

**Evaluación del efecto antimicrobiano de *Piper cubricola* Trel sobre microorganismos
patógenos de relevancia clínica**

Constanza Feria Gálvez

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2018**

**Evaluación del efecto antimicrobiano de *Piper cubricola* Trel sobre microorganismos
patógenos de relevancia clínica**

Constanza Feria Gálvez

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE PREGRADO EN QUIMICA
FARMACEUTICA

TUTOR:

GUILLERMO LEON MONTOYA, PhD

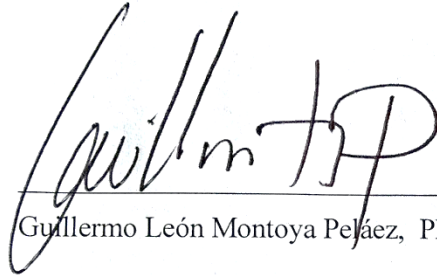
CO-TUTOR:

ANDRES FELIPE DÁVALOS, MSc

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
2018**

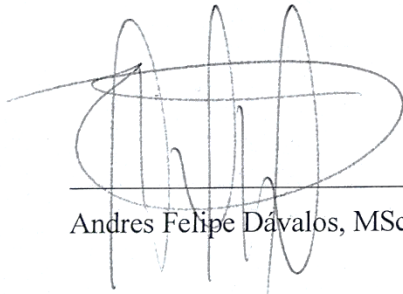
AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del Asesor:



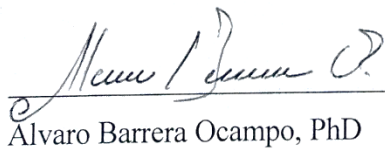
Guillermo León Montoya Peñáz, PhD

Co-asesor



Andres Felipe Dávalos, MSc

Firma del Evaluador:



Alvaro Barrera Ocampo, PhD

CONTENIDO

Evaluación del efecto antimicrobiano de <i>Piper cumbricola</i> Trel sobre microorganismos patógenos de relevancia clínica	1
TABLA DE FIGURAS.....	7
CONTENIDO DE TABLAS	8
1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
3.1 Planteamiento y justificación de la pregunta problema	14
3.1.1. <i>Desarrollo de fármacos antibióticos a partir de fuentes naturales</i>	14
3.1.2. <i>Reporte de potencia antimicrobiana en estudios preclínicos</i>	16
3.2. Marco Teórico y estado del arte.....	17
3.2.1 Genero Piper	17
3.2.2 Extracción Discontinua.....	18
3.2.3 Aceites Esenciales.....	18
3.3.1. Destilación por arrastre de vapor	19
3.3.1.1. <i>Método de inyección de vapor de agua</i>	19
3.3.1.2. <i>Hidrodestilación</i>	19
3.4 Difusión en Disco	19
3.5 Resistencia a los antibióticos	20
3.6 Problemática actual de los antibióticos.....	21
3.7 Microorganismos a evaluar.....	22
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2. Objetivos Específicos.....	24
5. METODOLOGÍA UTILIZADA	25
5.1. Reactivos Empleados	25
5.2 Materiales y Equipos.....	25
5.3. Recolección y tratamiento de la muestra	26
5.2 Extracto Etanólico.....	26
5.3 Fracciones volátiles.....	27
5.4 Difusión en disco o Kirby Bauer	27

5.4.1	Determinación de la sensibilidad de los microorganismos.....	28
5.4.2	Diluciones del aceite.....	28
5.4.3.	Preparación de los microorganismos.....	29
5.4.3.1.	<i>Cultivo del Microorganismo</i>	29
5.4.3.2.	<i>Ensayo de difusión en el agar</i>	29
5.4.3.3.	<i>Ensayo de difusión en Disco</i>	29
5.4.3.4	<i>Análisis Estadístico</i>	30
6.	RESULTADOS.....	31
6.1	Identificación de la planta.....	31
6.2.	Elaboración del Extracto Etanólico.....	32
6.4	Prueba de Difusión en Disco.....	35
7.	DISCUSIÓN.....	43
7.1	Extracto Etanólico.....	43
7.2	Obtención del aceite esencial.....	44
7.3.	Prueba Kirby-Bauer.....	44
8.	CONCLUSIONES.....	47
9.	RECOMENDACIONES.....	48
10.	AGRADECIMIENTOS.....	49
11.	REFERENCIAS.....	50
12.	ANEXOS.....	54
	Anexo 1 Fotografías de las placas de <i>S. aureus</i> de 791.4 mg/mL hasta 5,62 mg/mL con un volumen de 10 μ L.....	54
	Anexo 2 Medida de los halos de <i>S. aureus</i> desde 791,4 mg/mL hasta 40 mg/mL con un volumen de 10 μ L.....	56
	Anexo 3 Fotografías de los halos de inhibición obtenidos utilizando 5 μ L desde 791,4 mg/mL hasta 40 mg/mL.....	58
	Anexo 4 Medida de los halos de inhibición a 5 μ L.....	60
	Anexo 5 Medida de los halos con un volúmen de 10 μ L.....	62
	Anexo 6 Medida de los halos con un volumen de 5 μ L.....	63
	Anexo 7 Prueba t de student.....	64
	Anexo 8 Grafica de probabilidad para supervivencia.....	65
	Anexo 9 Analisis Probit.....	65
	Anexo 10 Protocolo de Seguridad Biológica.....	67

TABLA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de la Penicilina	13
Figura 2 Estructura de la Cefalosporina	13
Figura 3 Estructura del Carbapenem.....	13
Figura 4 Estructura del Pinosinol	14
Figura 5 Estructura de la Guinesina.....	14
Figura 6 Estructura de la Aduncamida	14
Figura 7 Estructura de la Piperina	15
Figura 8 Baucher de Piper Cumbricola Trel.....	31
Figura 9 Extracto Etanolico de Piper cumbricola Trel	32
Figura 10 Concentración del Extracto	32
Figura 11 Extracto Concentrado	33
Figura 12 Hojas de Piper en el homogenizador	33
Figura 13 Extracto de Piper cumbricola	33
Figura 14 Planta semipiloto	34
Figura 15 Aceite esencial Piper cumbricola	35
Figura 18 Grafica de los mm del halo vs concentración del aceite con un volumen de 10 μ L	41
Figura 29, 5,62 mg/mL de aceite esencial de P. cumbricola	55
Figura 30 791,4 mg/mL de aceite esencial P. cumbricola	55
Figura 31 670,4 mg/mL de aceite esencial P. cumbricola	58

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1 Reportes Preclínicos	17
Tabla 2 Listado de Bacterias y Resistencias	21
Tabla 3 Condiciones óptimas de extracción.....	34
Tabla 4. Efecto antimicrobiano de las bacterias <i>P. aeruginosa</i> , <i>E coli</i> , <i>S. aureus</i> . El control negativo era DMSO en los aceites y agua tipo 2 en los extractos ubicado en el disco 5 del centro, el control positivo fue amikacina ubicado en el disco 4, disco 1 al 3 son réplicas del aceite. En la primera línea son replicas del extracto	36
Tabla 5 Evaluación del aceite esencial sobre <i>S.aureus</i>	37
Tabla 6 Halos de inhibición del <i>S.aureus</i> con concentraciones de 40 a 5,2 mg/mL de aceite esencial	39
Tabla 7 Medidas de los halos a 10 µL con 791,4 mg/mL aceite esencial <i>P. cumbricola</i>	56
Tabla 8 Medidas de los halos a 10 µL con 670,4 mg/mL de aceite esencial <i>P. cumbricola</i>	56
Tabla 9 Medidas de los halos a 10 µL con 400 mg/mL de aceite esencial <i>P. cumbricola</i>	56
Tabla 10 Medidas de los halos a 10 uL con 175 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	56
Tabla 11 Medidas de los halos a 10 uL con 74,1 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i> ...	57
Tabla 12 Medidas de los halos con 56,2 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	57
Tabla 13 Medida de los halos con 40 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	57
Tabla 14 Medidas de los halos con 791,4 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	60
Tabla 15 Medida de los halos con 670,4 mg/mL de aceite esencial <i>P. cumbricola</i>	60
Tabla 16 medidas de los halos con 400 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	60
Tabla 17 Medida de los halos con 175 mg/mL de aceite esencial <i>P. cumbricola</i>	60
Tabla 18 Medida de los halos con 74,1 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	61
Tabla 19 Medidas de los halos con 56,2 mg/mL de aceite esencial <i>P. cumbricola</i>	61
Tabla 20 Medida de los halos con 40 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	61
Tabla 21 Medida de los halos con 30 mg/mL de aceite esencial de <i>P. cumbricola</i>	61

[S](#)

1. RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha venido en aumento en las últimas décadas, mientras que el volumen de investigaciones enfocadas en el hallazgo de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana ha sido muy poca. Por esta razón, es necesario explorar nuevas fuentes de antibióticos, de donde se puedan extraer moléculas diferentes a las que se encuentran en el arsenal terapéutico actual. Dentro de este contexto, se estudió la planta *Piper cumbricola* Trel, perteneciente a la familia *Piperaceae*, sobre la cual se ha reportado que ha tenido varios reportes de posibles extractos o metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. A partir de las hojas y partes aéreas de esta planta, se extrajo aceite esencial y se elaboró un extracto etanólico, los cuales se evaluaron en relación con su efecto antibacteriano. Se utilizó, la técnica de difusión en disco en varios microorganismos patógenos para el ser humano.

Los productos anteriormente obtenidos fueron evaluados a diferentes volúmenes (5 μ L y 10 μ L) sobre discos estériles para probar su actividad antibacteriana. A continuación, se evaluó su concentración mínima inhibitoria sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, utilizando el método de Kurbi Bauer, el cual aumenta en la difusión de discos en agar. Se encontró que esta bacteria era resistente al extracto y al aceite esencial. Luego, se procedió a ensayar con otras bacterias que fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. A partir de los resultados experimentales obtenidos se puede concluir que el aceite esencial de *Piper cumbricola* Trel posee actividad antibacteriana sobre la especie *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 17,5 mg/mL. Estos resultados aunque preliminares, permiten proponer los metabolitos secundarios de esta planta (monoterpenos y sesquiterpenos como componentes principales de las fracciones volátiles de las plantas) como fuentes promisorias de alternativas de tratamiento de agentes infecciosos como *S.aureus*.

Palabras clave: *Efecto antibacteriano, Kurbi bauer, Piper cumbricola Trel, extracto, aceite esencial.*

2. INTRODUCCIÓN

El último informe del “Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos” reveló la presencia generalizada de resistencia antibiótica en una muestra realizada a 500.000 personas, en 22 países¹. La principal conclusión de este informe internacional de salud es que la resistencia antimicrobiana se convertirá en un problema de salud pública a nivel mundial. A nivel nacional, la resistencia exhibida por bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se ha convertido en un problema de salud que se ha incrementado. En lo que respecta a *P. aeruginosa*, presenta una tendencia de multiresistencia por la expresión de carbapenemasas. Así mismo, *E. coli* presenta resistencia a las cefalosporinas², mientras que *S. aureus* ha venido incrementando su resistencia a la oxacilina en los hospitales³.

Según el Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia, en el año 2016, se reportaron unos 2.632 casos de resistencia antimicrobiana. Estos casos de resistencia están asociados principalmente a la intervención invasiva con dispositivos médicos (tubos, jeringas, catéteres, etc.), una práctica que es muy frecuente en hospitales y servicios de salud. De este número, se estima que la mortalidad puede ascender hasta el 21%, y su ocurrencia se circunscribe principalmente a los pacientes de cuidados intensivos que a su vez son los pacientes que mayor riesgo presentan, debido a que su sistema inmune se encuentra inmunosuprimido o muy debilitado por su momentánea y precaria condición de salud⁴.

Dicho lo anterior, se hace evidente que la resistencia antibiótica viene en aumento. Por esta razón, las alarmas de la OMS están encendidas, se teme caer en una era post-antibiótica donde las infecciones comunes pasen a ser mortales, dado que no se cuenta con una variedad de medicamentos que puedan atacar a los microorganismos multiresistentes. Además, se estima que una de las razones para que no haya dicha variedad, es por un error de la industria farmacéutica en la mala práctica de desarrollar medicamentos con el mismo núcleo químico y con solo leves cambios estructurales. Ello, probablemente aumentó la frecuencia de eventos de resistencia y disminuyó el número de nuevas entidades químicas para esta aplicación terapéutica.

Por esta razón, la OMS hace el llamado para que sus países miembros vigilen e informen a la población de los riesgos que enfrentan los pacientes que desarrollan resistencia. Es necesario que comprendan que los antibióticos deben ser consumidos en la totalidad de días prescritos, para asegurar la muerte de los microorganismos. Por otra parte, la OMS recomienda que el personal de salud prescriba antibióticos solo cuando sea necesario, es decir, cuando el paciente se encuentra con un diagnóstico de infección⁴. Lo anterior, sería parte importante de la estrategia para disminuir la resistencia antimicrobiana que actualmente existe, por el consumo inapropiado de medicamentos que no están indicados para los síntomas de quien los consume.

De no tratarse la resistencia, se prevé que para el 2050 se producirán 10 millones de muertes a causa de infecciones producidas por organismos resistentes a los antibióticos⁵, según la comisión europea una de las soluciones es implementar estrategias para reducir el uso indiscriminado de los antibióticos, esta solución actualmente en Colombia se está llevando a cabo por medio del plan nacional de respuesta a la resistencia a los antimicrobianos². Además, otra de las soluciones es la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos antibióticos que tengan nuevas estructuras para que estos no sean reconocidos por las bacterias. Es por esta razón, que en este proyecto se busca conocer si es posible obtener un efecto antibacteriano empleando las plantas medicinales como una de las principales características de países tropicales con acceso a una exuberante biodiversidad.

Tomando como punto de partida el contexto anteriormente citado, este estudio planteo evaluar el potencial terapéutico de un extracto etanólico y el aceite esencial de *Piper cumbricola* Trel, una especie nativa del área andina suramericana. Estos productos se tomaron como insumo, debido a previos reportes que sustentan algún tipo de efecto antimicrobiano del género *Piper*. Una vez recuperados los metabolitos secundarios de la planta, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana en los microorganismos *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, los cuales fueron seleccionados porque pueden producir una amplia gama de enfermedades que van desde infecciones cutáneas leves, hasta enfermedades de riesgo vital como abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis y neumonía. El principal objetivo de este trabajo de

investigación fue determinar si existía en alguna medida un potencial antimicrobiano contra las cepas patógenas enunciadas anteriormente.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 Planteamiento y justificación de la pregunta problema

3.1.1. Desarrollo de fármacos antibióticos a partir de fuentes naturales

Los orígenes de los antibióticos datan de 1930 con la aparición de la penicilina, obtenida a partir del hongo *Penicilium notatum* (especie productora de penicilina y primer antibiótico que rápidamente se industrializó). Luego, llegaron las cefalosporinas que provienen del hongo *Cephalosporium acremonium*, las cuales ofrecen un amplio espectro de tratamiento para bacterias y menos efectos adversos. Por otra parte, se tienen los macrólidos que provienen de *Streptomyces erythreus*, que mejoran la penetración tisular y amplían el espectro de actividad. Por último, uno de los antibióticos más potentes es el Carbapenem que proviene de *Streptomyces catleya*, estos poseen el espectro más amplio de todos los betalactámicos frente a bacterias gram positivas y gram negativas. En síntesis, la mayoría de los antibióticos que actualmente existen en el mercado, son obtenidos a partir de fuentes naturales como los hongos, que comparten el mismo núcleo químico betalactámico, como se puede visualizar en las siguientes figuras.

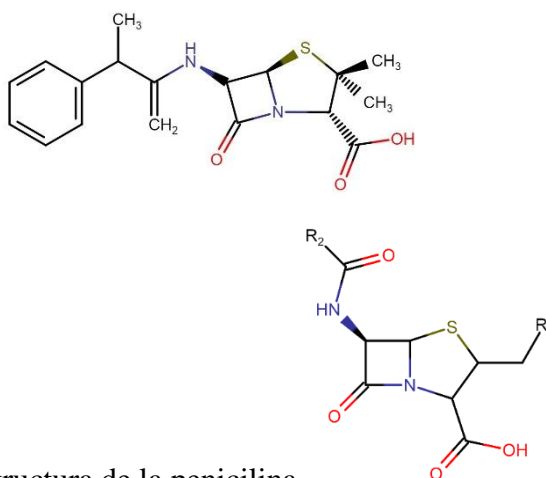


Figura 1 Estructura de la penicilina

Figura 2 Estructura de la cefalosporina

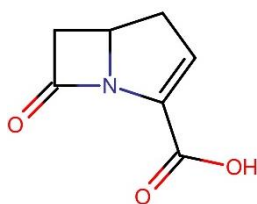


Figura 3 Estructura del Carbapenem

En este contexto, se plantea lo siguiente, a pesar de las diferencias en las estructuras químicas reportadas entre este tipo de organismos ¿es posible encontrar plantas nativas con actividad antimicrobiana? Actualmente, se ha visto que una de las plantas utilizadas en medicina tradicional son las especies del género *Piper*, las cuales se usan para las infecciones generales como malaria y paludismo⁶. Su eficacia se debe a los compuestos bioactivos que estas tienen como la piperina, sesamina y pironesinol. Ahora bien, dichos compuestos se han analizado en estudios farmacológicos demostrando que sus extractos, poseen una eficacia como agentes antitumorales, anticancerígenos y antimicrobianos. Por ejemplo, los resultados que se obtuvieron a partir de un extracto hidroetanólico de *P. betle*. Por otra parte, se tiene la *Aduncamida* y *Piperina*. Son compuestos que están presentes en estas especies piperáceas y tienen una eficacia antimicrobiana contra diversos microorganismos incluidos los patógenos. Además, se ha demostrado que las especies *Piper guineense*, *Piper lanceaefolium*, *Piper tuberculatum*, *Piper nigrum*, poseen actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *E coli* y *S. aureus*⁶

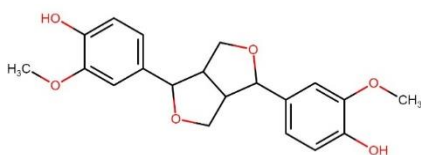


Figura 4 Estructura del Pironesinol

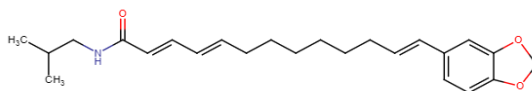


Figura 5 Estructura de la Guinesina

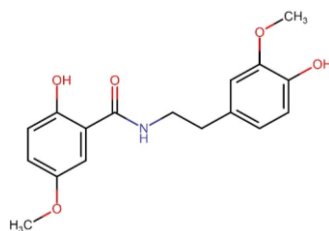


Figura 5 Estructura de la Aduncamida

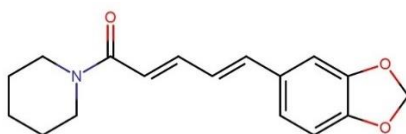


Figura 6 Estructura de la Piperina

3.1.2. Reporte de potencia antimicrobiana en estudios preclínicos

Un estudio preclínico está diseñado para evaluar la potencia de compuestos antes de ser ensayados sobre personas⁷. En este proyecto, el interés fue definir de manera preliminar si existía alguna capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias de alta peligrosidad para los seres humanos y que sirva como sustrato para posterior investigación que puedan centrarse en encontrar las estructuras químicas que poseen esta actividad.

Por esta razón los ensayos preclínicos están dirigidos a descubrir nuevas actividades terapéuticas y que abran una puerta inicial a nuevas entidades farmacológicas. Dentro de este contexto, la literatura científica permite reconocer que el género de esta planta posee una serie de compuestos químicos, que le proveen el potencial para el descubrimiento de nuevas entidades químicas antimicrobianas. La tabla 1 resume los reportes recientes en literatura científica de evaluaciones antimicrobianas, cuyos resultados son expresados en concentración mínima inhibitoria (CMI) y que define la potencia tanto como los microorganismos sobre los cuales fueron evaluados.

Tabla 1 Reportes Preclínicos

Especie	Compuesto Bioactivo	Microorganismo	CMI
<i>Piper betle</i>	Extracto hidroetanólico	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Streptococcus aureus</i>	500 µg/mL ⁸ 5 mg/mL ⁹ 10 mg/mL ¹⁰
<i>Piper capense</i>	Extracto Hidrometanólico	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	512 µg/mL ¹¹
<i>Piper hayneanum</i>	Extracto metanólico	<i>Streptococcus aureus</i>	1 µg/mL ¹²
<i>Piper ovatum</i>	Aceite esencial y extracto hidroalcohólico	<i>Bacillus subtilis</i>	15,6 µg/mL ¹³
<i>Piper pulchrum</i>	Extracto acuoso, Extracto etanólico y Extracto en hexano	<i>Streptococcus aureus</i> <i>Bacillus areus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Echerichia coli</i>	0,6 µg/ml ¹⁴
<i>Piper tuberculatum</i>	Extracto hidroetanólico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Echerichia coli</i> <i>Streptococcus aureus</i>	10,2 µg/mL ¹⁵

3.2. Marco Teórico y estado del arte.

3.2.1 Genero Piper

El género *Piper* pertenece a la familia de las piperáceas, estas tienen alrededor de 2500 especies que se encuentran distribuidas en ambos hemisferios. Las especies *Piper* están distribuidas en área tropical y subtropical, son mundialmente usadas en la medicina popular de América latina y la India^{16,17}. La especie que se tomó en este proyecto es nativa del Valle del Cauca, *Piper cumbricola* Trel de la que actualmente no se tiene ningún tipo de reporte científico. Sin embargo, se sabe por reportes etnofarmacológicos que estas especies poseen actividad antimicrobiana como es el caso de la *Piper guineense*, *Piper lanceaefolium*, *Piper tuberculatum*, *Piper nigrum*, *Piper pulchrum*, *Piper aduncum*, *Piper betle*, *Piper capense*, *Piper chaba*, *Piper cubeba*, *Piper hayneanum*, *Piper ovatum*, *Piper regnellii*, *Piper sarmentosum*, *Piper stylosum*⁶.

Además estas plantas poseen muchos compuestos bioactivos, los reportes fitoquímicos demuestran la presencia de compuestos como Pinosinol, Guineesina, Piperdardina, Peridina, y tienen adicionalmente reportes de actividad antimicrobiana⁶. Incluso, se ha informado que estos compuestos son obtenidos a través de extractos étanolicos y aceites esenciales, que se elaboran utilizando estas plantas como materia prima, para después realizar un fraccionamiento de sus componentes. Comúnmente se utiliza la extracción discontinua, para la obtención del extracto etánolico y por otra parte la destilación por arrastre de vapor para la elaboración de los aceites esenciales.

3.2.2 Extracción Discontinua

Es una técnica donde el material vegetal en estado sólido es pulverizado para aumentar el área de superficie que se sumerge en el disolvente, lo que le permite tener un contacto para la extracción por difusión de los principios activos. En este tipo de extracción, se tiene en cuenta que la separación de una mezcla de sólidos se lleva a cabo aprovechando las diferencias de solubilidad del material vegetal en un disolvente. Esta es una extracción discontinua porque el solvente no se recircula, se utiliza solo una vez. Uno de los tipos de esta extracción es la maceración, donde se permite que haya contacto del material vegetal con el solvente por un tiempo determinado, a fin de facilitar el transporte de los compuestos bioactivos del material vegetal al solvente.

3.2.3 Aceites Esenciales

Son los productos volátiles de naturaleza compleja, conformados por compuestos que le dan el aroma característico a cada planta. Oficialmente, se denominan aceites esenciales a los productos que se obtienen por arrastre con corriente de vapor de agua, aunque también se pueden obtener por otros métodos de extracción. Estos se caracterizan por ser menos densos que el agua y presentar insolubilidad en ella, son lipófilos y solubles en disolventes apolares como hexano, éter, etc.

Además, se oxidan fácilmente y poseen índices de refracción elevados¹⁸. Para su obtención, existen métodos oficiales y no oficiales, de acuerdo con la normatividad internacional. A continuación, se hará una breve descripción de los métodos oficiales más usados.

3.3 Métodos oficiales

3.3.1. Destilación por arrastre de vapor

3.3.1.1. Método de inyección de vapor de agua

Es el método más utilizado, en donde se pasa una corriente de vapor de agua por el material vegetal, el cual arrastra los aceites esenciales, posteriormente se condensa el vapor de agua y se recoge en un recipiente la mezcla de agua y aceite. Luego, se separa el agua del aceite esencial por diferencia de densidades usando un embudo separador.

3.3.1.2. Hidrodestilación

En este método, se coloca en contacto el material vegetal con el agua llevando a ebullición. Previamente, hay una maceración y al evaporarse el agua se transforma en vapor. Ya que, su alta temperatura tiene la capacidad de arrastrar las moléculas orgánicas de bajo peso molecular que generalmente son las que aportan el olor característico de las plantas y posteriormente es condensado para colectarse y ser separado por diferencia de densidades con otras sustancias extraídas.

3.4 Difusión en Disco

Con la difusión de disco se busca la concentración más baja de un antimicrobiano en concentraciones de (mg/L o µg/mL) que inhiba el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación por aproximadamente 24 horas¹⁹. Estas pruebas, son realizadas en microorganismos que se sospechan son causantes de enfermedades y se cree que puede tener

resistencia a los agentes antimicrobianos, siendo estos importantes para determinar la resistencia y la elaboración de estudios epidemiológicos que permitan comparar la susceptibilidad de los nuevos agentes antimicrobianos, por lo que son importantes para tomar decisiones en el tratamiento farmacoterapéutico.

La difusión en disco evalúa el rendimiento de todos los métodos de prueba de susceptibilidad, esta prueba se usa en laboratorios de diagnóstico para confirmar una resistencia inusual¹⁹. Además, para determinar esta concentración, se hace necesario que los microorganismos tengan la capacidad de producir un crecimiento visible en placas de Agar Mueller Hintong o en caldo, para después insertar en un agente antimicrobiano en concentraciones que se disminuirán.

3.5 Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos se puede definir microbiológica o clínicamente. La primera se refiere a la presencia de un mecanismo de resistencia determinado genéticamente (adquirido o mutado), clasificando al patógeno como resistente o susceptible en función de la aplicación de un límite establecido en una prueba de laboratorio fenotípica. Mientras que, la resistencia clínica se refiere a la actividad antimicrobiana que se correlaciona con una probabilidad del fracaso terapéutico. En palabras más sencillas, es tratar un patógeno con un fármaco al que se ha probado que es susceptible produciendo un resultado mejor que el obtenido con el patógeno probado como resistente²⁰. Esta resistencia se adquiere cuando las bacterias sensibles obtienen los genes que codifican un mecanismo de resistencia a través de la mutación o transferencia de material genético de otras bacterias. La transferencia puede ocurrir por medio de conjugación, transducción y transformación²¹.

Puntualmente, en el caso de *P. aeruginosa* y *E. coli*, el mecanismo de defensa desarrollado por estas bacterias es a través de una enzima conocida como betalactamasa, esta hidroliza los anillos betalactámicos de los antibióticos como penicilina y cefalosporina. Igualmente, en lo que confiere al *S. aureus*, esta se defiende por una alta producción de betalactamasa, produciendo hidrolisis a

los anillos betalactámicos de los antibióticos. Por lo que, se produce una degradación del antibiótico impidiéndole cumplir con su función bacteriostática o bactericida²².

La resistencia es una respuesta que se genera cuando las bacterias mutan debido al uso indiscriminado de los fármacos. Esto se debe a que las personas consumen los antibióticos por un corto tiempo, es decir que el microorganismo aún no ha muerto cuando el paciente decide dejar de consumir los medicamentos, permitiéndole a la bacteria replicarse con resistencia a este antibiótico.

3.6 Problemática actual de los antibióticos

Actualmente, la OMS ha reportado los antibióticos que presentan resistencia clasificándolos de acuerdo con la gravedad del evento en nivel crítico, alto y medio. En la siguiente tabla se pueden identificar los antibióticos en estado crítico y prioritario de resistencia.

Tabla 2 Listado de Bacterias y Resistencias

PRIORIDAD	BACTERIA PATÓGENA	RESISTENCIA
CRITICA	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Escherichia Coli</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Serratia spp</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Providencia spp</i> , <i>Morganella spp</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Carbapenem Cefalosporina 3ra Generación
PRIORITARIA	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Campylobacter spp</i> , <i>Salmonellae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Vancomicina Meticilina Claritromicina Flouroquinolonas

Los antibióticos que presentan una mayor resistencia son: el Carbapenem y las Cefalosporinas de tercera generación, los cuales son de prioridad crítica. Seguidamente se encuentra la vancomicina, meticilina, claritromicina y fluoroquinona²³, estos son de uso prioritario a nivel mundial.

3.7 Microorganismos a evaluar

Los microorganismos que se evaluaron fueron: *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los dos primeros son bacilos gram negativos, mientras que el último es un coco gram positivo. Con respecto a la *P.aeruginosa*, este es uno de los más importantes patógenos oportunistas en los seres humanos convirtiéndose en una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales, que tiene una participación importante en los pacientes inmunosuprimidos o aquellos que tienen enfermedades pulmonares los cuales están propensos a desarrollar estas infecciones oportunistas²⁴. Por otra parte, se tiene la *E coli*, esta bacteria se caracteriza por tener flagelos móviles peritricos de rápido crecimiento, además es un anaerobio facultativo²⁵, es una especie con gran diversidad, desde de cepas comenzales intestinales hasta las patógenas extraintestinales, la gravedad de esta bacteria está en que causa infecciones urinarias y digestivas, sepsis y meningitis. Además, es una de las protagonistas de infección de la comunidad, lo que se ha convertido en un problema a nivel mundial por su resistencia al carbapenem²⁶

Por otra parte, también se evaluó *Staphylococcus aureus*, este es un coco gram positivo que se dispone en grupos a modo de racimos irregulares, son poco exigentes en sus requerimientos nutricionales, crecen en condiciones ambientales, a unas temperaturas entre 30 °C y 37 °C, se caracteriza por la producción de enzimas como catalasa y coagulasa, la capacidad de fermentar manitol y producción de una nucleasa estable al calor²⁷. Es un patógeno que combina factores de virulencia bacteriana como la disminución de las defensas del huésped, causa enfermedades que pueden ser mortales como abscesos, bacteremia, endocarditis, osteomielitis, meningitis, neumonía y sepsis que son graves para la salud del ser humano²⁸.

Estas bacterias tienen una resistencia a los antibacterianos, la cual es muy común entre los pacientes que se encuentran hospitalizados, puesto que adquieren resistencia como resultado de la asistencia recibida. Durante hospitalizaciones prolongadas la probabilidad de adquirir este tipo de infecciones aumenta y al mismo tiempo la consecuencia de una alta mortalidad²⁹. Es por esto, que se pretende investigar dentro de las alternativas naturales que se han reportado con actividad antibacteriana. Utilizando para este fin, la planta *Piper cumbricola* Trel la cual es accesible en

nuestra región, con lo que se espera obtener resultados que permitan ampliar el conocimiento de estas plantas y posiblemente en futuros estudios se puedan convertir en un prototipo de antibiótico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano de un extracto etanólico y el aceite esencial de la planta *Piper cumbricola* Trel sobre la inhibición del crecimiento en *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

4.2. Objetivos Específicos

1. Obtener el extracto etanólico de las hojas de *Piper cumbricola* Trel
2. Obtener el aceite esencial de las hojas y las espigas de *Piper cumbricola* Trel
3. Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria de las diluciones del extracto etanólico y aceite esencial de la especie *Piper cumbricola* Trel sobre *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

5. METODOLOGÍA UTILIZADA

5.1. Reactivos Empleados

Los reactivos utilizados en la fase experimental fueron:

- Alcohol Etilico Grado A al 96% marca Agenquimicos Ltda
- Agua Tipo 2
- DMSO
- Agar CASO
- Agar Cetrimida
- Agar EMB
- Agar Manitol salado
- Agar Mueller Hintong
- Caldo CASO
- *Echerichia coli* ATCC 27853
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

5.2 Materiales y Equipos

- Material de vidrio
- Plancha de calentamiento
- Molino de cuchillos
- Homogenizador
- Planta de extracción semipiloto
- Puntas estériles
- Discos estériles de 6 mm

- Pie de rey
- Cabina de flujo laminar de seguridad microbiológica
- Autoclave
- Horno microondas
- Incubadora a 35 °C
- Cabina Fotográfica

5.3. Recolección y tratamiento de la muestra

Previamente, se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos para ubicar plantas piperáceas en la ciudad de Cali. Se usó la información de los herbarios virtuales, con lo que se logró encontrar la planta en el Ecoparque el Embudo y se identificó la especie con la colaboración del Doctor Ricardo Callejas Posada, quien es experto en el estudio e identificación de las plantas de esta familia.

En el lugar de la colección, se tomó una muestra que contenía las partes más importantes de la planta como lo son: el tallo, las hojas y espigas. A continuación, se llevó a cabo el prensado de la planta que fue sometido a altas temperaturas aproximadamente 80 °C y a bajas temperaturas alrededor de los 5 °C para finalmente obtener la planta en condiciones aptas de preservación y con ello elaborar el Boucher de la planta colectada y aportarla al herbario de la Universidad Icesi.

5.2 Extracto Etanólico

Se elaboró un extracto etanólico utilizando una mezcla de un litro de etanol al 96% por un litro de agua, que se adicionó 200 g de la planta molida, la cual previamente, se sometió a una temperatura de 40 °C ± 2 °C por 99 horas y se dejó en incubación por 3 semanas a temperatura ambiente, al que se le realizó una agitación ocasional. Este extracto obtenido, se realizó por medio de una extracción discontinua, específicamente se subclasifica en una extracción por maceración sólido-líquido, siendo el sólido el material vegetal, que para este caso son las hojas de la planta

Piper cumbricola Trel. Se dejó en maceración por tres semanas y por último se usó el rotaevaporador para extraer el agua y etanol contenidos en los extractos, logrando obtener así los alcaloides..

5.3 Fracciones volátiles

Para la obtención del aceite esencial se toman las hojas y las espigas de la planta, aproximadamente 4 Kg y se adicionaron en un homogenizador con una cantidad cercana a los 13 litros de agua, logrando obtener un extracto sin maceración. El propósito es reducir su tamaño y aumentar la eficiencia de la extracción obteniéndose un extracto de *Piper cumbricola* Trel. El extracto obtenido, es introducido en el percolador de la planta de extracción sólido-líquido PSE, ubicado en el laboratorio de fitoquímica de la universidad Icesi. Para la obtención del aceite se utilizó el percolador, el cual tiene una chaqueta a la que se le ha adicionado aceite caliente para proveer calor al extracto, al mismo tiempo se mantuvo en constante agitación. Este proceso se hizo hasta que el agua contenida en el extracto llegó a su punto de ebullición. Permitiendo así, la liberación de las fracciones volátiles de la materia vegetal introducida que llegan después al condensador. En ese momento, hubo un cambio de estado en la materia, pasando de fase gaseosa a la fase líquida de estas fracciones, que se convierten en aceite.

5.4 Difusión en disco o Kirby Bauer

La evaluación del extracto y el aceite esencial de la especie *Piper cumbricola* Trel sobre *Pseudomona aeruginosa*, se llevó a cabo por medio de la prueba Kirby Bauer con los siguientes pasos: determinación de la sensibilidad de los microorganismos, diluciones del aceite esencial y extracto seco, ensayo de difusión en el agar. A continuación, se hará una breve descripción.

5.4.1 Determinación de la sensibilidad de los microorganismos

En primer lugar, se procedió a sembrar los microorganismos teniendo en cuenta el protocolo de seguridad biológica que está consignado en el anexo No. 10 de este documento. Se cultivaron los microorganismos en agares selectivos, que para este caso son: EMB, Manitol salado y Cetrimida. A fin de, rectificar que efectivamente se trata de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Seguidamente, se procedió a cultivar las bacterias en un agar universal. Para este proyecto, se utilizó un agar CASO. Así, se tomó una solución salina, de concentración 0.9%, para preparar una dilución de 0,5 en la escala de McFaland. Además, se midió en espectrofotómetro su absorbancia, para comprobar que se encontraba en el intervalo de 0,086 a 0,090. Después se sembró en un agar Mueller Hintong, introduciendo los discos estériles de 6 mm, que contenían el extracto seco o el aceite puro de la planta en mención. Se procedió a dejarlo en la incubadora por un lapso mínimo de 18 horas, a una temperatura de 37 °C y posteriormente se leyeron los resultados.

5.4.2 Diluciones del aceite

Se prepararon 15 diluciones del aceite obtenido a unas concentraciones de 741,4 mg/mL, 670,4 mg/mL, 400 mg/mL, 175 mg/mL, 79,1 mg/mL, 67,0 mg/mL, 56,2 mg/mL, 40 mg/mL, 30 mg/mL, 20 mg/mL, 17,5 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL, 7 mg/mL y 5,62 mg/mL con las que se logró determinar cuál era la concentración mínima que inhibe el crecimiento del microorganismo. Se utilizó como solvente DMSO (Dimetilsulfóxido), ya que es un solvente aprótico³⁰, es decir un compuesto polar que carece de enlaces N-H y O-H, permitiendo solvatar totalmente el aceite esencial que es otro compuesto apolar.

5.4.3. Preparación de los microorganismos

5.4.3.1. Cultivo del Microorganismo

Primero, se procedió a cultivar el microorganismo en cuestión en un agar CASO, este se dejó incubar por un término de 24 horas a 37 °C. Después se realizó la dilución tomando aproximadamente 6 colonias del mismo tamaño y forma que se diluyeron en solución salina, el cual se rectificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm, el cual corresponde a una turbidez que contiene aproximadamente 1×10^8 UFC/mL ya que se encontraba en un rango de 0,08 – 0,1 nm³¹.

5.4.3.2. Ensayo de difusión en el agar

Se realizó por el método de Kirby Bauer³², el cual consiste en probar el antibiótico en un disco estéril de 6 mm sobre agar Mueller Hintong. Se usaron solamente los microorganismos que mostraron sensibilidad, para la cual se tomaron las cajas petri y se les adicionó una cantidad aproximada de 15 mL de agar Mueller Hintong, este se preparó conforme a lo que decía en la etiqueta y se llevó a esterilizar por 15 minutos a una temperatura de 121 °C. Posteriormente, se dejó solidificar y a continuación se le aplicó con la ayuda de un hisopo estéril, una cantidad aproximada de 100 µL de la dilución bacteriana, la cual se dejó secar para después insertar los discos de 6 mm esterilizados que previamente contenían 10 µL o 5 µL de la dilución del aceite esencial. Estos fueron incubados por un término de 18 a 24 horas en los que se obtienen los resultados.

5.4.3.3. Ensayo de difusión en Disco

Se tomaron los microorganismos que resultaron sensibles al método y se probaron aquí las diluciones del extracto de la planta y el aceite esencial a estudiar, en el que se ensayaron las 15 concentraciones (741,4 mg/mL, 670,4 mg/mL, 400 mg/mL, 175 mg/mL, 79,1 mg/mL, 67,0

mg/mL, 56,2 mg/mL, 40 mg/mL, 30 mg/mL, 20 mg/mL, 17,5 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/ mL, 7 mg/mL y 5,62 mg/mL). Se usó el mismo método de difusión en agar para medir posteriormente el diámetro de inhibición y luego determinar hasta donde había aparición del halo.

5.4.3.4 Análisis Estadístico

Para la evaluación del efecto antibacteriano, se realizó un análisis de probabilidad de supervivencia, ya que este es el análisis de elección cuando se busca hasta donde el prototipo de antibiótico le puede causar muerte a la bacteria que se analiza, para la comparación de los resultados obtenidos con los dos volúmenes 5 μ L y 10 μ L, se realizó una prueba *t* de Student.

6.2. Elaboración del Extracto Etanólico

Se colectó aproximadamente 2 Kg entre hojas, espigas y tallos de la planta, las cuales se sometieron al horno a una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un total de 99 horas. Una vez pasado el tiempo de secado, se separaron las hojas de las espigas y los tallos, donde estos dos últimos tejidos se descartaron. Posteriormente, se utilizó el molino de cuchillos del laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Icesi para moler las hojas. A partir de lo anterior, se logró obtener exactamente 205,9 g de hoja pulverizada. Este polvo se tomó como materia prima para la elaboración del extracto, utilizando como solvente una solución que contenía 1 litro de agua tipo 2 y 1 litro de etanol al 96%, el cual después se mezcló y se dejó macerando por 3 semanas, este extracto se puede visualizar en la figura 9.

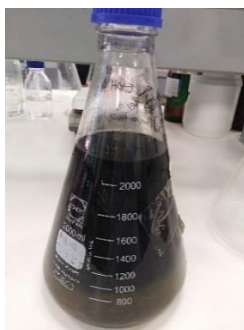


Figura 2 Extracto Etanólico de Piper cubricola Trel

Por último, se procede a realizar la concentración del extracto, utilizando un rotaevaporador, cuyas condiciones óptimas fueron: 70 mbar, 178 rpm y $39.9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este proceso se llevó a cabo por 2 días, del que se obtuvieron finalmente 400 mL del extracto concentrado, estos resultados se pueden visualizar en la figura 10 y la figura 11.



Figura 3 Concentración del Extracto

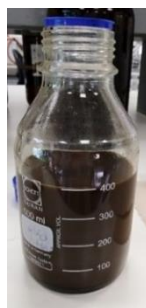


Figura 4 Extracto Concentrado

6.3 Extracción del Aceite esencial

Se colectaron hojas, flores y tallos frescos de la planta en mayo, los cuales fueron procesados al siguiente día en el laboratorio de Fitoquímica, para lo cual se separaron las hojas y las espigas del tallo con la ayuda de unas tijeras podadoras, donde este último se descartó. Después, se agregaron exactamente 4475,25 g de hojas y espigas con 18,7 litros de agua tipo 2 en un homogenizador hasta obtener un extracto acuoso, tal como se visualiza en las figuras 12 y 13, el cual posteriormente se introdujo en el percolador de la planta de extracción semipiloto de la Universidad Icesi.



Figura 5 Hojas de Piper en el homogenizador



Figura 6 Extracto de Piper cubricola



Figura 7 Planta semipiloto

Una vez en el percolador de la planta semipiloto consignados en la figura 14, se ajustó a las condiciones necesarias para su extracción las cuales fueron:

Tabla 3 Condiciones óptimas de extracción

Condiciones	Temperatura del Extractor	Temperatura de Entrada del condensador	Temperatura de Salida del condensador	Temperatura del Aceite
Iniciales	29 °C	25 °C	25 °C	80 °C
Destilación	52 °C	115 °C	27 °C	125 °C

Pasadas 2 horas, se obtuvo la primera gota, cuyas condiciones fueron las que se relacionan en la tabla No 3 en destilación. El resultado fue un destilado del aceite junto a otros compuestos, los cuales después se introdujeron en un embudo de separación, a fin de obtener el aceite esencial retirándole los compuestos no oleosos. Posteriormente, se procedió a emplear tubos de ensayo para separar totalmente el aceite, el cual se observa en la figura 15.

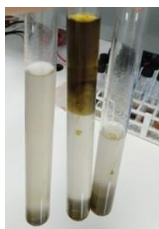


Figura 8 Aceite esencial *Piper cumbricola*

Al final de este proceso, se obtuvo 5,678 g del aceite esencial, cuyo porcentaje de rendimiento es:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{5,678 \text{ g}}{4475,25 \text{ g}} = 0,127 \%$$

6.4 Prueba de Difusión en Disco

Se utilizó la técnica de Kirby Bauer³², para la cual se tomaron tres bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Ya que, estas se utilizan como referencia para este tipo de pruebas, porque se analizan bacterias de las cuales se tiene resistencia y se necesita encontrar nuevas opciones farmacéuticas.

En primer lugar, se colocaron a crecer las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en medios específicos agar EMB, agar Manitol salado y agar de Cetrimida, a fin de asegurarse de que se tenía tal bacteria. Después, se pasó a un agar CASO y se dejaron crecer por 24 horas. Se realizó la dilución de la bacteria en solución salina y con la ayuda de un espectrofotómetro, se confirmó que poseía una absorción entre 0,08 y 0,1 nm, por cada bacteria. Seguidamente, se aplicó la dilución a cada caja petri que contenía agar Mueller Hintong previamente autoclavado. Después de que esta solución se secase, se introdujo los discos estériles que contenían el aceite esencial o el extracto concentrado, con 4 réplicas y un control positivo de amikacina. Además, de un control negativo que fue agua tipo 2 para el caso del extracto y DMSO para el análisis del aceite. Estos controles, se usaron para observar que no se presentaran falsos positivos, es decir inhibición en el control negativo o crecimiento en el control positivo.

No se observó actividad antimicrobiana con el aceite ni con el extracto concentrado frente a las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa*, lo cual se presenta en la tabla 4, donde solamente el control positivo muestra inhibición. Además, se puede visualizar que los discos del 1 al 3 son las réplicas, el disco No 4 corresponde al control positivo, el cual contiene una carga de 30 µg por disco y el disco No 5 es el control negativo al que se aplicó agua tipo 2. Sin embargo, en el caso de la bacteria *S. aureus* se pudo visualizar actividad, tal como se muestran en la tabla 4, en donde solamente se tiene el control de vehiculo de DMSO en el medio.


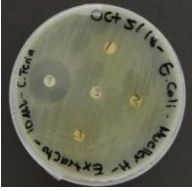
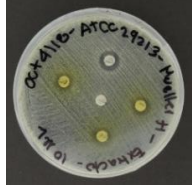
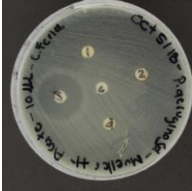



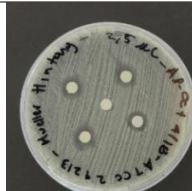








	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Extracto (10 µL)			
Aceite (10 µL)			
Aceite (5 µL)			
Aceite (2,5 µL)			

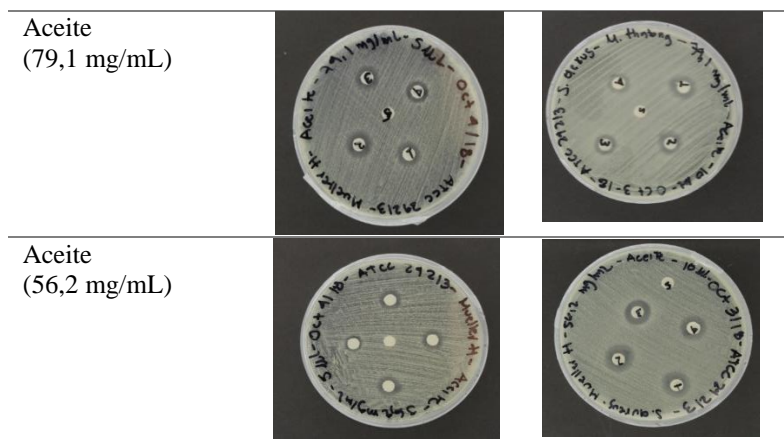
Tabla 4. Efecto antimicrobiano de las bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*. El control negativo era DMSO en los aceites y agua tipo 2 en los extractos ubicado en el disco 5 del centro, el control positivo fue amikacina ubicado en el disco 4, disco 1 al 3 son réplicas del aceite. En la primera línea son replicas del extracto

Dado a que se observa inhibición en las figuras que corresponden al aceite esencial en *S. aureus* en la tabla 4, se procede a realizar las diluciones para determinar el efecto antibacteriano, en unas

concentraciones de 741,4 mg/mL, 670,4 mg/mL, 400 mg/mL, 175 mg/mL, 79,1 mg/mL, 56,2 mg/mL, 40 mg/mL, 17,5 mg/mL y 5,62 mg/mL. Los resultados obtenidos, se pueden visualizar en la tabla 5, en donde las réplicas son del disco 1 al 3, el disco 4 es el control positivo de amikacina y el disco 5 es el control negativo, todos con una carga por cada disco de 10 μ L obteniendo los resultados, que se muestran en el anexo No. 1. Además, las medidas de los halos de inhibición se realizaron por sextuplicado y se pueden visualizar en el anexo No. 2. Adicionalmente, se probó la influencia de la cantidad de carga del disco por lo que se repitió la prueba con una carga de 5 μ L, los cuales se muestran en el anexo No 3. Así mismo, las medidas de los halos se encuentran en el anexo No. 4.

Tabla 5 Evaluación del aceite esencial sobre *S.aureus*

	5 μ L	10 μ L
Aceite (741mg/mL)		
Aceite (670,4 mg/mL)		
Aceite (400 mg/mL)		
Aceite (175 mg/mL)		



En la columna izquierda corresponde a un volumen de 5 μ L, en la columna derecha un volumen de 10 μ L, disco 4 control positivo de amikacina, disco 5 control negativo de DMSO, los discos 1-3 corresponden a replicas del aceite esencial en las diferentes concentraciones

Al observar la tabla 4, se tiene como resultado que este extracto concentrado posee una inhibición muy pequeña, que fue en promedio un halo de 9,82 mm. Dado que se creía que poseía actividad antibacteriana, se procede a diluir el extracto preparando diluciones a 804 mg/mL y 582 mg/mL, para determinar si había tal inhibición. Dando como resultado, que este extracto no posee actividad antibacteriana, lo cual se puede visualizar en la tabla 5.

Con la finalidad de observar más detenidamente cuál es la concentración en la que deja de aparecer el halo de inhibición, se prepararon nuevamente otras diluciones entre 5,62 mg/mL y 40 mg/mL mg/mL estas fueron: 5,62 mg/mL, 7 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/ mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL y 40 mg/mL. Estos, se encuentran ubicados desde el halo 2 al halo 9 respectivamente, con lo que se obtuvieron los siguientes resultados:

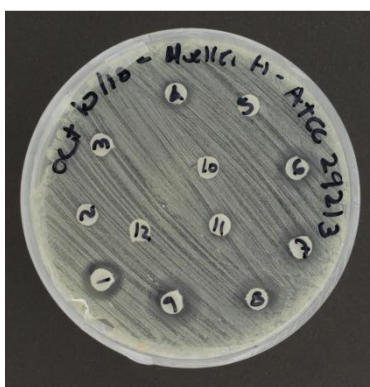


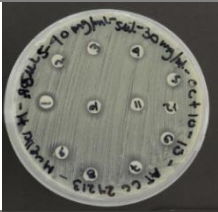









Figura 16 *S. aureus* con concentraciones de 40 mg/mL a 5,92 mg/mL

1. Control positivo. 2. 5,92 mg/mL, 3. 7 mg/mL, 4. 10 mg/mL, 5. 15 mg/mL, 6. 17,5 mg/mL, 7. 20 mg/mL, 8. 30mg/mL, 9. 40 mg/mL, 10-12 réplicas del control negativo

Se realizaron replicas para obtener una mayor precisión en los datos de los halos de inhibición. Logrando los resultados que se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 6 Halos de inhibición del *S.aureus* con concentraciones de 40 a 5,2 mg/mL de aceite esencial

	5 μ L	10 μ L
.Extracto (804 mg/mL)		
Extracto (582 mg/mL)		
Aceite (40 mg/mL y 30 mg/mL)		
Aceite (20 mg/mL y 17,5 mg/mL)		
Aceite (15 mg/mL y 10 mg/mL)		
Aceite (7 mg/mL y 5,2 mg/mL)		

Columna izquierda con un volumen de 5 μ L, columna derecha con un volumen de 10 μ L, primera y segunda fila corresponde a evaluaciones utilizando extracto, de la tercera hasta la sexta fila son evaluaciones con el aceite esencial, disco 1 control positivo de amikacina, disco 6 control negativo, disco 2-5 y disco 11 corresponden a las concentraciones de 40 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL y 7 mg/mL. En los discos 7 al 10 las concentraciones restantes.

Las medidas de los halos de inhibición se encuentran consignados en el anexo No 5. Con los resultados obtenidos, se realizan las siguientes gráficas, registradas en la figura 17 a la figura 19, donde se relaciona los milímetros de inhibición obtenidos a partir de las concentraciones usadas desde (741,4 mg/mL- 5,62 mg/mL), del que se observa una concentración mínima de inhibición en 17,5 mg/mL, con un halo en promedio de $8,62 \pm 0,17$ mm a un volumen de 10 μ L. Además, la concentración que se obtiene usando un volumen de 5 μ L, fue de 30 mg/mL con un halo de inhibición de $9,31 \pm 0,09$ mm. Con respecto a la figura No 19, se realizó una comparación de las gráficas obtenidas en las figuras 17 y 18, en donde se visualiza que no existe una diferencia significativa obtenida a partir de los volúmenes 5 μ L y 10 μ L

Por tanto, puede afirmarse que los resultados son más exitosos cuando se aplica un volumen de 10 μ L. Además, se realizó una gráfica de probabilidad de supervivencia (anexo 8) con la cual se corroboró dichas concentraciones mínimas donde se comienza a visualizar el efecto antimicrobiano.

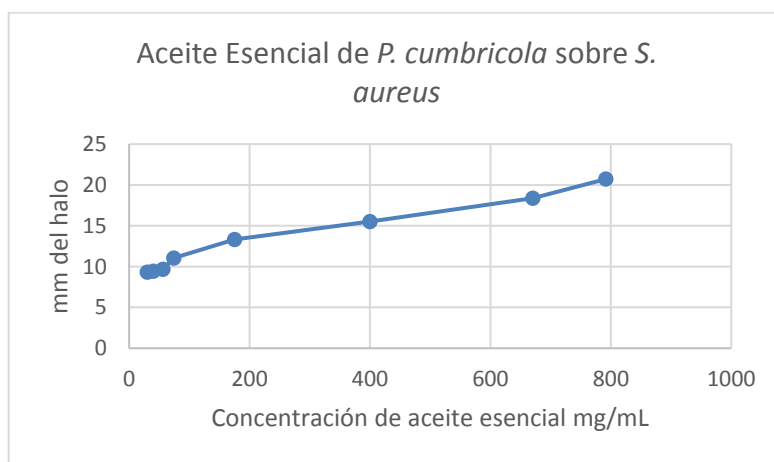


Figura 17. Gráfica de los mm del halo vs concentración del aceite con un volumen de 5 μ L

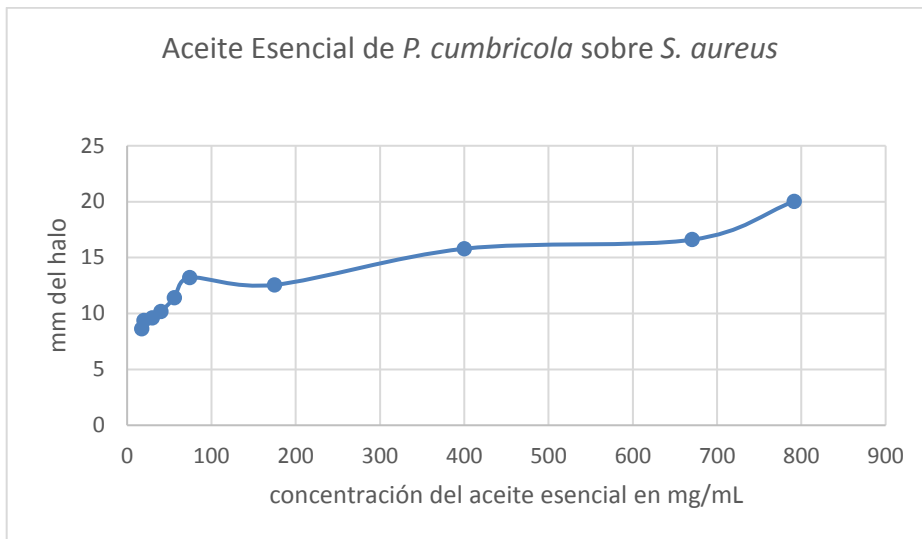


Figura 98 Grafica de los mm del halo vs concentración del aceite con un volumen de 10 µL

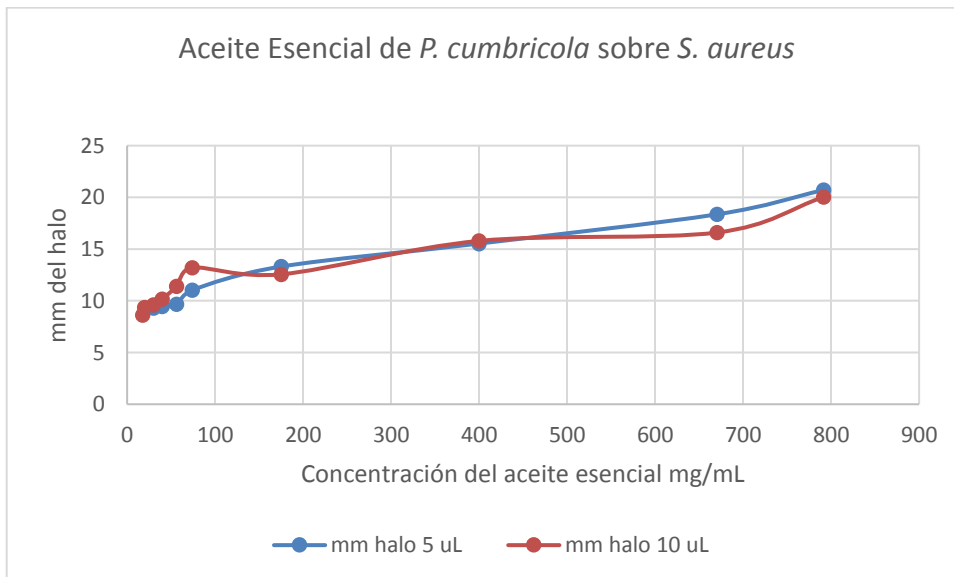
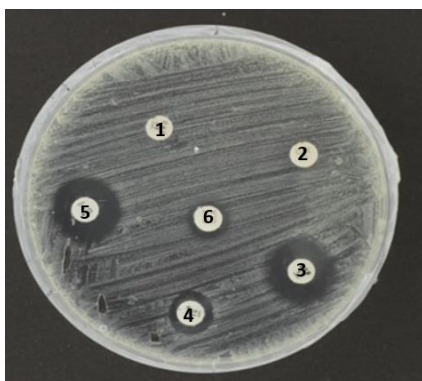


Figura 19 Grafica comparativa de los volúmenes empleados

Figura 20 Antibiograma *S. aureus* ATCC 29213



1. Ceftazidina (30 µg), 2. Cefotaxima (30 µg), 3. Ertapenem (10 µg), 4. Ampicilina (10 µg), 5. Ciprofloxacina (5 µg), 6. Ceftazidina (5 µg)/Acido Clavudinico (30 µg)

Adicionalmente, se realizó el antibiograma que se puede observar en la figura 20, utilizando Ertapenem, Ampicilina, Ciprofloxacina, Ceftalazidima/ Ácido Clavulídico, Ceftalazima, Ceftalazidina, a fin de probar la susceptibilidad y la resistencia de la *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Se puede visualizar en la figura 20 que esta cepa no responde a la Cefataxima y Ceftalazidina, ya que no se presentó inhibición. En contraste, se tuvo susceptibilidad al Ertapenem y la Ciprofloxacina puesto que presentó una inhibición mayor del crecimiento. También, se tuvo una susceptibilidad intermedia en Ampicilina y Ceftalazidina/Ácido Clavulídico. Así mismo, se midieron los halos correspondientes a una carga de 5 µL, los cuales se encuentran en el anexo No 6.

Por otro lado, se ha logrado observar que la concentración a la cual el aceite esencial comienza a presentar una inhibición para la cepa *S. aureus* ATCC 29213 fue de 17,5 mg/mL con un volumen de 10 µL de aceite en el disco. Mientras que, a un volumen de 5 µL de aceite, se tuvo inhibición hasta una concentración de 30 mg/mL. Además, a través de una prueba *t* de Student, se pudo establecer con una significancia de 0,05 que estadísticamente los datos de la concentración a la cual se comienza a presentar inhibición cuando el volumen es 5 µL y 10 µL son iguales, ya que se acepta la hipótesis nula donde se establece que, las medias de los halos obtenidas con los dos volúmenes son iguales debido a que el valor *p* es de 0,065. Lo anterior se visualiza en la figura 32 en donde puede observarse que los halos de inhibición con volúmenes evaluados (5 µL y 10 µL) tuvieron resultados muy similares.

7. DISCUSIÓN

7.1 Extracto Etanólico

En lo que se refiere al extracto concentrado, este se elaboró utilizando el método de la extracción discontinua, específicamente se subclasifica en una extracción por maceración sólido-líquido. Ya que se aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente. Además, la velocidad con la que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de partícula de la droga pulverizada, así como el grado de hinchamiento de las células y las propiedades del solvente. Por último, se concentró y se obtuvo un fluido de baja viscosidad de color verde oscuro. Se evaluó en los diferentes cultivos y se tuvo como resultado una pequeña inhibición la cual se encontraba en promedio con un halo de 9,82 mm. Por lo tanto, se procede a diluirse a una concentración de 804 mg/mL y 582 mg/mL, del extracto puro seco en agua tipo 2. En donde se pudo visualizar que no había una inhibición, es decir no hay efecto antibacteriano. Razón por la que no fue posible establecer la concentración en donde se empezaba a presentar inhibición de este producto. De lo que se concluye, que esta especie, *Piper cumbricola* Trel cuando se efectúa una extracción etanólica, no evidencia una actividad antimicrobiana. De igual modo, se ha encontrado que el extracto concentrado de las raíces de *Piper Longum* no posee actividad contra *S. aureus*³³, por lo que se infiere que al ser una sustancia que posee muchos compuestos, no se puede visualizar la actividad que este extracto realmente puede tener debido a la interferencia entre ellas.

No obstante, se han notificado estudios, en el caso de la *Piper longum* donde han sub-fraccionado, el extracto de esta especie quedando separados en sus compuestos principales³⁴, donde efectivamente se pudo visualizar que la piperina tiene efecto sobre *Bacillus cereus* el cual es otra bacteria gram positiva. Adicionalmente, en otro estudio realizado, también se encontró la efectividad de este compuesto sobre la especie *S. aureus* y su efecto potencializador con la ciprofloxacina en especies resistentes a la metilicina³⁵. Este es un hecho importante, ya que se debe estudiar si la *Piper cumbricola* Trel posee este mismo compuesto para probar su efecto. Por otro lado, se podría evaluar su efecto sinérgico utilizando otros antibióticos de importancia clínica,

como por ejemplo la oxacilina, que es un antibiótico al cual ya existe resistencia en Colombia³⁶ para el tratamiento de la *S. aureus*. Este podría ser un aporte importante, especialmente en los casos de resistencia que viven los pacientes en UCI, como son los inmunosuprimidos, porque es la población más propensa a experimentar estas resistencias.

7.2 Obtención del aceite esencial

La obtención del aceite esencial *Piper cumbricola* es un proceso de extracción continúa logrado a través del arrastre de vapor; el agua que permanece en contacto con el material vegetal permite la difusión celular de los principios activos hasta lograr su extracción. En este proyecto, a través de este proceso se obtuvo un rendimiento de 0,127 %. Valor cercano a los ya reportados en los aceites esenciales del género *Piper*.

Para la especie *Piper betle* se encuentra un rendimiento entre 0,15 %-0,2%³⁷, este aceite se caracteriza por un alto porcentaje de safrol, sustancia a la que se le atribuye la actividad antimicrobiana en las plantas. Además, se ha encontrado especies que la presentan con un alto contenido, posiblemente, tienen actividad y potencia antimicrobiana. Ya que, esta especie tiene un 27.48 % de este compuesto y reporta una potencia mayor de 1 mg/mL.

Por otro lado, se han estudiado cerca de doce aceites esenciales del género *Piper* donde se confirma mediante un análisis de GC- FIC y GC-MS que su componente mayoritario es el safrol, este oscila desde el 90% al 2%. Por ejemplo, en el caso del *Piper divericatum*, que contiene una concentración mínima inhibitoria de 0,650 mg/mL para la bacteria *S. aureus*, posee un una concentración de 98% de safrol^{38 39}. Por lo anterior, es posible que la *Piper cumbricola* tenga propiedades similares a estas.

7.3. Prueba Kirby-Bauer

El resultado en las bacterias gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa*, se observa en las figuras 16-19, en donde se evidencia la ausencia de actividad antibacteriana, tanto para el extracto concentrado y el aceite esencial de *P. cumbricola*. Lo anterior puede deberse quizá a la morfología

que tienen estas bacterias, ya que, poseen una capa delgada de péptidoglucano con una membrana plasmática que está ocupada por un gel denominado periplasma, este se compone por proteínas, que convierten las macromoléculas en productos más pequeños porque son metabolizados por la bacteria. Es decir, que estas proteínas reaccionan con los antibióticos o cualquier entidad química que les pueda provocar lisis. Además, contienen enzimas que participan en la modificación de compuestos que pueden dañar su estructura celular⁴⁰.

En contraste, se encuentran los resultados obtenidos con la bacteria *Staphylococcus aureus*, que es una gram positiva. Esta bacteria en su morfología está conformada por una gran capa de péptidoglucano sin periplasma, lo que permite inferir que puede haber una mayor penetración del aceite esencial. Ya que no se tiene una capa de proteínas y enzimas que impidan al aceite entrar en su estructura.

Cabe resaltar que solo el aceite esencial tuvo una respuesta en la inhibición lo cual puede deberse a que la extracción por arrastre de vapor resulta más adecuada para obtener la actividad antibacteriana. Lo mencionado anteriormente es coherente si se considera que estos aceites esenciales se componen de diferentes compuestos que no les permite desarrollar fácilmente resistencia a los microorganismos⁴¹.

De la misma manera, se puede establecer que este aceite esencial no tiene una alta potencia antibacteriana, ya que la cantidad necesaria para generar la inhibición es 18 veces mayor comparada con otros aceites esenciales de esta familia. Un ejemplo de ello, es el aceite extraído a partir de *Piper divericatum*, que contiene una concentración mínima inhibitoria de 0,650 mg/mL para la bacteria *S. aureus*³⁹. Adicionalmente, esto podría explicar la falta de actividad del aceite esencial evaluado en bacterias gram negativas como la *E. coli*, porque las especies potentes como la *Piper divericatum*, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de estos microorganismos.

De acuerdo con lo visualizado en el antibiograma, se estableció que la cepa *S. aureus* ATCC 29213 posee una resistencia a los antibióticos Cefataxima y Ceftalazidina, los cuales son unas cefalosporinas de amplio espectro. Mientras que el aceite esencial de *P. cumbricola*, presentó un efecto antibacteriano en esta cepa, por lo que se observa una mayor inhibición del crecimiento antimicrobiano con el aceite. Este es un hallazgo importante, porque actualmente según las guías

de práctica clínica, se puede visualizar que los antibióticos más comunes para el tratamiento de infecciones adquiridas por *S. aureus* son fármacos de amplio espectro como la ampicilina con sulbactam, que es un medicamento que ataca las betalactamasas. En el caso de la peritonitis, se tiene la cefalotina con amikacina, la cual también tiene un efecto sinérgico de alta potencia³. Por tanto, se podría pensar a futuro en nuevas farmacoterapias donde se incluya el aceite esencial de *P. cumbricola* para el tratamiento de infecciones de *S. aureus*, disminuyendo la resistencia a los antibióticos y evitando el consumo de los más potentes.

8.CONCLUSIONES

- El aceite esencial de la planta *Piper cumbricola*, tiene efecto antibacteriano, ya que se puede visualizar la formación del halo en diferentes concentraciones hasta llegar a una concentración mínima donde comienza a aparecer inhibición, lo cual es una evidencia de la inhibición bacteriana.
- El aceite esencial tiene una baja potencia, ya que se necesitan altas concentraciones para producir la actividad antibacteriana.
- Se obtuvo un resultado más eficiente empleando un volumen de 10 μ L debido a que se halló una concentración mínima donde comienza la inhibición es de 17,5 mg/mL.
- El aceite esencial de *Piper cumbricola* Trel, tiene mejores resultados que las cefalosporinas en la cepa *S. aureus* ATCC 29213, dado que presenta efecto antibacteriano, mientras que la cefalosporina no presenta este efecto..

9. RECOMENDACIONES

- Elaborar la confirmación del efecto antimicrobiano por micro dilución en caldo, visualizándolo en un lector de platos, el cual daría un resultado más confiable, puesto que es determinado por un instrumento analítico de alta resolución.
- Hacer la prueba de Kurbi Baguer, para otras especies gram positivas de importancia farmacéutica, para de esta manera, cerciorarse que funciona en las demás bacterias que poseen una morfología similar.
- Probar el aceite esencial en hongos con el objetivo de visualizar si posee una actividad antifúngica, que podría ser menor a la ya establecida en las bacterias gram positivas.
- Ensayar este aceite con otro antibiótico como por ejemplo oxacilina con el fin de evaluar si hay un efecto sinérgico fármaco-aceite esencial que logre una ampliación de su halo, es decir, una mejor susceptibilidad a la bacteria.
- Realizar un fraccionamiento bioguiado con el extracto y el aceite con el fin de encontrar sus componentes principales, para después revisar si estas moléculas purificadas poseen un mayor efecto antibacteriano.
- Realizar el proceso de la extracción utilizando las raíces de planta con el objetivo de encontrar más información acerca de su efecto antibacteriano y, determinar si este efecto es mayor que el encontrado en sus partes aéreas.

10.AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por haberme dado fortaleza para culminar este trabajo con éxito. A mi familia por todo su apoyo incondicional, por todos los consejos recibidos en los momentos difíciles. A mi tutor Guillermo L Montoya PhD, por toda su orientación, enseñanza y apoyo, por mostrarme el lado positivo de los problemas. A mi co-tutor Andrés F Davalos MSc, por su orientación y ayuda en la escritura. A Juan Camilo Sánchez, por su apoyo en este proyecto como curador del herbario. Al doctor Ricardo Callejas por la identificación de la planta. A mi evaluador Álvaro Barrera PhD, por tomarse el tiempo en leer y corregir este proyecto. A los asistentes del laboratorio de Productos Naturales por sus enseñanzas y a mis compañeros que formaron parte de este proceso.

11.REFERENCIAS

1. *Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos Manual para la primera fase de implementación.*
2. Estratégico, P. *PLAN NACIONAL DE RESPUESTA A LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.* (2018).
3. Edición, P. *GUÍA DE MANEJO ANTIBIÓTICO.*
4. *Resistencia antimicrobiana es un reto para sistemas de salud.*
5. de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J. & Harbarth, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med.* **13**, e1002184 (2016).
6. Mgbeahuruike, E. E., Yrjönen, T., Vuorela, H. & Holm, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. *South African J. Bot.* **112**, 54–69 (2017).
7. Patiño. *Farmacología Médica.*
8. Limsuwan, S. & Voravuthikunchai, S. P. Anti-Streptococcus pyogenes Activity of Selected Medicinal Plant Extracts Used in Thai Traditional Medicine. *Trop. J. Pharm. Res. August* **12**, 535–540 (2013).
9. Piyawan Voravuthikunchai, S. & Mitchell, H. *Inhibitory and Killing Activities of Medicinal Plants against Multiple Antibiotic-resistant Helicobacter pylori.* *Journal of Health Science* **54**, (2008).
10. Roslinah Mohamad Hussain*1, Nurul Adzuani Mohd Din1 & Noor Anis Nadhirah Md Na. Piper Betle Ethanolic reduces Neutrophil Scavenging Ability and Possibly Catalase Activity in *S. aureus*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 35–40 (2013).
11. Tekwu, E. M. *et al.* Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethnomedically used against strains of Mycobacterium tuberculosis. *J. Ethnopharmacol.* **142**, 374–382 (2012).
12. Antimicrobial and wound healing activities of piper hayneanum. **3**, 2018 (2018).
13. Silva, D. R. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Properties of Piper ovatum Vahl. *Molecules* **14**, 1171–1182 (2009).
14. Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A. & Muñoz, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement. Altern. Med.* **6**, 1–6 (2006).

15. da Costa, J. G. M. *et al.* Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. *Pharmacogn. Mag.* **6**, 331–4 (2010).
16. Kulski. *Phytochemistry of the genus Piper*. *Phytochemistry* **46**, (Pergamon, 1997).
17. Kulski. *Growth study and essential oil analysis of Piper aduncum from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **23**, (Elsevier, 2013).
18. Kuklinski. *Farmacognosia*. (2000).
19. Andrews, J. M. & M, J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 5–16 (2001).
20. MacGowan, A. & Macnaughton, E. Antibiotic resistance. *Medicine (United Kingdom)* **45**, 622–628 (2017).
21. Anthony A, A., Adekunle C, F. & Thor A, S. Residual antibiotics, antibiotic resistant superbugs and antibiotic resistance genes in surface water catchments: Public health impact. *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C* (2018). doi:10.1016/J.PCE.2018.03.004
22. González-Bello, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 4221–4228 (2017).
23. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Available at: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. (Accessed: 13th October 2018)
24. Federación de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires., D. Á. & Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* **48**, ([Federación de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires], 2014).
25. Sussman, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. (Cambridge University Press, 1997).
26. Liang, W. *et al.* Emergence and mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Henan, China, 2014. *J. Infect. Public Health* **11**, 347–351 (2018).
27. Alba Fernández Torres, Ana María García Ros, María Belén Pérez González, M. de los S. B. Zúñez Y. *Staphylococcus aureus* - - Google Libros. Available at: <https://books.google.com.co/books?id=uPuzDQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=staphylococcus+aureus&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj7tarqvsHeAhXD1FkKHQyAB40Q6AEINDAC#v=onepage&q=staphylococcus+aureus&f=false>. (Accessed: 6th November 2018)

28. Gil, M. *Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina.*
29. Djordjevic, Z. M., Folic, M. M. & Jankovic, S. M. Correlation between cefepime utilisation and Pseudomonas aeruginosa resistance rates to β -lactams and carbapenems in patients with healthcare-associated infections. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **13**, 60–64 (2018).
30. Brayton, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* **76**, 61–90 (1986).
31. Win, Alen, Janda, Koneman, Procorp, Wood, S. *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas.* (2006).
32. ROJAS, J. J., GARCÍA, A. M. & LÓPEZ, ALVIN J. EVALUACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* **4**, 28–32 (2005).
33. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu., J. & CHANDA, S. *Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extract of 34 Indian Medicinal plants against some Staphylococcus species.* *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY* **32**, (Scientific and Technical Research Council of Turkey, 2008).
34. . P. D. L. *et al.* Antibacterial Activity of Extracts of Piper longum. *J. Pharmacol. Toxicol.* **2**, 574–579 (2007).
35. Khan, I. A., Mirza, Z. M., Kumar, A., Verma, V. & Qazi, G. N. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 810–2 (2006).
36. Asociación Colombiana de Infectología., E. *et al.* *Infectio : revista de la Asociación Colombiana de Infectología.* *Infectio* **18**, (La Asociación, 2014).
37. Saxena, M., Khare, N. K., Saxena, P., Syamsundar, K. V & Srivastava, S. K. *Antimicrobial activity and Chemical composition of leaf oil in two varieties of Piper betle from northern plains of India.* *Journal of Scientific & Industrial Research* **73**, (2014).
38. Barbosa, Q. P. S. *et al.* Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of piper divaricatum: a new source of safrole. *Quim. Nova* **35**, 1806–1808 (2012).
39. Pineda, R., Vizcaíno, S., García, C. M., Gil, J. H. & Durango, D. L. chemical composition and antifungal activity of piper auritum kunth and Piper holtonii C.DC. against pitopahogenic fungi. *Chil. J. Agric. Res.* **72**, 507–515 (2012).
40. Pastor-Sánchez, R. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. *Gac. Sanit.* **20**, 175–181 (2006).

41. gholami, S., Tabatabaei, M. & Sohrabi, N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. *Microb. Pathog.* **109**, 94–98 (2017).

12. ANEXOS.

Anexo 1 Fotografías de las placas de *S. aureus* de 791.4 mg/mL hasta 5,62 mg/mL con un volumen de 10 μ L



Figura 21 791,4 mg/mL de aceite *P. cumbricola*



Figura 22, 670,4 mg/mL de aceite *P. cumbricola*

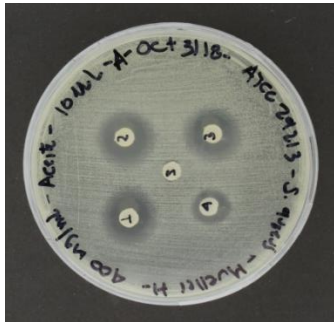


Figura 23 400 mg/mL de aceite *P. cumbricola*



Figura 24 175 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

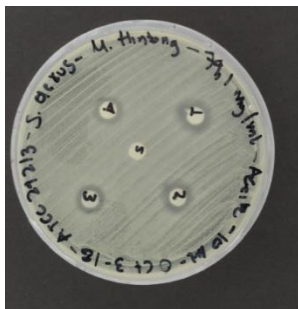


Figura 25, 74,1 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*



Figura 26, 56,2 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

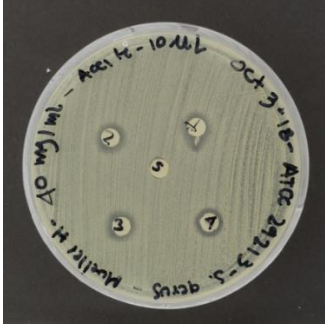


Figura 27, 40 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*



Figura 28, 17,5 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

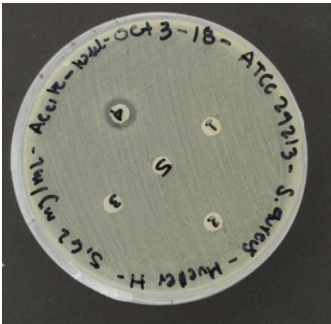


Figura 109, 5,62 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

Anexo 2 Medida de los halos de *S. aureus* desde 791,4 mg/mL hasta 40 mg/mL con un volumen de 10 μ L

*Tabla 7 Medidas de los halos a 10 μ L con 791,4 mg/mL aceite esencial *P. cumbricola**

halo 1	halo 2	halo 3	promedio
19,36	21,46	17,94	19,33
19,44	22,21	18,24	22,17
18,81	21,63	19,43	18,60
19,91	23,12	18,98	μ 20,03
19,31	22,2	18,56	SD 1,65
19,17	22,38	18,46	% CV 8,24
x 19,33 x	x 22,17 x	x 18,60	

*Tabla 8 Medidas de los halos a 10 μ L con 670,4 mg/mL de aceite esencial *P. cumbricola**

halo 1	halo 2	halo 3	promedio
18,26	16	15,63	17,89
18,25	16,53	16,42	16,03
18,14	15,56	15,43	16,01
17,09	16,28	16,69	μ 16,64
17,96	15,96	16,18	SD 1,00
17,63	15,85	15,68	%CV 5,99
17,89 x	16,03 x	16,01	

*Tabla 9 Medidas de los halos a 10 μ L con 400 mg/mL de aceite esencial *P. cumbricola**

halo 1	halo 2	halo 3	promedio
15,58	16,88	16,22	15,07
15,55	15,53	16,24	16,41
15,17	16,52	14,65	15,9
14,44	16,29	15,45	μ 15,79
14,72	16,61	16,35	SD 0,77
14,93	16,61	16,48	%CV 4,9
15,07 x	16,41 x	15,90	

*Tabla 10 Medidas de los halos a 10 μ L con 175 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola**

halo 1	halo 2	halo 3	promedio
13,34	13,14	12,14	14,14
13,81	13,13	12,17	13,15
14,4	13,09	12,97	12,57
14,31	13,42	12,87	μ 13,29
14,32	13,19	12,64	SD 0,74

14,64		12,9		12,64	%CV	5,6
14,14	x	13,15	x	12,57		

Tabla 11 Medidas de los halos a 10 uL con 74,1 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
11,19		11,83		10,59		12,07
11,73		11,75		10,07		11,53
12,99		11,9		10,67		10,64
12,38		11,43		10,9	μ	11,41
12,25		10,91		11	SD	0,74
11,88		11,38		10,62	%CV	6,5
12,07	x	11,53	x	10,64		

Tabla 12 Medidas de los halos con 56,2 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
13,22		13,05		12,58		13,6
13,66		13,36		12,55		13,12
13,65		13,43		12,54		12,92
13,66		12,81		12,79	μ	13,21
13,66		12,98		13,27	SD	0,44
13,76		13,07		13,79	%CV	3,3
13,60	x	13,12	x	12,92		

Tabla 13 Medida de los halos con 40 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
10,12		10,27		10,15		10,2
10,18		10,25		10,04		10,19
10,19		10,16		10,04		10,13
10,19		10,19		10,21	μ	10,17
10,26		10,12		10,16	SD	0,07
10,26		10,17		10,16	%CV	0,65
10,20	x	10,19	x	10,13		

Anexo 3 Fotografías de los halos de inhibición obtenidos utilizando 5 μ L desde 791,4 mg/mL hasta 40 mg/mL

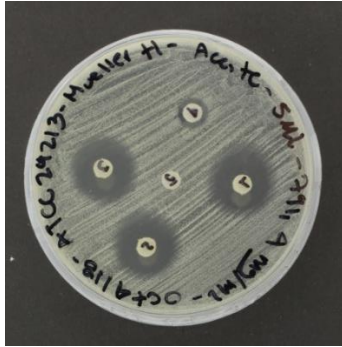


Figura 110 791,4 mg/mL de aceite esencial *P. cubricola*



Figura 31 670,4 mg/mL de aceite esencial *P. cubricola*



Figura 32 400 mg/mL de aceite esencial *P. cubricola*



Figura 33 175 mg/mL aceite de esencial de *P. cubricola*

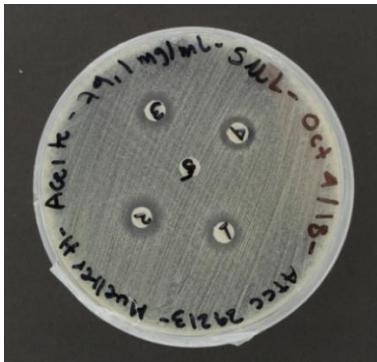


Figura 34, 79,1 mg/mL aceite esencial de *P. cumbricola*



Figura 35 56,2 mg/mL aceite esencial *P. cumbricola*

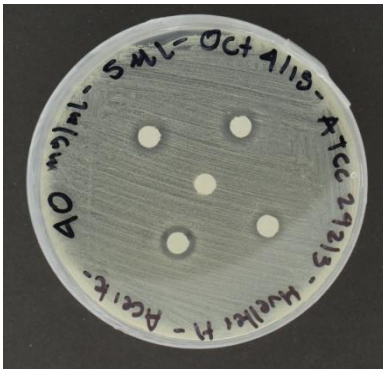


Figura 37 40 mg/mL aceite esencial de *P. cumbricola*

Anexo 4 Medida de los halos de inhibición a 5 μ L

Tabla 14 Medidas de los halos con 791,4 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
20,75		20,14		20,28		21,07
20,76		20,07		20,66		20,45
21,64		20,7		20,9		20,60
21,29		20,89		20,85	μ	20,71
21,41		20,16		21,03	SD	0,44
20,54		20,74		19,9	% CV	2,28
21,07	x	20,45	x	20,60		

Tabla 15 Medida de los halos con 670,4 mg/mL de aceite esencial *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
15,38		19,01		19,38		16,29
16,67		19,8		18,84		20,022
16,94		20,36		18,39		18,77
16,79		20,15		18,41	μ	18,36
15,96		20,15		18,63	SD	1,67
16,02		20,66		18,99	% CV	9,09
16,29	x	20,02	x	18,77		

Tabla 16 medidas de los halos con 400 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
15,59		15,5		14,92		15,59
15,13		15,34		15,23		15,61
15,42		15,51		15,87		15,38
16,15		15,74		15,16	μ	15,53
15,89		15,42		15,49	SD	0,34
15,35		16,16		15,62	% CV	2,17
15,59	x	15,61	x	15,38		

Tabla 17 Medida de los halos con 175 mg/mL de aceite esencial *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
12,77		13,6		13,32		12,86
12,37		13,68		13,78		13,42
13,57		13,67		13,88		13,65
13,52		13,24		13,67	μ	13,31
12,4		13,11		13,84	SD	0,49
12,51		13,22		13,38	% CV	3,7
12,86	x	13,42	x	13,65		

Tabla 18 Medida de los halos con 74,1 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
10,61		11,49		10,93		10,56
10,17		11,5		10,92		11,52
10,18		11,87		10,92		11,04
10,65		11,31		11,47	μ	11,04
10,87		11,59		11,22	SD	0,47
10,87		11,36		10,75	% CV	4,29
10,56	x	11,52	x	11,04		

Tabla 19 Medidas de los halos con 56,2 mg/mL de aceite esencial *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
10,06		9,21		9,44		9,91
9,58		9,49		9,62		9,46
9,95		9,34		9,99		9,65
9,86		10,34		9,75	μ	9,67
10		9,75		9,5	SD	0,39
9,99		8,62		9,58	% CV	4,04
9,91	x	9,46	x	9,65		

Tabla 20 Medida de los halos con 40 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
8,98		9,49		9,71		9,30
9,88		9,52		8,86		9,62
8,97		9,33		9,98		9,41
9,65		9,78		8,74	μ	9,44
9,52		9,8		9,59	SD	0,4
8,82		9,8		9,55	% CV	4,21
9,30	x	9,62	x	9,41		

Tabla 21 Medida de los halos con 30 mg/mL de aceite esencial de *P. cumbricola*

halo 1		halo 2		halo 3		promedio
9,1		9,7		9,17		9,20
9,08		9,68		9,17		9,50
9,08		9,67		9,02		9,24
9,31		9,33		9,36	μ	9,31
9,32		9,32		9,34	SD	0,09
9,33		9,32		9,35	% CV	0,86
9,20	x	9,50	x	9,24		

Anexo 5 Medida de los halos con un volúmen de 10 μ L

Concentración 40 mg/mL

halo 1	halo 2	halo 3	halo 4	halo 3	promedio
10,12	10,27	10,15	10,16	10,12	10,20
10,18	10,25	10,04	10,26	10,11	10,19
10,19	10,16	10,04	10,25	10,11	10,13
10,19	10,19	10,21	10,24	10,11	10,21
10,26	10,12	10,16	10,24	10,11	10,12
10,26	10,17	10,16	10,13	10,17	10,17
10,20	10,19	10,13	10,21	10,12	10,17

Concentración 30 mg/mL

halo 1	halo 2	halo 3	halo 4	halo 3	promedio
10,1	9,5	9,51	9,67	9,39	10,07
10,06	9,49	9,34	9,67	9,26	9,54
10,2	9,5	9,21	9,7	9,27	9,46
10,1	9,51	9,5	9,7	9,5	9,65
9,99	9,52	9,54	9,73	9,1	9,29
9,98	9,7	9,66	9,4	9,2	9,60
10,07	9,54	9,46	9,65	9,29	9,60

Concentración 20 mg/mL

halo 1	halo 2	halo 3	halo 4	halo 10	promedio
10,22	9,19	9,11	9,02	9,74	9,63
9,17	9,18	9,11	9,01	9,77	9,17
9,19	9,18	9,1	9,06	9,78	9,03
9,99	9,18	9,1	9,22	9,78	9,23
9,19	9,13	8,89	9,52	9,78	9,77
10,01	9,18	8,88	9,52	9,77	9,37
9,63	9,17	9,03	9,23	9,77	9,37

Concentración 17,5 mg/mL

halo 1	halo 2	halo 3	halo 4	promedio
8,87	8,86	8,53	8,48	8,86
8,87	8,85	8,53	8,48	8,73
8,86	8,77	8,52	8,31	8,52
8,86	8,69	8,52	8,32	8,37
8,86	8,69	8,5	8,33	8,62
8,86	8,52	8,49	8,32	
8,86	8,73	8,52	8,37	

Anexo 6 Medida de los halos con un volumen de 5 µL

Concentración 40 mg/mL

halo 2	halo 2	halo 3	halo 4	halo 3	promedio
9,54	8,94	9,17	9,49	9,58	9,16
9,23	8,94	9,18	9,57	9,41	9,03
9,22	9,08	10,25	9,59	9,4	9,57
9	9,08	9,82	9,59	9,4	9,54
8,99	9,08	9,49	9,61	9,79	9,56
8,98	9,08	9,48	9,4	9,79	9,37
9,16	9,03	9,57	9,54	9,56	

Concentración 30 mg/mL

halo 1	halo 2	halo 3	halo 4	halo 3	promedio
9,1	9,7	9,17	9,36	9,05	9,20
9,08	9,68	9,17	9,37	9,05	9,50
9,08	9,67	9,08	9,37	9,04	9,25
9,31	9,33	9,36	9,37	9,04	9,31
9,32	9,32	9,34	9,34	9,04	9,04
9,33	9,32	9,35	9,05	9,04	9,26
9,20	9,50	9,25	9,31	9,04	

Anexo 7 Prueba t de student

Prueba T e IC de dos muestras: mm. volumen

Método

μ_1 : media de mm cuando volumen = 5

μ_2 : media de mm cuando volumen = 10

Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

No se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticos descriptivos: mm

volumen	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
5	144	13,61	4,01	0,33
10	180	12,82	3,62	0,27

Estimación de la diferencia

Diferencia	IC de 95% para la diferencia
0,794	(-0,050. 1,639)

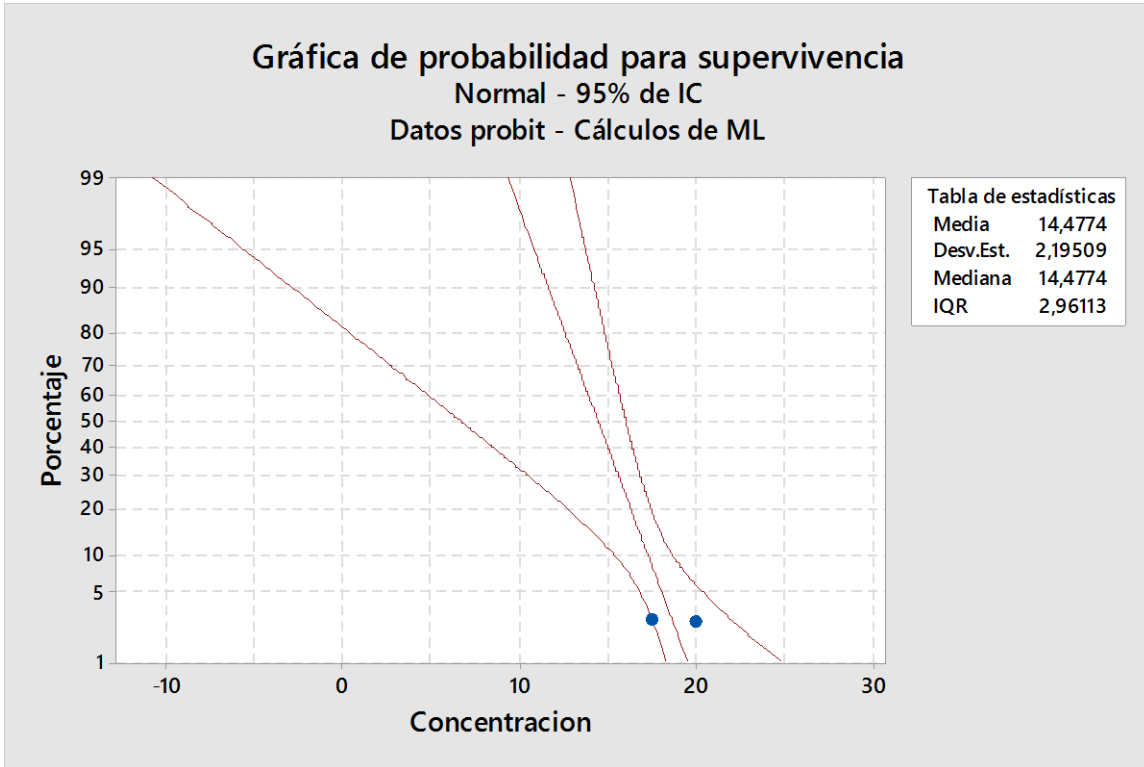
Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T	GL	Valor p
1,85	291	0,065

Anexo 8 Grafica de probabilidad para supervivencia



Anexo 9 Analisis Probit

Análisis de Probit: supervivencia vs. Concentración

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
supervivencia	1	10 (Evento)
	0	648
Total		658

Frecuencia: halo

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	6,59536	2,90660	2,27	0,023
Concentracion	-0,455563	0,164728	-2,77	0,006

Natural

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	7,32982	12	0,835
Desviación	7,26962	12	0,839

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Estimación	Error estándar	IC normal de 95,0%	
			Inferior	Superior
Media	14,4774	1,26061	12,0066	16,9481
Desv.Est.	2,19509	0,793726	1,08060	4,45902

Anexo 10 Protocolo de Seguridad Biológica

PROTOCOLO DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

1. OBJETIVO

- 1.1. Definir un procedimiento para la manipulación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Echerichia Coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, en el laboratorio 406 L, el cual incluye la eliminación de los materiales que se incluyen en el trabajo realizado con el material biológico.

2. ALCANCE

- 2.1 Este procedimiento garantizará la seguridad de los estudiantes, investigadores, profesores, tutores, personal de aseo y de manejo de desechos.

3. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

- 3.1. El personal de operación y las personas autorizadas que ingresan al laboratorio 406 L deben tener un conocimiento de este procedimiento y seguir las instrucciones
- 3.2. El personal autorizado al ingresar a este laboratorio debe verificar que este protocolo sea debidamente cumplido por los estudiantes investigadores y tutores.
- 3.3. El ingreso de personal al lugar de manipulación de las cepas, debe ser controlado, y solo las personas autorizadas podrán ingresar a este espacio
- 3.4. Los estudiantes deben usar adecuadamente los implementos de seguridad para el manejo de cepas bacteriana de nivel de riesgo II de *Pseudomonas aeruginosa*
- 3.5. Todo el personal debe conocer la información de la utilización de *Pseudomonas aeruginosa*, específicamente si lo van a manipular

4. DEFINICIONES

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se define como un patógeno oportunista en los humanos en instalaciones asociadas a la atención médica, es una especie aeróbica gram negativa. Este patógeno es común en pacientes inmunosuprimidos y los asistidos o ventilación mecánica. Esta es un patogeno de riesgo 2

La cepa de *Echerichia Coli* es una bacteria gramnegativa con forma de bacilo perteneciente a la familia enterobacterias, este es una bacteria de riesgo 1

Grupo de riesgo 1 (riesgo invidual y poblacional escaso o nulo) El microorganismo que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales

Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

5. MATERIALES

5.1 IMPLEMENTOS DE SEGURIDAD RECOMENDADOS

- * Bata de laboratorio anti-fluidos y de manga larga
- * Guantes de nitrilo
- * Gorro
- * Tapabocas
- * Gafas de seguridad
- * Pantalones largos que cubran toda la piel
- * Zapatos cerrados que cubran toda la piel

5.2 EQUIPOS

- * Cabina de seguridad biológica
- * Mesones de laboratorio
- * Autoclave
- * Mecheros para la esterilización continua de los instrumentos
- * Caneca roja para el desecho del material biológico
- * Etiqueta en la caneca roja que de información sobre la identidad de las cepas.

5.3 DESINFECTANTES

- * Etanol al 70 %
- * Hipoclorito de sodio al 0,5 %

6. DESCRIPCION DEL PROCESO

6.1 CONSIDERACIONES GENERALES: IMPLEMENTOS DE SEGURIDAD RECOMENDADOS

- 6.1.1. Se usará siempre la bata para el trabajo en el laboratorio
- 6.1.2. Se usan guantes de nitrilo para todos los procedimientos que puedan tener un contacto directo o accidental con las cepas *Pseudomonas aeruginosa*. Una vez usados, los guantes deben ser desechados en el tarro rojo (riesgo biológico), a continuación se lavaran las manos.
- 6.1.3. El personal se lavará las manos después de manipular todo el material contaminado y después de utilizar las zonas de trabajo del laboratorio
- 6.1.4. Se prohíbe usar las prendas protectoras fuera del laboratorio en lugares como cafeterías, oficinas, biblioteca, salas para el personal y baños

6.1.5. En el laboratorio está prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto

6.1.6. Esta prohibido almacenar alimentos o bebidas en las zonas de trabajo del laboratorio

6.2 HIGIENE Y SANITIZACIÓN

6.2.1 Se realizará sanitización del personal antes y después del trabajo del laboratorio.

6.2.2 Verificar la existencia de desinfectantes y antisépticos, como son el hipoclorito de sodio 0,5% y etanol al 70%

6.2.3 La higiene de las manos se realizará el lavado de antebrazos y manos con agua y jabón líquido el cual formará una abundante espuma con el jabón y se frotarán bien las manos durante 30 segundos, se aclararán en agua limpia y se secarán con una toalla de papel.

6.2.4 Se aplicará etanol al 70 % sobre toda la superficie de las manos y se dejará secar a fin de sanitizar.

6.2.5 Se utilizará etanol al 70 % en una toalla absorbente para sanitizar la Cámara de Seguridad Biológica tipo II, pasando una sola vez por el mismo lugar.

6.2.6 Se evitará la contaminación cruzada, aplicando etanol al 70% sobre las manos al ingresarlas a la cámara

6.2.7 El material se ingresará a la cámara deberá sanitizar antes y después.

6.3 CONSIDERACIONES GENERALES: CAMA DE SEGURIDAD BIOLOGICA TIPO II

6.3.1. La cámara de bioseguridad no se utilizará si no funciona de manera adecuada

6.3.2. La ventana de vidrio no debe abrirse mientras se esta utilizando la cámara

6.3.3. Los aparatos y materiales introducidos en la cámara deben ser mínimos y no deberán bloquear el sistema de circulación del aire en la cámara de distribución trasera

6.3.4. Se utilizarán mecheros para proteger el área de trabajo e incinerar las asas metálicas que se utilicen

6.3.5. El trabajador no debe alterar el flujo de aire al sacar y volver a introducir repetidas veces los brazos, ni generar movimientos bruscos con ellos.

6.3.6. las rejillas de aire no deben estar bloqueadas con papeles, pipetas u otros materiales, pues se perturba el flujo de aire y se puede provocar la contaminación del material y la exposición del trabajador

6.3.7. la superficie de la cámara de seguridad biológica se limpiará con una toalla absorbente que contenga un desinfectante una vez finalizado el trabajo

6.3.8 El ventilador de la cámara se encenderá 5 minutos antes de empezar el trabajo y debe seguir funcionando al menos 5 minutos después de concluido el trabajo

6.3.9 No se introducirán papeles en las cabinas de seguridad biológica

PROTOCOLO PARA EL TRABAJO EN EL LABORATORIO 406 L

6.4.1. Al inicio de las labores dentro del laboratorio se deben tener en cuenta las consideraciones generales del numeral 6.1 y el procedimiento descrito de higiene y sanitización descrito en el apartado 6.2.

6.4.2. Para trabajar directamente con las cepas como para el material que pueda ser potencialmente contaminado por ellas, se debe realizar todo bajo Cámara de Seguridad Biológica Tipo II.

6.4.3. Para el trabajo dentro de la cámara se deben tener en cuenta las consideraciones generales del trabajo en CSB del numeral 6.3.

6.4.4. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Echerichia Coli* ATCC 25922 se encuentran en crio-conservación (viales Eppendorf) en el refrigerador del primer piso a -80°C, por lo tanto siempre que se vayan a utilizar, se deben retirar de manera cuidadosa, introducir las en tubos Falcón de 15 o 50 ml, cerrados con hielo en su interior, y transportarlas hasta el laboratorio en nevera de icopor evitando movimientos bruscos que posibiliten las caídas, rompimientos, golpes y derrame del contenido de los viales con el microorganismo.

6.4.5. Al momento de llegar al laboratorio se deben ingresar rápidamente los tubos falcón a la CSB, para evitar posibles contaminaciones.

6.4.6. Los tubos falcón se abren dentro de la CSB, donde se extrae cada cepa (tubo Eppendorf), estos se abrirán sólo cuando sea necesario. A partir de ese momento no se deben retirar materiales de la CSB, ya que existe una exposición directa con el agente bacteriano.

6.4.7. La puerta de ingreso a la CSB del laboratorio permanecerá cerrada durante el desarrollo de los procedimientos y como mínimo cinco minutos después de haber terminado los mismos.

6.4.8. Se dispondrá de todos los insumos necesarios para cada procedimiento desde el inicio en la CSB, para minimizar los recorridos que puedan generar diseminación del agente biológico.

6.5. PROTOCOLO PARA EL MANEJO DE DESECHOS

6.5.1. Todo insumo utilizado dentro de la CSB y que haga parte de cada procedimiento de trabajo se manejará como residuo biológico potencialmente peligroso.

6.5.2. Se dispondrá de una bolsa roja para el desecho de los materiales utilizados durante los procedimientos, la cual se rotulará con la etiqueta



PELIGRO BIOLÓGICO

**ACCESO RESTRINGIDO.
SÓLO PERSONAL AUTORIZADO**

Nivel de bioseguridad: _____

Investigador encargado: _____

En caso de emergencia, avísese a: _____

Teléfono diurno: _____

Teléfono particular: _____

**Las autorizaciones de entrada deberán solicitarse al
investigador encargado mencionado más arriba**

El material de vidrio utilizado, así como las puntas de micropipeta que hayan o no tenido contacto directo con el agente, deben tener un tratamiento especial antes de ser reutilizados. Estos desechos deben ser esterilizados en autoclave y posteriormente lavados (si se desean reciclar).

6.5.4. El material desechable tales como cajas de Petri, guantes, filtros de membrana etc., se deben inactivar en autoclave o incinerar. No re-utilizar.

6.5.5. El material que se utilizó para la manipulación de las cepas será rotulado con la siguiente nomenclatura: Iniciales del microorganismo (PA) seguido de la palabra ATCC y su correspondiente número (), la fecha de su utilización y las iniciales de las personas encargadas (CFG Constanza Feria Galvez). Todo separado por un guión a media altura. Por ejemplo, PA ATCC 27853– 09/08/2018– CFG

6.6. PARA EL INGRESO AL LABORATORIO 406L LAS PERSONAS DEBERÁN:

6.6.1. Utilizar los implementos de seguridad recomendados (apartado 6.1.)

6.6.2. Quitarse todo tipo de accesorios: reloj, pulseras, anillos, aretes.

6.6.3. Colocarse las prendas de seguridad destinadas para el personal.

6.6.4. En caso de tener el cabello largo recogerlo o usar gorro.

6.6.5. No utilizar maquillaje.

6.6.6. No ingresar al área alimentos, bebidas o medicamentos puesto que podría desencadenar una contaminación cruzada con las cepas a trabajar de *Pseudomonas aeruginosa* y *Echerichia Coli*.

6.6.7. Retirar las prendas de seguridad al finalizar el trabajo en el laboratorio, guardar las mismas en un bolsa plástica hermética para evitar contaminar otros elementos. Realizar un proceso de lavado y desinfección de las prendas de laboratorio para evitar la diseminación del microorganismo, usando agentes desinfectantes (hipoclorito de sodio).

7. REFERENCIAS

Chosewood, W. D. (2009). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. . US .