



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

TEMA:

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Piper nubigenum* Kunth, FRENTE
A CEPAS ATCC DE *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*
PRODUCTORAS DE ENFERMEDADES BUCALES.”**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Odontólogo

Autor: Estefania Katherine Mosquera Santos

Tutor: MSc. David Israel Guerrero Vaca

Riobamba – Ecuador

2021

PÁGINA DE REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de sustentación del proyecto de investigación de título: “EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Piper nubigenum* Kunth, FRENTE A CEPAS ATCC DE *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* PRODUCTORAS DE ENFERMEDADES BUCALES.”, presentado por **Estefania Katherine Mosquera Santos** y dirigida por el MSc. **David Israel Guerrero Vaca**, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación, escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH; para constancia de lo expuesto firman:

MSc. David Guerrero Vaca.

Tutor



Firma

Dr. Carlos Espinoza Chávez.

Miembro del Tribunal



Firma

Dra. María Calderón Paz.

Miembro del Tribunal



Firma

CERTIFICADO DEL TUTOR

El suscrito docente-tutor de la Carrera de Odontología, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Chimborazo, MSc. David Israel Guerrero Vaca CERTIFICA, que la señorita Estefania Katherine Mosquera Santos con C.I: 1719101196, se encuentra apto para la presentación del proyecto de investigación: “Efecto antimicrobiano de *Piper nubigenum* Kunth, frente a cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* productoras de enfermedades bucales.” y para que conste a los efectos oportunos, expido el presente certificado, a petición de la persona interesada, el 03 de junio en la ciudad de Riobamba en el año 2021.

Atentamente,



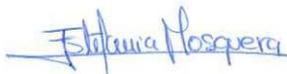
MSc. David Israel Guerrero Vaca

Bqf. David Guerrero. Msc
REPRESENTANTE TÉCNICO
Cel. 0979287225

DOCENTE – TUTOR DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA

AUTORÍA

Yo, Estefania Katherine Mosquera Santos, portador de la cédula de ciudadanía número 1719101196, por medio del presente documento certifico que el contenido de este proyecto de investigación es de mi autoría, por lo que eximo expresamente a la Universidad Nacional de Chimborazo y a sus representantes jurídicos de posibles acciones legales por el contenido de esta. De igual manera, autorizo a la Universidad Nacional de Chimborazo para que realice la digitalización y difusión pública de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



.....
Estefania Katherine Mosquera Santos

C.I. 1719101196

ESTUDIANTE UNACH

AGRADECIMIENTO

A mi querida Universidad Nacional de Chimborazo por abrirme las puertas y darme la oportunidad de convertirme en profesional. Agradecer también al MSc. David Israel Guerrero Vaca, mi docente tutor por guiarme y apoyarme con su conocimiento para la realización de esta investigación. Agradezco también a mis docentes por contribuir en mi formación con su conocimiento y experiencia que me servirá tanto en mi vida profesional como en la vida diaria. Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo la cual me ayudó con sus laboratorios, la donación de cepas ATCC y la ayuda tanto del Decano de la Facultad de Ciencias el Doctor Edmundo Caluña, como de la Ingeniera Carla Haro, el Ingeniero Benjamín Román y la Doctora Yolanda Buenaño que me ayudaron en la parte práctica de este proyecto investigativo con sus conocimientos y su tiempo.

Estefania Katherine Mosquera Santos

DEDICATORIA

Esta dedicatoria va dirigida a Dios y a la virgencita de Fátima que jamás me han abandonado a lo largo de mi formación en la Universidad Nacional de Chimborazo. A mi madre, profesional Odontóloga, a quien admiro por su fuerza y entereza, por quien seguí esta hermosa carrera, ella que con tanto esfuerzo y dedicación, siempre me ha apoyado tanto económica como psicológicamente, en el transcurso no solo de mi carrera sino en cada día de mi vida y estaré eternamente agradecida, además es y será siempre mi modelo a seguir. A mi padre por escucharme día a día, creer siempre en mí, darme ánimos y estar ahí cuando más lo necesite, además de ayudarme con la recolección de plantas usadas para esta investigación. A mi hermana, mi amiga incondicional, quien con sus palabras de aliento me ayudo en este duro camino, quien nunca dejo de creer en mí, acompañándome muchas veces en mis noches de desvelo. A mi novio quien aguantó todos mis cambios de humor, además de ayudarme, enseñarme y acompañarme desde que lo conocí. A mis perritos Thor, Lucky, Celeste, Dasha, Kiara, Conan, Layca y mi gatito Alex que fueron mi compañía durante toda mi carrera y que son parte importante de mi vida.

Estefania Katherine Mosquera Santos

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1. Objetivo general.....	5
4.2. Objetivos específicos.....	5
5. MARCO TEÓRICO.....	6
5.1. Medicina ancestral.....	6
5.1.1. Origen.....	6
5.1.2. Metabolitos importantes en el efecto antimicrobiano.....	7
5.1.3. Plantas de uso odontológico.....	7
5.1.4. Clasificación taxonómica de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	8
5.1.5. Habitación de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	8
5.1.6. Uso de la <i>Piper nubigenum Kunth</i>	9
5.2. Microbiota oral.....	9
5.2.1. Microambientes.....	9
5.2.1.1. Saliva.....	9
5.2.1.2. Mucosa bucal.....	10
5.2.1.3. Superficies dentarias.....	10
5.2.1.4. Surco gingival.....	10
5.2.1.5. Lengua.....	10
5.2.1.6. Materiales dentales.....	10
5.2.2. <i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>).....	11
5.2.2.1. Clasificación taxonómica.....	11
5.2.2.2. Características.....	11
5.2.2.3. Manifestaciones clínicas.....	12
5.2.2.4. Diagnóstico.....	14

5.2.3.	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>E. faecalis</i>).....	14
5.2.3.1.	Clasificación taxonómica.	14
5.2.3.2.	Características.	14
5.2.3.3.	Enfermedades por <i>E. faecalis</i>	15
5.2.3.4.	Transmisión.....	16
5.2.3.5.	Resistencia.....	16
5.2.3.6.	Diagnóstico.....	16
5.2.3.7.	Tratamiento.	16
5.3.	Cepas microbiológicas.....	16
5.4.	Medios de cultivo de Cepas.....	17
5.4.1.	Tipos de medio de cultivo.....	17
5.4.1.1.	Según el agar:.....	17
5.4.1.2.	Según su utilidad en microbiología diagnóstica:.....	18
5.4.1.3.	Según el formato de los medios de cultivo:.....	18
5.4.2.	Medio de cultivo para hongos.....	18
5.4.2.1.	Agar Dextrosa Sabouraud.....	19
5.4.3.	Medio de cultivo para <i>E. faecalis</i>	19
5.4.3.1.	Infusión Cerebro Corazón.	19
5.5.	Siembra.....	19
5.5.1.	Tipos de siembra.....	19
5.5.1.1.	Tubos con agar inclinado.....	19
5.5.1.2.	Siembra en placas.	19
5.5.2.	Aislamiento de microorganismos.	20
5.5.2.1.	Por diseminación en la superficie de un medio sólido en la placa Petri.....	20
5.5.2.2.	Por mezcla.	20
6.	METODOLOGÍA.....	21
6.1.	Tipo de investigación.....	21

6.2. Diseño de la investigación.....	21
6.3. Muestra de estudio.....	21
6.4. Entorno.....	21
6.5. Técnicas e instrumentos.....	21
6.6. Recursos.....	21
6.6.1. Materia prima vegetal.....	21
6.6.2. Material microbiológico.....	22
6.7. Cuestiones éticas.....	22
6.8. Intervenciones.....	22
6.8.1. Tratamiento de la planta.....	22
6.8.1.1. Recolección.....	22
6.8.1.2. Acondicionamiento de especies vegetales.....	22
6.8.2. Determinación del contenido de humedad total.....	22
6.8.3. Determinación de cenizas totales.....	23
6.8.4. Preparación de los extractos.....	24
6.8.5. Tamizaje fitoquímico.....	25
6.8.5.1. Tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.....	27
6.8.5.2. Tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.....	28
6.8.5.3. Tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.....	31
6.8.6. Preparación de concentraciones.....	32
6.8.7. Activación y replicación de cepas ATCC 29219 de <i>E. faecalis</i> y cepas ATCC 10231 de <i>C. albicans</i>	32
6.8.8. Siembra de microorganismos.....	33
6.9. Operacionalización de variables.....	34
6.9.1. Variable independiente.....	34
6.9.2. Variable dependiente.....	34
7. RESULTADOS.....	35

7.1. Recolección.....	35
7.2. Acondicionamiento de especie vegetal.....	36
7.3. Determinación del contenido de humedad total por el método gravimétrico.....	38
7.4. Determinación de cenizas totales.	38
7.5. Preparación de los extractos.	39
7.5.1. Extracto Etéreo.....	39
7.5.2. Extracto Alcohólico.	40
7.5.3. Extracto Acuoso.....	41
7.6. Tamizaje fitoquímico.....	42
7.7. Preparación de concentraciones.....	48
7.8. Activación y replicación de cepas.	50
7.9. Resultados de los halos inhibitorios producidos por los extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a las cepas ATCC de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i>	51
7.9.1. Resultados de los halos inhibitorios de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC 29219 de <i>E. faecalis</i>	51
7.9.1.1. Resultados de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>E. faecalis</i>	53
7.9.1.2. Resultados de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>E. faecalis</i>	54
7.9.1.3. Resultado de los halos inhibitorios de Extracto Acuoso de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>E. faecalis</i>	55
7.9.1.4. Nivel de sensibilidad de los extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a <i>E. faecalis</i>	55
7.9.2. Resultados de los halos inhibitorios de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC 10231 de <i>C. albicans</i>	56
7.9.2.1. Resultados de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>C. albicans</i>	57
7.9.2.2. Resultados de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>C. albicans</i>	58

7.9.2.3. Resultado de los halos inhibitorios de extracto acuoso de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>C. albicans</i>	59
7.9.2.4. Nivel de sensibilidad de los extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a <i>E. faecalis</i>	60
7.10. Halos inhibitorios de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a <i>E. faecalis</i> , en comparación con <i>Piper augustifolium</i>	61
7.11. Halos inhibitorios de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a <i>C. albicans</i> , en comparación con <i>Piper carpunya</i>	61
7.12. Contrastación de la hipótesis.....	62
8. DISCUSIÓN.....	66
9. CONCLUSIONES.....	70
10. RECOMENDACIONES	72
11. BIBLIOGRAFÍA.....	73
12. ANEXOS	80
ANEXO1. Halos inhibitorios de los extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>E. faecalis</i>	80
ANEXO 2. Halos inhibitorios de los extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC de <i>C. albicans</i>	80
ANEXO 3. Certificado de donación de cepas ATCC por parte de la ESPOCH.	81
ANEXO 4. Certificación de la planta otorgada por el herbario de la ESPOCH.	82
ANEXO 5. Pronunciamiento favorable N° MAAE-ARSFC-2020-0881.	83
ANEXO 6. Guía de movilización.....	84
ANEXO 7. Autorización de recolección de especímenes de especies de la diversidad biológica Nro. 881	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1.	Taxonomía de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.	8
Tabla Nro. 2.	Taxonomía de <i>C. albicans</i>	11
Tabla Nro. 3.	Taxonomía de <i>E. faecalis</i>	14
Tabla Nro. 4.	VI. Cepas ATCC de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i>	34
Tabla Nro. 5.	VD. Efecto antimicrobiano de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.	34
Tabla Nro. 6.	Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.....	42
Tabla Nro. 7.	Tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico de raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.....	43
Tabla Nro. 8.	Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.....	44
Tabla Nro. 9.	Tamizaje fitoquímico de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth en comparación con plantas de la misma familia.....	45
Tabla Nro. 10.	Resultado de los halos de inhibición de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth frente a cepas ATCC 29219 de <i>E. faecalis</i>	51
Tabla Nro. 11.	Descripción de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth frente a cepas ATCC de <i>E. faecalis</i>	53
Tabla Nro. 12.	Descripción de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth frente a cepas ATCC de <i>E. faecalis</i>	54
Tabla Nro. 13.	Nivel de sensibilidad de los extractos frente al <i>E. faecalis</i>	55
Tabla Nro. 14.	Resultado de los halos de inhibición de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth frente a cepas ATCC 10231 de <i>C. albicans</i>	56
Tabla Nro. 15.	Descripción de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth frente a cepas ATCC de <i>C. albicans</i>	57
Tabla Nro. 16.	Descripción de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth frente a cepas ATCC de <i>C. albicans</i>	58
Tabla Nro. 17.	Nivel de sensibilidad de los extractos frente a la <i>C. albicans</i>	60

Tabla Nro. 18.	Halos inhibitorios de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a <i>E. faecalis</i> , en comparación con <i>Piper augustifolium</i>	61
Tabla Nro. 19.	Halos inhibitorios de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a <i>C. albicans</i> , en comparación con <i>Piper carpunya</i>	61
Tabla Nro. 20.	Prueba de normalidad.....	62
Tabla Nro. 21.	Estadístico de prueba H1	63
Tabla Nro. 22.	Estadístico de prueba H2.....	63
Tabla Nro. 23.	Estadístico de prueba H3.....	64
Tabla Nro. 24.	Estadístico de prueba H4.....	64
Tabla Nro. 25.	Estadístico de prueba H5.....	65

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía Nro. 1. Planta <i>Piper nubigenum Kunth</i> en su habidad natural.....	35
Fotografía Nro. 2. Identificación de Planta por el herbario de la ESPOCH.	35
Fotografía Nro. 3. Limpieza de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	36
Fotografía Nro. 4. Raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> preparada para el secado.....	36
Fotografía Nro. 5. Raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> cortada y seca.	37
Fotografía Nro. 6. Raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> molida.....	37
Fotografía Nro. 7. Pesos después del proceso de determinación de humedad total.	38
Fotografía Nro. 8. Pesos finales después del proceso de determinación de cenizas.....	38
Fotografía Nro. 9. Peso de materia vegetal para extracto etéreo.	39
Fotografía Nro. 10. Extracto Etéreo.....	39
Fotografía Nro. 11. Peso de materia vegetal para extracto alcohólico.	40
Fotografía Nro. 12. Extracto alcohólico.	40
Fotografía Nro. 13. Peso de materia vegetal para extracto acuoso.....	41
Fotografía Nro. 14. Extracto acuoso.....	41
Fotografía Nro. 15. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.	42
Fotografía Nro. 16. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.	43
Fotografía Nro. 17. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.....	45
Fotografía Nro. 18. Extracto etéreo en un balón de rotavapor de 100 ml.	48
Fotografía Nro. 19. Concentración del extracto etéreo en el rotavapor.....	48
Fotografía Nro. 20. Extracto alcohólico en un balón de rotavapor de 100 ml.....	49
Fotografía Nro. 21. Concentración del extracto alcohólico en el rotavapor.....	49
Fotografía Nro. 22. Sonicador	50
Fotografía Nro. 23. Activación y replicación de cepas ATCC 29219 de <i>E. faecalis</i> y cepas ATCC 10231 de <i>C. albicans</i>	50
Fotografía Nro. 24. Resultados significativos en cepas ATCC 29219 de <i>E. faecalis</i>	51
Fotografía Nro. 25. Resultados significativos en cepas ATCC 10231 de <i>C. albicans</i>	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico Nro. 1. Mapa de la zona de la planta endémica.	8
Gráfico Nro. 2. Esquema de extracción de los metabolitos secundarios.	24
Gráfico Nro. 3. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.	27
Gráfico Nro. 4. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico	28
Gráfico Nro. 5. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.	31
Gráfico Nro. 6. Halos de inhibición de los diferentes extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC 29219 de <i>E. faecalis</i>	52
Gráfico Nro. 7. Distribución por concentraciones extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	53
Gráfico Nro. 8. Distribución por concentraciones extracto alcohólico de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	54
Gráfico Nro. 9. Halos de inhibición de los diferentes extractos de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i> frente a cepas ATCC 10231 de <i>C. albicans</i>	57
Gráfico Nro. 10. Distribución por concentraciones extracto etéreo de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	58
Gráfico Nro. 11. Distribución por concentraciones extracto alcohólico de la raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i>	59

RESUMEN

La medicina ancestral es una alternativa económica y de fácil adquisición que ayuda al tratamiento de enfermedades de una manera natural. El objetivo de la investigación es evaluar el efecto antimicrobiano de la *Piper nubigenum Kunth*, frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans* productoras de enfermedades bucales. Se obtuvieron extractos etéreo, alcohólico y acuoso, mediante maceración, posteriormente, se realizó un análisis fitoquímico para obtener metabolitos secundarios, se concentró los extractos y se dividió en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25%, aplicados en diferentes discos en blanco de antibiograma (OXOID), además de 1 disco de control positivo en la cepa de *E. faecalis* (Amoxicilina + ácido clavulánico) y en la cepa *C. albicans* (Ketoconazol), además se añadió un disco de control negativo (agua destilada), para cada cepa. Se estableció que los extractos etéreo, en todas sus concentraciones y alcohólico al 25%, frente a cepas de *E. faecalis*, obtuvieron los valores más altos entre los extractos en general. En cuanto a los extractos en general frente a cepas de *C. albicans*, los valores oscilan entre 2,33 mm y 7,66 mm. En conclusión los metabolitos secundarios se correlacionan con los resultados obtenidos en los halos inhibitorios, mostrando mayor inhibición en los extractos etéreo en todas sus concentraciones y alcohólico al 25% frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, mientras que los extractos en general frente a la cepa ATCC de *C. albicans* no mostraron resultados significativos, con valores nulos según la escala de Duraffourd ($p=0,00$; $p=0,742$; $p=0,002$; $p=0,002$; $p=0,001$).

Palabras Clave: *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Piper nubigenum Kunth*

ABSTRACT

Ancestral medicine is an inexpensive and easily acquired alternative that naturally helps disease treatment. The research aims to evaluate the antimicrobial effect of *Piper nubile* Kunth against ATCC strains of *E. faecalis* and *C. albicans* that produce oral diseases. Ethereal, alcoholic, and aqueous extracts were obtained by maceration, then a phytochemical analysis was carried out to obtain secondary metabolites; the extracts were concentrated and divided into concentrations of 100%, 75%, 50%, 25%, it applied on different antibiogram blank disks(OXOID), in addition to 1 positive control disc in the *E. faecalis* strain (Amoxicillin + clavulanic acid) and the *C. albicans* strain (Ketoconazole), in addition, a negative control disc (distilled water), for each strain. It was established that the ethereal extracts, in all their concentrations and 25% alcoholic, compared to strains of *E. faecalis*, obtained the highest values among the extracts in general. Regarding the extracts in general against strains of *C. albicans*, the values range between 2.33 mm and 7.66 mm. In conclusion, the secondary metabolites correlate with the results obtained in the inhibitory halos, showing more inhibition in the ethereal extracts in all their concentrations and 25% alcoholic compared to ATCC strains of *E. faecalis*, while the extracts in general compared to the ATCC strain of *C. albicans* did not produce significant results, with null values according to the Duraffourd scale ($p = 0.00$; $p = 0.742$; $p = 0.002$; $p = 0.002$; $p = 0.001$).

Keywords: *Candida albicans*, *Enterococci faecalis*, *Piper nubile* Kunth

Reviewed by:

Mgs. Hugo Romero

ENGLISH PROFESSOR

c.c. 0603156258

1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación se dirige hacia el campo farmacológico y está relacionada con sustancias que son capaces de eliminar los microorganismos tanto de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) como de *Candida albicans* (*C. albicans*), productores de enfermedades bucales. Una de las principales características de la investigación actual, es buscar una sustancia de origen natural que inhiba la reproducción de los microorganismos antes mencionados y disminuir las enfermedades bucales que estos producen. La causa principal de la proliferación de *E. faecalis* y de *C. albicans* depende de las características de los microorganismos.

E. faecalis, bacteria que se encuentra entre los patógenos más importantes, debido a que posee resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos, además, puede crecer en medios con 6,5% de cloruro de sodio, a un pH 9,6 y a una temperatura de 10°C a 45°C, debido a esto posee mayor supervivencia.⁽¹⁾

La cepa de *C. albicans*, es un hongo comensal que se encuentra normalmente en la flora bucal del ser humano, los ecosistemas colonizados habitualmente por este hongo son: la boca , intestino, vagina y piel .^(2,3)

El desarrollo de esta investigación estudia el posible efecto antimicrobiano de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a *E. faecalis* y *C. albicans*. Esta raíz posee gran interés académico, por su uso como medicina tradicional para combatir enfermedades infecciosas bucodentales en la región amazónica de nuestro país Ecuador.

La presente investigación es de tipo cuasi experimental, in vitro, desarrollada en un ambiente de campo. Para ello se realiza en primer lugar un análisis fitoquímico que determina los metabolitos de la raíz, posteriormente se analiza la actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *E. faecalis* y *C. albicans*, productoras de enfermedades bucales.

La finalidad de esta investigación es determinar si existe efecto antimicrobiano en la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*, productoras de enfermedades bucales y obtener conocimiento científico sobre la planta.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la Odontología existen un gran número de enfermedades bucodentales asociadas a microorganismos, que pueden convertirse en patógenos al cambiar o al alterarse el medio en el que habitan.

E. faecalis es una bacteria propia de la flora intestinal, vagina o tracto hepatobiliar, que se reconoce como bacteria causante de varias infecciones y que ha además ha creado resistencia a medicamentos. Según un artículo realizado por Niklitschek et al. ⁽⁴⁾, este microorganismo se encuentra en el 70% de las raíces obturadas que presentan periodontitis apical persistente y en pacientes con necrosis pulpar.⁽⁵⁻⁸⁾

C. albicans es un hongo polimórfico con morfología levaduriforme, comensal oportunista que coloniza las mucosas en el 30 a 60 % de las personas. Los factores de virulencia de este patógeno son: la adherencia a células del hospedero, secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología que se encuentra normalmente.⁽⁹⁾

Las infecciones por *C. albicans*, muestran manifestaciones principalmente en las mucosas. En la población geriátrica la infección por *C. albicans* es uno de los 3 motivos principales de consulta en la clínica odontológica. Un artículo realizado en la Universidad Rey Juan Carlos en Madrid en el año 2015 nos revela que el 14 % de los adultos mayores poseen candidiasis subprotésica, enfermedad producida por un déficit en la higiene bucal y desadaptación de las prótesis dentales. En este artículo se puede observar que: el hongo *C. albicans* está presente en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades sistémicas.⁽¹⁰⁾

En cuanto a *Piper nubigenum Kunth*, cabe recalcar que al no existir investigaciones previas se usaron investigaciones sobre la familia *Piper*, en busca de una posible alternativa a las enfermedades bucales producidas por *E. faecalis* y *C. albicans*. Un primer estudio de Azuero et al. ⁽¹¹⁾ sobre *Piper carpuya Ruiz & Pay*, analizó el efecto antimicrobiano frente a *C. albicans*, obteniendo resultados favorables con un halo de inhibición de 10-14 mm.

Un segundo estudio realizado por Bornaz et al. ⁽¹²⁾ respecto al efecto antimicrobiano de *Piper augustifolium* frente a *E. faecalis*, se observó halos de inhibición de 9.03 mm, que reflejan alta efectividad frente a *E. faecalis*.

Por último un estudio realizado por Rodríguez et al. ⁽¹³⁾ en los laboratorios de la Universidad Central de Colombia, titulado “Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas

frente a patógenos de importancia clínica en Colombia”, analizó la presencia de flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles, quinonas y alcaloides, compuestos importantes en la actividad antimicrobiana.

3. JUSTIFICACIÓN.

La inhibición de *E. faecalis* y *C. albicans*, es una posible solución a las enfermedades bucales producidas por estos microorganismos y que son de gran importancia en odontología.

Con este estudio, se busca conocer las características y propiedades que posee *Piper nubigenum Kunth*, además de su posible uso como medicina natural para evitar enfermedades bucales. Esta planta posee importancia ancestral para la cultura Kichwa, pero no tiene estudios previos, por lo tanto al desarrollar la investigación ampliamos nuestro conocimiento sobre el género *Piper* obteniendo datos importantes, sobre el efecto antimicrobiano frente a cepas de interés como: *E. faecalis*, presente en el fracaso endodóntico y *C. albicans*, un hongo oportunista que en el huésped inmunodeprimido se vuelve patógeno.⁽⁴⁾

El estudio está enfocado a pacientes inmunodeprimidos, poseedores de enfermedades sistémicas, catastróficas y virales con gran incidencia de *C. albicans*, y pacientes con necrosis pulpar, periodontitis apical persistente, enfermedades nosocomiales producidas por *E. faecalis*.

Esta investigación tiene como propósito, conocer los metabolitos presentes en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, y analizar el efecto antimicrobiano que produce frente a *E. faecalis* y *C. albicans*, estableciendo sus posibles usos.

La factibilidad de este estudio en el aspecto económico se evidencia, debido a que el investigador puede solventar los gastos de la investigación, además el tiempo que se empleará en la investigación es un periodo de 6 meses. Los conocimientos académicos requeridos para el desarrollo de la investigación, relacionados con Odontología son proporcionados por la carrera, mientras que la parte relacionada con las ciencias químicas el investigador la realiza con la ayuda y conocimientos del tutor.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto antimicrobiano de *Piper nubigenum Kunth*, frente a cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, productoras de enfermedades bucales.

4.2. Objetivos específicos.

- Realizar un análisis fitoquímico de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, para conocer los principales metabolitos secundarios posibles en la actividad antimicrobiana.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, frente a las cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, mediante halos de inhibición.
- Establecer la significancia estadística de los resultados de inhibición de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, en la inhibición de cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

5. MARCO TEÓRICO.

5.1. Medicina ancestral.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a esta medicina como “La suma total de habilidades, conocimientos y prácticas basadas en creencias, experiencias y teorías propias de diferentes saberes, usadas para la salud en la prevención, valoración y tratamiento de enfermedades, tanto mentales como físicas”. Además, representa los saberes milenarios de la madre tierra y el uso que los indígenas dan a las plantas medicinales a partir de un aprendizaje ancestral, que tiene un valor incalculable.⁽¹⁴⁾

Esta práctica debe ser valorada y estudiada de manera crítica, pues puede tener gran impacto en la salud pública. Un artículo publicado por la Revista cubana de Salud Pública, nos menciona la importancia del desarrollo de la medicina natural y tradicional, presentando a la combinación de estas dos medicinas, como un modelo de perfeccionamiento tanto económico como social.⁽¹⁵⁾

Según la OMS la interculturalidad, es la práctica basada en el alivio de la sintomatología de una enfermedad, usando el conocimiento indígena y las plantas medicinales. La medicina ancestral es usada en el 70% de los países latinoamericanos, incluido entre ellos Ecuador, país con gran diversidad cultural. Los profesionales de la salud que han trabajado con estos conocimientos ancestrales, manifiestan que usaron la medicina natural en pacientes que no respondieron correctamente al tratamiento farmacológico.⁽¹⁶⁾

Según un estudio realizado en la Universidad Técnica de Ambato, la etnia indígena prefiere la medicina natural, porque es más económica, de fácil acceso y están familiarizados con ella desde niños. Usan fármacos solo si sus conocimientos ancestrales no funcionan y sugieren combinar la medicina natural con los fármacos.⁽¹⁶⁾

5.1.1. Origen.

La medicina tradicional existe desde la creación del mundo, utiliza plantas en la curación de enfermedades, es transmitida de generación en generación y continuará transmitiéndose a lo largo de los años. Durante muchos años esta medicina curó heridas, inflamación, picaduras y mordeduras de víboras, entre otras dolencias. En la década de los 80, existió un fuerte interés por el conocimiento y uso de las plantas como medicina tradicional, producido por la alta tasa de muerte, debido a reacciones medicamentosas. Desde ese momento hasta la época actual, se ha usado la medicina ancestral por diferentes culturas como medicina

alternativa, aliviando muchas enfermedades. Esta medicina debe su efectividad a las propiedades de los metabolitos presentes en las plantas.⁽¹⁷⁾

5.1.2. Metabolitos importantes en el efecto antimicrobiano.

Algunos de los metabolitos presentes en plantas, tienen una implicación ecológica usada como defensa contra herbívoros, virus, hongos y bacterias. Los compuestos se dividen en tres categorías principales que son: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenos se dividen en seis grupos: triterpenos, esteroides, tetraterpenos, diterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos. Los compuestos fenólicos incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos, todos estos compuestos tiene aplicaciones farmacéuticas relacionadas con efectos antibacterianos, antioxidantes y analgésicos. El último grupo son los compuestos nitrogenados, en los que se incluye a los alcaloides y glucósidos, los cuales tiene mayor relación en las funciones de defensa. Un artículo publicado en Colombia da a conocer que los metabolitos más importantes en el efecto antimicrobiano son los flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles, quinonas y alcaloides.^(13,18)

5.1.3. Plantas de uso odontológico.

La medicina natural, busca el bienestar de las personas que poseen enfermedades bucales importantes. Estudios revelan la existencia de varias plantas usadas en Odontología por ejemplo: *moráceas*, usada contra infecciones e inflamaciones en la cavidad oral, *salvia* en forma de vino para enjuagues bucales, conservando una buena higiene oral y ayudando a la salud de las encías, *Cochleria officinalis* una planta propia del norte de Europa, cuya tintura se diluye en agua ayudando a la inflamación de las encías, *geun urbanum* y *potentilla reptans* ayudan a la inflamación y a la movilidad de las piezas dentales.⁽¹⁹⁾

Un problema importante en Odontología es la resistencia que tienen los microorganismos a tratamientos farmacológicos, debido a su uso indiscriminado. Por esta razón los productos de origen vegetal podrían proporcionar una alternativa natural aprovechando las propiedades curativas de las plantas, además posee bajo costo y toxicidad, siendo favorable para las personas de bajos recursos.⁽²⁰⁾

La OMS reconoce la importancia que tiene la medicina natural a nivel mundial; asimismo existen pruebas empíricas y científicas que aceptan el uso de las plantas como tratamiento medicinal a varias enfermedades crónicas y agudas.⁽²⁰⁾

5.1.4. Clasificación taxonómica de *Piper nubigenum* Kunth.

Tabla Nro. 1. Taxonomía de *Piper nubigenum* Kunth.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>
Epíteto específico	<i>Nubigenum</i>
Autor	<i>Kunth</i>
Determinador:	SIN

Fuente: Herbario de la ESPOCH.

5.1.5. Habitación de *Piper nubigenum* Kunth.

La planta *Piper nubigenum* Kunth se encuentra en la provincia de Pastaza, cantón Pastaza, parroquia Fátima, en el km 7 ½ vía al Tena, en el anillo vial que une la parroquia Fátima con la Palestina. Esta zona presenta las siguientes características: clima megatérmico húmedo con una temperatura que oscila entre 18° a 24°C, con totales pluviométricos que superan los 3.000 mm y una humedad relativa mayor al 85%. El tipo de suelo en el que se encuentra la planta es de orden inceptisol (suelo considerado inmaduro en su evolución), formado a partir de ceniza volcánica, de textura limosa, franco limoso, franco arcilloso limoso de poca profundidad con un pH ligeramente ácido. Rodeado de selva Amazónica.^(21,22)

Gráfico Nro. 1. Mapa de la zona de la planta endémica.



Fuente: Google earth.

5.1.6. Uso de la *Piper nubigenum Kunth*.

Se tiene conocimiento de que los indígenas de etnia Kichwa, se refieren a *Piper nubigenum Kunth* con el nombre común *Shya* y que la utilizan en enfermedades bucales. Principalmente sus raíces, con las que realizan una maceración que se colocan en el sitio a tratar. Este macerado produce una sensación analgésica, además se cree elimina bacterias.

5.2. Microbiota oral.

La microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos en un hábitat específico, definida desde el nacimiento hasta que el ser humano es adulto. Influye en la nutrición, inmunidad, desarrollo y fisiología del ser humano.⁽²³⁾

Fue Antón Van Leeuwenhoek quien, en el año 1863, observó por primera vez microorganismos en placas dentales que actualmente forman parte de la microbiota humana. Esta gran diversidad microbiana nos ayuda a comprender ¿cómo se constituyen estas comunidades?, ¿cómo interactúan? y ¿cómo se lleva a cabo la homeostasis en el ser humano? Lo principal es: la biopelícula, su diversidad y riqueza de bacterias anaerobias. Los microambientes que existen en esta, están condicionados por varios factores tanto anatómicos como fisiológicos.^(2,24)

En la cavidad oral, los microorganismos colonizan en un par de horas después del parto; además son fundamentales en la inducción y función del sistema inmunológico del huésped. Como detalle importante, debemos saber que la cavidad oral contiene varios microambientes y cada uno de ellos posee su propia composición de microorganismos.⁽²⁵⁾

5.2.1. Microambientes.

5.2.1.1. Saliva.

Líquido que baña las superficies de la cavidad bucal y que contiene glicoproteínas de alto peso molecular como: la mucina, compuesta por cadenas laterales de oligosacáridos que unidas a la proteína mediante unos enlaces de O-glucósidos, forman nutrientes que ayudan al crecimiento microbiano. En la saliva existen muchos microorganismos que son: *Neisseria flavescens*, *Granulicatella adiacens*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus mitis* y *Prevotella melaninogenica*. Por otro lado, el microorganismo *Fusobacterium nucleatum* crea una coagregación con anaerobios estrictos como *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en la placa dental.⁽²⁵⁾

5.2.1.2. Mucosa bucal.

Está formada por cocos Gram positivos [Gram (+)] anaerobios facultativos. En una tesis realizada en la Universidad Autónoma de Madrid se demostró que en la mucosa oral predominan: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*; estos últimos también asociados a la placa dental. Además Rosenblatt observó que los días críticos de un recién nacido son los dos primeros; debido a que en este tiempo existe una contaminación bucal, para lo cual es muy importante tener un protocolo que evite la transmisión de microorganismos patógenos.⁽²⁵⁾

5.2.1.3. Superficies dentarias.

En las superficies dentarias existen alrededor de 92 especies de microorganismos, que pueden verse afectados por cambios temporales de la microbiota; debido a diferentes enfermedades. Además, las superficies dentales no se descaman; por lo tanto, en ella se desarrolla la biopelícula a largo plazo. Estos microorganismos, considerados cariogénicos, producen ácido acético, láctico, fórmico y propiónico, que son el resultado del metabolismo de los hidratos de carbono. Los microorganismos más importantes en este proceso son: *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* y *Lactobacillus*.⁽²⁵⁾

5.2.1.4. Surco gingival.

En el surco gingival predominan *Proteobacterias*, teniendo en cuenta que en la capa superior del biofilm podemos encontrar, *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannarella forsythia*, las cuales tiene dependencia entre ellas y con el medio, además encontramos *C. albicans* en el surco gingival, sobre todo en pacientes embarazadas.⁽²⁵⁾

5.2.1.5. Lengua.

En la lengua se encuentran varios tipos de microorganismos, 45% de cocos Gram (+) anaerobios facultativos, 16% Gram negativos [Gram (-)] anaerobios y 12% de bacilos Gram (+) anaerobios facultativos.^(25,26)

5.2.1.6. Materiales dentales.

Las personas portadoras de prótesis tienen una composición de microorganismos que dependen de varios factores. *Prevotella* y *Veionella* son microorganismos que se encuentran en pacientes con estomatitis subprotésica, enfermedad producida principalmente por *C. albicans*. Según un estudio publicado por la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia, *C. albicans* se presenta en la saliva en un 63.3% y en la lengua en un 46.6%, de pacientes

edéntulos. Además la encontramos en pacientes con periodontitis en la saliva en un 38.7% y en la lengua en un 22.5%.^(25,26)

5.2.2. *Candida albicans* (*C. albicans*).

A lo largo de la historia *C. albicans* ha recibido varios nombres, Robins en 1853 la denominó *Oidium albicans*, esta se incluyó en 100 sinónimos y pasó por 18 géneros de los cuales solo dos han perdurado por mucho tiempo.⁽²⁷⁾

El género *Monilia*, incluyó en esta la especie *Monilia Candida*, que luego pasó a llamarse *Monilla albicans*, dominando la literatura hasta 1923. En este año se propone un nuevo género de *Candida* específicamente la especie *C. albicans*, este término fue aceptado finalmente por el Congreso Internacional de Microbiología, y desde ese momento todas aquellas levaduras que no encajan en el género *Monilia* se encuentran en el nuevo género, también conocido como Candidiasis.⁽²⁷⁾

5.2.2.1. Clasificación taxonómica.

El género *Candida* pertenece a las levaduras, correspondiente a los hongos unicelulares que son capaces de adaptarse a temperaturas de 37°C y convertirse en patógenos.

Tabla Nro. 2. Taxonomía de *C. albicans*.

Dominio	Eucarya
Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Blastomycetes
Familia	Cryptococcaceae
Género	<i>Candida</i>
Especies	<i>C. albicans</i>

Fuente: Biasoli, M⁽²⁸⁾

5.2.2.2. Características.

C. albicans, hongo polimórfico debido que su morfología puede ser: levaduriforme o filamentosa, además se considera un hongo comensal oportunista que se encuentra entre la microbiota normal mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria del ser humano colonizando el 30% al 60% de las personas. Cuyos factores de patogenicidad incluyen la adhesión, la secreción de enzimas y el cambio de morfología.⁽⁹⁾

5.2.2.3. Manifestaciones clínicas.

1. Candidiasis pseudomembranosa.

Forma clínica más conocida como muguet, cuyas características son: la presencia de placas blanco-amarillentas, consistencia gelatinosa o blanda, que se desprende con facilidad dejando esta zona con úlceras, en ocasiones dolorosas. Las zonas en la que predominan las lesiones son: la mucosa de los carrillos, los bordes de la lengua y orofaringe. Puede presentarse de dos formas: aguda (evolución menos a 15 días) y crónica (persistente por más de 15 días) ^(3,29)

2. Candidiasis eritematosa aguda.

Esta enfermedad también denominada lengua dolorosa antibiótica, suele presentarse con mayor frecuencia en el dorso de la lengua. Las manifestaciones producidas son: depapilación de la mucosa lingual, dolor, impotencia funcional, imposibilidad de ingerir alimentos calientes, ácidos y picantes. ^(3,29)

3. Candidiasis eritematosa crónica

- **Palatitis candidiásica eritematosa crónica:** mucosa enrojecida, con atrofia de la, asintomática, pudiendo manifestar alteraciones en el gusto. Relacionada a tres factores: inmunosupresión, infección por VIH y enfermedades que afectan a los pulmones, produciendo xerostomía, además de usar aerosoles. ^(3,29)
- **Glositis candidiásica eritematosa crónica:** superficie lisa de coloración rojiza, con sintomatología escasa, alteración del gusto, sin dolor o ligero escozor, que se manifiesta de manera extensa en las superficies dorsales de la lengua, desapareciendo las papilas filiformes. ^(3,29)

4. Candidiasis hiperplásica crónica o leucoplasia-candidiasis.

Placas blancas, sin desprendimiento al raspado, persistentes, que se localizan en las mucosas yugales, lengua, labios y paladar. Poseen forma triangular que a menudo se encuentran de manera bilateral y retrocomisural. Se distinguen dos formas: ^(3,29)

- **La forma homogénea:** placa blanca, uniforme, adherente y asintomática ^(3,29)
- **La forma nodular:** caracterizada por la presencia de nódulos múltiples blanquecinos en una mucosa eritematosa, además de ser dolorosa. ^(3,29)

5. Lesiones orales comúnmente asociadas a candidiasis.

- **Estomatitis protésica:** también llamada estomatitis subprotésica o palatitis subplaca. Lesión traumática, con alteraciones eritematosas en las mucosas donde se acienta la

prótesis, con mayor frecuencia en la mucosa palatina. Los factores de origen de esta patología son: higiene deficiente, utilización nocturna de la prótesis, microtraumatismos sobre la mucosa, desajuste o mala adaptación de las prótesis. En lesiones avanzadas, se forman hiperplasias, formaciones nodulares, dando mayor sintomatología. Según su extensión y la severidad de la infección existen tres categorías: ^(3,29)

- a) **Tipo I de Newton:** Relacionada con la obstrucción de ductos salivales por prótesis. Punteado rojizo, sobre la mucosa palatina de forma localizada. ^(3,29)
 - b) **Tipo II de Newton:** Relacionada con el acumulo de placa bacteriana en la prótesis dental y la mucosa subyacente. Lesión eritematosa, que afecta parcial o totalmente la mucosa que cubre la prótesis. ^(3,29)
 - c) **Tipo III de Newton:** Relacionada con el acumulo de placa bacteriana en la placa y la mucosa subyacente. Lesión granular, que afecta al centro del paladar duro y a los bordes alveolares. ^(3,29)
- **Queilitis comisural o angular:** conocida también como “boquera” o “perleche”. Lesiones que afectan a las comisuras labiales, de forma bilateral, con pequeñas erosiones, fisuras y grietas con lesiones costrosas, cuya sintomatología dolorosa, puede afectar a la capacidad funcional. En ocasiones se observa junto a lesiones de estomatitis subprotésica y se clasifica en cuatro grupos: ^(3,29)
 - a) **Tipo I:** Localizada, con lesión mínima en piel. ^(3,29)
 - b) **Tipo II:** Fisurada, con gran extensión en longitud y profundidad. ^(3,29)
 - c) **Tipo III:** fisuras intensas en forma radial, desde el ángulo a la piel. ^(3,29)
 - d) **Tipo IV:** Eritematosa, sin fisuras. Se extiende al borde de los labios. ^(3,29)
 - **Glositis romboidal media:** alteración rara de la lengua, frecuente en hombres que se presenta en la línea media del dorso lingual, con un área rojiza, romboidal, plana y no se observan las papilas filiformes. ^(3,29)
 - **Lengua negra vellosa:** relacionada a la infección por *C. albicans* frecuente en ancianos del sexo masculino. Se presenta como un aumento de las papilas que además forman

vellosidades con coloración oscura (debido a la oxidación de la queratina), suele afectar al tercio de la lengua, pero también puede extenderse a toda la superficie. ^(3,29)

6. Candidiasis mucocutánea crónica.

Esta lesión aparece en personas mayores solo en la forma difusa, no es de carácter hereditario. La candidiasis, es la única manifestación presente en áreas de la piel, mucosa oral y uñas. ^(3,29)

5.2.2.4. Diagnóstico

Existen tres tipos de diagnósticos fundamentales: El diagnóstico clínico, el diagnóstico de laboratorio y el diagnóstico serológico. Al ser un hongo comensal no se puede diferenciar mediante conteo, la diferencia entre comensal y patógeno, por lo tanto es importante la diferenciación clínica y el diagnóstico de laboratorio. ⁽²⁹⁾

5.2.3. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

Existen 33 especies de *Enterococcus* entre las cuales el más frecuente es *E. faecalis*. Los *Enterococcus* son bacterias catalogadas como Gram (+) que se encuentran en el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario y ocasionalmente en la saliva. Esta bacteria se considera un patógeno oportunista. En la última década esta bacteria ha sido de gran importancia en enfermedades nosocomiales. El sistema nacional de vigilancia de las infecciones nosocomiales de Estados Unidos, han considerado a esta bacteria como la tercera causa de infecciones nosocomiales, debido a que vive en ambientes hostiles. ⁽⁵⁾

5.2.3.1. Clasificación taxonómica.

Tabla Nro. 3. Taxonomía de *E. faecalis*.

Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Familia	Enterococcaceae
Género	<i>Enterococcus</i>
Especie	<i>Enterococcus faecalis</i>

Fuente: Pava-Ángel, T. ⁽³⁰⁾

5.2.3.2. Características.

Microbiológicamente *E. faecalis* está dentro de la clasificación de los Gram (+) no formadores de esporas anaerobios, los cuales tienen una catalasa negativa. Debido a este tipo de características fueron considerados como *Streptococcus* durante un largo tiempo, pero en 1984, la diferencia en sus características hizo que crearan un nuevo grupo. Además, poseen

células ovoides que se presentan en cadenas cortas. Producen un pH final de 4,2 - 4,6. Crecen en un caldo de cultivo. En la actualidad se tiene más conocimiento de la composición de los *Enterococcus*, por lo tanto es reconocido como una bacteria oral transitoria. El hábitat normal de esta bacteria es el tracto gastrointestinal y genitourinario, pero no la cavidad oral, por lo cual aún no se conoce con exactitud el origen, pero se cree que sería exógeno.^(5,31-33)

5.2.3.3. Enfermedades por *E. faecalis*.

Esta bacteria puede causar varias enfermedades como:

1. Infecciones orales en endodoncias.

Las enfermedades orales son un problema importante de la Salud Pública, principalmente la caries, que afecta a 66% de la población nacional. Una opción de tratamiento para salvar la pieza dental de la extracción cuando la caries ha avanzado es la endodoncia; cuyo objetivo es la eliminación del tejido pulpar y la limpieza tanto química como mecánica del conducto radicular, para su posterior obturación evitando así la infección. En la mayoría de los casos este procedimiento tiene un pronóstico favorable, aunque en ocasiones si existe el riesgo de fracaso en el tratamiento endodóntico, cuyas causas principales son: la remoción incompleta del tejido pulpar y los microorganismos que se encuentran en el conducto radicular, que pueden haber sobrevivido a la limpieza mecánica y química de este. Las bacterias más frecuentes encontradas en tratamientos por primera vez y en tratamientos con recidiva, son de especies Gram (+) anaerobias facultativas especialmente *E. faecalis*. Esta bacteria ha sido aislada tanto en lesiones periapicales como en conductos radiculares. Un estudio de *E. faecalis* en periodontitis apical, nos da a conocer que el proceso de infección se produce después de una necrosis o una iatrogenia, la cual da paso a la invasión y colonización del conducto radicular, produciendo un crecimiento de anaerobios que forman una biopelícula, que se adhiere a las paredes de los conductos. Diferentes autores han aislado *E. faecalis* en infecciones endodónticas en un 70% y en casos de caries dental en un 60%.^(4,34)

2. Bacteriemia.

Enfermedad causada por diseminación de bacterias al torrente sanguíneo.^(33,35)

3. Endocarditis.

La endocarditis es derivada de una Bacteriemia con complicación, el 10-15% de los casos de endocarditis son producidos por *E. faecalis*, asociados a manipulaciones urogenitales o gastrointestinales, pero la gran mayoría son espontáneos en la comunidad. Se produce por

una inflamación y destrucción del endocardio por diseminación de bacterias al torrente sanguíneo y es de gran importancia en el campo odontológico.⁽³³⁾

5.2.3.4. Transmisión.

E. faecalis es una bacteria que normalmente se encuentra en el intestino, aunque también podemos encontrarla en la boca y en el tracto vaginal. Dicha bacteria, en cantidades normales, no causa ningún problema, pero si prolifera en otras áreas del cuerpo puede causar infecciones. Según los centros de control y prevención de enfermedades, esta bacteria se encuentra en el 80% de infecciones. Se transmite por falta de higiene e ingresa a través de heridas, sangre u orina, a personas con un sistema inmunológico débil. También puede transmitirse de persona a persona.⁽³³⁾

5.2.3.5. Resistencia.

E. faecalis ha desarrollado resistencia a agentes antimicrobianos como: penicilinas, cefalosporinas y vancomicina.^(5,36)

5.2.3.6. Diagnóstico.

Para el diagnóstico de *E. faecalis* en infecciones se realiza un aislamiento del microorganismo y se estudia la sensibilidad antibiótica por difusión de discos.⁽³⁷⁾

5.2.3.7. Tratamiento.

E. faecalis es un microorganismo que puede ser tratado con ampicilina, penicilina, cefalosporinas y vancomicina; pero tiene la capacidad de resistir a los antibióticos gracias a su fluidez, además, puede intercambiar el ADN potenciando así su resistencia a los antibióticos. Por esta razón se presentan como un reto a la hora de tratarlos en la clínica odontológica.^(30,38)

5.3. Cepas microbiológicas.

Células de microorganismos que se aíslan de un cultivo puro de una colonia. A la cepa se le realiza una comparación de las características para poder describir su especie y verificar la identidad. Deben estar acompañadas de un certificado que determine sus características fenotípicas y genotípicas.

- **Cepas de referencia:** microorganismos definidos en género y especie, de origen conocido.

- **Cepas de reserva:** cultivo que se obtiene al reactivar y sembrar el cultivo de referencia, con este se preparan los cultivos de trabajo.
- **Cepas de trabajo:** son cultivos obtenidos a partir del cultivo de reserva estos se destinan al control y trabajo diario en el laboratorio.
- **ATCC:**(American Type Culture Collection) son microorganismos que se encuentran certificados para microbiología y que son usados en el medio farmacéutico, clínico etc.^(39,40)

5.4. Medios de cultivo de Cepas.

Material rico en nutrientes necesarios para la reproducción y desarrollo de un microorganismo.

5.4.1. Tipos de medio de cultivo.

5.4.1.1. Según el agar:

1. **Cultivo en medio líquido:** llamado también caldos de cultivo, este tipo de crecimiento es rápido ya que la movilidad ayuda al consumo de nutrientes por parte del microorganismo, además no contiene agente gelificante y los microorganismos crecen por todo el medio. Se realiza en tubos o Erlenmeyer para evitar contaminación antes y después de la siembra. En este tipo de cultivo no habrá formación de colonias, por lo tanto no puede usarse en aislamiento.^(41,42)
2. **Cultivo en medio sólido:** compuesto de 1,5% de agar, crea un crecimiento en la superficie, puede colocarse tanto en placas Petri como en tubos de ensayo.⁽⁴²⁾
3. **Cultivo en medio semisólido:** compuestos de una porción de agar menor a 0,5% usado en pruebas bioquímicas y de movilidad. La siembra se realiza en tubos de ensayo sin inclinar, mediante punción o picadura utilizando un hilo. Sirve para comprobar si el microorganismo es móvil o no, ya que el microorganismo se difunde alrededor de la zona de la picadura, mientras que los microorganismos inmóviles van a desarrollarse sólo en la zona de la picadura. Si la siembra se realiza en forma de vaivén, esta crearía un patrón de crecimiento erróneo, este tipo de siembra es considerado un método de conservación de microorganismos anaerobios facultativos.^(41,42)

5.4.1.2. Según su utilidad en microbiología diagnóstica:

1. **Nutritivos:** medios de cultivo, que permiten el crecimiento de los microorganismos en general.⁽⁴²⁾
2. **De enriquecimiento:** permiten el desarrollo de microorganismos estrictos que no crecen en cualquier medio gracias a que contienen componentes adicionales.⁽⁴²⁾
3. **Selectivos:** contienen componentes que inhiben el crecimiento de microorganismos no deseados, desarrollándose con mayor facilidad el microorganismo escogido para cultivar, un ejemplo es: el agar MacConkey; el cual contiene un cristal violeta que impide el desarrollo de bacterias Gram (+) y ayuda al crecimiento de bacterias Gram (-).⁽⁴²⁾
4. **Diferenciales:** poseen componentes que afloran las características del microorganismo, por ejemplo: agar MacConkey; contiene lactosa como indicador de bacterias fermentadoras.⁽⁴²⁾

5.4.1.3. Según el formato de los medios de cultivo:

1. **Sólido en placas:** para aislar colonias.⁽⁴²⁾
2. **Sólido en tubo:** ayuda a conservar un cultivo por largo tiempo.⁽⁴²⁾
3. **Medio líquido en tubo:** permite a detectar el crecimiento de los microorganismos.⁽⁴²⁾
4. **Medio semisólido en tubo:** permite el diagnóstico de bacterias de interés clínico tanto anaerobias en el fondo del tubo, como aerobias en la superficie del tubo, además se realiza en un medio enriquecido como el caldo de Tioglicolato.⁽⁴²⁾

5.4.2. Medio de cultivo para hongos.

El medio de cultivo puede ser líquido o sólido. Los medios de cultivo dependiendo de su consistencia, se vierten en tubos o placas Petri que se usan para aislamientos, velocidad de crecimiento, estudios de sensibilidad, etc. Pero también se debe tener en cuenta que son más fáciles de contaminar, con lo cual se debe tener mucho cuidado. Los tubos de ensayo que, aunque tiene un espacio reducido, ofrecen mayor seguridad a la hora de la manipulación, tiene mayor resistencia a la contaminación y deshidratación, ayudándonos a conservar el cultivo por un tiempo prolongado. Para realizar un cultivo de hongos se mantiene un pH de 7 o ligeramente ácido. Para mayor seguridad del operador, todo cultivo debe ser manipulado dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada. El medio de cultivo

recomendado para el crecimiento de *C. albicans* es el agar Dextrosa Sabouraud con cloranfenicol; el cual evita el crecimiento de otras bacterias que pueda dañar el cultivo.⁽⁴³⁾

5.4.2.1. Agar Dextrosa Sabouraud.

Esta recomendado en cultivos que serán utilizados en trabajos de microbiología, sobre todo, se recomienda en patógenos saprófitos. Es un agar de aislamiento e identificación de hongos; algunos poseen antibióticos que impiden el crecimiento de bacterias que puedan dañar el cultivo sembrado como por ejemplo los agares Sabouraud con gentamicina o el agar Sabouraud con cloranfenicol.^(42,44)

5.4.3. Medio de cultivo para *E. faecalis*.

El medio de cultivo de *E. faecalis* debe ser un medio nutritivo que ayude al crecimiento de microorganismos exigentes. En cuanto al Agar Cerebro Corazón, es un medio líquido que generalmente se usa en especies bacterianas y fúngicas, con este agar podremos diferenciar los *Enterococcus* de los *Streptococcus*.⁽⁴⁵⁾

5.4.3.1. Infusión Cerebro Corazón.

Medio de cultivo usado en una amplia variedad de especies, se usa para la diferenciación de *Enterococcus*, rico en nutrientes, es además un medio base que ayuda a nutrir microorganismos exigente, gracias a la presencia de peptona e infusión de cerebro de ternera.⁽⁴⁵⁾

5.5. Siembra.

Paso importante que se lleva a cabo para aislar y replicar microorganismos.

5.5.1. Tipos de siembra.

5.5.1.1. Tubos con agar inclinado.

Este tipo de siembra favorece al desarrollo de microorganismos tanto aerobios como anaerobios facultativos, el tiempo de almacenamiento es en periodos cortos y la temperatura es de 4° C.⁽⁴¹⁾

5.5.1.2. Siembra en placas.

Para este tipo de Siembra se puede realizar de 2 maneras:

- a. Se puede realizar en la superficie en la cual se utiliza asa, espátula de Drigalski o hisopo.
- b. Se puede realizar por medio de mezcla, en la cual se juntan el inocuo con el medio de cultivo agarizado y fundido a una temperatura de 45°C.

Las placas se siembran en posición invertida, para evitar la concentración de agua que podría provocar una condensación en la tapa de la placa. Cada microorganismo da origen a una colonia de cultivo puro, mediante esta técnica podemos no solo sembrar, sino también contar y aislar.⁽⁴¹⁾

5.5.2. Aislamiento de microorganismos.

5.5.2.1. Por diseminación en la superficie de un medio sólido en la placa Petri.

Es la técnica más utilizada, pero se debe tener en cuenta el uso de la posición invertida, evitando así la condensación del agua. Existen varios tipos de trazados de separación:

- **Agotamiento de asa:** una vez flameada el asa, se enfría y se roza la siembra, se realizan estrías en las dos placas de manera consecutiva sin volver a cargar el asa.^(41,46)
- **Depósito y posterior quemado:** esta técnica tras la incubación nos ayudará a observar colonias aisladas en regiones de la placa inmaculada, ayudando al estudio de la morfología de la colonia.^(41,46)
- **Dilución previa en solución fisiológica o caldo:** tomando una muestra y depositándola en el caldo nutritivo, se realiza un estrellado, esta técnica se realiza en secuencia para obtener colonias aisladas.⁽⁴¹⁾
- **Extensión en superficie con espátula de Drigalski:** Según esta técnica, se depositará en la superficie de la placa una gota o 0,1 ml de una disolución compuesta por el cultivo de microorganismos, la cual se extenderá con una espátula en todas las direcciones hasta que esté completamente seco, se debe siempre tener en cuenta la previa esterilización de la espátula.⁽⁴¹⁾

5.5.2.2. Por mezcla.

Esta técnica nos permite calcular el número de bacterias que se encuentran en la muestra y trabajar con exactitud. Si esta técnica se realiza añadiendo un medio de cultivo fundido y mezclando por rotación suave en la placa, obtendremos colonias separadas y podremos distinguir unas colonias de otras, aquellas colonias que se encuentran en la superficie, tendrán unas características diferentes dependiendo del tipo de microambiente, mientras que las que se encuentren en el fondo tendrán una forma lenticular, este tipo de técnica se utiliza para determinar el número de microorganismos viables, sin importar si son anaerobios facultativos o microaerófilos.⁽⁴¹⁾

6. METODOLOGÍA.

6.1. Tipo de investigación.

La presente investigación fue de tipo observacional, que según su objetivo fue aplicada, según el nivel de profundización del objeto fue descriptiva y según el periodo temporal fue transversal.

6.2. Diseño de la investigación.

La investigación tuvo un diseño de enfoque mixto, in vitro y según la manipulación de las variables fue cuasi-experimental.

6.3. Muestra de estudio.

La muestra estuvo constituida por 22 cajas Petri que cumplieron con las siguientes características: 11 cajas con cepa ATCC 29219 de *E. faecalis* y 11 cajas para las cepas ATCC 10231 de *C. albicans*. De estas 11 cajas en cada microorganismo se usaron 3 cajas para las concentraciones 100%, 75%, 50% y 25% del extracto etéreo, 3 cajas para las concentraciones 100%, 75%, 50% y 25% del extracto alcohólico, 3 cajas para las concentraciones 100%, 75%, 50% y 25% del extracto acuoso, 1 caja para el control negativo (C-) y 1 caja para el control positivo (C+), que en el caso de *E. faecalis* se realizó con amoxicilina + ácido clavulánico y en el caso de la *C. albicans* se realizó con ketoconazol.

6.4. Entorno.

La investigación se desarrolló en los laboratorios de productos naturales y microbiología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

6.5. Técnicas e instrumentos.

La técnica fue la observación y el instrumento, la lista de cotejo (Bitácora de laboratorio).

6.6. Recursos.

6.6.1. Materia prima vegetal.

- Se utilizó la raíz de *Piper nubigenum Kunth* como muestra vegetal, recolectada en la provincia de Pastaza, ciudad de Puyo, parroquia Fátima a una altura de 1050 m.s.n.m. a una temperatura de 18°C a 24°C.
- Se empleó 50 g de raíz seca y molida de *Piper nubigenum Kunth* para realizar los diferentes extractos y 15 g de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* seca y molida para realizar el control de drogas crudas.

6.6.2. Material microbiológico.

- Cepas ATCC 29219 de *E. faecalis*, que fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la ESPOCH.
- Cepas ATCC 10231 de *C. albicans*, donadas por el laboratorio de microbiología de la ESPOCH.

6.7. Cuestiones éticas.

En la presente investigación, no se realizó ningún tipo de intervención en individuos considerados vulnerables, ni tampoco en tejidos humanos, debido a que se aplicó un proceso de investigación in vitro.

6.8. Intervenciones.

- Conjunto de cepas ATCC 29219 de *E. faecalis*, donadas por el laboratorio de microbiología de la ESPOCH.
- Conjunto de cepas ATCC 10231 de *C. albicans*, donadas por el laboratorio de microbiología de la ESPOCH.

6.8.1. Tratamiento de la planta.

6.8.1.1. Recolección.

- Se recolectó la cantidad necesaria de muestra vegetal de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* en Ecuador, en la provincia de Pastaza, ciudad de Puyo, parroquia Fátima, para su uso en la investigación.
- Se recogió la especie vegetal y se efectuó la identificación por parte del herbario de la ESPOCH.

6.8.1.2. Acondicionamiento de especies vegetales.

- La limpieza de la materia vegetal se realizó con: agua, toallas de cocina, toallas húmedas.
- El proceso de secado se realizó de forma natural, a la sombra y posteriormente se colocó la muestra en papel filtro, en un lugar fresco durante 20 días.
- Se trituró la raíz de *Piper nubigenum Kunth* seca, en el molino.

6.8.2. Determinación del contenido de humedad total.

Para determinar la humedad se utilizó el método gravimétrico, demostrando la pérdida de agua de la muestra después de ser desecada en la estufa.

Materiales.

- Balanza analítica.
- 0.5 mg de muestra.
- Cápsula de porcelana.
- Estufa u horno de calentamiento.
- Desecadora.

Procedimiento.

Se taró y desecó las capsulas a 105°C, posteriormente se pesó, se colocó 5g de muestra y se introdujo en la estufa a 105°C durante 3 horas. La cápsula se colocó en la desecadora donde se dejó enfriar a temperatura ambiente, se pesó y se colocó en la estufa durante una hora más, hasta obtener una masa constante.

6.8.3. Determinación de cenizas totales.

Las cenizas totales son el residuo orgánico que se obtiene al incinerar una droga mediante la determinación gravimétrica.

Materiales y reactivos.

- Crisol de porcelana.
- Desecador.
- Mechero.
- Estufa.
- Pinza.
- Pesa.
- Mufla.

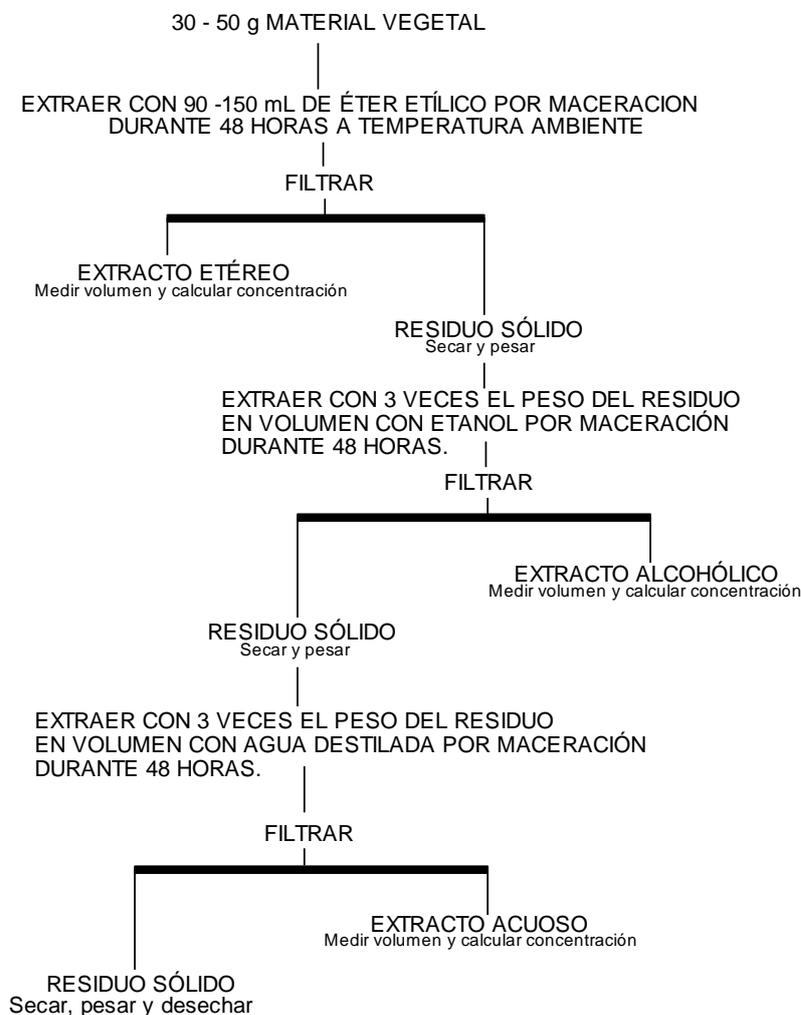
Procedimiento.

Se situó la muestra en crisoles previamente tarados, se pesó y calentó hasta carbonizar, posteriormente se incineró en la mufla a una temperatura de 700 a 750°C durante 2 horas. Después se dejó enfriar el crisol en una desecadora, hasta conseguir un peso constante que no varían en más de 0.5 mg por g.

6.8.4. Preparación de los extractos.

En el desarrollo del tamizaje fitoquímico, se aplicaron varias técnicas al material vegetal fresco, seco o en extractos. En esta investigación el tamizaje se realizó en el extracto etéreo, alcohólico y acuoso.

Gráfico Nro. 2. Esquema de extracción de los metabolitos secundarios.



Fuente: Cuéllar et al. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales.⁽⁴⁷⁾

Materiales y reactivos.

- Materia vegetal.
- Frasco ámbar de boca ancha.
- Éter.
- Alcohol al 96%.
- Agua destilada.
- Vidrio reloj.
- Espátula.

- Sorbona.
- Papel filtro.
- Matraz de 125 ml.
- Frascos ámbar pequeños.
- Balanza.
- Probeta 100 ml.
- Embudo.

Siguiendo la técnica de preparación de extractos, se utilizó 50 g de materia vegetal seca y previamente molida y se realizó las siguientes acciones:

Extracto Etéreo.

- Se situó la materia vegetal en un frasco ámbar de boca ancha con tapa.
- Se cubrió con éter y se dejó macerar por 48 horas.
- El extracto se filtró en un matraz de 125 ml.

Extracto Alcohólico.

- Se dejó secar la materia vegetal usada en el extracto etéreo, se pesó, y colocó en un frasco ámbar.
- Se vertió alcohol al 96% hasta cubrir toda la materia vegetal.
- Se tapó y dejó macerar por 48 horas, posteriormente se filtró el extracto en un matraz de 125 ml.

Extracto Acuoso.

- Se dejó secar la raíz de *Piper nubigenum Kunth* usada en el extracto alcohólico, se pesó y colocó la raíz en un frasco ámbar.
- Se vertió agua destilada hasta cubrir toda la materia vegetal.
- Se tapó y se dejó macerar por 48 horas.
- Finalmente se filtró el extracto acuoso en un matraz de 125 ml.

6.8.5. Tamizaje fitoquímico.

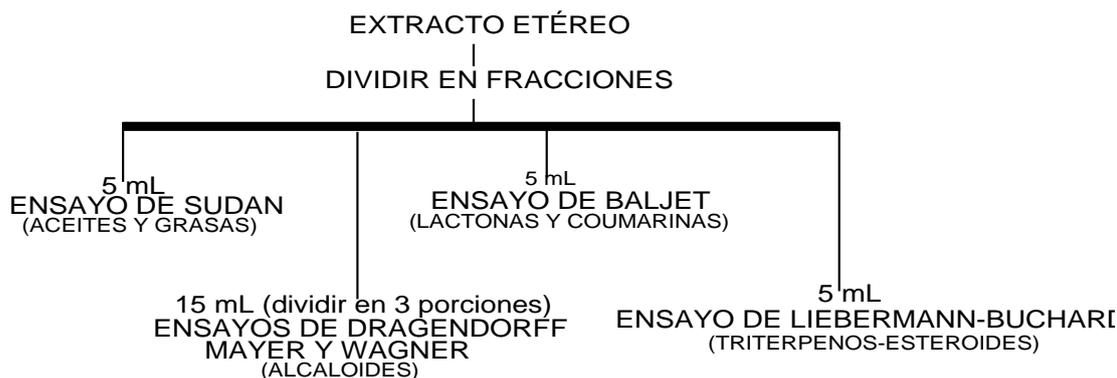
Materiales y reactivos.

- Espátula.
- Gradilla.
- Papel aluminio.

- Papel filtro.
- Pinzas.
- Pipetas volumétricas.
- Probetas.
- Reverbero eléctrico.
- Trípode.
- Tubos de ensayo.
- Varilla de agitación.
- Vasos de precipitación.
- Reactivo Sudan III o Sudan IV.
- Ácido clorhídrico concentrado.
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Mayer.
- Reactivo de Wagner.
- Alcohol al 96%.
- Reactivo de Baljet.
- Cloroformo.
- Anhídrido acético.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Carbonato de sodio.
- UV- visible.
- Agua destilada.
- Reactivo de Fehling.
- Tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica.
- Solución al 2% de Ninhidrina en agua.
- Hidróxido de sodio.
- Cinta de magnesio metálico.
- Alcohol amílico.
- Acetato de sodio.
- Refrigerador.

6.8.5.1. Tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Gráfico Nro. 3. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.



Fuente: Cuéllar et al. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales.⁽⁴⁷⁾

Ensayo de Sudan: Se colocó 5 ml de extracto, al cual se le añadió 1 ml del reactivo de Sudan III o Sudan IV y se calienta a baño maría hasta su evaporación.

El ensayo se considera positivo si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el líquido o en las paredes del tubo.

Ensayo de Dragendorff: Se evaporó 5 ml de extracto etéreo a baño maría y se disolvió en 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, posteriormente se calentó y se dejó enfriar hasta la acidez.

Después se colocó 3 gotas del reactivo de Dragendorff A y Dragendorff B. Si en el ensayo hay opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Ensayo de Mayer: Se evaporó 5 ml del extracto a baño maría, luego se disolvió en ácido clorhídrico concentrado, se calentó y se dejó enfriar hasta la acidez, posteriormente se añadió 2 o 3 gotas de solución.

Si en el ensayo hay opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Ensayo de Wagner: Se realizó el mismo proceso que en los ensayos de Dragendorff y Mayer.

El ensayo se considera positivo si existe opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Ensayo de Baljet: Se tomó 5 ml de extracto y se evaporó el solvente a baño maría, posteriormente se disolvió en 1 ml de alcohol y se adicionó 1 ml del reactivo de Baljet.

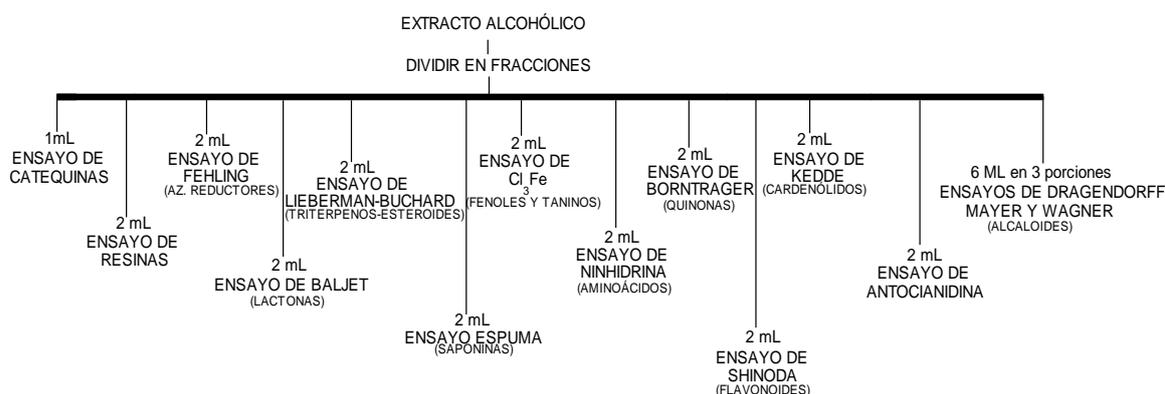
Se considera un ensayo positivo si existe coloración o precipitado rojo.

Ensayo de Liebermann-Buchard: Se tomó 5 ml del extracto etéreo, posteriormente se evaporó y disolvió en 1 ml de cloroformo, después se añadió 1 ml de anhídrido acético, una vez mezclado se dejó caer por la pared del tubo de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El ensayo se considera positivo si presenta los siguientes cambios de coloración:

- Cambio rápido: color rosado a azul.
- Cambio moderado: color verde intenso a verde visible.
- Cambio lento: color verde oscuro a negro al final de la reacción.

6.8.5.2. Tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.

Gráfico Nro. 4. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico



Fuente: Cuéllar et al. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales.⁽⁴⁷⁾

Ensayo de Catequinas: Se aplicó una gota de extracto alcohólico en un papel filtro. Sobre la mancha formada en el papel filtro se colocó la solución de carbonato de sodio y se introdujo la muestra a la luz UV-visible.

El ensayo se considera positivo, si aparece una mancha verde carmelita a la luz UV-visible.

Ensayo de Resinas: Se colocó 5 ml del extracto alcohólico y se adicionó 10 ml de agua destilada.

El ensayo se considera positivo si existe precipitado.

Ensayo de Fehling: Se colocó 5 ml del extracto alcohólico en un tubo de ensayo, se evaporó a baño maría y el residuo se disolvió en 1 o 2 ml de agua, posteriormente se adicionó 2 ml del reactivo y se calentó 5 a 10 minutos.

El ensayo se considera positivo si toma color rojo o tiene un precipitado rojo.

Ensayo de Baljet: Se colocó 5 ml de extracto alcohólico en el tubo de ensayo y se adicionó 1 ml del reactivo Baljet.

Este ensayo se considera positivo si posee una coloración (++) o precipitado rojo (+++).

Ensayo de Lieberman-Buchard: Se colocó 5 ml del extracto alcohólico en un tubo de ensayo y se evaporó el residuo, posteriormente se disolvió en 1 ml de cloroformo, se añadió 1 ml de anhídrido acético y se mezcló. Por la pared se dejó caer 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (no se agitó).

El ensayo se considera positivo si presenta los siguientes cambios de coloración:

- Cambio rápido: color rosado a azul.
- Cambio moderado: color verde intenso a verde visible.
- Cambio lento: color verde oscuro a negro al final de la reacción.

Ensayo Espuma: Se colocó 5 ml de extracto alcohólico y 10 ml de agua, se agitó y mezcló durante 5 a 10 minutos.

El ensayo se considera positivo, si aparece 2 mm de espuma en la superficie del líquido por más de 2 minutos.

Ensayo de Cloruro férrico: Se colocó 5 ml del extracto alcohólico en un tubo de ensayo y se adicionó 3 gotas de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica.

Este ensayo es considerado positivo si tiene las siguientes características:

- Coloración roja o vino, posee compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intensa, posee taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul, posee taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de Ninhidrina: Se tomó 5 ml de extracto alcohólico mezclándolo con 2 ml de solución al 2% de ninhidrina en agua, se calentó la mezcla durante 5 a 10 minutos a baño maría.

Este ensayo se considera positivo si se obtiene un color azul violáceo.

Ensayo de Borntrager: Se tomó 5 ml de extracto alcohólico en un tubo de ensayo, se evaporó a baño maría y se disolvió el residuo en 1 ml de cloroformo, posteriormente se adicionó 1 ml de hidróxido de sodio, se agitó y se dejó en reposo hasta ver la división.

Si la fase superior se colorea de color rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

Ensayo de Shinoda: Se diluyó 5 ml de extracto alcohólico en 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedazo de cinta de magnesio metálico, después de 5 minutos, se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezcló las fases y se dejó reposar.

Este ensayo es considerado positivo si el alcohol amílico toma un color amarillo, naranja, carmelita, rojo, intenso en todos los casos.

Ensayo de Antocianidina: Se tomó 5 ml de extracto, se calentó 10 minutos con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, se dejó enfriar y se colocó 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico y se agitó hasta la separación en dos fases.

Este ensayo es considerado positivo cuando se observa un color rojo a marrón en la fase amílica.

Ensayo de Dragendorff: Se colocó 5 ml del extracto en un tubo de ensayo, se evaporó, se disolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% y se añadió 3 gotas de reactivo.

Para considerar el ensayo positivo se debe observar opalescencia (+), turbidez (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Mayer: Se colocó 5 ml de extracto, se evaporó y colocó 1 ml de ácido clorhídrico al 1% y una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó, filtró y añadió 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer.

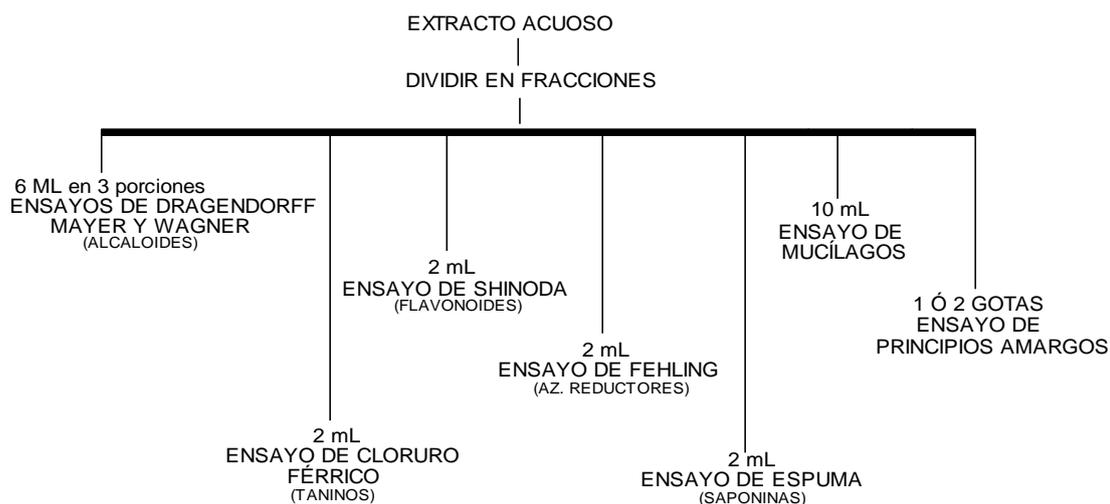
Para considerar el ensayo positivo se debe observar opalescencia (+), turbidez (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Wagner: Se colocó 5 ml del extracto, se evaporó y colocó 1 ml de ácido clorhídrico al 1% y el reactivo de Wagner.

Para considerar el ensayo positivo se debe observar opalescencia (+), turbidez (++) y precipitado (+++).

6.8.5.3. Tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.

Gráfico Nro. 5. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.



Fuente: Cuéllar et al. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales.⁽⁴⁷⁾

Ensayo de Dragendorff: Se colocó 5 ml de extracto en un tubo de ensayo, se añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, se calentó y se dejó enfriar, se añadió 3 gotas de reactivo.

Para considerar el ensayo positivo se debe observar opalescencia (+), turbidez (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Mayer: Se colocó 5 ml de extracto y se añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, se añadió una pizca de cloruro de sodio, se mezcló, filtró y añadió 2 o 3 gotas del reactivo.

Para considerar el ensayo positivo se debe observar opalescencia (+), turbidez (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Wagner: Se colocó 5 ml de extracto, se adicionó 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, se calentó y se dejó enfriar, posteriormente se añadió 2 a 3 gotas de reactivo.

Para considerar el ensayo positivo se debe observar opalescencia (+), turbidez (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Cloruro férrico: A 5 ml del extracto acuoso, se le añadió acetato de sodio y 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica.

El ensayo se considera positivo cuando posee la siguiente información:

- Coloración roja o vino, posee compuestos fenólicos en general.

- Coloración verde intensa, posee taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul, posee taninos del tipo pirogalotánicos

Ensayo de Shinoda: Se añadió 5 ml de extracto acuoso, 1 ml de ácido clorhídrico y un pedazo de cinta de magnesio metálico, se dejó reposar 5 minutos y posteriormente se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y dejó reposar.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

Ensayo de Fehling: Se colocó 5 ml de extracto en un tubo de ensayo, se adicionó el reactivo y se calentó a baño maría de 5 a 10 minutos.

El ensayo es positivo si posee coloración o precipitado rojo.

Ensayo de Espuma: Se colocó 5 ml de extracto acuoso y se agitó.

Si el ensayo posee espuma de 2 mm en la superficie del tubo por más de 2 minutos, se considera positivo.

Ensayo de Mucilaginosos: Se colocó 10 ml de extracto acuoso y se dejó enfriar a 0°C - 5°C.

El ensayo se considera positivo si la solución toma una consistencia gelatinosa.

Ensayo de Principios amargos: Se colocó 1 gota de extracto en la lengua y se saboreó.

El ensayo se considera positivo si su sabor es amargo o astringente bien diferenciado.

6.8.6. Preparación de concentraciones.

Para preparar las concentraciones se colocó los extractos tanto etéreo como alcohólico en el rotavapor para eliminar los solventes utilizados. En el caso del extracto acuoso no se utilizó el rotavapor, sino el sonicador para unir las partículas de agua con el extracto de la raíz.

Posteriormente se realizaron concentraciones de 100% 75% 50% y 25%, añadiendo agua destilada según corresponda.

6.8.7. Activación y replicación de cepas ATCC 29219 de *E. faecalis* y cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.

- Se preparó agar de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el fabricante en la ficha técnica.

- Se esterilizó las cajas Petri y los medios de cultivo.
- En la cámara de flujo laminar se realizó la activación, mediante la siembra en los medios de cultivo establecido y se procedió a la incubación por 3 días

Este procedimiento se realizó tanto con cepas ATCC 29219 de *E. faecalis* como cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.

6.8.8. Siembra de microorganismos.

- Se colocó los agares: infusión cerebro corazón y Sabouraud dextrosa con cloranfenicol en las diferentes cajas Petri y se rotuló.
- Se preparó el patrón 0,5 Mc Farland en un tubo de 10 ml con: 0,05 ml de cloruro de bario al 0,048 molar y 9.95 ml de ácido sulfúrico al 0,18 molar.⁽⁴⁸⁾
- Se tomó una muestra de las cepas ATCC 29219 de *E. faecalis* y ATCC 10231 de *C. albicans*, previamente activada y se disolvió en 10 ml de solución salina, hasta obtener una concentración igual a 0,5 Mc Farland.
- Se realizó la siembra de los microorganismos en cada una de las cajas Petri, con un isopo,
- Posteriormente se ubicó 4 discos en blanco para antibiograma (OXOID) y se colocó la concentración mínima inhibitoria (CMI) que fue de 20µg/ml, de las siguientes concentraciones C1=100%, C2=75%, C3=50%, C4=25%, de los diferentes extractos, en cada disco en blanco para antibiograma, con una micropipeta electrónica de 1 ml.⁽⁴⁹⁾
- Se rotuló y realizó el control negativo con agua esterilizada en un disco en blanco para antibiograma.
- El control positivo de la cepa ATCC 29219 de *E. faecalis* se realizó con un disco de amoxicilina + ácido clavulánico para antibiograma.
- El control positivo de la cepa ATCC de 10231 de *C. albicans*, se realizó con Ketoconazol en tableta que fue molida y pesada en su totalidad. Se ejecutó el cálculo para la disolución de esta en 5 ml de agua destilada esterilizada, se sumergió el disco blanco para antibiograma, en esta disolución durante 5 minutos, colocándolo posteriormente en la caja Petri de control positivo.

- Se selló las cajas con Parafilm.
- Se colocó en la estufa a 35°C durante 24 horas.
- Pasadas las 24 horas, se midió los halos de inhibición presentes en cada una de las cajas.

6.9. Operacionalización de variables.

Efecto antimicrobiano de *Piper nubigenum Kunth*, frente a cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* productoras de enfermedades bucales.

6.9.1. Variable independiente.

Tabla Nro. 4. VI. Cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

Conceptualización	Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
Cultivo puro certificado usado como material de estudio de investigaciones relacionadas con la inhibición de determinados microorganismos	Cultivo relacionado con inhibición de microorganismos	Código de la cepa ATCC Nivel de sensibilidad	Observación	Lista de cotejo (Bitácora)

6.9.2. Variable dependiente.

Tabla Nro. 5. VD. Efecto antimicrobiano de *Piper nubigenum Kunth*.

Conceptualización	Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
Conjunto de componentes químicos en los metabolitos secundarios, cuya función es eliminar o reducir la proliferación de bacterias o microorganismo.	Metabolitos secundarios	Medida del halo inhibitorio en milímetros (mm).	Observación	Lista de cotejo (Bitácora)

7. RESULTADOS.

7.1. Recolección.

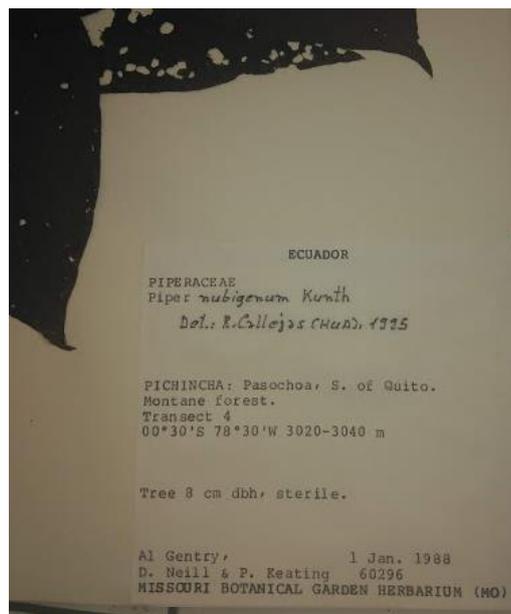
- Se recolectó, 30 ejemplares de *Piper nubigenum* Kunth en Ecuador en la provincia de Pastaza, en la ciudad de Puyo, parroquia Fátima para su uso en la investigación.

Fotografía Nro. 1. Planta *Piper nubigenum* Kunth en su hábitad natural.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefanía Mosquera

Fotografía Nro. 2. Identificación de Planta por el herbario de la ESPOCH.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefanía Mosquera

La Fotografía Nro. 1 refleja a *Piper nubigenum* Kunth en su hábitat natural. La Fotografía Nro. 2 muestra la identificación realizada por el herbario de la ESPOCH.

7.2. Acondicionamiento de especie vegetal.

- Se realizó la limpieza del material vegetal con agua, toallas de cocina y toallitas húmedas.

Fotografía Nro. 3. Limpieza de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 3, se observa el proceso de limpieza de la materia vegetal.

Fotografía Nro. 4. Raíz de *Piper nubigenum Kunth* preparada para el secado.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 4, se observa 110 g de raíz de *Piper nubigenum Kunth* preparada para ser secada a la sombra.

Fotografía Nro. 5. Raíz de *Piper nubigenum* Kunth cortada y seca.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 5 se observa a la raíz de *Piper nubigenum* Kunth antes de ser pulverizada en el molino, en él se pulverizó 96 g de muestra vegetal.

Fotografía Nro. 6. Raíz de *Piper nubigenum* Kunth molida.



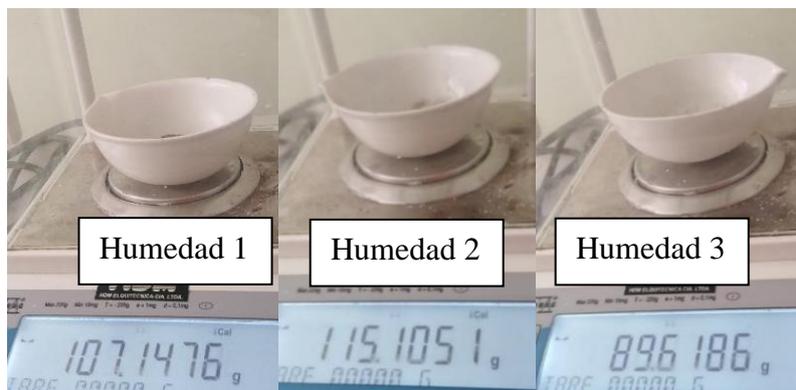
Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 6 se observa una muestra de la raíz *Piper nubigenum* Kunth después de ser pulverizada.

7.3. Determinación del contenido de humedad total por el método gravimétrico.

Expresión de los resultados: $H_T = 3,64\%$

Fotografía Nro. 7. Pesos después del proceso de determinación de humedad total.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En el estudio de humedad total de la materia vegetal se obtuvo un resultado de 3,64%, que es menor al rango establecido por Cuéllar et al. ⁽⁴⁷⁾ en el Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales, pero al estar correctamente seca no contiene humedad y por lo tanto no es propensa al crecimiento de hongos, siendo una planta estable. ⁽⁵⁰⁾

7.4. Determinación de cenizas totales.

Expresión de resultados: $C_T = 3,10\%$

Fotografía Nro. 8. Pesos finales después del proceso de determinación de cenizas.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

Las cenizas totales de la materia vegetal dieron como resultado un 3,10% que se encuentra dentro del rango que nos da la Real Farmacopea Española, considerando la raíz de la planta, estable. ⁽⁵¹⁾

7.5. Preparación de los extractos.

7.5.1. Extracto Etéreo.

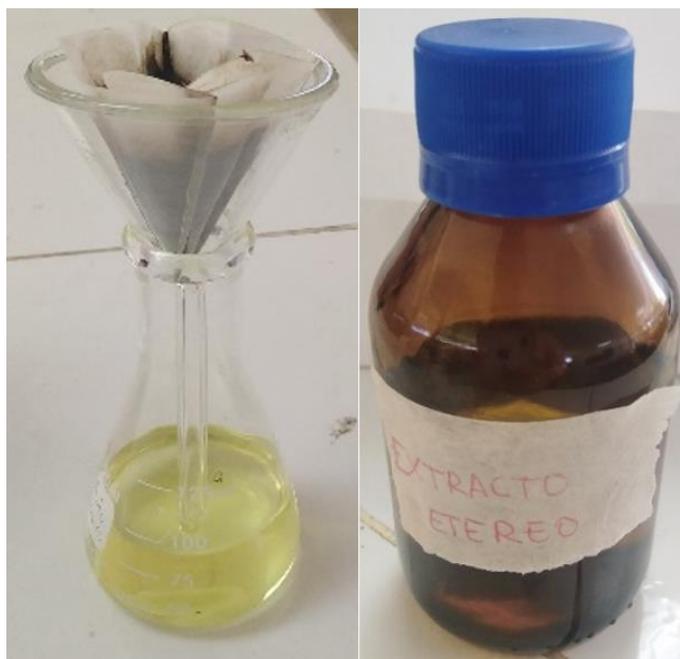
Se obtuvo 100 ml de extracto etéreo tras la maceración de 50,36 g de material vegetal.

Fotografía Nro. 9. Peso de materia vegetal para extracto etéreo.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 10. Extracto Etéreo.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

7.5.2. Extracto Alcohólico.

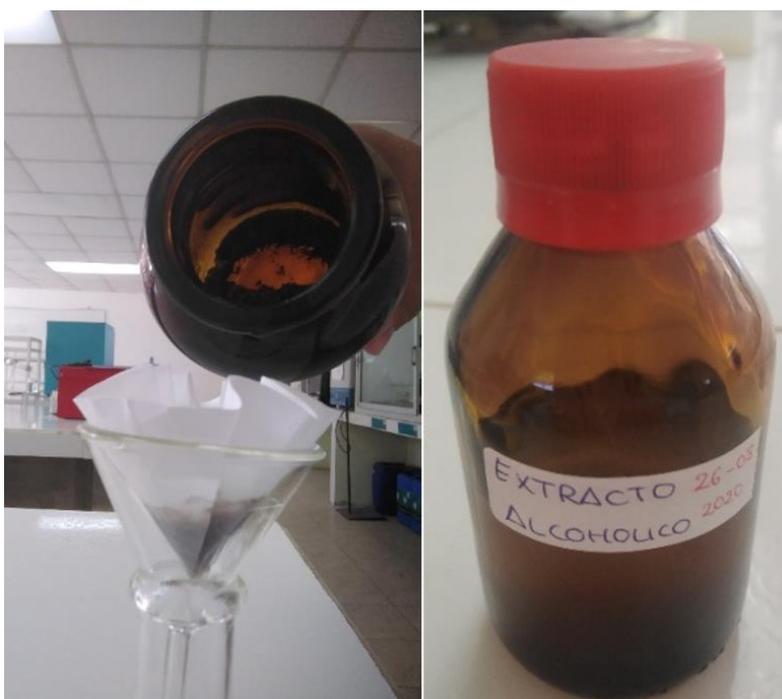
Después de la maceración de 50.02 g de material vegetal, se obtuvo 100 ml de extracto alcohólico.

Fotografía Nro. 11. Peso de materia vegetal para extracto alcohólico.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 12. Extracto alcohólico.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

7.5.3. Extracto Acuoso.

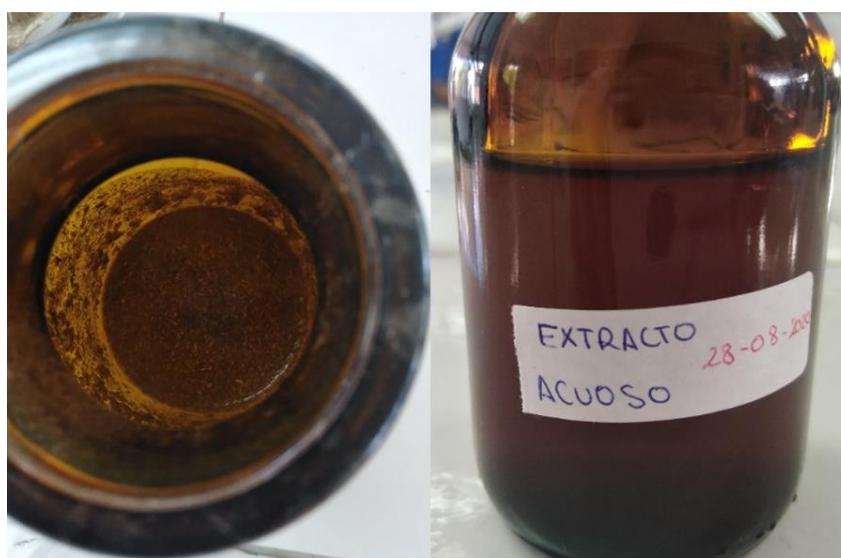
Se obtuvo 125 ml de extracto acuoso, después de la maceración de 46.52 g de material vegetal.

Fotografía Nro. 13. Peso de materia vegetal para extracto acuoso.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 14. Extracto acuoso.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

7.6. Tamizaje fitoquímico.

Tabla Nro. 6. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth.

Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.		
Ensayo	Resultado	Metabolito
Ensayo de Sudan III o IV	+++	Aceites y Grasas
Ensayo de Dragendorff	+++	Alcaloides
Ensayo de Mayer	-	Alcaloides
Ensayo de Wagner	++	Alcaloides
Ensayo de Baljet	-	Lactonas
Ensayo de Liebermann-Buchard	-	Triterpenos y Esteroides

Poca cantidad (+), Moderada Cantidad (++), Abundante cantidad (+++), No se evidencia reacción (-)

Fuente: Registro fotográfico

Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 15. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.



Fuente: Registro fotográfico

Autora: Estefania Mosquera

Análisis: En la Tabla Nro. 6 y la Fotografía Nro. 15, se evidencia abundante cantidad de alcaloides (Ensayo de Dragendorff), aceites y grasas (Ensayo de Sudan III o IV). Cantidad moderada de alcaloides (Ensayo de Wagner) y no se evidenció reacción en lactonas (Ensayo de Baljet), alcaloides (Ensayo de Mayer) triterpenos y esteroides (Ensayo de Liebermann-Buchard).

Los alcaloides de tipo base se disuelven en solventes orgánicos como el éter. Mientras que los alcaloides de tipo sales o también considerados alcaloides que tiene otros componentes, se disuelven de mejor manera en agua. En el extracto etéreo se puede constatar la presencia

de alcaloides de tipo base de manera abundante en el ensayo de Dragendorff y de manera moderada en el ensayo de Wagner. (52,53)

Tabla Nro. 7. Tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico de raíz de *Piper nubigenum* Kunth.

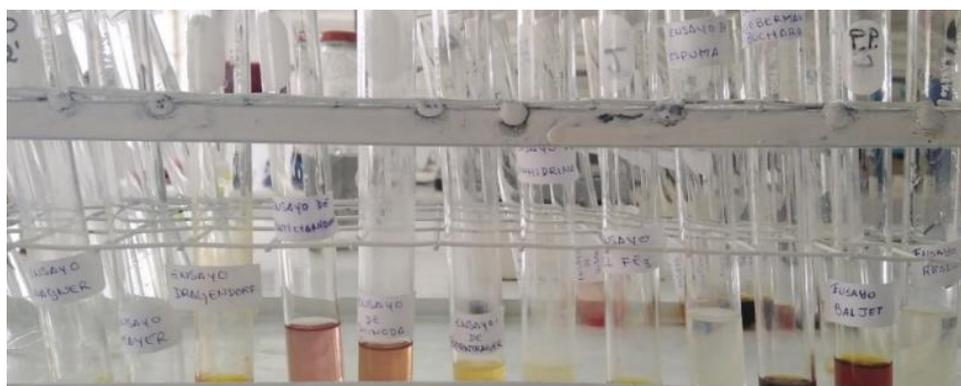
Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de raíz de <i>Piper nubigenum</i> Kunth.		
Ensayo	Resultado	Metabolito
Ensayo de Catequinas:	++	Compuesto Catequinólicos
Ensayo de Resinas:	-	Resinas
Ensayo de Fehling:	+++	Azúcares reductores
Ensayo de Baljet:	-	Lactonas
Ensayo de Lieberman-Buchard:	-	Triterpenos y Esteroides
Ensayo Espuma:	-	Saponinas
Ensayo de Cloruro férrico:	+	Fenoles y Taninos
Ensayo de Ninhidrina:	-	Aminoácidos
Ensayo de Borntrager:	++	Quinonas
Ensayo de Shinoda:	+++	Flavonoides
Ensayo de Antocianidina:	+	Antocianidina
Ensayo de Dragendorff:	+++	Alcaloides
Ensayo de Mayer:	+	Alcaloides
Ensayo de Wagner:	++	Alcaloides

Poca cantidad (+), Moderada Cantidad (++), Abundante cantidad (+++), No se evidencia reacción (-)

Fuente: Registro fotográfico

Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 16. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.



Fuente: Registro fotográfico

Autora: Estefania Mosquera

Análisis: En la Tabla Nro. 7 y la Fotografía Nro. 16, se observan los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de la *Piper nubigenum Kunth*, en los cuales se evidenció abundante cantidad de: azúcares reductores (Ensayo de Fehling), flavonoides (Ensayo de Shinoda) y alcaloides (Ensayo de Dragendorff); también una mediana cantidad de: compuestos catequinólicos (Ensayo de Catequinas), quinonas (Ensayo de Borntrager), alcaloides (Ensayo de Wagner) y poca cantidad de: antocianidina (Ensayo de Antocianidina), alcaloides (Ensayo de Mayer), fenoles y taninos (Ensayo de Cloruro férrico). No se evidenció reacción de: resinas (Ensayo de Resinas), lactonas (Ensayo de Baljet), saponinas (Ensayo de Espuma), aminoácidos (Ensayo de Ninhidrina), triterpenos y esteroides (Ensayo de Lieberman-Buchard). Un estudio realizado por Rodríguez et al. ⁽¹³⁾ sobre la actividad antimicrobiana, demuestra que los metabolitos como: alcaloides, flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos ejercen actividad antimicrobiana. De los metabolitos antes mencionados, *Piper nubigenum Kunth* posee poca cantidad de: alcaloides (Ensayo de Mayer), taninos y fenoles (Ensayo de Cloruro férrico), por lo tanto, se correlacionan los halos inhibitorios obtenidos con los resultados del tamizaje fitoquímico.

El extracto alcohólico al estar disuelto en agua posee un solvente orgánico e inorgánico. En él se puede evidenciar alcaloides de tipo base y sales, mediante los ensayos de Dragendorff y Wagner, debido a que solubles en solventes orgánicos, por otro lado, el ensayo de Mayer posee alcaloides tipo sales, debido a que se disuelve de mejor manera en agua.^(52,53)

Tabla Nro. 8. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de raíz de *Piper nubigenum Kunth*.

Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de raíz de <i>Piper nubigenum Kunth</i>.		
Ensayo	Resultado	Metabolito
Ensayo de Dragendorff	+++	Alcaloides
Ensayo de Mayer	++	Alcaloides
Ensayo de Wagner	+++	Alcaloides
Ensayo de Cloruro férrico	+++	Taninos
Ensayo de Shinoda	++	Flavonoides
Ensayo de Fehling	+++	Azúcares reductores
Ensayo de Espuma	-	Saponinas
Ensayo de Mucilagos	++	Polisacárido
Ensayo de Principios amargos	-	
Poca cantidad (+), Moderada Cantidad (++), Abundante cantidad (+++), No se evidencia reacción (-)		

Fuente: Registro fotográfico
 Autora: Estefanía Mosquera

Fotografía Nro. 17. Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.



Fuente: Registro fotográfico
 Autora: Estefania Mosquera

Análisis: La Tabla Nro. 8 y la Fotografía Nro. 17, reflejan los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, observándose abundante cantidad de: alcaloides (Ensayo de Dragendorff y Wagner), taninos (Ensayo de Cloruro férrico) y azúcares reductores (Ensayo de Fehling); además una cantidad moderada de alcaloides (Ensayo de Mayer), flavonoides (Ensayo de Shinoda) y poca cantidad de polisacáridos (Ensayo de Mucilagos) y principios amargos (Ensayo de principios amargos). No existió reacción de saponinas (Ensayo de Espuma).

En los ensayos de Dragendorff y Wagner se refleja una combinación de alcaloides de tipo base y sales, ya que por lo expuesto anteriormente existe una prevalencia de alcaloides en el extracto acuoso, en el caso del ensayo de Mayer se reflejan alcaloides tipo sales, ya que se observan de mejor manera los alcaloides en el extracto acuoso, al ser un solvente inorgánico.^(52,53)

Tabla Nro. 9. Tamizaje fitoquímico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* en comparación con plantas de la misma familia.

	Metabolitos	<i>Piper nubigenum Kunth</i>	<i>Piper carpunya</i> ⁽⁵⁴⁾	<i>Piper augustifolium</i> ⁽⁵⁵⁾
Extracto etéreo	Aceites y Grasas	+++		+
	Alcaloides (Dragendorff)	+++	+++	+
	Alcaloides (Mayer)	-	+++	-
	Alcaloides (Wagner)	++	+++	
	Cumarinas	-	+	
	Triterpenos y Esteroides	-		+
Extracto alcohólico	Compuesto Catequinólicos	++		

	Resinas	-		
	Azúcares reductores	+++		
	Cumarinas	-	+++	+
	Triterpenos y esteroides	-		
	Saponinas	-	+	
	Fenoles y Taninos	+	-	
	Aminoácidos	-		
	Quinonas	++	-	
	Flavonoides	+++	++	+
	Antocianidina	+		+
	Alcaloides (Dragendorff)	+++	+++	+
	Alcaloides (Mayer)	+	-	+
	Alcaloides (Wagner)	++	+++	
Extracto acuoso	Alcaloides (Dragendorff)	+++	-	
	Alcaloides (Mayer)	++	-	
	Alcaloides (Wagner)	+++	+++	
	Taninos	+++	-	+
	Flavonoides	+++	++	+
	Azúcares reductores	+++		
	Saponinas	-	+	+
	Polisacárido	++		
	Principio amargo	-		
Poca cantidad (+), Moderada Cantidad (++), Abundante cantidad (+++), No se evidencia reacción (-), Espacios en blanco (en el estudio no se realizaron los ensayos)				

Fuente: Tomado de ^(54,55)

Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: De acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla Nro. 9. En el extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, se observan resultados positivos en alcaloides, comparado positivamente con la especie *Piper carpunya*, pero, no se evidencia alcaloides en la especie *Piper augustifolium*, lo cual es constancia probada que entre la misma familia existen diferentes metabolitos secundarios propios de cada especie. Con lo que respecta a aceites y grasas, en la *Piper nubigenum Kunth*, se refleja resultados positivos, de igual forma en la *Piper augustifolium*, aunque en baja cantidad. Siguiendo con las cumarinas, triterpenos y esteroides, en la especie utilizada en esta investigación, no se encontró ningún resultado positivo, de igual forma en la especie *Piper carpunya* y una poca cantidad de triterpenos y esteroides en la especie *Piper augustifolium*.

En el extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* se observan resultados positivos en compuestos catequinólicos, azúcares reductores, flavonoides, quinonas, alcaloides, fenoles, taninos y antocianidinas, lo cual comparado con la especie *Piper carpunya* tiene coincidencias en metabolitos como: flavonoides y alcaloides, además *Piper carpunya* posee otros metabolitos como cumarinas y saponinas que por el contrario son negativas en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*. En comparación con la especie *Piper augustifolium* existen coincidencias en la presencia de flavonoides, antocianidinas, y alcaloides, por el contrario, esta especie posee cumarinas que no se encuentran presentes en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*. Esta variación en los metabolitos puede afectar al efecto antimicrobiano de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*.

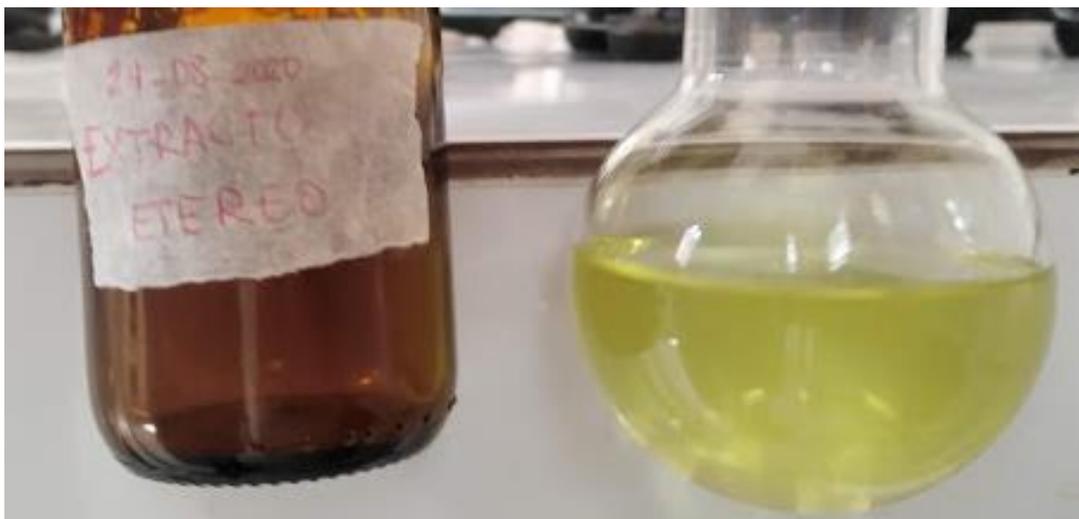
En el extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* se observan resultados positivos en alcaloides, taninos, flavonoides, azúcares reductores y polisacáridos. En comparación con *Piper carpunya* existen coincidencias en la presencia de metabolitos como: alcaloides y flavonoides, además esta especie de *Piper* posee otros metabolitos como saponinas que por el contrario son negativas en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*. En comparación con *Piper augustifolium* existen coincidencias en la presencia de taninos, flavonoides, posee también saponinas, metabolito que no se encuentran presentes en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*.

La variación en los resultados obtenidos en el tamizaje puede mitigar el efecto antimicrobiano de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, en comparación con otras especies de la misma familia. La variación de los resultados depende del órgano de la planta utilizada, la especie, la técnica de extracción de metabolitos, el tipo de cepa utilizada y el método de evaluación utilizado.⁽⁵⁶⁾

Es importante la comparación de los resultados de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* con *Piper carpunya* y *Piper augustifolium* debido a que el estudio realizado es nuevo y debe ser correlacionado con estudios que tengan similitud en el género *Piper* que ayude a entender el efecto antimicrobiano de la planta frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*.^(54,55)

7.7. Preparación de concentraciones

Fotografía Nro. 18. Extracto etéreo en un balón de rotavapor de 100 ml.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 19. Concentración del extracto etéreo en el rotavapor.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 18, se observa el extracto etéreo en un balón de rotavapor de 100 ml antes de la eliminación del solvente. En la Fotografía Nro. 19 se observa 20 ml de extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* que fue utilizado en la preparación de las

diferentes concentraciones, empleadas en el análisis del efecto antimicrobiano de la planta frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*.

Fotografía Nro. 20. Extracto alcohólico en un balón de rotavapor de 100 ml.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 21. Concentración del extracto alcohólico en el rotavapor.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 20, se observa el extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* en un balón de rotavapor de 100 ml, listo para la eliminación del solvente. La Fotografía Nro. 21, refleja el resultado de la exposición al rotavapor, se obtuvo 25 ml de extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* que fue utilizado en la preparación

de las diferentes concentraciones, empleadas en el análisis del efecto antimicrobiano de la planta frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*.

Fotografía Nro. 22. Sonicador



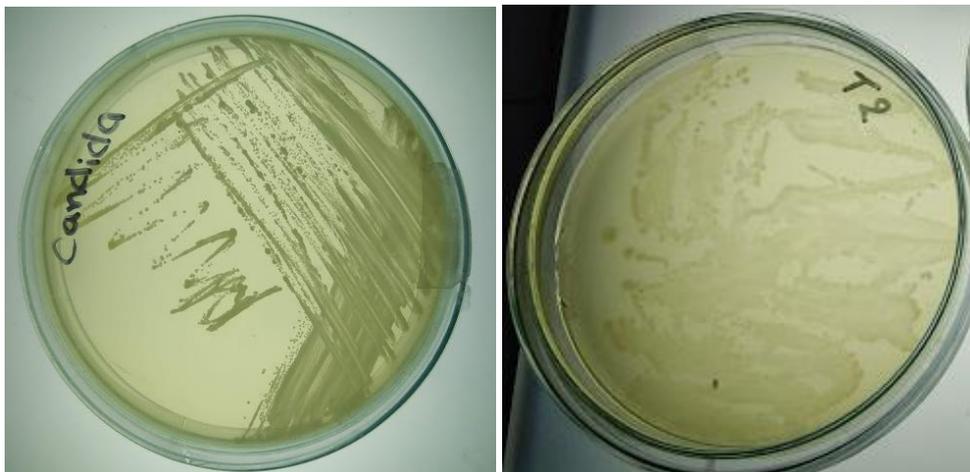
Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 22, se observa el sonicador. El extracto acuoso fue sometido al sonicador para unir de manera eficaz las partículas de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* con el agua destilada usada en la maceración.

Posteriormente se elaboró concentraciones de 100% 75% 50% y 25%, añadiendo agua destilada según corresponda. Estas concentraciones fueron empleadas en el analisis del efecto antimicrobiano de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*.

7.8. Activación y replicación de cepas.

Fotografía Nro. 23. Activación y replicación de cepas ATCC 29219 de *E. faecalis* y cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Fotografía Nro. 23 se muestra el resultado de la activación y replicación de cepas ATCC, a la derecha (cepas ATCC 29219 *E. faecalis*) y a la izquierda (cepas ATCC 10231 de *C. albicans*).

7.9. Resultados de los halos inhibitorios producidos por los extractos de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a las cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*.

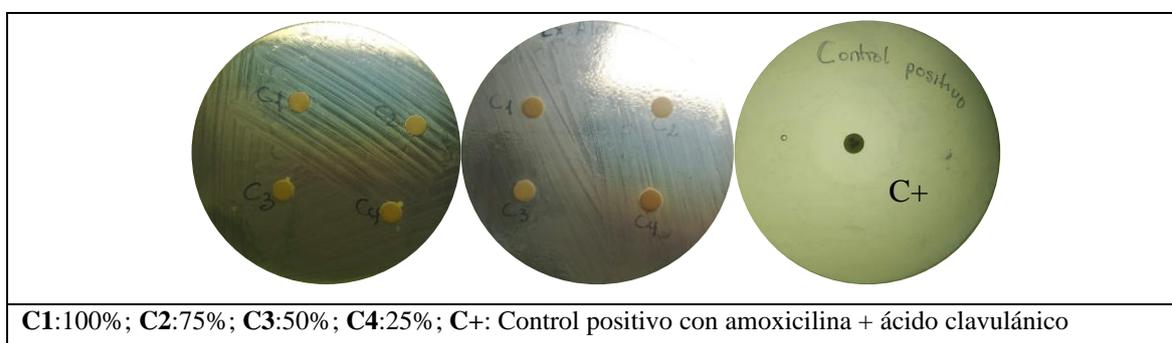
7.9.1. Resultados de los halos inhibitorios de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC 29219 de *E. faecalis*.

Tabla Nro. 10. Resultado de los halos de inhibición de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC 29219 de *E. faecalis*.

	100%	75%	50%	25%
Extracto Etéreo	10 mm	9.33 mm	8.3 mm	8.6 mm
Extracto Alcohólico	6.3 mm	7.3 mm	3 mm	9 mm
Extracto Acuoso	-	-	-	-
Control positivo	Amoxicilina + Ácido clavulánico			25 mm
Control negativo	Agua destilada esterilizada			-
No existió halo de inhibición (-)				

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH
Elaborado por: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 24. Resultados significativos en cepas ATCC 29219 de *E. faecalis*.



Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Tabla Nro. 10 y la Fotografía Nro. 24, se observa la media obtenida de los resultados de los halos de inhibición de la cepa ATCC 29219 de *E. faecalis*. Los halos de inhibición más significativos se encuentran en el extracto etéreo y sobre todo en las concentraciones: 100% y 75% con halos inhibitorios mayores a 8 mm esto determina sensibilidad según la escala de Duraffourd. Además, se obtuvo un resultado de 25 mm que determina que la cepa

ATCC 29219 de *E. faecalis* es sumamente sensible El control positivo realizado con amoxicilina + ácido clavulánico, según la escala de Duraffourd, que es utilizada en estudios in vitro y se establece dependiendo del diámetro del halo de inhibición formado alrededor del tratamiento.⁽²⁰⁾

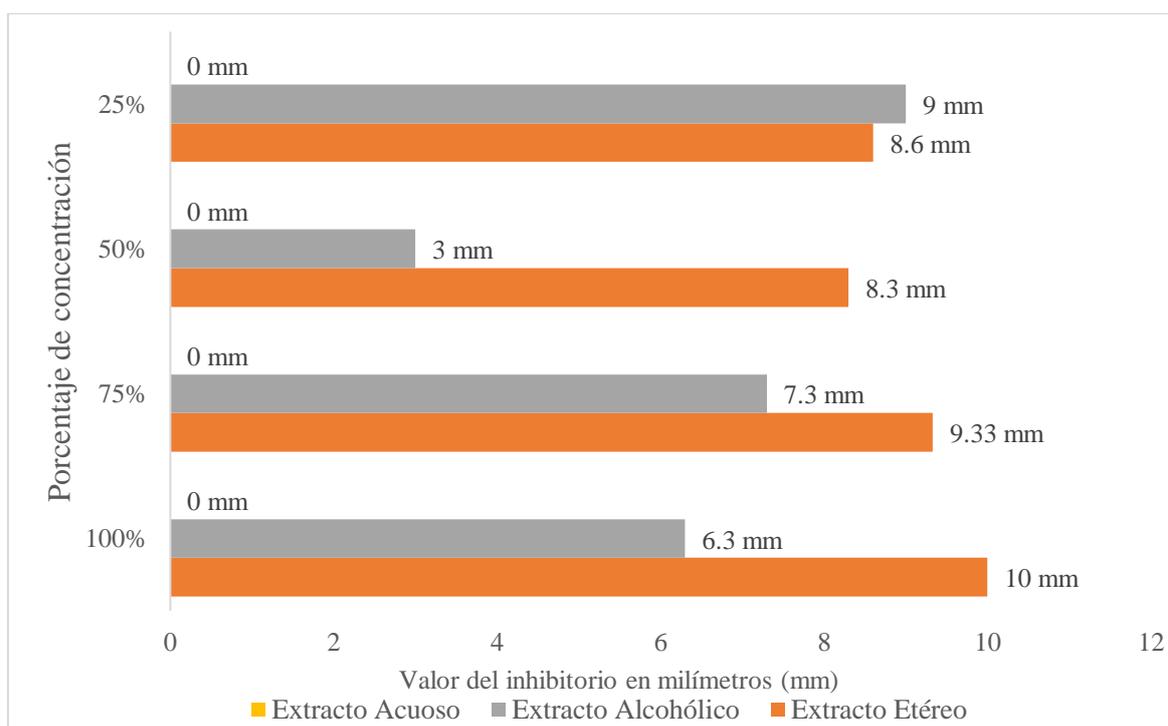
Nula: ≤ 8 mm

Sensible: $> 8 \leq 14$ mm

Muy sensible: $> 14 \leq 20$ mm

Sumamente sensible: > 20 mm

Gráfico Nro. 6. Halos de inhibición de los diferentes extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC 29219 de *E. faecalis*.



Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

El Gráfico Nro. 6, muestra los resultados de los halos de inhibición de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*. En el extracto etéreo al 100% y 75%, 50% y 25% se observan los halos de inhibición con valores de 10 mm y 9,33 mm, 8,6 mm, 8,3 mm, respectivamente, además en el extracto alcohólico al 25% encontramos un halo inhibitorio de 9 mm; todos estos valores demostraron que la cepa de *E. faecalis* es sensible a estos extractos y concentraciones, según la escala de Duraffourd. Por otro lado, encontramos también valores de 7,3 mm, 6,3 mm y 3 mm en el extracto alcohólico al 75%,

100% y 50% respectivamente, que demostraron que la cepa de *E. faecalis* tiene sensibilidad nula frente a estas concentraciones, según la escala de Duraffourd.⁽²⁰⁾

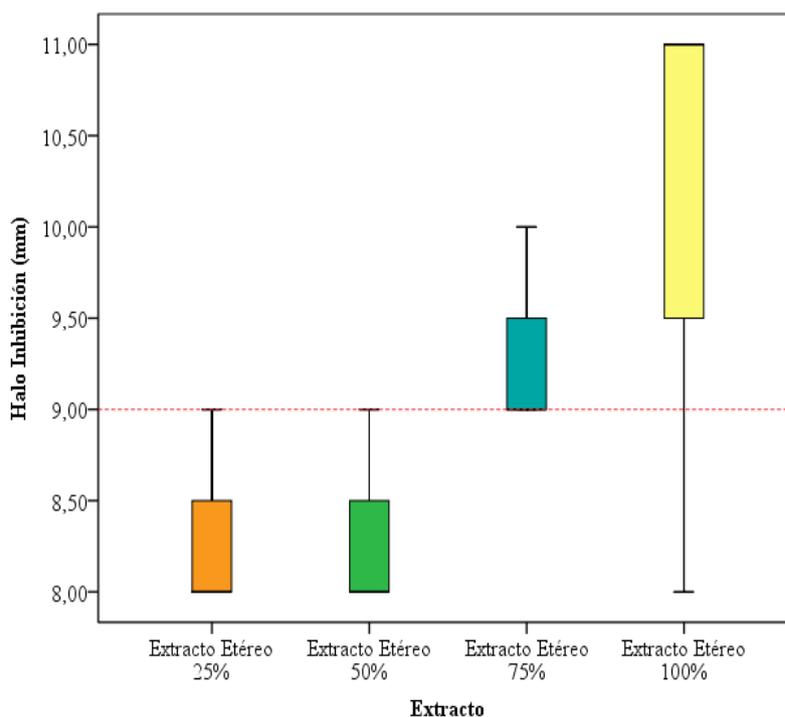
7.9.1.1. Resultados de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*.

Tabla Nro. 11. Descripción de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*.

Extracto Etéreo	Desviación			Mínimo	Máximo	Coeficiente de Variación
	Media	Mediana	Estándar			
25%	8,3333	8	0,57735	8	9	7%
50%	8,3333	8	0,57735	8	9	7%
75%	9,3333	9	0,57735	9	10	6%
100%	10	9	0,57735	9	10	6%

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefanía Mosquera.

Gráfico Nro. 7. Distribución por concentraciones extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*.



Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefanía Mosquera

Análisis: El valor inhibitorio del extracto Etéreo de la raíz de la *Piper nubigenum Kunth* con respecto a la cepa ATCC de *E. faecalis*, posee un coeficiente de variación entre 6% y 7% que aumenta a medida que aumenta la concentración, además se observa que la inhibición de las concentraciones de 25% y 50% se encuentran por debajo de la media, pero demuestran

sensibilidad. Además se observa que las concentraciones de 75% y 100% muestran los valores más altos, demostrando que la cepa de *E. faecalis* tiene mayor sensibilidad a estas concentraciones, pero no sobre pasa el rango de sensible según la escala de Duraffourd.⁽²⁰⁾

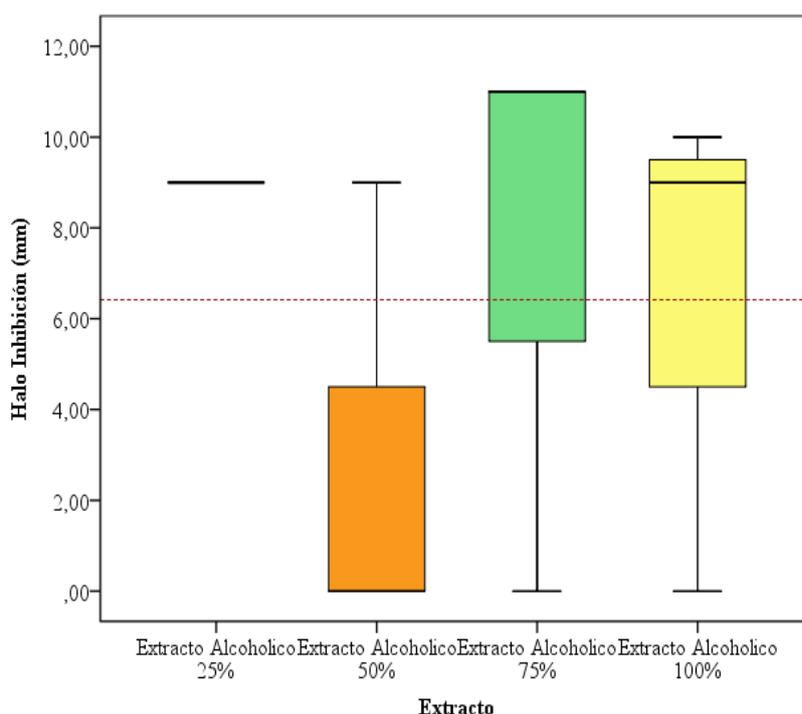
7.9.1.2. Resultados de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*

Tabla Nro. 12. Descripción de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*

Extracto Alcohólico	Desviación		Mínimo	Máximo	Coeficiente de Variación
	Media	Mediana			
25%	0	0	0	0	0%
50%	3	0	5,19615	9	173%
75%	7,33	11	6,35085	11	87%
100%	6,33	9	5,50757	11	87%

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Gráfico Nro. 8. Distribución por concentraciones extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*



Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: El valor inhibitorio del extracto alcohólico de la raíz de la *Piper nubigenum Kunth* con respecto a la cepa ATCC de *E. faecalis* posee un coeficiente de variación que demuestra que el extracto en sus niveles de inhibición tiene una variación considerable y los valores promedio se encuentran por encima de 8 mm en el extracto al 25% demostrando sensibilidad,

para las demás concentraciones la sensibilidad está por debajo de 8 mm, por lo tanto, se observa una sensibilidad nula en la escala Duraffourd.⁽²⁰⁾

7.9.1.3. Resultado de los halos inhibitorios de Extracto Acuoso de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC de *E. faecalis*.

El extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth con respecto a la cepa ATCC de *E. faecalis* no obtuvo valores inhibitorios, demostrando sensibilidad nula al microorganismo.

7.9.1.4. Nivel de sensibilidad de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a *E. faecalis*.

Tabla Nro. 13. Nivel de sensibilidad de los extractos frente al *E. faecalis*

Extracto		Nivel de Sensibilidad		
		Nula	Sensible	Total
Extracto Alcohólico 25%	f	0	3	3
	%	0,00%	20,00%	8,30%
Extracto Alcohólico 50%	f	2	1	3
	%	9,50%	6,70%	8,30%
Extracto Alcohólico 75%	f	1	2	3
	%	4,80%	13,30%	8,30%
Extracto Alcohólico 100%	f	1	2	3
	%	4,80%	13,30%	8,30%
Extracto Etéreo 25%	f	2	1	3
	%	9,50%	6,70%	8,30%
Extracto Etéreo 50%	f	2	1	3
	%	9,50%	6,70%	8,30%
Extracto Etéreo 75%	f	0	3	3
	%	0,00%	20,00%	8,30%
Extracto Etéreo 100%	f	1	2	3
	%	4,80%	13,30%	8,30%
Extracto Acuoso 25%	f	3	0	3
	%	14,30%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 50%	f	3	0	3
	%	14,30%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 75%	f	3	0	3
	%	14,30%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 100%	f	3	0	3
	%	14,30%	0,00%	8,30%
Total	f	21	15	36
	%	100,00%	100,00%	100,00%

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: El valor inhibitorio en comparación con la escala de Duraffourd revela que la cepa ATCC de *E. faecalis* fue sensible al extracto alcohólico como máximo en el 67% de las cajas y se obtuvo mayor sensibilidad en algunas cajas en las concentraciones de 75% y 100%, pero el valor media más alto se obtuvo en la concentración al 25%. En cuanto al extracto etéreo, el 58% de las cajas obtuvieron un resultado sensible según la escala de Duraffourd. Y por último, en el extracto acuoso se observó una sensibilidad nula según la escala.⁽²⁰⁾

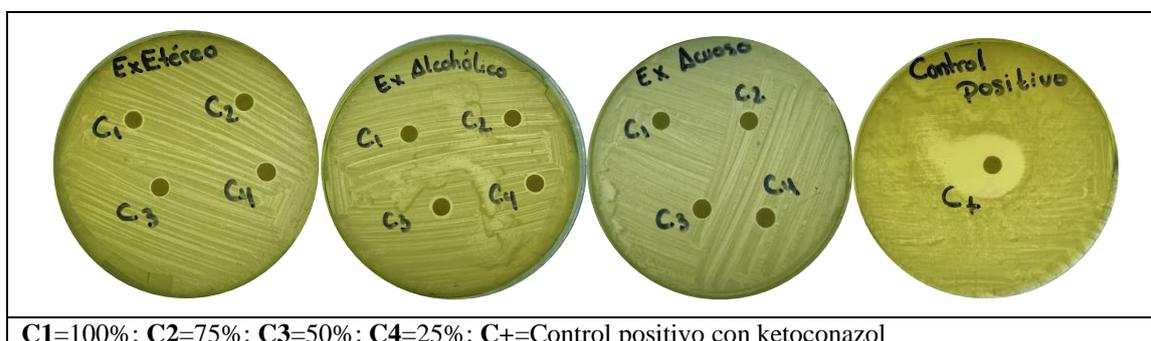
7.9.2. Resultados de los halos inhibitorios de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.

Tabla Nro. 14. Resultado de los halos de inhibición de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.

	100%	75%	50%	25%
Extracto Etéreo	7.6 mm	4.6 mm	7.3 mm	2.3 mm
Extracto Alcohólico	2.3 mm	2.6 mm	3 mm	2.6 mm
Extracto Acuoso	4.6 mm	3.5 mm	4.6 mm	4.6 mm
Control positivo	Ketoconazol			22 mm
Control negativo	Agua destilada esterilizada			-
No existió halo de inhibición (-)				

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH
Elaborado por: Estefania Mosquera

Fotografía Nro. 25. Resultados significativos en cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.

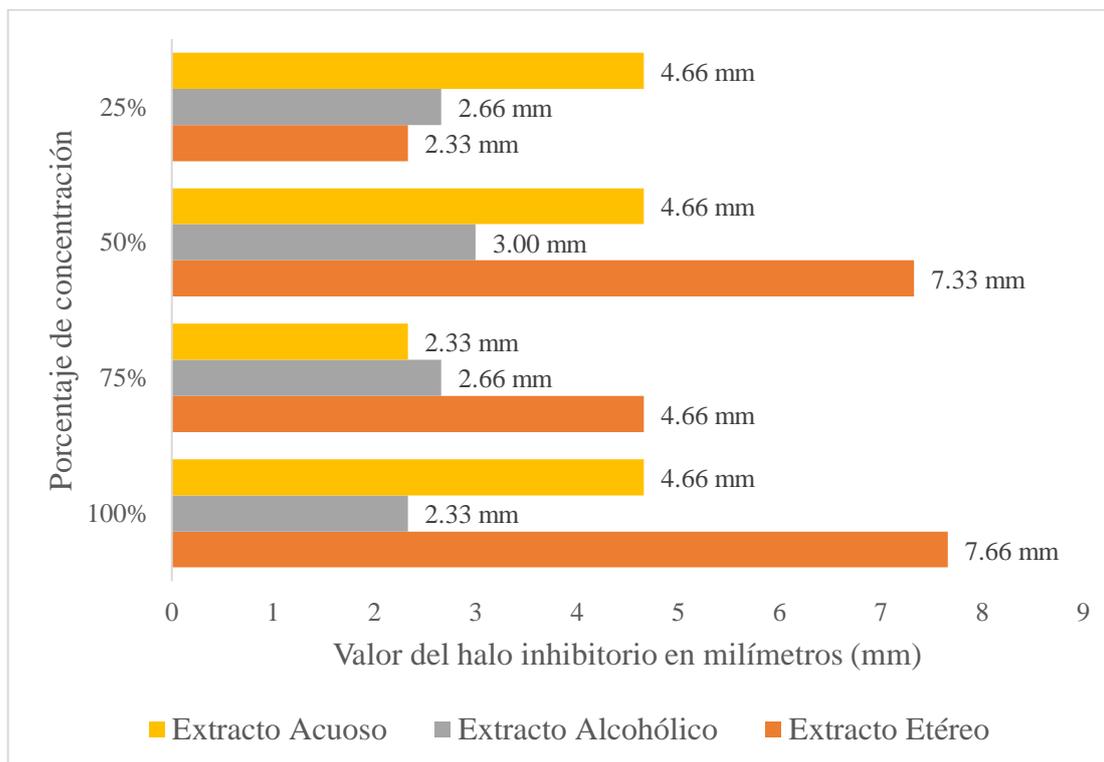


Fuente: Registro fotográfico
Autora: Estefania Mosquera

En la Tabla Nro. 14 y la Fotografía Nro. 25, se observa el resultado de la media obtenida entre los halos de inhibición de las cepas ATCC 10231 de *C. albicans*. En ella se ve una gran diferencia entre los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos y el control positivo. Además, se puede observar las cajas Petri de cepas ATCC 10231 de *C. albicans*, con discos en blanco para antibiograma, con las diferentes concentraciones de los

extractos más significativos. Los valores obtenidos en general tienen un sensibilidad nula según la escala de Duraffourd debido a que los valores son menores a 8 mm.⁽²⁰⁾

Gráfico Nro. 9. Halos de inhibición de los diferentes extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC 10231 de *C. albicans*.



Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

En el Gráfico Nro. 9, se observan los halos de inhibitorios obtenidos frente a cepas ATCC de *C. albicans*. Estos valores demuestran que: la sensibilidad obtenida según la escala de Duraffourd es nula, ya que los halos inhibitorios son menores a 8 mm.⁽²⁰⁾

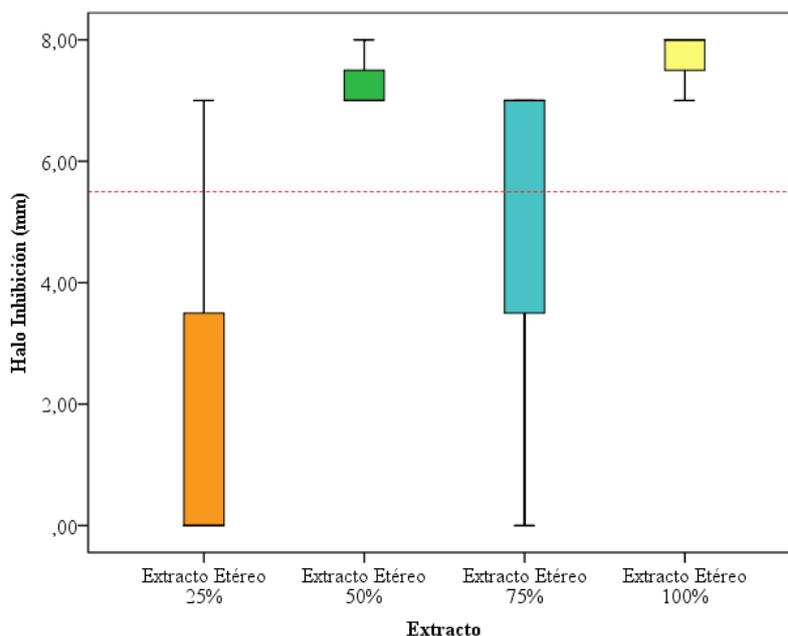
7.9.2.1. Resultados de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *C. albicans*.

Tabla Nro. 15. Descripción de halos inhibitorios de extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *C. albicans*.

Extracto Etéreo	Desviación			Mínimo	Máximo	Coeficiente de Variación
	Media	Mediana	Estándar			
25%	2,3333	0	16,333	0	7	700%
50%	7,3333	7	0,57735	7	8	8%
75%	4,6667	7	16,333	0	7	350%
100%	7,6667	8	0,57735	7	8	8%

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Gráfico Nro. 10. Distribución por concentraciones extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth.



Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: El valor inhibitorio del extracto Etéreo de la raíz de la *Piper nubigenum* Kunth con respecto a la *C. albicans* se encuentra por debajo de 6 mm, determinando que no se obtuvo inhibición en el extracto frente al microorganismo. El extracto al 50% y 100% mostró valores superiores al valor promedio del grupo que denotarían cercanía a los índices de sensibilidad. Los resultados obtenidos en los halos tuvieron una sensibilidad nula, según la escala de Duraffourd.⁽²⁰⁾

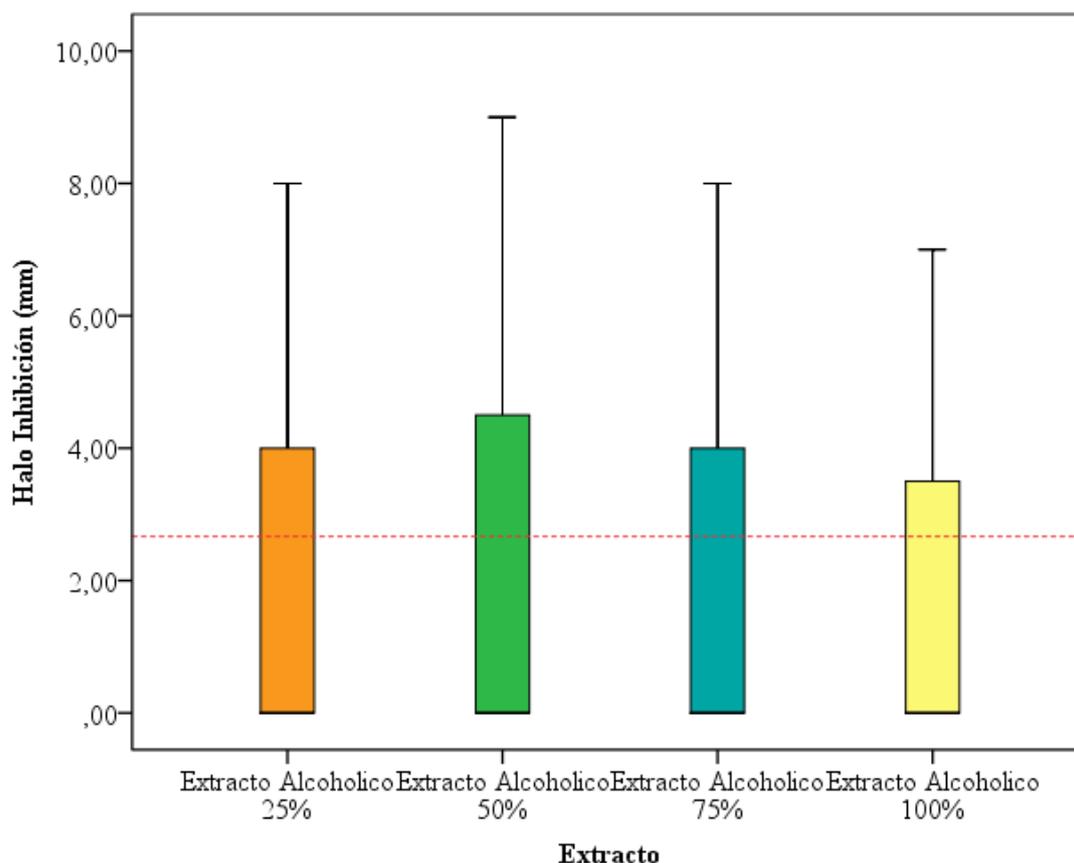
7.9.2.2. Resultados de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC de *C. albicans*.

Tabla Nro. 16. Descripción de halos inhibitorios de extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC de *C. albicans*.

Extracto Alcohólico	Desviación			Mínimo	Máximo	Coeficiente de Variación
	Media	Mediana	Estándar			
25%	2,6667	0	4,6188	0	8	173%
50%	3	0	5,19615	0	9	173%
75%	2,6667	0	4,6188	0	8	173%
100%	2,3333	0	4,04145	0	7	173%

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Gráfico Nro. 11. Distribución por concentraciones extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth.



Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: El valor inhibitorio del extracto alcohólico de la raíz de la *Piper nubigenum* Kunth con respecto a la cepa ATCC de *C. albicans* tienen un coeficiente de variación muy alto que superó el 100 %, al mismo tiempo los valores de inhibición se encuentran entre 2 mm y 4 mm, lo que determina que no se observó inhibición en el extracto frente al hongo, por lo tanto, se determinó una sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.⁽²⁰⁾

7.9.2.3. Resultado de los halos inhibitorios de extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a cepas ATCC de *C. albicans*.

El extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth con respecto a la cepa ATCC de *C. albicans* no obtuvo valores inhibitorios.

7.9.2.4. Nivel de sensibilidad de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum* Kunth frente a *C. albicans*.

Tabla Nro. 17. Nivel de sensibilidad de los extractos frente a la *C. albicans*

Extracto		Nivel de Sensibilidad		
		Nula	Sensible	Total
Extracto Alcohólico 25%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Alcohólico 50%	f	2	1	3
	%	5,70%	100,00%	8,30%
Extracto Alcohólico 75%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Alcohólico 100%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Etéreo 25%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Etéreo 50%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Etéreo 75%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Etéreo 100%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 25%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 50%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 75%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Extracto Acuoso 100%	f	3	0	3
	%	8,60%	0,00%	8,30%
Total	f	35	1	36
	%	100,00%	100,00%	100,00%

Fuente: Registro de bitácora de observación de los laboratorios de la ESPOCH procesado en SPSS versión 25
Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: El valor inhibitorio en comparación con la escala de Duraffourd revela que la cepa ATCC de *C. albicans* no fue sensible al extracto alcohólico en su mayoría de muestras y solo el 2,77% del total de cajas fue sensible. En cuanto al extracto etéreo se observó que la sensibilidad fue nula al igual que en el extracto acuoso.⁽²⁰⁾

7.10. Halos inhibitorios de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a *E. faecalis*, en comparación con *Piper augustifolium*.

Tabla Nro. 18. Halos inhibitorios de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a *E. faecalis*, en comparación con *Piper augustifolium*

	100%	75%	50%	25%	<i>Piper augustifolium</i> ⁽¹²⁾
Extracto Etéreo	10 mm	9.33 mm	8.3 mm	8.6 mm	
Extracto Alcohólico	6.3 mm	7.3 mm	3 mm	9 mm	9.03 mm
Extracto Acuoso	-	-	-	-	
Control positivo	Amoxicilina + Ácido clavulánico				25 mm
Control negativo	Agua destilada esterilizada				-
No existió halo de inhibición (-)					

Fuente: ⁽¹²⁾

Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: En la Tabla Nro. 18 se observa una comparación de los halos inhibitorios de *Piper nubigenum Kunth* y *Piper augustifolium* frente a *E. faecalis*. Los halos inhibitorios de *Piper nubigenum Kunth* son de menor diámetro que los obtenidos por *Piper augustifolium*, esto puede ser debido a que los resultados de los halos inhibitorios están correlacionados con los metabolitos presentes en el tamizaje fitoquímico, que obtuvo diferencias en los metabolitos debidas: al órgano de la planta utilizada, la especie, la técnica de extracción de metabolitos, el tipo de cepa utilizada y el método de evaluación utilizado.^(12,56)

7.11. Halos inhibitorios de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a *C. albicans*, en comparación con *Piper carpunya*.

Tabla Nro. 19. Halos inhibitorios de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a *C. albicans*, en comparación con *Piper carpunya*.

	100%	75%	50%	25%	<i>Piper carpunya</i> ⁽¹¹⁾
Extracto Etéreo	7.6 mm	4.6 mm	7.3 mm	2.3 mm	
Extracto Alcohólico	2.3 mm	2.6 mm	3 mm	2.6 mm	10 – 14 mm
Extracto Acuoso	4.6 mm	3.5 mm	4.6 mm	4.6 mm	
Control positivo	Ketoconazol			22 mm	
Control negativo	Agua destilada esterilizada			-	
No existió halo de inhibición (-)					

Fuente: Tomado por: ⁽¹¹⁾

Elaborado por: Estefania Mosquera

Análisis: La Tabla Nro. 19 refleja una comparación de *Piper nubigenum Kunth* y *Piper carpunya* frente a *C. albicans*. Los halos inhibitorios de *Piper nubigenum Kunth* son de menor tamaño que los obtenidos por *Piper carpunya*, esto puede ser debido a que los resultados de los halos inhibitorios están correlacionados con los metabolitos presentes en el tamizaje fitoquímico que obtuvo diferencias en los metabolitos debidas a varios factores como: el órgano de la planta utilizada, la especie, la técnica de extracción de metabolitos, el tipo de cepa utilizada y el método de evaluación utilizado.^(11,56)

7.12. Contrastación de la hipótesis.

Para determinar diferencias de significancia estadística entre las variables cuantitativas se establecerá mediante las pruebas de normalidad la distribución de datos.

Tabla Nro. 20. Prueba de normalidad

	Kolmogorov-Smirnova		
	Estadístico	gl	Sig.
Halo Inhibición (mm)	0,305	72	0,00
Halo Inhibición del Control Positivo	0,34	72	0,00

a Corrección de significación de Lilliefors

La prueba de normalidad mostró un valor en las variables cuantitativas menores a 0,05 ($p=0,00$; $p=0,00$) por tanto la distribución de datos no es normal, para la contrastación de hipótesis se considerará las pruebas no paramétricas.

Hipótesis 1.

H_0 : No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo de raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a la cepa ATCC de *E. faecalis* y el control positivo.

IC=95%

Error=5%

Decisión: Si $p \leq 0,05$ se rechaza H_0

Prueba

Tabla Nro. 21. Estadístico de prueba H1

Halo Inhibición del Control Positivo - Halo Inhibición (mm)	
Z	-4,310b
Sig. asintótica (bilateral)	0,00

a Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b Se basa en rangos negativos.

Conclusión: El valor de significancia fue menor a 0,05 ($p=0,00$) por lo tanto, se rechaza H_0 y se afirma que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo frente a la cepa ATCC de *E. faecalis* y el control positivo.

Hipótesis 2.

H_0 : No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo y alcohólico del extracto frente a la cepa ATCC de *E. faecalis*.

IC=95%

Error=5%

Decisión: Si $p \leq 0,05$ se rechaza H_0

Prueba

Tabla Nro. 22. Estadístico de prueba H2

Halo Inhibición (mm)	
U de Mann-Whitney	66,5
W de Wilcoxon	144,5
Z	-0,329
Sig. asintótica (bilateral)	0,742
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,755b

a Variable de agrupación: Concentración

b No corregido para empates.

Conclusión: El valor de significancia fue mayor a 0,05 ($p=0,742$) por lo tanto, se acepta H_0 y se afirma que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo y alcohólico frente a la cepa ATCC de *E. faecalis*.

Hipótesis 3.

H_0 : No existen diferencias estadísticamente significativas, entre los valores inhibitorios del extracto etéreo de la raíz de *Piper nubile* Kunth frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo.

IC=95%

Error=5%

Decisión: Si $p \leq 0,05$ se rechaza H_0

Prueba

Tabla Nro. 23. Estadístico de prueba H3

Halo Inhibición del Control Positivo - Halo Inhibición (mm)

Z	-3,111
Sig. asintótica (bilateral)	0,002

a Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b Se basa en rangos negativos.

Conclusión: El valor de significancia fue menor a 0,05 ($p=0,002$) por lo tanto, se rechaza H_0 y se afirma que existen diferencias estadísticamente significativas, entre los valores inhibitorios del extracto etéreo frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo.

Hipótesis 4.

H_0 : No existen diferencias estadísticamente significativas, entre los valores inhibitorios del extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo.

IC=95%

Error=5%

Decisión: Si $p \leq 0,05$ se rechaza H_0

Prueba

Tabla Nro. 24. Estadístico de prueba H4

Halo Inhibición del Control Positivo - Halo Inhibición (mm)

Z	-3,165
Sig. asintótica (bilateral)	0,002

a Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b Se basa en rangos negativos.

Conclusión: El valor de significancia fue menor a 0,05 ($p=0,002$) por lo tanto, se rechaza H_0 y se afirma que existen diferencias estadísticamente significativas, entre los valores inhibitorios del extracto alcohólico frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo.

Hipótesis 5.

H₀: No existen diferencias estadísticamente significativas, entre los valores inhibitorios del extracto acuoso de la raíz de *Piper nubile* Kunth frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo.

IC=95%

Error=5%

Decisión: Si $p \leq 0,05$ se rechaza H₀

Prueba

Tabla Nro. 25. Estadístico de prueba H5

Halo Inhibición del Control Positivo - Halo Inhibición (mm)	
Z	-3,272
Sig. asintótica (bilateral)	0,001

a Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b Se basa en rangos negativos.

Conclusión: El valor de significancia fue menor a 0,05 ($p=0,001$) por lo tanto, se rechaza H₀ y se afirma que existen diferencias estadísticamente significativas, entre los valores inhibitorios del extracto acuoso frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo.

8. DISCUSIÓN

El herbario de la ESPOCH emitió un certificado que dio a conocer, que la planta usada en esta investigación pertenece a la familia *Piper* y su nombre científico es *Piper nubigenum Kunth*, esta planta es usada en la Amazonía, como medicina ancestral. Cuéllar et al. ⁽⁴⁷⁾ menciona en el Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales que, para iniciar el estudio de la especie vegetal, se determina el contenido de humedad y cenizas. El contenido de humedad de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* fue de 3,64%, al ser un porcentaje bajo en relación con el rango establecido, se determinó que es una planta estable, por lo tanto, no posee exceso de humedad evitando así el crecimiento excesivo de hongos e insectos y el deterioro de la materia vegetal manteniendo sus metabolitos por más tiempo. El resultado de cenizas obtenido en la raíz de *Piper nubigenum Kunth* fue de 3,10%, este porcentaje se encuentra dentro de los valores registrados en la Real Farmacopea Española, por lo tanto, quizás no contiene sustancias inorgánicas como sales, arena y metales pesados, esto puede favorecer la pureza de la droga a la hora de preparar los extractos. ^(50,51)

En el tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, se obtuvo los siguientes metabolitos: aceites y grasas (proporciona olor y sabor propio a las plantas); alcaloides (metabolitos que actúan sobre todo en el sistema nervioso y presentan actividad antiespasmódica, antitusiva, diurética, sedante, antiinflamatoria y tiene aplicaciones dermatológicas). ^(57,58) Por el contrario, no posee cumarinas, triterpenos y saponinas. Al no existir estudios con el extracto etéreo de la familia *Piper*, se comparó con el extracto hexano de *Piper carpunya*, debido a que el solvente hexano y el éter tiene una polaridad similar. En este extracto hexano se observó la presencia de componentes similares como: alcaloides, además se encontraron cumarinas (metabolito que no se encuentran presente en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*). En comparación con el extracto etéreo de *Piper augustifolium* se observa la presencia de aceites, grasas y alcaloides, además, se observa triterpenos y esteroides (metabolitos que no se encuentran presentes en la raíz de *Piper nubigenum Kunth*). ^(54,55)

En el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* están presentes metabolitos como: catequinas (forman parte de los flavonoides y poseen efecto astringente, antiinflamatorio y sobre todo antioxidante), azúcares reductores (cambian el color y sabor de la comida), alcaloides, fenoles (poseen propiedades antioxidantes, antifúngicas o bacterianas), quinonas, flavonoides y antocianidinas (estos tres metabolitos

derivan de los fenoles).⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ En comparación con *Piper carpunya* y *Piper augustifolium*, se obtuvo coincidencias en compuestos como: alcaloides, antocianidina, flavonoides y fenoles. Por otro lado, se encuentran discrepancias en cumarinas (actúan como agentes antimicrobianos) y saponinas (poseen propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón).^(54,55,58)

El tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* reflejó resultados positivos en: alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, polisacáridos y taninos (los taninos forman parte de los compuestos fenólicos y posee efecto analgésico, antibacteriano, antihepatotóxico, antioxidante, antitumoral, inmunoestimulante, etc.).⁽¹⁸⁾ Además, presentó resultados negativos en: saponinas (metabolito reportado con actividad antimicrobiana) y principios amargos. En comparación con *Piper carpunya* y *Piper augustifolium*, se encuentran coincidencias en la presencia de alcaloides y discrepancias en saponinas, lo cual puede afectar al efecto antimicrobiano.^(13,54,55)

Los halos inhibitorios obtenidos en el extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 100%, 75%, 50% y 25% frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, muestran valores de 10 mm, 9.33 mm, 8.33 mm y 8.66 mm respectivamente, estos resultados determinan sensibilidad según la escala de Duraffourd y se consideran valores significativos, además de ser los valores más altos. Según los resultados obtenidos, el extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, refleja en sus cuatro concentraciones, efecto antimicrobiano bajo, que según la escala de Duraffourd se determina como sensible, presentando mayor actividad a una concentración del 100%. No se puede comparar con especies de la misma familia (*Piper*), porque en este tipo de extracto no hay estudios científicos relacionados con la actividad antimicrobiana.⁽²⁰⁾

El halo inhibitorio del extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 25% frente a cepas ATCC de *E. faecalis* fue 9 mm, valor similar al obtenido por *Piper augustifolium*, que fue de 9.03 mm, lo cual confirma que al igual que las plantas de la familia *Piper*, la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 25% posee un efecto antimicrobiano bajo o considerado como sensible según la escala de Duraffourd. Al contrario, que los halos inhibitorios obtenidos en el extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 50%, 75% y 100%, que reflejan valores menores a 8 mm, por lo tanto, poseen sensibilidad nula según la escala de Duraffourd. En cuanto al extracto acuoso, no se obtuvo halos de inhibición en ninguna de las concentraciones, además este tipo de extracto no pudo ser comparado con investigaciones

relacionadas con la familia *Piper*, debido a que no existen estudios científicos relacionado con la actividad antimicrobiana.^(12,20)

Los halos inhibitorios del extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 100%, 75%, 50% y 25% frente a cepas ATCC de *C. albicans*, obtuvieron resultados de 7.6 mm, 4.6 mm, 7.3 mm, 2.3 mm, es decir, según los resultados obtenidos existió actividad antimicrobiana muy baja, al poseer valores menores a 8 mm, se considera según la escala de Duraffourd como nula. Según estudios recientes, las saponinas tienen efecto antibacterial y además efecto antifúngico contra *C. albicans*, al no poseer saponinas en el extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, esto puede afectar al efecto antimicrobiano.^(62,63)

Los halos inhibitorios del extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 100%, 75%, 50% y 25% frente a cepas ATCC de *C. albicans*, obtuvieron resultados de 2.3 mm, 2.6 mm, 3 mm, 2.6 mm respectivamente, reflejando sensibilidad nula según la escala de Duraffourd. En comparación con *Piper carpunya*, que obtuvo halos inhibitorios de 10 -14 mm, se observa una gran diferencia, que puede ser debida a la correlación que existe entre los metabolitos secundarios (no existentes en el tamizaje fitoquímico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*) y la deficiencia del efecto antimicrobiano frente a cepas ATCC de *C. albicans*.^(11,20)

En cuanto al extracto acuoso de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* al 100%, 75%, 50% y 25% frente a cepas ATCC de *C. albicans*, los halos inhibitorios obtenidos fueron de 4.6 mm, 3.5 mm, 4.6 mm y 4.6 mm respectivamente, estos valores son menores a 8 mm, por lo tanto, determinan sensibilidad nula según la escala de Duraffourd, es decir, no tiene actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *C. albicans*. Este tipo de extracto no pudo ser comparado con investigaciones acerca de la familia *Piper*, debido a que no existen estudios científicos relacionados con la actividad antimicrobiana.

Los resultados negativos obtenidos en el análisis del tamizaje fitoquímico, de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, en comparación con *Piper carpunya* y *Piper augustifolium*, pueden ser debidos a varios factores como: el órgano de la planta utilizada, la especie, la técnica de extracción de metabolitos, el tipo de cepa utilizada y el método de evaluación. Estos factores pueden variar los metabolitos presentes en la planta, afectando al efecto antimicrobiano reflejado en los halos de inhibición de los extractos frente a las cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*.⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾

La significancia estadística obtenida en el extracto etéreo y el extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, indica que estos dos extractos en sus diferentes concentraciones obtuvieron valores iguales de sensibilidad, con halos de inhibición mayores a 8 mm por lo tanto se considera que poseen un efecto antimicrobiano bajo y que la cepa de *E. faecalis* según la escala de Duraffourd es sensible al extracto etéreo y alcohólico, no puede compararse con ningún otro estudio, debido a que no se han realizado investigaciones del extracto etéreo, pero se debe tener en cuenta que si existió un efecto antimicrobiano bajo.

Los resultados obtenidos en el extracto etéreo de la *Piper nubigenum Kunth* al 100%, 75%, 50% y 25% frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, muestran valores de 10 mm, 9.33 mm, 8.33 mm y 8.66 mm respectivamente que en comparación con el control positivo realizado con amoxicilina + ácido clavulánico, con un halo inhibitorio de 25 mm, se demostró que existe una gran diferencia en la inhibición que produce el extracto etéreo y la inhibición producida por el control positivo. Según un estudio realizado por Alvarado et al. ⁽⁶⁴⁾ los alcaloides y sobre todo las saponinas y taninos, ejercen efecto antibacterial en bacterias Gram (+) resistentes a antibióticos, como *E. faecalis*. El extracto etéreo de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* posee alcaloides, pero no refleja saponinas ni taninos por lo tanto esto puede afectar al halo inhibitorio del extracto etéreo.

Comparando los resultados obtenidos, en el efecto antimicrobiano de la *Piper nubigenum Kunth*, frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*, productoras de enfermedades bucales, se confirma que, en la evaluación tanto del extracto etéreo en todas sus concentraciones, como del alcohólico al 25%, frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, se obtuvieron valores similares, que oscilan entre 8,3 mm y 10 mm, que según la escala de Duraffourd refleja que la cepa de *E. faecalis* se muestra sensible a estos extractos. Por otra parte los extractos en general frente a cepas ATCC de *C. albicans* obtuvieron valores que oscilan entre 7,33 mm y 2,33 mm, considerados halos de inhibición bajos con actividad antimicrobiana no significativa, que comparados con la escala Duraffourd al tener halos de inhibición menores a 8 mm, son considerados valores con sensibilidad nula.⁽²⁰⁾

9. CONCLUSIONES.

En el análisis fitoquímico de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, se identificó metabolitos secundarios presentes en los tres extractos, importantes en la actividad antimicrobiana. En el extracto etéreo se evidenció alcaloides, por otro lado, en el extracto alcohólico se evidenció: alcaloides, flavonoides, quinonas, fenoles y taninos, por último, en el extracto acuoso se identificó: alcaloides, taninos y flavonoides. Además, se evidenciaron otros metabolitos en los extractos, que no son importantes en el efecto antimicrobiano (aceites y grasas, compuestos catequinólicos, azúcares reductores, antocianidina y polisacáridos) los cuales fueron constatados a través de reacciones de opalescencia, coloración y precipitación.

Se determinó la actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, a partir de tres extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* en diferentes concentraciones, demostrando en el extracto etéreo valores de 10 mm, 9.33 mm, 8.3 mm y 8.6 mm, que son considerados valores significativos y determinan sensibilidad, según la escala de Duraffourd. En el extracto alcohólico en varias concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) se obtuvo halos inhibitorios de 6.33 mm, 7.3 mm, 3 mm y 9 mm respectivamente, de estos valores el más significativo fue el obtenido en el extracto alcohólico al 25% que según la escala de Duraffourd determinó sensibilidad. Por último, en el extracto acuoso a varias concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) no se obtuvieron halos inhibitorios, por lo tanto, no se obtuvo efecto antimicrobiano. Por consiguiente, los valores más significativos de los tres extractos fueron los obtenidos en el extracto etéreo en las cuatro concentraciones y en el extracto alcohólico al 25%.

Se determinó la actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *C. albicans*, a partir de tres extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth*, en cuatro concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) demostrando que en el extracto etéreo se obtuvieron valores de 7.6 mm, 4.6 mm, 7.33 mm y 2.3 mm respectivamente, que son considerados valores no significativos, por lo tanto, según la escala de Duraffourd tienen sensibilidad nula. En el extracto alcohólico, se obtuvieron halos inhibitorios de 2.3 mm, 2.6 mm, 3 mm y 2.6 mm respectivamente, considerados valores no significativos con sensibilidad nula según la escala de Duraffourd. Por último, en el extracto acuoso, se obtuvieron halos inhibitorios de 4.6 mm, 3.5 mm, 4.6 mm y 4.6 mm valores que demostraron sensibilidad nula según la escala de Duraffourd. Por consiguiente, los valores obtenidos por los halos inhibitorios de los extractos en general

frente a cepas ATCC de *C. albicans* presentaron sensibilidad nula, así pues, no se obtuvo efecto antimicrobiano.

La evaluación del efecto antimicrobiano de *Piper nubile* Kunth, frente a cepas ATCC de *E. faecalis* y *C. albicans*, productoras de enfermedades bucales, demostró que la cepa ATCC de *E. faecalis* se mostró sensible al extracto etéreo en sus cuatro concentraciones y al extracto alcohólico al 25%. Se encontró además que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo y el control positivo frente a la cepa ATCC de *E. faecalis* ($p=0,00$) y que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo y del extracto alcohólico de la raíz de *Piper nubile* Kunth frente a la cepa ATCC de *E. faecalis* ($p=0,742$). Por último, se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores inhibitorios del extracto etéreo ($p=0,002$), alcohólico ($p=0,002$), y acuoso ($p=0,001$), de la raíz de *Piper nubile* Kunth frente a la cepa ATCC de *C. albicans* y el control positivo

Se determinó un nivel bajo de efecto antimicrobiano en el extracto etéreo en sus cuatro concentraciones, y en el extracto alcohólico al 25% frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, que puede deberse a que en estos extractos existe presencia de alcaloides, pero no de saponinas, estos metabolitos junto con los taninos ejercen efecto antimicrobiano en bacterias resistentes a antibióticos. Por el contrario, no existió efecto antimicrobiano significativo en los tres extractos de la raíz de *Piper nubile* Kunth frente a cepas ATCC de *C. albicans*, esto puede ser debido a la ausencia de metabolitos importantes en el efecto antimicrobiano como: saponinas, reportadas como antimicóticas. La patogenicidad del hongo *C. albicans* dependerá de varios factores, entre ellos su capacidad de adhesión, que favorece la formación de una biopelícula, ayudando al hongo a adherirse firmemente a las superficies, lo que facilita la invasión y diseminación de *C. albicans*, además posee un mecanismo de resistencia a los antifúngicos creando una barrera permeable, que bombea expulsando al fármaco fuera del microorganismo, por lo tanto, es mucho más difícil su eliminación.⁽⁶²⁻⁶⁵⁾

10. RECOMENDACIONES

Para estudios futuros, se debe tener en cuenta, el estudio de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* como: antiespasmódico, antitusivo, diurético, sedante o antiinflamatorio, basado en la gran cantidad de alcaloides que posee la raíz de *Piper nubigenum Kunth*.

Se sugiere realizar un estudio con las hojas de *Piper nubigenum Kunth*, debido a que las comparaciones que se han realizado durante toda la investigación, con estudios relacionados a la familia *Piper*, han sido realizados con las hojas, puede ser que en este órgano se encuentre mayor cantidad de metabolitos secundarios relacionados con la actividad antimicrobiana.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ríos Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2017;35(2):241.
2. Serrano Coll HA, Sánchez Jiménez M, Cardona Castro N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev CES Odontol*. 2015;28(2):113.
3. Pardi C. G, Mata Essayag S, Colella M, Roselló A, Pineda V. Micosis de la cavidad bucal. Parte I. *Acta odontológica Venez*. 2013;51(2):2,3.
4. Rodríguez Niklitschek C, Oporto V GH. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. *Rev Odontológica Mex*. 2015;19(3):183, 181,.
5. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2010;48(2):148-149,150,156,157, 149.
6. Farman M, Yasir M, Al-Hindi RR, Farraj SA, Jiman-Fatani AA, Alawi M, et al. Genomic analysis of multidrug-resistant clinical *Enterococcus faecalis* isolates for antimicrobial resistance genes and virulence factors from the western region of Saudi Arabia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):2.
7. Carrero Martínez C, González Gilbert MC, Martínez Lapiolo MA, Serna Varona F, Díez Ortega H, Rodríguez Ciodaro A. Baja frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia*. 2015;26(2):263 M.
8. Medell M, Hart M, Batista ML. Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. *Biomédica*. 2014;34(1).
9. De la Calle- Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Rev CES Med*. 2012;26(1):44,45.

10. Somacarrera Pérez M, López Sánchez A, Martín Carreras-Presas C, Díaz Rodríguez M. Lesiones traumáticas en la mucosa oral de los adultos mayores. *Av Odontoestomatol.* 2015;31(3):3.
11. Azuero A, Jaramillo-Jaramillo C, San Martín D, D'Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Rev Cienc UNEMI.* 2016;9(20):14.
12. Bornaz Acosta JG, Inofuentes Espinoza Z, Tito Aquino DE, Bornaz Arenas VL. Efecto antimicrobiano In vitro del extracto etanólico al 40% de *Piper augustifolium* (matico) sobre *Enterococcus faecalis*. *Rev Médica Basadrina.* 2019;13(02):13.
13. Rodríguez Pava CN, Zarate Sanabria AG, Sánchez Leal CL. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova* [Internet]. 2017;15(27):126. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>
14. Jiménez Silva ÁA. Medicina tradicional. In: *Boletín CONAMED-OPS.* 2017. p. 31.
15. Rojas Ochoa F, Silva Ayçaguer LC, Sansó Soberats F, Alonso Galbán P. El debate sobre la Medicina Natural y Tradicional y sus implicaciones para la salud pública. *Rev Cuba Salud Pública* [Internet]. 2013;39(1):108–9. Available from: <http://scielo.sld.cu>
16. Herrera López JL, Avila Larreal AG, López Chamorro PM, Guerrero Vargas LJ, Eugenio Proaño FE. Percepción de la medicina ancestral y convencional en comunidades indígenas de la ciudad de Ambato. *Enfermería Investig Investig Vinculación, Docencia y Gestión.* 2018;3(4):181–3.
17. Pascual Casamayor D, Pérez Campos YE, Morales Guerrero I, Castellanos Coloma I, González Heredia E. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *MEDISAN.* 2014;18(10):1468–9.
18. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotechnol Veg.* 2011;11(4):196–7.
19. Hernández Sanchez M, Aguilar Orozco S, Barajas Cortés L, Guerrero Castellón M, Robles Romero M, Sanchez Huerta H. Medicina tradicional, tratamiento alternativo en Gingivitis. *Rev Odontol Latinoam.* 2011;3(1):2.

20. Morillo Castillo JA, Balseca Ibarra MC. Eficacia inhibitoria del aceite esencial de *Cymbopogon Citratus* sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis*: Estudio in vitro. *Odontología*. 2018;20(2):7,1,.
21. Consorcio Nuñez y Jimenez. Plan de desarrollo ambiental de la provincia de Pastaza. 2014. 8,516.
22. Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo. Contenidos del Plan -SNI. 2014. 22,23, 32.
23. González Cervantes RM, Ruiseco Sánchez GB. La Microbiota del humano. *CIENCIA*. 2017;68(2):64.
24. Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, del Campo Moreno R, Ferrer Martínez M. Microbiota. *eimc*. 2016. 8 p.
25. Cruz Quintana SM, Díaz Sjostrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Rev Cubana Estomatol*. 2017;54(1):87–94.
26. Escobar Arregocés FM, Latorre Uriza C, Velosa Porras J, Ferro Camargo MB, Ruiz Morales AJ, Quiñones Lara SM, et al. Microorganismos en lengua y saliva de pacientes edéntulos y con periodontitis crónica y su posible conexión con la Proteína C reactiva. *Univ Odontol*. 2017;36(77):9.
27. Pardi G, Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venez*. 2002;40(1):1–2.
28. Biasoli M. Candidiasis. *Cent Ref Micol*. 2010;2(1):3,27,28, 13,14.
29. Otero RE, Peñamaría MM, Rodríguez PM, Martín BB, Carrión BA. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2015;31(3):137, 139–42. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852015000300004
30. Pava Angel T. Actividad Antimicrobiana de extractos de *Allium sativum* y *zinfiber officinale* sobre microorganismos de importancia en patologías infecciosas de cavidad oral [Internet]. *Enfásis Alimentación*. 2016. Available from: <http://es.calameo.com/read/001393942186baecd251e>

31. Vidana R, Sullivan A, Billstrom H, Ahlquist M, Lund B. Enterococcus faecalis infection in root canals. *Lett Appl Microbiol.* 2010;52:113.
32. Ortega González LM. Enterococos : actualización. *Rev Habanera Ciencias Médicas.* 2010;9(4):508.
33. Leonard BJ, Biggers A. What's to know about Enterococcus faecalis? *medicalnewstoday.* 2018. p. 4,6.
34. Ardila Medina CM, Maggiolo Villalobos S, Dreyer Arroyo E, Armijo Pérez J, Silva Steffen N. Enterococcus faecalis en dientes con periodontitis apical asintomática. *Arch Médico Camagüey.* 2014;18(4):417.
35. Bush LM. Bacteriemia. *Manual Msd Versión para profesionales.* 2018. p. 1,2.
36. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. *Biología de los microorganismos.* 2015. 891 p.
37. Gorrín Alemán I de la, Rodríguez Pérez R, Rodríguez Rodríguez J, Quiñones Perez D. Aislamientos de Enterococcus en muestras clínicas. *Acta Médica del Cent.* 2012;6(3):3.
38. Pupo Marrugo S, Díaz Caballero A, Castellanos Berrio P, Simancas Escorcía V. Eliminación de Enterococcus faecalis por medio del uso de hipoclorito de sodio , clorhexidina y MTAD en conductos radiculares. *Av Odontoestomatol.* 2014;30(5):266–7.
39. Rojas C F. Cepas: Material de referencia, manejo y aplicaciones en el área de microbiología [Internet]. departamento salud ambiental. 2016. p. 21. Available from: <https://www.metrologia.cl/medios/Cepas>
40. departamento de meta. Manejo de cepas microbiologicas. In: Departamento del Meta [Internet]. 2015. p. 2. Available from: <http://www.meta.gov.co/web/sites/default/files/adjuntos/I-SA-08 MANEJO DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS V1.pdf>
41. *Microbiología General: Siembra , aislamiento e identificación de microorganismos.* 2020. 4,5,6,7.
42. Barrero Cuevas L. *Microbiología Clínica [Internet].* Síntesis, editor. Vol. 2,

- Universidad Europea de Madrid. 2016. 40,41,42,46,47. Available from: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
43. Cañedo V, Ames T. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima; 2004. 18,21,22, 23.
 44. BD Bioxon. Manual BD Bioxon. México; 28,29.
 45. BD Diagnostics. BBL Brain Heart Infusion BBL Brain Heart Infusion with 6.5% Sodium Chloride. Rev BD. 2014. 1 p.
 46. Sanz Cervera S. Prácticas de Microbiología. España; 2011. 20,21,22.
 47. Cuéllar Cuéllar A, Miranda Martínez M. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales. 2014. 35,36.
 48. CDC. Manual para las pruebas de identificación y susceptibilidad antimicrobiana. Med y Lab. 2009;15(557,558).
 49. Remache Rocha YE. Comparación de la actividad antimicrobiana de dos muestras de apitoxina en función de la concentración de melitina frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Candida albicans*. [Internet]. Universidad central del Ecuador.; 2019. Available from: http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chkhask=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component%0Ahttp://www.albayan.ae%0Ahttps://scholar.google.co.id/scholar?hl=en&q=APLIKASI+PENGENA
 50. Cabrera Suárez HR, Morón Rodríguez FJ, Victoria Amador M del C, García Hernández AI, Acosta de la Luz CL. Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. Rev Cuba Plantas Med [Internet]. 2012;17(3):274, 275. Available from: <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>
 51. Sanitarios. AE de M y P. Real Farmacopea Española. 5º EDICIÓN. España; 2015. 28 p.
 52. Universidad Nacional Autónoma de México. Manual de prácticas. Tabla de disolventes más usados en orden de polaridad. In: Manual de Practicas [Internet]. México; 2019. p. 4,5. Available from: <http://organical.org/1311/1311tablas.pdf>

53. Nina C, Romero G. Extracción e identificación de alcaloides y otros compuestos químicos de la planta *Hyperziasaururus* (cola de quirquincho) sucre 2009 [Internet]. Sucre, Bolívia; 2014. Available from: https://www.usfx.bo/nueva/Dicyt/Handbooks/Ciencias de la Salud_2/Ciencias de la Salud_Handbook_Vol II/PAPERS_29/articulo_3.pdf
54. Cárdenas C, Pozo W, Almirall E, Roque A. Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos*(canela amazónica) y *Piper carpunya* (guaviduca, pinku), potenciales fungocontroladores. *Qualitas*. 2016;11(1):70,71,72.
55. Loja J. Elaboración de un gel antimicótico a base de manzanilla(*Matricaria chamomilla*) y Matico(*Piper angustifolium*). [Internet]. Universidad Técnica de Machala; 2014. Available from: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1331/7/CD00253-TESIS.pdf>
56. Llivicura Alvarado MA. Comparación In Vitro de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*); Frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Universidad Politécnica Salesiana; 2018.
57. Martínez Lombardo MC, Cano Ortiz A. Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén. *Boletín del Inst Estud Giennenses* [Internet]. 2009;126. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3177058.pdf>
58. Ávalos A, Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. *Hidrobiológica*. 2009;8(2):125.
59. Peñarrieta JM, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Rev Boliv Quim*. 2014;31(2):75.
60. Montoya Rivas J. Elaboración De Una Forma Farmacéutica Para Tratar La Miliaria a Partir Del Extracto De Las Hojas Hiel Del Sol Planta Nativa Del Centro Cultural Uni-Shu De La Comuna Chiguilpe De Santo Domingo De Los Tsachilas. [Internet]. Universidad regional autonoma de los Andes; 2016. Available from: <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/4783/1/PIUABQF009-2016.pdf>
61. Creus EG. Compuestos fenólicos. *OFFARM*. 2004;23(6):81.
62. Chilán K, Chalén S. Estudio comparativo de la actividad antimicótica de los extractos

- de *Chenopodium quinoa* Y *Moringa oleífera* en cepas de *Candida albicans*. [Internet]. 2019. Available from: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39919/1/BCIEQ-T-0361-Chilán-Caicedo-Kelly-Carolina%3B-Chalén-Figueroa-Shirley-Estefanía.pdf?fbclid=IwAR0K0KClzfAHW_yOn9Ecg06TpKm_cwhDi7S6OT-eus_sl0r2LuXu2hrUzNs
63. Zapana F, De Bruijn J, Aqueveque P. Aplicación de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) como agente antifúngico en frutas y hortalizas. Univ Concepción [Internet]. 2019;8. Available from: <http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/vii-congreso-quinua/ejes-tematicos/sistemas-productivos-tecnología-e-innovación/saponina-de-quinua-como-agente-antifúngico-en-frutas-y-hortalizas-chile.pdf?sfvrsn=2>
64. Alvarado Saavedra S, Herrera-Plasencia P, Enoki*Miñano E, Ruiz-Barrueto M, Millones Gómez PA. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Prosopis pallida* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Rev Cubana Med Trop.* 2018;70(2):8.
65. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomédica.* 2016;27(3):129,130.

12.ANEXOS

ANEXO1. Halos inhibitorios de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *E. faecalis*.

	100%	75%	50%	25%
Extracto Etéreo	11 mm	9 mm	8 mm	8 mm
	11 mm	10 mm	9 mm	9 mm
	8 mm	9 mm	8 mm	8 mm
Extracto Alcohólico	/	/	/	9 mm
	9 mm	11 mm	/	9 mm
	10 mm	11 mm	9 mm	9 mm
Extracto Acuoso	/	/	/	/
	/	/	/	/
	/	/	/	/
Control positivo	Amoxicilina + Ácido clavulánico		25 mm	
Control negativo	Agua destilada esterilizada		/	

ANEXO 2. Halos inhibitorios de los extractos de la raíz de *Piper nubigenum Kunth* frente a cepas ATCC de *C. albicans*.

	100%	75%	50%	25%
Extracto Etéreo	7 mm	/	7 mm	/
	8 mm	7 mm	7 mm	/
	8 mm	7 mm	8 mm	7 mm
Extracto Alcohólico	/	/	/	/
	7 mm	8 mm	9 mm	8 mm
	/	/	/	/
Extracto Acuoso	/	/	/	/
	7 mm	/	7 mm	7 mm
	7 mm	7 mm	7 mm	7 mm
Control positivo	Ketoconazol		22 mm	
Control negativo	Agua destilada esterilizada		/	

ANEXO 3. Certificado de donación de cepas ATCC por parte de la ESPOCH.



ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

A petición verbal de la interesada Srta. Estefanía Katherine Mosquera Santos con cédula de identidad número 1719101196

CERTIFICADO

Yo, Yolanda Verónica Buenaño Suárez con cédula de identidad 0604490490, Técnico de Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo certifico que las cepas de *Cándida albicans* ATCC10231 Y *Enterococcus faecalis* ATCC29219 pertenecen a dicho laboratorio y fueron utilizadas en la realización del trabajo de investigación de la Srta. Estefanía Katherine Mosquera Santos.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad pudiendo la interesada hacer uso de este documento como estime conveniente.

Riobamba, 23 de Noviembre de 2020

Atentamente

BQF. Yolanda Buenaño
TÉCNICO DE LABORATORIO ESPOCH

ANEXO 4. Certificación de la planta otorgada por el herbario de la ESPOCH.



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.021.CHEP.2020

30 de marzo del 2021

A QUIEN CORRESPONDA

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que el señorita Mosquera Santos Estefania Katherine con CI: 171910119-6, tesista de Odontología de la UNACH, con permiso de investigación: N0 MAE-ARSFC-2020-0881, se identificó la especie: *Piper nubigenum* Kunth.. Esta especie es nativa, que se revizó en el herbario y se archivarà en un año para los fines pertinentes. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y el interesado puedo usar el presente certificado como crea conveniente.

Atte.



Ing. Jorge Caranqui Msc.
RESPONSABLE
HERBARIO ESPOCH

HERBARIO POLITECNICO
FACULTAD DE
RECURSOS
NATURALES

ANEXO 5. Pronunciamiento favorable N° MAAE-ARSFC-2020-0881.

MINISTERIO DEL AMBIENTE Y AGUA

PRONUNCIAMIENTO FAVORABLE No. MAAE-ARSFC-2020-0881

Srta. **MOSQUERA SANTOS ESTEFANIA KATHERINE,**

Una vez que la propuesta para Autorización de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica Sin Fines Comerciales para Investigación Científica, ha sido analizada, el Ministerio del Ambiente y Agua en uso de las atribuciones que le confiere el Acuerdo Interministerial SENESCYT-MAE N°001 aprueba el Proyecto **EFFECTO ANTIMICROBIANO DE Piper nubigenum Kunth FRENTE A CEPAS ATCC DE Enterococcus faecalis y Candida albicans PRODUCTORAS DE ENFERMEDADES BUCALES**, al haber cumplido con los parámetros técnicos, administrativos y legales, establecidas en la ley.

Por lo dispuesto, se solicita realizar el pago correspondiente en:

BANECUADOR

RUC MAAE: 1768192860001

CUENTA CTE. No. 3001480604 / SUB-LÍNEA: 190499

TIPOS DE SERVICIOS: Servicios de Áreas Protegidas y Vida Silvestre

En base a lo dispuesto en el Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.

Atentamente,

LOAIZA BOSMEDIANO DAVID ABRAHAN

DIRECCIÓN DE BIODIVERSIDAD

ANEXO 6. Guía de movilización.

MINISTERIO DEL AMBIENTE Y AGUA

AUTORIZACION DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE ESPECIES DE LA DIVE AUTORIZACION DE RECOLECTA



GUÍA N°. 00057
CÓDIGO: MAAE-ARSFC-2020-0881

DATOS DEL SOLICITANTE

N. Identificación: 1719101196
Nombres: MOSQUERA SANTOS ESTEFANIA KATHERINE

DATOS DEL RESPONSABLE DE LAS MUESTRAS O ESPECÍMENES A TRANSPORTAR

Nº de C.I / Pasaporte	Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Transportista
1719101196	MOSQUERA SANTOS ESTEFANIA KATHERINE	Ecuatoriana	Si

ORIGEN

Provincia
ECUADOR

Tipo de Transporte: Terrestre

DESTINO

Provincia	Cantón	Parroquia
CHIMBORAZO	RIOBAMBA	RIOBAMBA

Centro de Tenencia: Herbario Escuela superior Técnica del Chimborazo

FECHA DE MOVILIZACIÓN

Desde: 2021-03-12	Hasta: 2021-03-15
-------------------	-------------------

MATERIAL BIOLÓGICO A MOVILIZAR

Especie	Tipo de Muestra	Número Muestra	Lote Muestra
Plantae-Piperales- Magnoliopsida-Piper-Piper nubigenum	raiz	30	N/A

ANEXO 7. Autorización de recolección de especímenes de especies de la diversidad biológica Nro. 881

MINISTERIO DEL AMBIENTE Y AGUA

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 881

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAAE-ARSFC-2020-0881

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA INICIO	FECHA FIN
2020-12-25	2021-06-25

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

Plantae

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES /TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

Nº de C.I/Pasaporte	Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Nº REGISTRO SENESCYT	EXPERIENCIA	GRUPO BIOLÓGICO
0603893298	GUERRERO VACA DAVID ISRAEL	Ecuatoriana	72417566		Magnoliopsida

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: EFECTO ANTIMICROBIANO DE Piper nubigenum Kunth FRENTE A CEPAS ATCC DE Enterococcus faecalis y Candida albicans PRODUCTORAS DE ENFERMEDADES BUCALES

7.- SE AUTORIZA LA RECOLECCION CON EL PROPOSITO DE:

Dirección: Calle Madrid 1159 y Andalucía Código postal: 170625 / Quito - Ecuador
Teléfono: 593-2 398-7600 - www.ambiente.gob.ec

Lenin



1 / 5

Evaluar el efecto antimicrobiano de la Piper Nubigenum Kunth, frente a cepas ATCC de Enterococcus faecalis y Candida albicans, productoras de enfermedades bucales.
Realizar un análisis fitoquímico de los extractos de la raíz de la Piper Nubigenum Kunth, para conocer los principales metabolitos secundarios posibles en la actividad antimicrobiana.
Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de la raíz de la Piper Nubigenum Kunth, frente a las cepas ATCC de Enterococcus faecalis y Candida albicans, mediante halos de inhibición.
Establecer la significancia estadística de los resultados de inhibición de los extractos de la raíz de la Piper Nubigenum Kunth en la inhibición de cepas ATCC de Enterococcus faecalis y Candida albicans.

8.- ÁREA GEOGRÁFICA QUE CUBRE LA RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES O ESPECÍMENES:

PROVINCIAS	SNAP	BOSQUE PROTECTOR
PASTAZA	NA	NA

9.- INFORMACIÓN DE LAS ESPECIES A RECOLECTAR

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE	TIPO MUESTRA	N° MUESTRA	N° LOTE
Magnoliopsida	Piperales	Piperaceae	Piper	Piper nubigenum	raíz	30	

10.- METODOLOGÍA APLICADA EN CAMPO

FASE DE RECOLECCIÓN:	Se recolectan los ejemplares en bolsas, en donde se guardarán los materiales recolectados hasta su preparación para el secado. Se anotan los datos de la colecta, como la fecha, localidad de muestreo, nombre del colector, altitud, hábitat, condiciones del tiempo en el momento de la colecta. Recordar que las plantas deben ser cogidas con moderación y solamente aquella cantidad que se vaya a herborizar.
FASE DE PRESERVACIÓN:	se conserva las especies recogidas limpias en una bolsa hasta su secado el cual se realizara de forma natural por el método de secado a la sombra siempre aislandola del sol y la humedad.

11. METODOLOGIA APLICADA EN LABORATORIO

MÉTODOS EMPLEADOS EN EL LABORATORIO:	secado, molienda, preparación extractos etéreo, alcohólico y acuosos mediante maceración de la materia vegetal en los diferentes solventes, tamizaje fitoquímico con reactivos, concentración de extractos y dilución de los mismos en diferentes concentraciones, activación y siembra de microorganismo, colocación de discos en blanco de antibiograma, colocación de las diferentes concentraciones de los extractos, incubación por 24 horas, medición de los halos de inhibición proporcionados en cada uno de los microorganismo resultado de la colocación de las concentraciones de los diferentes extractos.
---	--

12.- SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA RECOLECCION.

Grupo Biológico a Recolectar	Descripción	Tipo de Equipamiento
Magnoliopsida	SOBRES DE PAPEL, BOLSAS DE NYLON, AGUA MILLI-Q, ETIQUETAS	Equipo en Campo
Magnoliopsida	RAIZ, TIJERAS DE PAR, MACHTE	Material en Campo
Magnoliopsida	BALANZAS ANALÍTICAS, SORBONA, ESTUFA, MUFLA	Equipo en Laboratorio
Magnoliopsida	CAJAS PETRI, PAPEL TOALLA ESTÉRILES	Material en Laboratorio
Magnoliopsida	PAPEL ALUMINIO, FUNDAS ZIPLOC, TIJERAS, NAVAJA, ETIQUETAS, ROTULADORES, CAJAS DE CARTÓN, LIBRETA DE CAMPO	Material en Campo
Magnoliopsida	CAJAS PETRI, TUBOS DE ENSAYO, MORTERO, PIPETAS, BISTURÍ, ESTILETE, GUANTES, ALCOHOL	Material en Laboratorio
Magnoliopsida	REACTIVOS PARA TAMIZAJE, REVERBERO, TUBOS DE ENSAYO, SOLVENTES PARA PREPARACION DE EXTRACTOS	Material en Laboratorio

13.- COLECCIONES NACIONALES DEPOSITARIAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Magnoliopsida	Herbario Escuela Superior Técnica del Chimborazo
---------------	--

14.- RESULTADOS ESPERADOS

En el presente estudio se espera obtener los metabolitos secundarios de los extractos, etéreo, alcohólico y acuoso de la raíz de la *Piper nubile* Kunth y probar estos extractos en diferentes concentraciones frente a cepas ATCC de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, esperando un resultado significativo en los halos de inhibición que resulten del estudio.

15.- CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO PARA LA TOMA DE DECISIONES A LA ESTRATEGIA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD 2011-2020.

METAS	DESCRIPCIÓN
Meta04.19.01 Para el 2021, el Ecuador implementa a agenda nacional de investigaciones, con el involucramiento de la academia, sector público, privado, pueblos y nacionalidades.	En la presente investigación, se busca ampliar el conocimiento de la medicina ancestral analizando las características de la <i>Piper nubile</i> Kunth y su efecto antimicrobiano frente a cepas ATCC de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i> , productoras de enfermedades bucales

DE ACUERDO A LAS SIGUIENTES ESPECIFICACIONES

1. Solicitud de: **MOSQUERA SANTOS ESTEFANIA KATHERINE**

2. Institución Nacional Científica : **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**
3. Fecha de entrega del informe final o preliminar: **2021/06/10**
4. Valoración técnica del proyecto: **TELLO RAMOS FANNY ELIZABETH**
5. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS.**
6. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS**, sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.
7. Los especímenes o muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN, NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO.**
8. Los resultados que se desprendan de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

OBLIGACIONES DEL/ LOS INVESTIGADOR/ES.

9. Ingresar al sistema electrónico de recolecta de especímenes de especies la diversidad biológica del ministerio del ambiente y agua, el o los informes parciales o finales en formato PDF, en el formato establecido.

Con los siguientes anexos:

- Escaneado de el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las Colecciones Científicas Ecuatorianas como Internacionales depositarias de material biológico.
 - Escaneado de las publicaciones realizadas o elaboradas en base al material biológico recolectado.
 - Escaneado de material fotográfico que considere el investigador pueda ser utilizados para difusión. (se mantendrá los derechos de autor).
10. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos el número de Autorización de Recolección otorgada por el Ministerio del Ambiente y Agua, con el que se recolecto el material biológico.
 11. Depositar los holotipos en una institución científica depositaria de material biológico.
 12. Los holotipos solo podrán salir del país en calidad de préstamo por un periodo no más de un



año.

13. Las muestras biológicas a ser depositadas deberán ingresar a las colecciones respectivas siguiendo los protocolos emitidos por el Curador/a custodio de los especímenes.

14. Las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se responsabiliza a **MOSQUERA SANTOS ESTEFANIA KATHERINE.**

DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
CEVALLOS ROMAN GERARDO RAMIRO
2021-01-22

