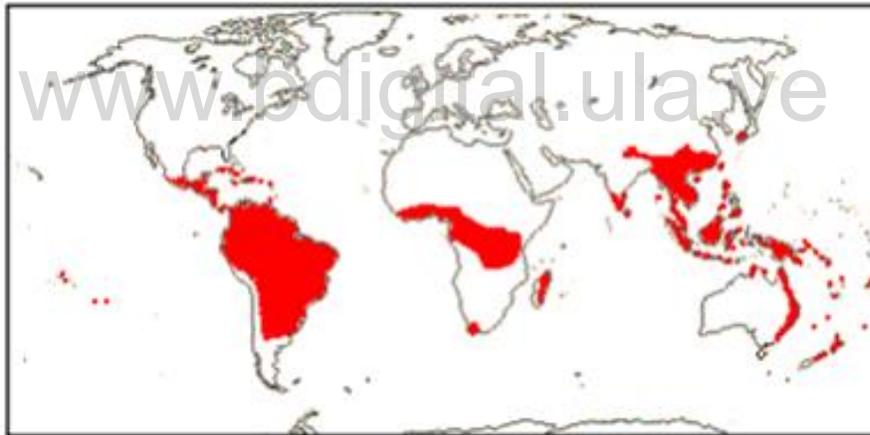


Figura 2. Distribución geográfica de la familia Piperaceae.
Tomada de: Stevens (2009).

Usos de la familia Piperaceae

La familia Piperaceae es una fuente importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antitumorales, antibacterianos y compuestos bioactivos novedosos, donde estos tienen gran importancia económica,

ecológica y medicinal, podemos encontrar que esta gran variedad de plantas son utilizadas para enfermedades asociadas con: las vías respiratorias (asma, bronquitis, y tos), el tracto digestivo (diarrea y dolor abdominal), también se han diagnosticado que la composición de estas plantas cuenta con ciertas actividades como: antiinflamatoria (reumatismo), antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica y la cicatrización de heridas) y antileucémica (Aricapa, 2011).

Una de las especies más representativas de la familia Piperaceae es la *Piper nigrum* más conocida comúnmente como la Pimienta Negra donde es utilizada como condimento por sus frutos aromáticos y picantes gracias a la presencia de piperina (Ciccio, 1996). Otras especies de esta familia han sido motivo de estudio fitoquímico tanto en Colombia como en otras partes del mundo por contener gran variedad de usos entre estos estudios podemos hablar de la raíz de *Piper methysticum* la cual es usada como bebida ya que esta posee una acción sedante, pero hay que tener en cuenta que en altas cantidades es anestésica e hipnótica esta bebida es utilizada en Asia (Novara, 1998).

En las islas del Pacífico a las raíces de *Piper methysticum* se les conoce comúnmente como kava, allí preparan una bebida refrescante, que es consumida habitualmente como tranquilizante para combatir la ansiedad. Otra de las especies más conocidas es la *Piper auritumkunth* de esta especie vegetal sus hojas son de gran utilidad por ejemplo para las afecciones de la piel; también se emplea para padecimientos como inflamación vaginal, infección de la matriz y para acelerar el parto, para este último lo preparan utilizando las hojas remojadas en alcohol. Así mismo se usa para enfermedades asociadas con el aparato digestivo, como dolor de estómago falta de apetito, diarrea e inflamación de estómago, se dice además que es un buen agente para la bronquitis, tos y para bajar fiebre (Novara, 1998).

Estudios químicos de la familia Piperaceae

Dentro de la familia Piperaceae, los metabolitos mayoritarios más destacados son polifenoles como chalconas, flavonas y flavononas, además de alcaloides, amidas, lignoides, terpenos y esteroides (Montero, 2017).

De acuerdo con estudios realizados se han aislado metabolitos pertenecientes a diferentes géneros como lo son: Sarmentosina, Chavibetol, Asaricina, Sarmentina, Decurrenal, Eupomatenoide, Sakuranetina, Galgravin, Ácido crasinervico, Hostmaniane, Piperina, Aduncamida, Piplartina (Montero, 2017).

Actividades biológicas de la familia Piperaceae

Algunos usos explorados y reportados en la literatura para especies de la familia Piperaceae son: antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, anti cancerígeno, analgésico, antiinflamatorio, antiasma, hipotensor, insecticida. Adicionalmente, varias especies de la familia Piperáceae han presentado actividad contra protozoos del género *Leishmania* (Cardona, Robledo, Rojano, Alzate, Guarín, Muñoz, y Sáez, 2013).

Generalidades del Género *Piper*

Es uno de los géneros de plantas, más importantes de los bosques neotropicales y subtropicales. Son las más extensas e importantes de la familia y cuenta con aproximadamente 1300 especies en el neotrópico y se estima en 700 especies en los trópicos del Viejo Mundo (Paredes y Ruíz, 2014).

Distribución geográfica

Al género *Piper* pertenecen alrededor de 800 especies en el neotrópico, principalmente en 5 áreas del continente americano: la Costa Pacífica de

Colombia y Ecuador, el oeste de la Amazonía del Perú y Ecuador, la Costa atlántica del Brasil y los Andes de Venezuela (Aricapa., 2011). En Ecuador este género está ampliamente distribuido, pero no se conoce el número de especies representadas; sobre 2400 m.s.n.m se han registrado 43 especies, (Ulloa y Moller, 1994). Colombia es uno de los países con mayor distribución de especies pertenecientes a este género, pues se han encontrado en gran parte del territorio colombiano, en la región Andina, principalmente en bosques húmedos y tropicales y el norte del Perú, el Sur de México y la Península de Yucatán (Beltrán, 2013).

Composición química del Género *Piper*

El género *Piper*, ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas. Este género es bien conocido como fuente de compuestos biológicamente activos como monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe, en gran medida, a la presencia de terpenoides que contienen grupos alcoholes, aldehídos y por último grupos cetónicos, que les confieren notables propiedades antimicrobianas (Guayanlema y Vargas, 2017).

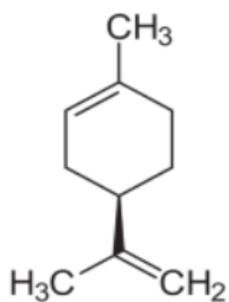
Entre los compuestos que conforma el aceite esencial del género *Piper*, que se le atribuye propiedades antibacterianas, podemos mencionar: terpenos como el safrol, α -humuleno, β - cariofileno, β -elemeno, germacreno, *p*- cimeno, γ - terpineno, mirceno, entre otros (Guayanlema y Vargas, 2017). Ver Figura 3.

En la tabla 1, se describen trabajos previos, que muestran los componentes mayoritarios del aceite esencial de algunas especies del género *Piper*.

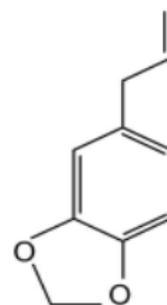
Tabla 1. Componentes químicos de los aceites esenciales de algunas especies del género *Piper*

NOMBRE	COMPUESTO	%ÁREA	PARTE	LOCALIDAD	REFERENCIA
<i>Piper amalago</i>	Sabineno	24,42	Hojas	Perú	Salamanca y Galiano (2016)
	Espatuleno	10,82			
	Santalol, E-cis, epi- β	8,28			
	Globulol	5,32			
	Cadina-1(10),4-diene	4,74			
	(+)-Ledeno	4,57			
	T-Elemeno	4,57			
	Germacreno D	4,43			
	Cariofileno	3,70			
	α -Cubebeno	3,38			
	Ylangeno	3,29			
	Copaeno	3,19			
	σ - Neocloveno	2,66			
(+) - Longifoleno	2,59				
<i>Piper acutifolium</i>	α -Copaen-11-ol	8,85	Hojas	Perú	(Salamanca y Galiano 2016)
	β -Pineno	4,30			
	Limoneno	4,23			
	Tropenol	4,11			
<i>Piper carpunya</i>	α -Copaen-11-ol	8,85	Hojas	Perú	(Salamanca y Galiano 2016)
	5,6-dimetoxibencimidazol	8,15			
	Eudesm-7(11)-en-4-ol	5,32			
	(-)-Espatuleno	5,24			
<i>Piper callosum</i>	Fitol	8,99	Hojas	Perú	(Salamanca y Galiano 2016)
	Longifolenaldehído	6,29			
	(-)-Espatuleno	5,90			
	Eudesm-7(11)-en-4-ol	5,80			
<i>Piper hispidum</i>	α -pineno	15,3	Hojas	Venezuela	(Morales, Araujo, Rojas y Rondón, (2013)
	β -pineno	14,8			
	β -elemeno	8,1			
	Óxido de cariofilleno	7,8			
<i>Piper nigrum</i>	Eugenol	3,46	Hojas	España	(Rivera., Romero y Garrido, 2021)
	Ácido octadecanoico	2,44			
	Trans-Anetol	2,19			
<i>Piper tuberculatum</i>	Dilapiol	32,32	Hojas	Ecuador	(Guayanlema y Vargas, 2017)
	(-)-espatuleno	11,37			
	α -farneseno	6,22			
	(-)-epóxido de humoleno II	6,04			
	Eudesmol	4,36			
	2-tridecanona	4,27			
<i>Piper auritum</i>	Safrol	74,29	Hojas	Cuba	(Sánchez y cols, 2009)
	σ - terpineno	6,21			
	α -terpinoleno	4,96			

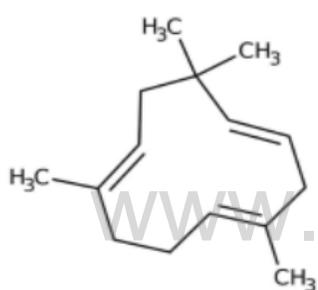
Elaborado por Morales y Buitrago (2023).



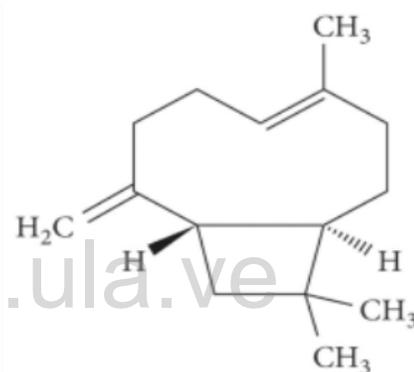
Limoneno (4)



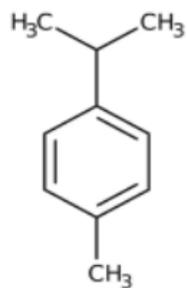
Safrol (5)



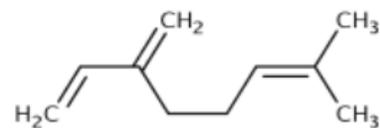
humuleno (6)



β - cariofileno (7)



p- cimeno (8)



Mirceno (9)

Figura 3. Estructuras químicas de algunos de los compuestos del Género *Piper*.

Usos del Género *Piper*

Entre los compuestos que conforma el aceite esencial del género *Piper*, que se le atribuye propiedades antibacterianas, podemos mencionar: terpenos como el safrol, α -humuleno, β -cariofileno, β -elemeno, germacreno, *p*- cimeno, γ - terpineno, mirceno, entre otros (Paredes y Ruíz, 2014).

El género *Piper*, tiene interés por su amplia utilización en la medicina tradicional de varios países, presentando una gran complejidad, tanto desde el punto de vista botánico, como químico. Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuye la propiedad analgésica, antirreumática, diurética, carminativa, estimulante, digestiva, antiulcerosa, dermatológica, antidiarreico, antihelmíntica, antiflogística y bactericida (Paredes y Ruíz, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Actividad Antibacteriana del Género *Piper*

Según Lima, Esmerino, Mroginski, Diniz, Leite, Armstrong, y Mansani, (2022). Describen que la actividad antibacteriana del género *Piper* observada fue de amplio espectro especialmente para las bacterias Gram positivas. El aceite esencial de *Piper amalago* L. mostró actividad insecticida y efecto repelente sobre larvas de *Plutella xylostella*. Los resultados indican que el aceite esencial de *Piper amalago* L. tiene un potencial insecticida y antimicrobiano por aún por explorar. La calidad de este aceite esencial, comprobada por sus efectos biológicos, mostró la posibilidad de su uso en el desarrollo de productos que ayuden en el control de plagas y en la lucha contra microorganismos patógenos.

Por otra parte, Guayanlema y Vargas (2017), refieren que la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *P. amalago* L., *P. tuberculatum* y *Piper lenticelosum* evaluada frente a *Staphylococcus aureus*, se observó que la CMI fue de 200 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL para *P. amalago* L, presentando mejores resultados que *P. tuberculatum* ya que su CMI es de 400 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL. En este sentido, mencionados autores sugieren que los aceites esenciales de *P. amalago* L., *P. tuberculatum* y *P. lenticelosum* presentan una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Asimismo algunos autores consideran la actividad antimicrobiana alta cuando los valores de CMI son inferiores a 100 µg/mL, moderada de 100 a 500 µg/mL, débil de 500 a 1000 µg/mL, o ninguna cuando es superior a 1000 µg/mL (Rondón, Velasco, Cornejo, Fernández y Morocho, 2016).

Así mismo, Salamanca y Galiano (2016) demostraron que el aceite esencial de *Piper amalago* L. presentó actividad antibacteriana significativa frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus*, ya que a una concentración del 50 % obtuvo halos de $20,25 \pm 1,77$ mm y $20,25 \pm 5,3$ mm respectivamente. Además el aceite esencial al 50 % y el extracto etanólico poseen sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* metilicina resistente con halos de $17,25 \pm 0,35$ mm y 16 ± 0 mm respectivamente. Destacaron también la sensibilidad del aceite esencial al 50 % frente a *Staphylococcus aureus* ($17,25 \pm 1,77$ mm). Ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico estudiados presentaron actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Generalidades de *Piper amalago* L.

Piper amalago L. se conoce comúnmente como: Cordoncillo Negro, Matico, Palo soldado, Condorcillo Chico, LumPom, Puchuch, Tzac al bak (Maya), pertenece a la familia Piperaceae se compone de especies herbáceas, con hojas que se encuentran alternas a lo largo del tallo, delgadas, expandidas y planas, con pequeñas flores hermafroditas discretas (Novaes y Silva, 2014).

Descripción taxonómica del *Piper amalago* L.

Reino: Plantae.

Phylum: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

Especie: *amalago* L.

Descripción Botánica *Piper amalago* L.

Arbusto alto y muy ramificado, de aproximadamente 1,5-3 m de alto o algunas veces hasta 6 m. Pecíolos cortos, glabros y vaginados solamente en la base. Hojas palmatinervias, delgadas pero muy firmes y rígidas, variables en forma, lanceolado-elípticas a ovado-elípticas o redondo-ovadas, 7-14 cm de largo y 3,5-7 cm de ancho, gradualmente o abruptamente acuminadas o largamente acuminadas, obtusas o redondeadas en la base, glabras o a veces diminutamente puberulentas en los nervios del envés. Pedúnculos delgados, de igual tamaño o incluso más grandes que el pecíolo, glabros o puberulentos. Inflorescencias delgadas en espigas solitarias, de 3-7 cm de largo o más, el raquis puberulento o hirteloso, brácteas ciliadas, algunas veces hirtelosas,

estambres cuatro, anteras reniformes, fruto glabro (Standley y Steyermark, 1952). En las figuras 4 se muestra la especie *Piper amalago* L.



Figura 4. *Piper amalago* L.
Fuente: (Morales, 2022)

Composición química de *Piper amalago* L.

Según Guayanlema y Vargas (2017), el componente mayoritario del *Piper amalago* L., es el Sabineno, con un 20,42 % (ver Tabla 2), relacionando el presente análisis con investigaciones a nivel mundial, existen estudios que indican que la presencia de este compuesto químico (Sabineno) en otras *Piper*, es uno de los componentes mayoritarios que existen científicamente.

Tabla 2. Componentes mayoritarios de *Piper amalago* L.

Componente químico	Porcentaje %
Sabineno	20,42
Espatulenol	10,82
Biciclogermacreno	8,50
Gamma- cadineno	5,06
Total compuestos	44,8

Por otra parte, del aceite esencial de *Piper amalago* L. en una provincia en Brasil, fueron elucidados un total de 21 compuestos. Los sesquiterpenos representaron el 61,9 %, los monoterpenos el 28,57 %, en su mayoría hidrocarburos monoterpénicos y los compuestos aminados el 9,52 %. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ferraz, Balbino, Zini, Ribeiro, Bordignon, y Gilsane (2010), quienes determinaron que en el aceite esencial de *Piper amalago* L predominaron los sesquiterpenos con un 46,68 % y los monoterpenos con un 38,27 %; asimismo de los sesquiterpenos los más abundantes fueron zingibereno, δ -elemeno y β -cariofileno mientras que limoneno fue el monoterpeno más abundante seguido de α -pineno. Los componentes en común con el estudio antes mencionado por Ferraz fueron τ -elemeno, cariofileno, d-limoneno, α - pineno y β -pineno. Los resultados del presente estudio también son similares a los reportados por Mota, Souza, Boone, Cardoso, y Bastos (2013), quienes determinaron la composición de los aceites esenciales de hojas, tallo, flores y raíces de *Piper amalago* L. e igualmente concluyeron que los sesquiterpenos predominaron sobre los monoterpenos.

El predominio de sesquiterpenos y monoterpenos también se evidenció en otros estudios de aceites esenciales de otras especies del género *Piper* que corroboraron sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiespasmódicas, relajantes, entre otras. Este predominio de sesquiterpenos y monoterpenos se puede indicar como responsable de la buena actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper amalago* L. obtenida en el estudio realizado por Salamanca y Galiano, (2016).

La mayoría de los análisis de aceites esenciales de *P. amalago* L. se han realizado en hojas. En donde parece haber una prevalencia de los sesquiterpenos hidrocarbonados como biciclogermacreno, β -felandreno y germacreno D, con cantidades significativas de hidrocarburos monoterpénicos como el α -pineno y otros sesquiterpenoides como el espatulenol (Dos Santos, da Silva Novaes, dos S. Polidoro, de Barros, Mota, Lima, Krause, Cardoso, Jacques, y Camkramão, 2018).

Así como lo mencionan Da Silva, da Trindade, Alves, Figueiredo, Maia y Setzer (2017), que reportan las composiciones de los aceites esenciales de inflorescencias brasileñas, demostrando diferentes compuestos químicos del aceite esencial de *Piper amalago* L. como lo son: α -aromadendreno (18,5%), silfiperfol-6-eno (13,5 %), limoneno (10,5 %), *p*-cimeno (9,3 %) y α -muurolool (5,0 %), mientras que las de las otras especies son (E)-nerolidol (14,2–19,9 %), germacreno D-4-ol (10,3–12,7 %), α -cadinol (8,2–11,1 %), β -felandreno (7,3 a 8,2 %), biciclogermacreno (3,0 a 9,1 %), τ -cadinol (4,9 a 6,1 %) y δ -cadineno (2,3 a 6,6 %).

Da Silva y cols (2017) reportan como principales componentes del aceite esencial de partes aéreas de especímenes brasileños de *P. amalago*: limoneno (20,5 %), zingibereno (11,2 %), δ -elemeno (6,8 %) y α -pineno (5,2

%). También señalan los principales componentes del aceite esencial del tallo: longifoleno (6,6 %), α -amorfenol (23,3 %) y α -muurolool (9,3 %) y el aceite esencial de las raíces: α -amorfenol (14,4 %).

Otro aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L. de Brasil fue analizado por Dos Santos, da Silva Novaes, dos S. Polidoro, de Barros, Mota, Lima, Krause, Cardoso, Jacques, y Camkramão (2018) y otra vez muestra un desglose químico diferente del aceite esencial descrito por Da Silva y cols. (2017): biciclogermacreno (12,01 %), α -cadinol (9,43 %), isocariofileno (8,32 %), γ -muurolool (8,29 %), (E)-nerolidol (5,24 %), espatulenol (4,38 %) y γ -cadineno (3,77 %). Aunque diferentes entre sí, estos aceites esenciales muestran un predominio de sesquiterpenos. Se puede observar varias de estas estructuras químicas en la figura 5.

Usos Generales del *Piper amalago* L.

Esta planta es utilizada contra los problemas cardiovasculares como la hipertensión y trastornos renales como piedras renales. Tradicionalmente el uso de *P. amalago* L. se utiliza para aliviar el dolor en el pecho y la inflamación, además el té de las hojas de *P. amalago* L. se utilizan en el tratamiento de quemaduras. Estudios científicos y farmacológicos de la especie *Piper amalago* L., han demostrado su acción anti-inflamatoria, antimicrobiana, cicatrizante y leishmanicida. Además, se ha sugerido que tiene propiedades antioxidantes, ya que contiene vitexina y lupeol que se han aislado a través de análisis Novaes., da Silva Mota., Barison., Veber., Negrão., Kassuya y de Barros. (2014).

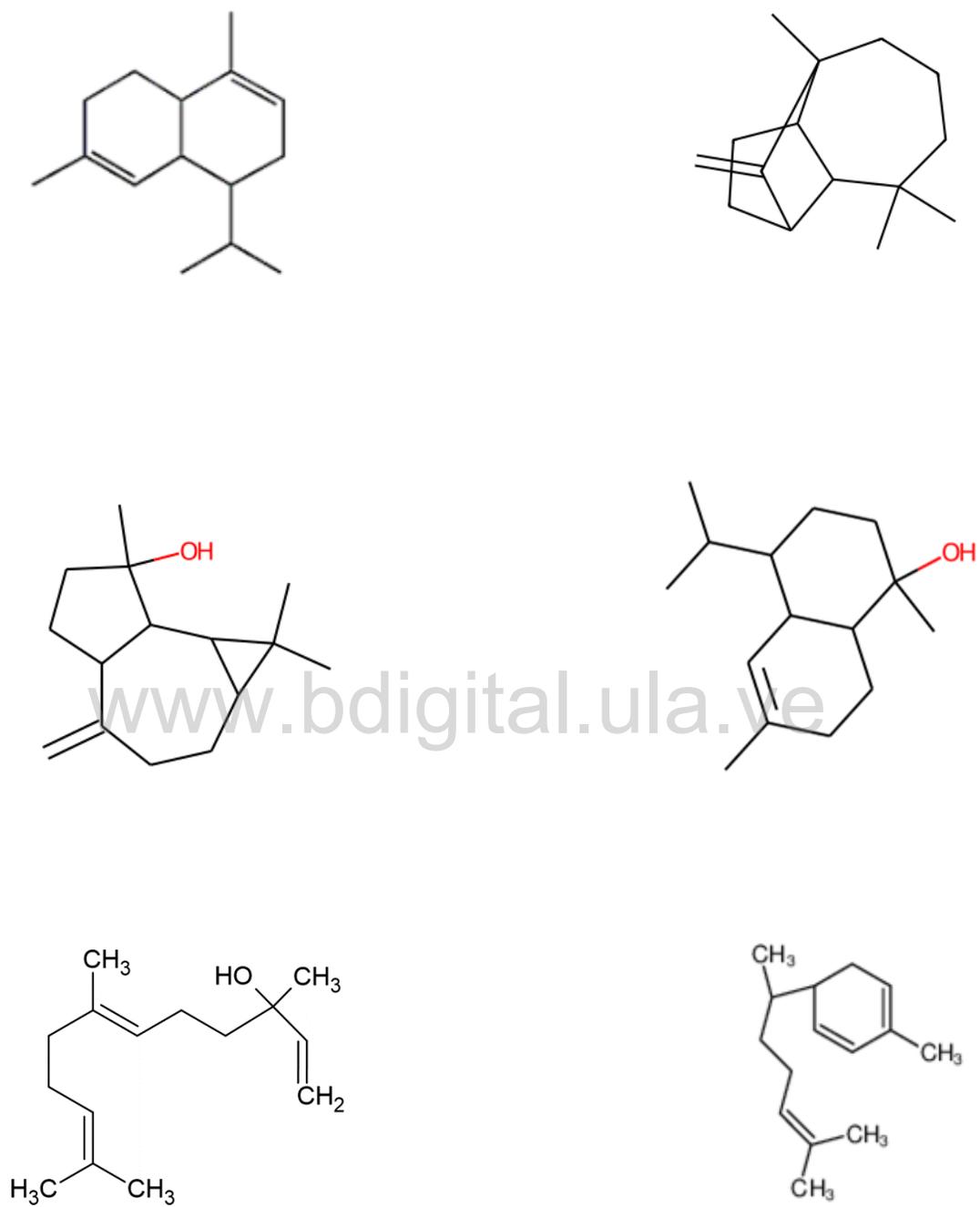


Figura 5. Algunas estructuras químicas de la especie *Piper amalago* L.

Definición Operacional de Términos

Antiséptico

Son aquellos productos químicos utilizados para la desinfección de la piel, heridas y cavidades del organismo, impide o retarda el crecimiento de los microorganismos, puede ser bactericida (matar) o bacteriostáticos (inhiben el crecimiento) de las bacterias (Silva, 2018).

Antibacteriano

Sustancias que reducen el incremento gradual del número, tamaño, complejidad y reproducción de las bacterias (Descriptores de la Ciencia de la Salud, 2003).

Bacteriostático

Impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped (Asensio, 2000).

Bactericida

Es aquella sustancia que produce la muerte a una bacteria. Los organismos secretan sustancias bactericidas como medios defensivos contra las bacterias. Provocan una reducción en la población bacteriana en el huésped o en el uso de sensibilidad microbiana. Su acción es letal sobre los microorganismos, lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados (Asensio, 2000).

Medios de cultivo

Es una sustancia o solución que permite el crecimiento de uno o más organismos. Cultivo es el producto del crecimiento de un organismo o grupo

de organismos, establecido con fines experimentales o industriales. Cultivo puro es el cultivo de un solo organismo y su progenie (French, 1980).

Concentración Mínima Inhibitoria

Es la menor concentración de antibióticos capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación (Paredes y Roca, 2004).

Concentración Mínima Bactericida

Paredes y Roca (2004) la describen como la menor concentración capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 mL de medio cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

Metabolitos secundarios

Son moléculas generadas por diversas especies vegetales. Los metabolitos son moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas pero cumplen con funciones muy importantes en el reino vegetal, puede ser una ventaja competitiva considerable sobre otros organismos. En este sentido no todos los componentes químicos elaborados por la planta, presentan el mismo uso dentro de la fitoquímica (Marcano, y Hasegawa, 2002)

Halo de inhibición

Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen, se mide la potencia del antibiótico frente al germen (Ramos, 2014).

Operacionalización de las Variables

Según Palella y Martins (2010), describen que las variables se operacionalizan para transformar los conceptos abstractos en empíricos y de esta manera poderlos medir. Por consiguiente, se operacionalizaron el evento de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L. en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Para tal fin, se consideraron las definiciones conceptuales y operacionales, así se conocen las dimensiones y los indicadores respectivos (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del aceite esencial *Piper amalago* L. en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Variable	Tipo	Definición conceptual
Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Piper amalago</i> L. en cepas Gram-positivas y Gram-negativas.	Dependiente	Capacidad antibacteriana que poseen los aceites esenciales, bien sea resistencia o sensibilidad.
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Método de difusión en agar (Kirby Bauer).	Sensibilidad	Tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.
	Sensibilidad media	
	Resistencia	

Fuente: Morales y Buitrago (2023).

Tabla 4. Operacionalización de la variable independiente: Aceites esenciales de *Piper amalago* L.

Variable	Tipo	Definición conceptual
Aceite esencial de <i>Piper amalago</i> L.	Independiente	Los aceites esenciales de plantas proporcionan una fuente excelente de propiedades naturales biológicamente activos, una de las características es que son generalmente líquidos aromáticos miscibles con solventes orgánicos, es así como la mayoría de los aceites son volátiles, son menos densos que el agua, inmiscibles con ella, pero suficientemente solubles para impartir su aroma tal como lo describe (Albornoz, 1980).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	Cromatograma	Revisión de los compuestos según antecedentes.

Hipótesis

Estudios previos de aceites esenciales indican que las especies del género *Piper* poseen actividad antibacteriana atribuida a diversos metabolitos secundarios que biosintetizan (terpenos y otros compuestos), en tal sentido, se espera que los aceites esenciales de las hojas y tallos de *Piper amalago* L. posean actividad antibacteriana.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación en general responde a objetivos específicos. Partiendo de estos, se define el tipo de investigación. En relación a la Investigación Holística ha organizado y clasificado los objetivos, así como sus correspondientes tipos de investigación. Específicamente pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, confirmativa y evaluativa. Una investigación confirmatoria requiere de una explicación previa a una serie de respuestas o hipótesis, los cuales se desean confirmar (Hurtado, 2010). Es por ello que, durante esta investigación se quiere confirmar la actividad antibacteriana que presenta el aceite esencial de *Piper amalago* L. frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

Diseño de la Investigación

Según Palella y Martins (2010), la investigación se considera tanto experimental como de laboratorio ya que es aquella el cual el investigador manipula una variable experimental no comprobada bajo condiciones estrictamente controlada. Su objetivo es describir de qué modo y por qué causa se produce o puede producirse un fenómeno y presenta las siguientes características:

- Presencia de un problema para el cual realiza una investigación bibliográfica.

- Identifica y define el problema
- Define hipótesis, variables y operacionalización de variables
- Diseño del plan experimental
- Realización del experimento

De acuerdo con lo antes expuesto, la presente investigación es de tipo confirmatoria, con un diseño experimental, donde el investigador interviene sobre las variables independientes o sobre los procesos de causa-efecto y los modifica de manera intencional y planificada para ver los efectos, pero además hace un control estricto de variables extrañas para descartar que los cambios hayan sido originados por otros factores distintos a las variables independientes (Hurtado, 2010).

Población y Muestra

La población es el conjunto de elementos que se quiere conocer o investigar algunas de sus características. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2016).

En este sentido, la unidad de investigación (población) estuvo representada por la planta *Piper amalago* L. y la subunidad de investigación (muestra) estuvo representada por las hojas y tallos de la especie *Piper amalago* L. Se recolectaron para el tamaño de la muestra 600 g, de hojas frescas y 1400 g, de tallos frescos.

Sistema de Variables

Existen diferentes tipos de variables como son: la variable dependiente, variable independiente y variable interviniente. Teniendo de esta forma que la variable dependiente es la que se modifica por acción de la variable independiente, constituye los efectos o consecuencias que se miden. En relación a la variable independiente es la causa que genera y explica los cambios en la variable dependiente y en cuanto a la variable interviniente es la que se interpone entre la variable independiente y la variable dependiente pudiendo influir en la modificación de esta última (Arias, 2016).

Las variables que guardan relación con el objetivo de la investigación son las siguientes: variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana. Variable independiente (VI): Los componentes volátiles del aceite esencial de *Piper amalago* L

Instrumento de Recolección de Datos

Una vez definido el evento de estudio y sus indicios, así como las unidades de estudio, es necesario que el investigador seleccione los instrumentos mediante los cuales obtendrá la información necesaria para llevar a cabo la investigación. Los instrumentos representan la herramienta con la cual se va a recoger, filtrar y codificar la información, es decir, el con qué. Los instrumentos, pueden estar ya elaborados e incluso normalizados, como es el caso de los test y algunas escalas. Sin embargo, si se trata de eventos poco estudiados, puede ser necesario que el investigador elabore sus propios instrumentos, y estos pueden ser listas de cotejo, escalas o cuestionarios, entre otros (Hurtado, 2010).

Procedimientos de la Investigación

Es importante que el investigador describa con detalle, paso por paso, el procedimiento que llevará a cabo durante la investigación, esta descripción permite, no sólo verificar que el procedimiento utilizado cumplió con los requerimientos metodológicos del proceso de investigación, sino además hará posible que otros investigadores puedan apoyarse en la información para investigaciones similares en otros contextos (Hurtado, 2010).

Recolección de la muestra

El material vegetal utilizado de *Piper amalago* L, se recolectó en la zona de Tovar, Municipio Tovar del estado Mérida, el día 28 de septiembre del 2022, del cual se tomó aproximadamente 2,5 kg de la planta, posteriormente se almacenó en un contenedor plástico en el refrigerador, para su posterior tratamiento y obtención del aceite esencial. El estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA.

Obtención del aceite esencial de Piper amalago L.

Para la obtención del aceite esencial de la planta en estudio se utilizó 600 g de las hojas y 1400 g de tallos del material vegetal fresco, el cual fue licuado con agua para lograr un mayor rendimiento del aceite esencial.

Una vez preparado el material vegetal, se colocó en un balón de extracción de 2 litros de capacidad. Luego se realizó el proceso de hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger. La temperatura se mantuvo a 70 °C durante 3 horas y 30 minutos, ver figura 6. Al culminar el proceso de extracción, se obtuvo el aceite esencial de la especie *Piper amalago* L. el cual presentó

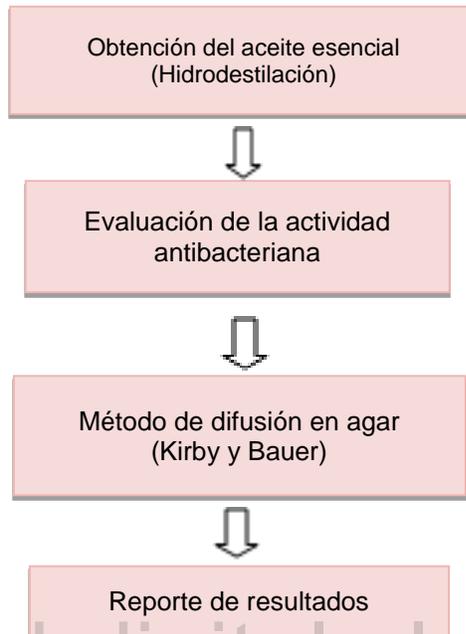
un color transparente y un aspecto claro, se le colocó sulfato de sodio anhidro para quitarle restos de humedad y se almacenó a 4 °C. en un envase estéril hermético debidamente rotulado, resguardado de la luz y el oxígeno. Ver esquema 1.



Figura 6. Técnica de Extracción: Hidrodestilación.

Fuente: Morales (2023).

Esquema 1. Procedimiento empleado para la obtención y análisis del aceite esencial de *Piper amalago* L.



www.bdigital.ula.ve

Preparación del Aceite Esencial para la Determinación de la Actividad Antibacteriana

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Piper amalago* L. se seleccionaron diferentes cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, estas fueron obtenidas del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis del Estado Mérida.

La actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar con discos. Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la

Universidad de Los Andes bajo la asesoría de la Profesora Yndra Cordero y el auxiliar de Laboratorio Emilio Salazar.

Microorganismos de ensayo

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies de bacterias Gram positivas y tres de la especie Gram negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. En la tabla 5 se muestra las bacterias empleadas para el estudio de la actividad antibacteriana de la especie *Piper amalago* L.

Tabla 5. Microorganismos de ensayo.

Cepas Gram positivas	Cepas Gram negativas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (25992)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (19433)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC (23357)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)

Determinación de la actividad antibacteriana por el método de Difusión de Agar en Disco (Kirby – Bauer)

Prueba de Susceptibilidad Antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana se empleó la técnica de difusión en agar con disco llamada también método de Kirby- Bauer, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias

desconocidas de origen vegetal con potencial antibacteriano. Se emplearon bacterias de referencia internacional: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Método de Difusión en Agar con Discos

Preparación del Inóculo: Cada inóculo bacteriano se preparó en solución salina fisiológica (SSF) estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias) (Velasco, Rojas, Salazar, Rodríguez, Díaz, Morales, y Rondón, 2007).

Preparación de las Placas: Se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton en placas de Petri (CLSI, 2020). Luego las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C hasta su uso (Velasco y cols., 2007).

Preparación de los Discos: Se emplearon discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm diámetro, los cuales se organizaron en una placa de Petri y se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda la noche previa al ensayo. Posteriormente fueron impregnados con 10 µL de aceite. (Velasco y cols., 2007).

Inoculación: Una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar con un hisopo estéril. Se colocaron los discos de papel de filtro, previamente impregnados con los aceites esenciales sobre la superficie del agar inoculado. También se colocó el disco estándar del

antibiótico de referencia como control positivo (Ver tabla 6) (Velasco y cols., 2007).

Incubación: Después de haber colocado los discos en las placas con agar Müller-Hinton éstas se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos (Preincubación); luego se incubó a 37 °C por 24 horas en posición invertida, en atmósfera aeróbica. Durante dicho tiempo las cepas inoculadas bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Velasco y cols., 2007).

Lectura de los Ensayos: Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas. La medición de los diámetros de inhibición alrededor de los discos impregnados con los aceites es producto de la acción antibacteriana y se expresaron en milímetros (Velasco, y cols., 2007).

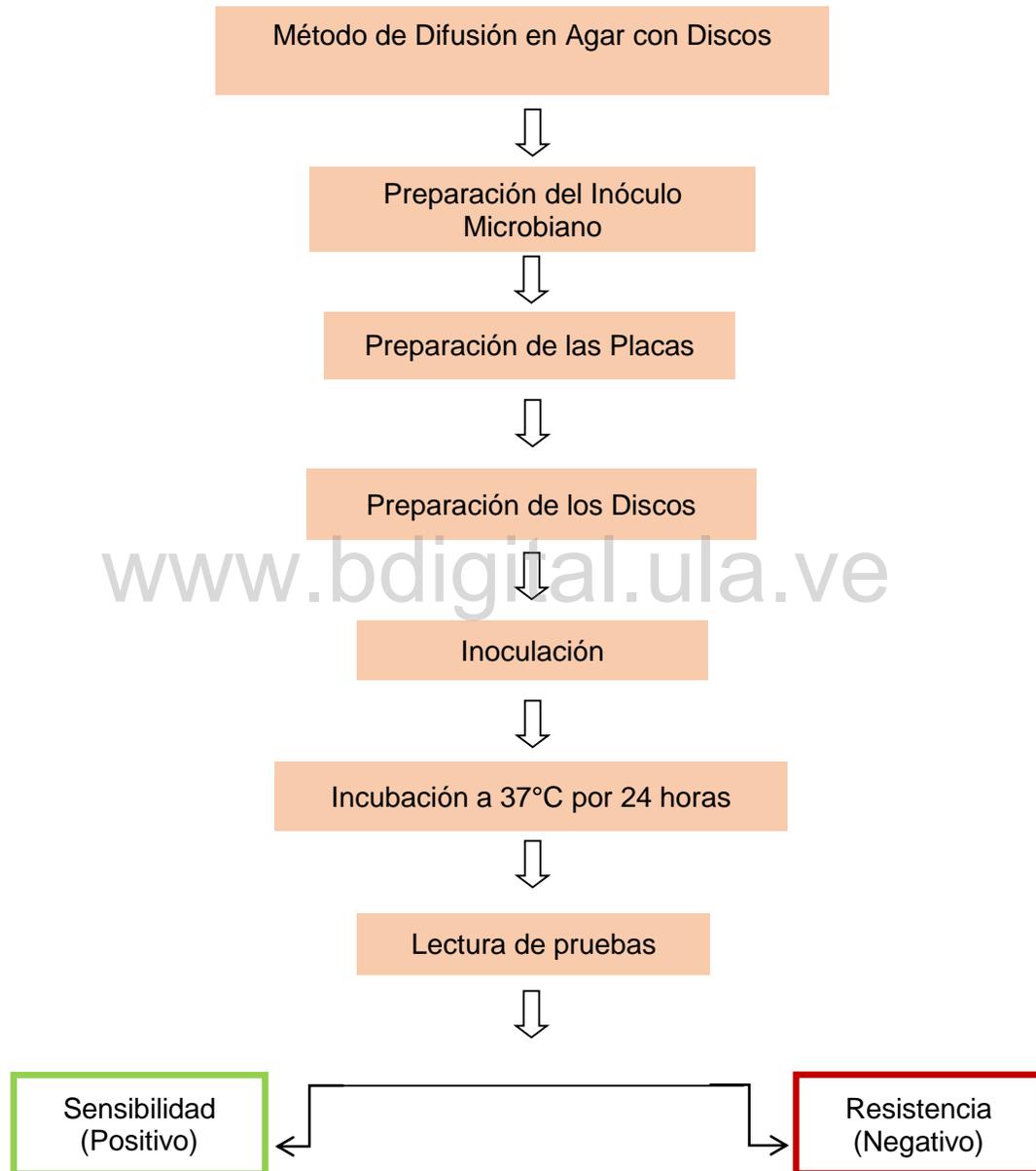
Por último, se realizó la lectura de la prueba para verificar la sensibilidad, sensibilidad media o resistencia de las diferentes cepas bacterianas utilizadas. Se considera como resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) cuando un halo de inhibición del crecimiento bacteriano se observa alrededor del disco. En caso contrario, la ausencia de dicho halo se interpretará como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana).

Todos estos pasos se pueden observar en el esquema 2.

Tabla 6. Antibióticos de referencia según la bacteria

Bacterias	Compuesto de referencia
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	Eritromicina 15 µg
<i>E. faecalis</i> ATCC (19433)	Ampicilina 10 µg
<i>E. coli</i> ATCC (25992)	Piperacilina 100 µg
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	Piperacilina 100 µg
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	Piperacilina 100 µg

Esquema 2. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L. por el método de difusión en agar o método de Kirby y Bauer.



Fuente: Morales y Buitrago (2023)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención del aceite esencial de la especie *Piper amalago* L.

Durante el proceso de extracción del aceite esencial de las hojas y tallos de la especie *Piper amalago* L., de 600 g de las hojas se obtuvo (1 mL) y de 1400 g de los tallos se obtuvo (0,4 mL), los cuales presentaron las siguientes características: color transparente, aspecto claro, un rendimiento de (0,16 %) para el aceite esencial obtenido de las hojas; y color amarillo, aspecto turbio, un rendimiento de (0,06 %) para el aceite esencial obtenido de los tallos.

Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper amalago* L.

Se determinó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Piper amalago* L. obtenidas de las hojas y tallos frente a bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC (25923) y *Enterococcus faecalis*) ATCC (19433) y gramnegativas (*Escherichia coli* ATCC (25992), *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), interpretando los resultados por medio del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

Las lecturas arrojadas en el ensayo con el aceite esencial puro de las hojas fueron las siguientes: para las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) 18 mm, *Enterococcus faecalis* ATCC (19433) 10 mm. Mientras que para las cepas Gram negativas *Escherichia coli*

ATCC (25992) 7 mm, *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357) 8 mm y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) 7 mm y en el ensayo con el aceite esencial puro de los tallos fueron las siguientes: para las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) 15 mm, *Enterococcus faecalis* ATCC (19433) 9 mm. Mientras que para las cepas Gram negativas *Escherichia coli* ATCC (25992) 7 mm, *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357) 8 mm y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) 8 mm (Ver Figura 7). En la tabla 7 se muestra la actividad del aceite esencial puro y los controles positivos.

Tabla 7. Resultados de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Piper amalago* L.

Bacterias	Aceite esencial de <i>P. amalago</i> L. Hojas	Aceite esencial <i>P. amalago</i> L. Tallos	Control positivo
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	18 mm	15 mm	32 mm E 15 µg
<i>E. faecalis</i> ATCC (19433)	10 mm	9 mm	32 mm AMP 10 µg
<i>E. coli</i> ATCC (25992)	7 mm	7 mm	27 mm PIP 100 µg
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	8 mm	8 mm	27 mm PIP 100 µg
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	7 mm	8 mm	27 mm PIP 100 µg

Leyenda: E: Eritromicina; AMP: Ampicilina; PIP: Piperacilina

Las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Enterococcus faecalis* ATCC (19433) presentaron mayor actividad. En las bacterias Gram negativas para *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357) la actividad fue igual que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853). Mientras que *Escherichia coli* ATCC (25992) la actividad fue menor.

Figura 7. Actividad antibacteriana obtenida del aceite esencial de las hojas y tallos de *Piper amalago* L. frente a cepas Gram positivas y Gram negativas

Staphylococcus aureus

ATCC (25923)

3. A.E. Hojas: 18 mm

4. A.E. Tallo: 15 mm



Enterococcus faecalis

ATCC (19433)

3. A.E. Hojas: 10 mm

4. A.E. Tallo: 9 mm

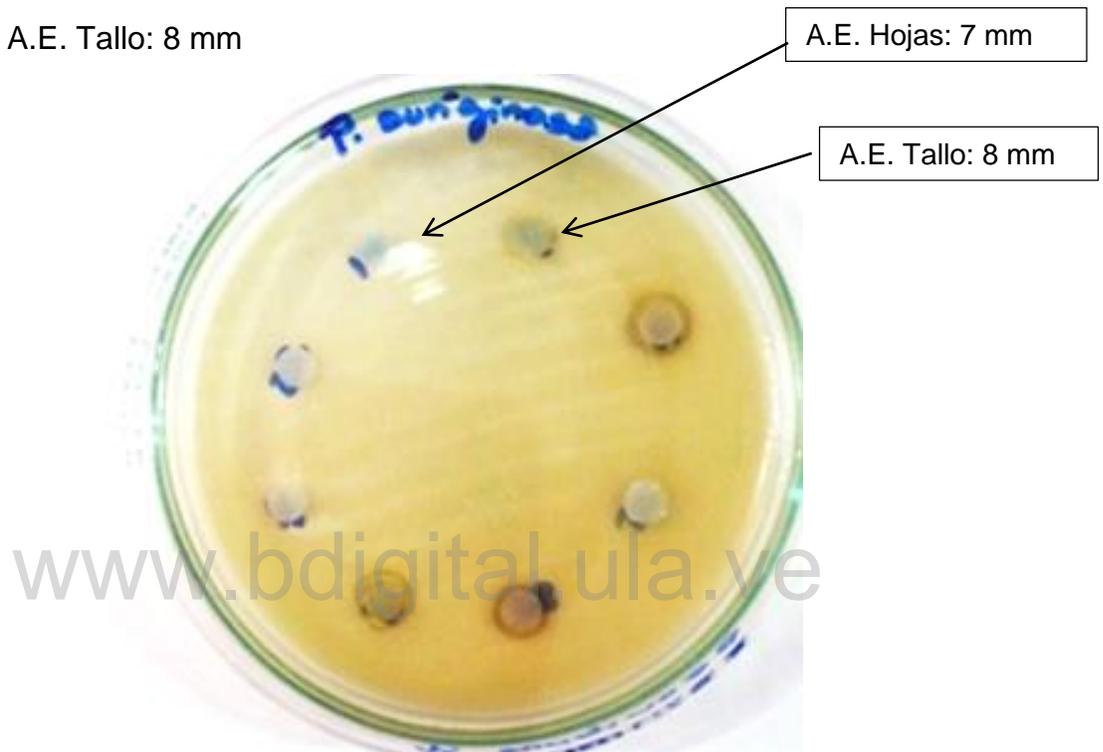


Pseudomonas aeruginosa

ATCC (27853).

3. A.E. Hojas: 7 mm

4. A.E. Tallo: 8 mm

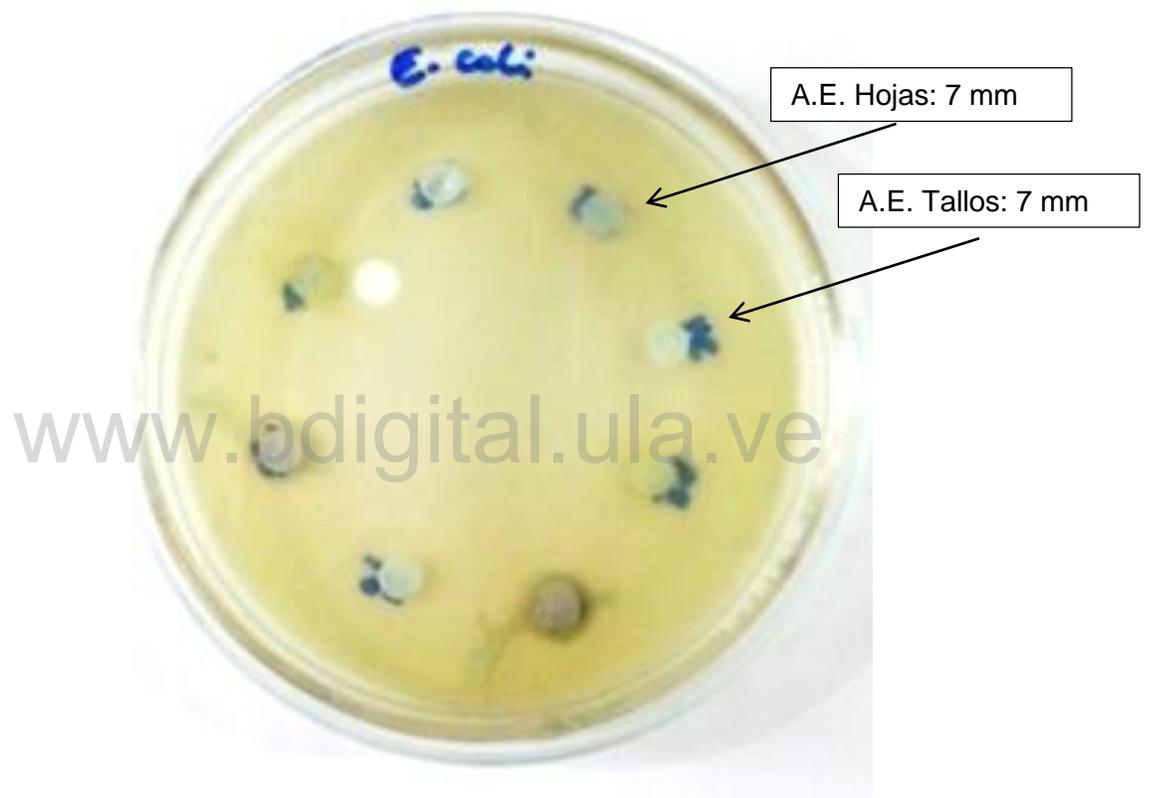


Escherichia coli

ATCC (25992)

3. A.E. Hojas: 7 mm

4. A.E. Tallo: 7 mm



Klebsiella pneumoniae

ATCC (23357)

3. A.E. Hojas: 8 mm

4. A.E. Tallo: 8 mm



Discusiones

Después de analizar los resultados obtenidos con la aplicación de esta investigación, se pretendió confirmar la relación entre la composición química presentada en los antecedentes del aceite esencial de las hojas y tallos de *Piper amalago* L. y su posible actividad antibacteriana. Cabe destacar, que en la literatura consultada refieren estudios sobre acción antibacteriana de esta planta, lo que llevó a realizar comparaciones. Para ello se realizó el siguiente análisis:

Se realizaron las extracciones y el rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas de *P. amalago* L. en el proceso de hidrodestilación y calculado sobre la base del peso seco de 600 g fue de 0,16 %. Mientras que el rendimiento del aceite esencial obtenido de los tallos *P. amalago* L. en el proceso de hidrodestilación y calculado sobre la base del peso seco de 1600 g fue de 0,016 %. Este rendimiento es relativamente bajo si lo comparamos con el reportado en un trabajo realizado en Ecuador por otros investigadores (Guayanlema y Vargas 2017), quienes reportaron un rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas de *P. amalago* L., en el proceso de hidrodestilación y calculado sobre la base del peso seco de 500 g fue de 0,4 %.

Por otra parte, la actividad biológica de los aceites esenciales ha sido confirmada en muchos estudios, los datos presentan gran variabilidad. Las causas de ese comportamiento parecen ser las diferencias en la composición de los aceites esenciales debido a factores genéticos y ambientales y es por eso que resulta de interés la identificación y estudio de los principales constituyentes que son responsables de la actividad del aceite esencial (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, y Iglesia, 2009).

Entre los compuestos que conforman el aceite esencial del género *Piper*, que se le atribuyen propiedades antibacterianas, podemos mencionar: terpenos como el safrol, α -humuleno, β - cariofileno, β -elemeno, germacreno, p - cimeno, γ - terpineno, mirceno, entre otros (Sánchez y cols, 2009).

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula. Algunos autores plantean que su actividad bacteriostática y/o bactericida se debe fundamentalmente, a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad. Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides, consiste en la ruptura de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos produce la muerte en la célula bacteriana (Maguna, Romero, Garro, y Okulik, 2006).

Respecto a la actividad antibacteriana de los aceites esenciales puros de hojas y tallos de *Piper amalago* L, mostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* 18 mm en aceite esencial de hojas y 15 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L., *E. faecalis* 10 mm en aceite esencial de hojas y 9 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L. y *P. aeruginosa* 7 mm en aceite esencial de hojas y 8 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L, comprobado por el método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). Estos resultados concuerdan con lo publicado por Santos (2021) quien reportó la actividad antibacteriana del aceite esencial puro de hojas de *Piper amalago* L. a una concentración de 10 μ g contra *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*,

utilizando el método de difusión en agar, mostrando que la mayor actividad antibacteriana que presentó el aceite esencial fue la inhibición del crecimiento bacteriano para cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Asimismo, a la actividad antibacteriana de los aceites esenciales puros de hojas y tallos de *Piper amalago* L, mostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* 18 mm en aceite esencial de hojas y 15 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L., *E. faecalis* 10 mm en aceite esencial de hojas y 9 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L. y *E. coli* 7 mm en aceite esencial de hojas y 7 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L, comprobado por el método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). Estos resultados concuerdan con lo publicado por Guayanlema y Vargas (2017), quienes reportaron actividad del aceite esencial de las hojas de *Piper amalago* L. frente a las mismas bacterias. Los resultados de estos investigadores mostraron actividad moderada frente *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 200 µg/mL y la CMB fue de 400 µg/mL. Para *Escherichia coli* ATCC (25922), valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 100 µg/mL y la CMB fue de 200 µg/mL, y actividad débil frente *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) con CMI de 900 µg/mL.

Por otra parte, la actividad antibacteriana de los aceites esenciales puros de hojas y tallos de *Piper amalago* L. en estudio, mostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* 18 mm en aceite esencial de hojas y 15 mm en aceite esencial de tallos de *Piper amalago* L. comprobado por el método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). En los estudios realizados por Salamanca y Galiano (2016), lograron inhibir el crecimiento de cepas Gram positivas *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus cereus* mediante la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las especies en estudio a las concentraciones de 100 µg al 100 % con sus diluciones al 50 % y 10 % por el método de difusión en agar.

Presentando actividad antibacteriana significativa frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus* y a una concentración del 50 % obtuvo halos de $20,25 \pm 1.77$ mm y $20,25 \pm 5.3$ mm respectivamente. Además el aceite esencial al 50 % y el extracto etanólico poseen sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* metilina resistente con halos de 17.25 ± 0.35 mm y 16 ± 0 mm respectivamente. Destacó también la sensibilidad del aceite esencial al 50 % frente a *Staphylococcus aureus* (17.25 ± 1.77 mm). Ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico estudiados presentaron actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Los resultados fueron similares con esta investigación, ya que el aceite esencial de *Piper amalago* L. de Perú posee sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* al igual que el aceite de esta especie obtenido en Mérida Venezuela.

Es importante mencionar, que la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas y tallos de *P. amalago* L. frente a las cepas ensayadas, Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, se pueden atribuir al contenido de algunos de sus componentes que se han reportado. Entre los componentes volátiles mayoritarios encontrados en la especie *P. amalago* L. de otros países se encuentran sabineno (20,42 %) y espatulenol (10,82 %), de naturaleza sesquiterpénica en gran proporción y posiblemente a los que se les atribuye la actividad antibacteriana (Guayanlema y Vargas, 2017).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de las hojas y tallos de la especie *Piper amalago* L, tuvieron un rendimiento de 0,4 % las hojas y 0,016 % los tallos.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las hojas y tallos de la especie *Piper amalago* L., presentó una moderada actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y poca actividad frente a las bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*).

RECOMENDACIONES

- Identificar los compuestos químicos volátiles por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Realizar el estudio utilizando otras partes de la planta de *Piper amalago* L., como flores y raíces.
- Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica frente a otras cepas de interés clínico.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas- Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Arias, F. (2016). *El Proyecto de Investigación*. Caracas, Ediciones Episteme, 7^{ma} Ed.
- Aricapa, A. (2011). *Estudio fitoquímico de Piper pesaresanum y Piper crassinervium (Piperaceae)*. (Trabajo de Investigación) Universidad Católica de Pereira Colombia.
- Arraiza, M. (2000). *Estudios sobre plantas medicinales y aromáticas*. (Trabajo de Investigación) Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Asensio, C. (2000). *Utilización de los Aceites esenciales de variedades de óregano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva*. (Trabajo de Investigación) Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina
- Avello I, y Cisternas F., (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Médica de Chile*, 138 (10), 1288-1293.
- Beltrán, J. (2013). *Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie Piper imperiale (Piperaceae)*.(Trabajo de Investigación) Facultad de Ciencias,

de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia.

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Zaragoza- España: 2^{da}. Ed. Editorial Acribia, S.A.

CLSI. (2020) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cabrera, C., Gómez, R, y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Rev. Médica de Colombia*, 38 (2), 149-158.

Cardona, G., Robledo, W., Rojano, S., Benjamín, A., Alzate, F., Muñoz, D., y Saez, J. (2013). Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18 (2), 268-277.

Cardozo, A. (2006). *Botánica Sistemática* (3era ed.). Caracas, Venezuela: Catedra de Botánica sistemática de la Facultad de Agronomía.

Ciccio, J. (1996). Constituyente del aceite esencial de las hojas de la *Piper terrabanum* (Piperaceae). *Revista Tropical de Biología*, 44(2): 507-511.

Da Silva, J., da Trindade, R. Alves, N., Figueiredo, P., Maia, J., Setzer, W. (2017). Aceites esenciales de especies neotropicales de *Piper* y sus actividades biológicas. *Rev. Int. J. Mol. Ciencia*, 18, 2571.

- De La Fuente, S., Villareal, J., y Diaz, M. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46 (02), 7-16.
- Descriptores de la ciencia de la salud [internet]. Sao paulo: *Biblioteca virtual de salud*. [Online].; 2003 [cited 2017 01 01. Available from: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>.
- Dos Santos, L., da Silva Novaes, A., dos S. Polidoro, A., de Barros, M., Mota, J., Lima, D., Krause, L., Cardoso, C., Jacques, R. y Camkramão, E. (2018). Chemical characterisation of *Piper amalago* (Piperaceae) essential oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry (GCxGC/qMS) and their antilithiasic activity and acute toxicity. *Rev. Phytomedicine*, 29, 432–445.
- Echeverri-Toro, L. M. (2012). Klebsiella pneumoniae multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 29 (02), 175-182.
- Ferraz A, Balbino J, Zini, C., Ribeiro, V., Bordignon, S. y Von Poser, G. (2010). Acaricidal activity and chemical compositions of the essential oil from three *Piper* species. *Rev. Parasitol*, 107 (1), 8-243.
- French, E y Hebert, T. (1980). *Método de Investigación Fitopatológica*. San José de Costa Rica: Ediciones, Instituto de Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA.

- Gallegos, M. (2017). *Las Plantas Medicinales: Usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo*. (Trabajo de Investigación) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- García, J., (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. En Cantón, R., García, J., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., y Vila, J. (Eds) *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (pp.10 - 50). España: Mc Graw Hill
- Gonçalves, V., Esmerino, L., Mroginski, V., Batista, B., Torres, A., Armstrong, L., y Araujo, G. (2022). Atividade antimicrobiana e inseticida do óleo essencial de *Piper amalago* L. (Piperaceae). *Rev.Brasileña de Desarrollo*, 8 (1), 998-1013.
- Guayanlema, J., Araujo, L., y Vargas, C. (2017). *Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de dos especies de la familia Piperaceae recolectadas en la provincia de Guayas-Ecuador durante el período abril-agosto del 2016*. (Tesis de Grado de Licenciado en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico) Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba-Ecuador.
- Gutierrez, M. (2002). La Cromatografía de Gases y La Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos Causantes de Mal Olor. *Rev. Boletín Intexter (U.P.C.)*, 2 (122), 35-41.
- Hurtado, J. (2010). *El proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación*. Bogotá-caracas: Ediciones Quirón.
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O. y Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. (Comunicaciones

Científicas y Tecnológicas en Internet). Facultad de Agroindustrias, UNNE.

Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Organica* (2da ed.). Caracas-Venezuela: Repositorios de la Universidad Central de Venezuela.

Marinoff, M. (2006). *Plantas Medicinales desde la Biblia hasta la Actualidad Farmacia, Facultad de Agroindustrias, UNNE.*

Martinez, A. (2001). *Aceites Esenciales*. Facultad Química Farmaceutica. Universidad de Medellin, Medellin-Colombia.

Medinilla, A. (1996). *Manual de laboratorio de Farmaconogsia*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de Guatemala, Ciudad Guatemala.

Moncayo, A. (2020). *Caracterización de metabolitos secundarios de naturaleza esteroidea presentes en el aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico de la especie Clinopodium tomentosum (kunth) govaerts (Lamiaceae)*. (Trabajo de Investigación) Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Ecuador.

Moncayo, S. (2021). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador. *Rev. de la Facultad de Farmacia*, 63 (1), 14-24. Universidad de Los Andes, Merida-Venezuela.

Montero, A. (2017). *Estudio fitoquímico de hojas de la especie vegetal Piper catripense (Piperaceae) y evaluación de su capacidad antioxidante*. (Trabajo de Investigación) Universidad Distrital Francisco José De Caldas Facultad de Ciencias y Educación. Bogotá-Colombia.

- Morales A, Rojas. J., Moujir, L., Araujo, L., y Rondón, M. (2013). Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of *Piper hispidum* Sw. essential oil collected in Venezuela. *Rev. Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (6), 16-20.
- Moreno, C. G. (2009). Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana en Patógenos Respiratorios. *Rev de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69 (2), 185-192.
- Mota, J., Souza, D., Boone, C., Cardoso, C. y Caramão, E. (2013). Identification of the volatile Compounds of leaf, Flower, Root and Stem Oils of *Piper amalago* (Piperaceae). *Rev. Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16 (1), 6-11.
- Murray, P. (2018). *Microbiología Médica Básica*. Barcelona-España: Ediciones Elsielvier.
- Nadinic, J. Ferraro, G., Bandoni, A., y Martino, V. (2015). *Fitoquímica Fitoingredientes y otros productos naturales*. Buenos Aires: Ediciones Eudeba.
- Novaes, A., da Silva Mota, J., Barison, A., Veber, C., Negrão, F., Kassuya, C. y de Barros, M. (2014). Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Rev. Phytomedicine*, 21 (4), 523-528.
- Novara, L. (1998). Piperaceae. *Rev. Aportes Botánicos de Salta*, (11) 2 Herbario Mcns Facultad de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta Buenos Aires 177 - 4400 Salta - República Argentina Issn 0327 – 506 X.

- OMS (2017). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 12 de Octubre de 2022.
- Parella, S. y Martins, P. (2010). *Metodología de la Investigación Cuantitativa* (3era ed.). Caracas: Ediciones FEDUPEL.
- Paredes, G. y Ruíz, M. (2014). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de extractos vegetales de los generos Aspidosperma y Piper frente a cepas de Pseudomonas*. (Trabajo de Investigación). de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iqutus-Perú.
- Paredes, R. y. Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Rev. Farmacología*, 23 (3), 116-118.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. and Boll, P.M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 43 (4), 597-673.
- Pedraza, P. y Castellanos, H. (2009). *Estudio Comparativo de la Actividad Antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibiótico y administración intravenosa a través de métodos in vitro*. (Trabajo de Investigación) de la Universidad Pontificia Javerina Bogotá-Colombia.
- Puzul, S. (2016). *Evaluación del rendimiento en materia seca de hojas y aceite esencial de Lippia alba (Mill.) N.E. Br. ex Britton y P. Wilson, a través de cortes aplicando podas, en la Ciudad Universitaria, Guatemala* (Trabajo de Investigación), de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Quiñonez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: Evolución y perspectiva actuales ante el enfoque "Una Salud". *Rev. Cubana de Medicina Tropical*, 69 (3) versión On-line ISSN 1561-3054
- Ramos, F. Microbiología: Halos de inhibición. [Online]; 2014 [cited 20170128]. Available from: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/ha-los-de-inhibicion.html>.
- Rivera, A., Romero, R. y Garrido, A. (2021). Aplicación de técnicas cromatografías acopladas a espectrometría de masas de alta resolución para la autenticación de *Piper nigrum*: una aproximación metabólica al estudio del origen geográfico y procesado. Grupo de Investigación "Química Analítica de Contaminantes", *Rev. del Departamento de Química y Física, Universidad de Almería, Almería, España*, 3 (7), 12-20.
- Rondón, M., Velasco, J., Cornejo, X., Fernández, J., y Morocho, V. (2016) Chemical composition and antibacterial activity of *Piper lenticelloseum* C.D.C essential oil collected in Ecuador. *Rev. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (08), pp. 156-159.*
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales Características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Rev Salud Pública de Mexico*, 44 (2), 464-475.
- Ruiz, C., y Díaz, C., y Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 81 (2), 81-94.

- Salamanca, S., y Galiano, M. (2016). *Actividad antimicrobiana de cuatro especies del genero Piper y elucidación estructural de sus aceites esenciales*. (Trabajo de Investigación) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, TM., Naranjo, E., y Iglesia A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de Anís). *Rev. Protección Veg*, 24 (1), 39-46.
- Santos, V. (2021). *Estudo da Composição química e de atividades biológicas de Óleos essenciais e do extrato bruto obtido de folhas de Piper amalago L.* (Trabajo de Investigación) de la Universidade Federal do Paraná. Curitiba-Brasil.
- Skoog, A., Holler, J., y Crouch, R., (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (Edición 6ta ed.). Madrid: McGraw-Hill.
- Silva, J. (2018). *Evaluación de la actividad antibacteriana y hemoaglutinante de los extractos de Solanum phureja, Tropaeolum tuberosum, Oxalis tuberosa y Ullucus tuberosus*. (Trabajo de Investigación) Biblioteca de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Smith N., Mori S., Henderson, A., Stevenson, D. y Heald, S.(2004). *Flowering Plants of the Neotropics The New York Botanical Garden*. Princeton, University Press, New York, USA.
- Standley, P., y Steyermark, J. (1952). Flora of Guatemala. *Rev. Fieldiana: Botany*, 24 (3), 369-396.
- Stevens, P.F. (2009). Angiosperm phylogenywebsite: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

- Ulloa, C., y. Moller, P. (1994). Especies forestales leñosas arbóreas y arbustivas de los bosques montanos del Ecuador. Quito. *Rev. Ministerio del Ambiente del Ecuador*, 1(02) (pp. 123-145).
- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A y Rondón M. (2007). Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*, 2, 85-88
- Wasserman, E., Busch, D., Whalen, H., Crum, J., y Graveline, D. (1999) *The Discovery and development of penicillin*. The Alexander Fleming Laboratory Museum, London, UK. *Rev. Royal Society of Chemistry*. Recuperado el 10 de Mayo de 2017, de <http://www.acs.org/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/historia-quimica/descubrimiento-desarrollo-penicilina.html>.